

**Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych**

lek. Piotr Januszyk

**Profil ekspresji genów i kodowanych przez nie białek związanych ze zjawiskiem utraty
adekwatnej odpowiedzi na leczenie w raku endometrium**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauk medycznych

Promotor

dr hab. n. med. Dariusz Boroń

Promotor pomocniczy

dr n. med. i n. o zdr. Benjamin Oskar Grabarek

Rzeszów 2021

lek. Piotr Januszyk

Katedra Biochemii

Wydział Nauk Medycznych im. Prof. Zbigniewa Religi w Zabrze

Wyższa Szkoła Techniczna w Katowicach

e-mail: piotr.januszyk@icloud.com

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW.....	5
WYKAZ PUBLIKACJI, NA PODSTAWIE KTÓREJ OPARTA JEST ROZPRAWA DOKTORSKA.....	6
WYKAZ TABEL	7
1. Wstęp.....	8
1.1. Rak błony trzonu macicy.....	8
1.2. Salinomycyna.....	9
1.3. Zjawisko utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe	9
1.4. Kaspazy	11
1.5. Regulatorowa rola mikro RNA.....	12
1.6. Charakterystyka semaforyny 3B w kontekście procesu nowotworzenia..	12
2. Założenia i cel pracy	14
3. Materiał i metody.....	16
3.1. Hodowla komórkowa raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na salinomycynę	16
3.2. Ekstrakcja całkowitego RNA wraz z oceną jakościową i ilościową ekstraktów	16
3.3. Wyznaczenie mikromacierzowego profilu ekspresji mRNA i miRNA w komórkach raka endometrium traktowanych salinomycyną.....	17
3.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją.....	17
3.5. Test immunoenzymatyczny ELISA	19
3.6. Aktywność kaspazy-3, -8 i -9.....	19
3.7. Materiał kliniczny – próbki endometrium zmienione nowotworowo i prawidłowe	19
3.7.1. Grupa badana	19
3.7.2. Grupa kontrolna	20
3.8. Badanie immunohistochemiczne.....	21
3.9. Analiza statystyczna.....	23
4. Wyniki.....	24
4.1. Analiza profilu ekspresji ocenianych mRNA w hodowli komórkowej raka endometrium linii Ishikawa eksponowanych na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	24
4.1.1. Aktywność transkrypcyjna genów związana ze zjawiskiem lekooporności w komórkach raka endometrium pod wpływem salinomycyny w porównaniu do komórek nietraktowanych lekiem	24

4.1.2.	Aktywność transkrypcyjna genów szlaku kaspaz w komórkach raka endometrium pod wpływem salinomycyny w porównaniu do komórek nietraktowanych lekiem	25
4.1.3.	Zmiany profilu ekspresji wybranych genów pro- i antyapoptotycznych w hodowli komórek raka endometrium eksponowanej na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	25
4.2.	Mikromacierzowy profil miRNA różnicujących hodowlę raka endometrium linii Ishikawa eksponowaną na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	26
4.2.1.	Profil ekspresji miRNA potencjalnie regulujących ekspresję wybranych mRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności w komórkach raka endometrium eksponowanych na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej	26
4.2.2.	Profil ekspresji miRNA potencjalnie regulujących ekspresję <i>CASP3</i> , <i>CASP8</i> , <i>CASP9</i> w komórkach raka endometrium eksponowanych na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	26
4.3.	Ocena aktywności kaspazy-3, -8 i -9 w komórkach raka endometrium traktowanych salinomycyną w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	27
4.4.	Profil stężeń białek TUFT1, MTMR11, SLC30A5 w hodowli raka endometrium eksponowanej na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczony metodą ELISA	27
4.5.	Zmiany profilu ekspresji SEMA3B w próbkach raka endometrium i kontrolnych.....	28
5.	Dyskusja.....	29
6.	Wnioski	37
7.	Piśmiennictwo.....	38
8.	Streszczenie.....	47
9.	Abstract.....	50
10.	Oświadczenia współautorów publikacji na podstawie której oparta jest rozprawa doktorska.....	53
11.	Załączniki	56

WYKAZ SKRÓTÓW

ABC - kompleks awidyna-biotynyłowana peroksydaza

ACTB – beta aktyna

AraC – cytarabina

BSA – surowicza albumina wołowa (ang. Bovine Serum Albumin)

DAB - 3,3-diaminobenzzydina

DISC - kompleks indukujący śmierć (ang. Death-Inducing Signaling Complex)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EMT – przejście nabłonkowo-mezenchymalne

FBS – bydlęca surowica płodowa (ang. Fetal bovine serum)

IL-8 – interleukina 8

Me - mediana

MEM – ang. Minimum Essential Medium

NAFLD – niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. nonalcoholic fatty liver disease)

NEAA – ang. Non-Essential Amino Acid

NFkB – jądrowy czynnik kB

NRP1 – receptor neuropilinowy 1

NRP2 – receptor neuropilinowy 2

PBS – roztwór soli fizjologicznej (ang. Phosphate-buffered saline)

Q1 – kwartył dolny

Q3 – kwartył górny

RTqPCR – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją (ang. Quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction)

SEMA - semaforyna

siRNA – mały interferujący RNA (ang. small interfering RNA)

TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. tumor necrosis factor alfa)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. Vascular Endothelial Growth Factor)

**WYKAZ PUBLIKACJI, NA PODSTAWIE KTÓREJ OPARTA JEST
ROZPRAWA DOKTORSKA**

1. **Januszyk P**, Januszyk K, Wierzbik-Strońska M, Boroń D, Grabarek B. Analysis of the Differences in the Expression of mRNAs and miRNAs Associated with Drug Resistance in Endometrial Cancer Cells Treated with Salinomycin. *Curr Pharm Biotech* 2020; 21: 1-8.
2. Januszyk K, **Januszyk P**, Grabarek BO, Boroń D, Oplawski M. The Influence of Salinomycin on the Expression Profile of mRNAs Encoding Selected Caspases and MiRNAs Regulating their Expression in Endometrial Cancer Cell Line. *Curr Pharm Biotech* 2019; 21: 1-11.
3. Dziobek K, Oplawski M, Grabarek B, Zmarzły N, **Januszyk P**, Adwent I, Dąbrus D, Leśniak E, Kiełbasiński R, Kieszkowski P, Boroń D. Expression of Semaphorin 3B (SEMA3B) in Various Grades of Endometrial Cancer. *Med Sci Monit.* 2019; 25: 4569-4574.

WYKAZ TABEL

Tabela I Sekwencja nukleotydowa starterów wykorzystanych w reakcji RTqPCR..... 18

1. Wstęp

1.1. Rak błony trzonu macicy

Rak błony trzonu macicy stanowi określany także jako rak endometrium jest najczęściej występującym nowotworem ginekologicznym u kobiet w wieku okołomenopauzalnym i postmenopauzalnym [1, 2, 3].

Czynnikami, które w istotny sposób zwiększają ryzyko wystąpienia raka endometrium

są nadwaga, otyłość, cukrzyca, insulinooporność, nadciśnienie tętnicze, wiek okoł- i postmenopauzalny oraz długotrwała ekspozycja na estrogeny, która nie została zbilansowana działaniem progesteronu [4, 5]. Sytuacja taka występuje, gdy sekrecja estrogenów i progesteronu przez jajniki ulega znacznemu obniżeniu a wzrasta produkcja androstendionu, który w adipocytach tkanki tłuszczowej zostaje przekształcony do estronu. Długotrwała stymulacja błony śluzowej macicy przez estron, którego wpływ nie jest równoważony progesteronem wiąże się z nadmierną i niepoddającą się kontroli komórek nabłonka błony śluzowej macicy. Skutkuje to długotrwałą stymulacją błony śluzowej macicy przez estron, którego wpływ nie jest równoważony progesteronem, co sprzyja nadmiernej i niekontrolowanej proliferacji komórek nabłonka [6, 7].

Charakterystycznym objawem raka endometrium jest wystąpienie nieprawidłowych krwawień z dróg rodnych. Do mniej charakterystycznych objawów towarzyszących procesowi nowotworowemu w obrębie endometrium zalicza się utratę masy ciała, bóle w podbrzuszu, anemię, jak także objawy związane z przerzutowaniem do sąsiednich tkanek i narządów [8].

Różnicowanie raka trzonu macicy może być związane ze zdolnością lub jej brakiem ekspresji receptorów estrogenowych przez komórki masy guza. Rak endometrium estrogenozależny (typ I, 80% wszystkich przypadków) występuje przede wszystkim u otyłych kobiet z nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą. Z kolei rak endometrium nieestrogenozależny jest charakterystyczny dla kobiet w wieku postmenopauzalnym [9, 10].

Natomiast, jeśli za kryterium podziału przyjmie się stopień patomorfologicznego zróżnicowania komórek raka endometrium można wyróżnić następujące przypadki raka trzonu macicy: G1 - wysokozróżnicowany (<5% raka litego); G2 - średniozróżnicowany (6-50% raka litego) oraz G3 - niskozróżnicowany (>50% raka litego) [11].

W terapii raka błony śluzowej macicy stosuje się leczenie operacyjne, którego zakres uzależniony jest od stopnia zaawansowania klinicznego raka endometrium oraz leczenie uzupełniające w postaci radioterapii, radiochemioterapii oraz chemioterapii [12, 13].

W badaniach *in vitro* wykorzystuje się następujące linie komórkowe raka endometrium: linię Ishikawa (odpowiada stopniowi G1 i typowi I raka endometrium), linie EC-1-A, HEC-1-B (odpowiadają stopniowi G2 i typowi II raka endometrium) oraz linię KLE (odpowiada stopniowi G3 i typowi II raka endometrium) [14].

1.2. Salinomycyna

Salinomycyna zaliczana jest do grupy antybiotyków jonoforowych. Została wyizolowana

w 1974 roku ze szczepu bakteryjnego *Streptomyces albus* przez Miya-zakiego i wsp. [15].

Sugeruje się, że mechanizm działania salinomycyny związany jest z indukcją nieprawidłowej równowagi jonowej pomiędzy jonami sodu i potasu w błonach komórkowych, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek. Doniesienia naukowe wskazują, że salinomycyna charakteryzuje się około 100-krotnie większą cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych, szczególnie tych, które nabrały cech macierzystości [16, 17].

Zaobserwowano, że w przypadku przewlekłej białaczki limfocytarnej indukcja apoptozy przez salinomycynę zachodziła z udziałem szlaku sygnalizacyjnego Wnt/ β -katenina, pełniącego ważną rolę w procesach samoodnawiania się komórek [16, 17].

Pierwsze doniesienia o skuteczności salinomycyny w nowotworach cechujących się wysokim ryzykiem wystąpienia lekooporności na leczenie zostały opisane przez Naujokat i wsp. W pracy tej opisano przypadek 82-letniej pacjentki z rozsianym rakiem sromu, którą leczono salinomycyną uzyskując zadawalającą odpowiedź kliniczną [18].

Brakuje natomiast doniesień wpływu salinomycyny w kontekście raka endometrium.

1.3. Zjawisko utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe

Zjawisko lekooporności początkowo zostało zaobserwowane w stosunku do utraty wrażliwości przez komórki bakteryjne na antybiotyki [19]. W miarę lepszego rozumienia etiopatogenezy wielu chorób o podłożu zapalnym pojęcie lekooporności zostało

rozszerzone również na inne niż antybiotyki grupy leków, a tym samym chorób nie tylko o podłożu bakteryjnym. Sytuacja utraty adekwatnej odpowiedzi na stosowane leczenie obserwowana jest w onkologii [20, 21].

Sugeruje się, że opisywane zjawisko związane jest, m.in. z wystąpieniem nowych mutacji DNA, zmianami metabolicznymi w komórkach nowotworowych, inaktywacją leku, hamowaniem apoptozy komórek nowotworowych, przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT), heterogenicznością komórek tworzących masę guza, wpływem czynników epigenetycznych, jak również dowolną kombinacją wymienionych czynników [22, 23].

Z tego względu wskazuje się, że terapia skojarzona, z wykorzystaniem równocześnie więcej niż jednego leku może stanowić lepszą opcję strategii terapeutycznej w porównaniu do monoterapii. Takie postępowanie opiera się na zjawisku synergistycznego działania leków, których efekt terapeutyczny jest większy niż gdyby każdy z leków był stosowany oddzielnie [24].

Jednym z mechanizmów związanych z opornością na leczenie jest zmniejszona aktywacja leku. Taką sytuację odnotowano, m.in. w terapii ostrej białaczki szpikowej, w leczeniu której stosuje się cytarabinę (AraC), będącą przedstawicielem leków nukleozydowych, aktywowanych poprzez szereg reakcji fosforylacji. Zaburzenie tej kaskady skutkuje brakiem możliwości przekształcenia AraC do aktywnego metabolitu – trifosforanu AraC [25].

Innym z potencjalnych mechanizmów indukujących lekooporność jest zmiana poziomu ekspresji cytokin, czynników wzrostu, receptorów związanych ze szlakiem sygnalizacyjnym wobec którego jest ukierunkowane [26].

Stosunkowo nowym obszarem badań nad lekoopornością na chemioterapeutyki jest udział

w tym procesie EMT, podczas którego odnotowuje się zmiany ekspresji receptorów adhezji komórkowej – integryn i kadheryn oraz metaloproteinaz [27, 28]. Należy także pamiętać o roli mechanizmów epigenetycznych zaangażowanych w utratę adekwatnej odpowiedzi na leczenie [29].

Zjawisko lekooporności zostało zaobserwowane również w nowotworach ginekologicznych, w tym w raku endometrium, podkreślając wieloczynnikowy charakter obserwowanych zmian [30, 31]. Lepsze poznanie i zrozumienie molekularnych mechanizmów, które podlegają modyfikacji podczas leczenia onkologicznego oraz tych które mają związek z wystąpieniem lekooporności skłania nie tylko do poszukiwania

nowych systemów markerowych detekcji tego procesu, ale również włączenia do leczenia nowych leków [18, 22, 23].

1.4. Kaspazy

Kaspazy są proteazami cysteinowymi, syntetyzowanymi w formie nieaktywnego biologicznie zymogenu. Wyróżnia się 14 przedstawicieli kaspaz, które na podstawie analizy sekwencji, specyficzności substratowej zostały podzielone na trzy główne grupy.

Do pierwszej z nich zaliczamy kaspazy-1, -4, -5, -11, -12, -13 i -14, które odgrywają główną rolę aktywatorów cytokin uczestniczących w procesie zapalnym. Druga grupa kaspaz, to tzw. kaspazy efektorowe. Przedstawicielami tego rodzaju białek jest kaspaza-3, 6 i 7. Enzymy tej grupy ulegają aktywacji przez inne proteazy, np. kaspazy inicjujące lub inne kaspazy wykonawcze. Trzecią grupę stanowią kaspazy inicjatorowe, czyli kaspaza2, -8, -9, -10 i -12, rozpoznające w substratach sekwencję tetrapeptydu [32, 33]. Rola kaspaz opisywana jest przede wszystkim w kontekście apoptozy komórki [34, 35], procesu który ulega zaburzeniu w chorobach nowotworowych [36, 37].

Wskazuje się także na udział cząsteczek micro RNA (miRNA), czyli sekwencji 17-25 nukleotydowych, które wpływają na aktywność transkrypcyjną genów w kontekście kancerogenezy [38, 39].

Proces apoptozy zależny od kaspaz może przebiegać szlakiem zewnętrznym indukowanym poprzez interakcję ligandu, np. czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α) z receptorem śmierci, który w następnym etapie ulega trimeryzacji, co umożliwia uruchomienie szlaku śmierci. Aktywacja kaspazy8/10 rozpoczyna proteolizę enzymów i białek struktur komórkowych, która przebiega kaskadowo.

Natomiast w szlaku wewnętrznym (mitochondrialnym) kluczową rolę pełnią kaspazy oraz kaspazy wykonawcze -3, 6, 7. Aktywacja prokaspazy 9 w wyniku proteolizy prowadzi do aktywacji prokaspazy 3 lub 7 które z kolei aktywują kaskady kaspaz i proteolizę białek komórkowych [40,41].

Dotychczas nie poznano dokładnego mechanizmu poprzez który salinomycina przyczynia się do apoptozy komórek nowotworowo zmienionych. Niemniej jednak opisano nadekspresję kaspazy 3, 8 ,9 proapoptotycznego białka Bax, obniżenie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl2, jądrowego czynnika kappa B (NFkB) pod wpływem salinomycyny [42].

1.5. Regulatorowa rola mikro RNA

MikroRNA (miRNA) są to jednoniciowe, niekodujące cząsteczki RNA pochodzenia endogennego uczestniczące w negatywnej potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Geny kodujące miRNA zlokalizowane są w eksonach i intronach transkryptów oraz w obszarach między genowych. Mogą występować samodzielnie lub jako policistronowe jednostki transkrypcyjne, które posiadają wspólne sekwencje regulatorowe.

Wpływają na ponad 30% wszystkich procesów biologicznych, m.in. apoptozę, angiogenezę, proliferację, przerzutowanie komórek nowotworowych. Nieprawidłowa ekspresja tych cząsteczek może być przyczyną zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu. Cząsteczki miRNA coraz częściej wykorzystywane są w diagnostyce chorób oraz jako nowe strategie terapeutyczne.

Dane literaturowe podają, że stanowią one ok. 5% całego genomu człowieka. Obniżenie ekspresji mRNA ma miejsce w wyniku przyłączenia się miRNA do końca 3' regionu UTR docelowego transkryptu. Czynnikiem determinującym ten proces jest komplementarność sekwencji obu cząsteczek. W zależności od jej stopnia obserwuje się degradację transkryptu (pełna komplementarność między mRNA:miRNA) lub inhibicję procesu translacji (częściowa komplementarność między mRNA:miRNA) [43].

1.6. Charakterystyka semaforyny 3B w kontekście procesu nowotworzenia

Semaforyny (SEMA) należą do grupy błonowych białek uczestniczących w regulacji takich procesów komórkowych jak: proliferacja, migracja komórek nowotworowych, angiogeneza. Uczestniczą także w procesie powstawania zjawiska lekooporności [44]. Charakteryzują się budową domenową, przy czym najistotniejsza w procesie transdukcji sygnału wzdłuż szlaków sygnalizacyjnych zależnych od SEMA3B jest domena SEMA, wspólna dla wszystkich białek tej grupy [45,46].

Przykładem istotnej semaforyny w kontekście nowotworzenia jest SEMA3B, określana jako supresor wzrostu guza, która wykazuje powinowactwo względem receptorów neuropilinowych (NRP1 i NRP2). Efektem oddziaływania SEMA3B ze swoistymi receptorami jest wyciszenie ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF, ang. Vascular Endothelial Growth Factor), zahamowanie procesu tworzenia sieci nowych naczyń krwionośnych, za pośrednictwem których do masy guza

dostarczane są składniki odżywcze i tlen, niezbędne do utrzymania wysokiego potencjału proliferacyjnego komórek i promowania powstawania przerzutów nowotworowych [47,48].

Nieprawidłowy wzorzec ekspresji SEMA3B odnotowano w raku piersi [47], raku jajnika [49], raku wątrobowokomórkowym [50], raku płuc [51] i raku endometrium [52]. Ostatnie badania wskazują, że SEMA3B jest obiecującym nowym celem terapeutycznym w osteoporozie, spowodowanej niedoborem estrogenem [53].

Pomimo badań nad rolą SEMA3B w nowotworzeniu, na podstawie dostępnej literatury, związek między ekspresją SEMA3B a wskaźnikiem przeżycia całkowitego u pacjentów z rakiem endometrium nie został jeszcze ustalony. Obserwacje Huanga i wsp. [54] wskazują na występowanie związku pomiędzy ekspresją SEMA3B a wskaźnikiem przeżycia u pacjentów z rakiem trzustki, przy czym w grupie pacjentów z niskim stężeniem SEMA3B czas przeżycia wyniósł ok. 19 miesięcy, a u tych z wyższym stężeniem ok. 41 miesięcy [54]. Z kolei, Tang i wsp. [55] wykazali, średni czas przeżycia pacjentów z rakiem przetyku z niskim stężeniem SEMA3B wynosi ok. 41 miesięcy, a u pacjentów z wyższym stężeniem SEMA3B ok. 19 miesięcy [55].

2. Założenia i cel pracy

Wystąpienie zjawiska utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe (lekooporność) związane jest, m.in. z wystąpieniem nowych mutacji DNA, zmianami metabolicznymi w komórkach nowotworowych, inaktywacją leku, hamowaniem apoptozy komórek nowotworowych, przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT), heterogenicznością komórek tworzących masę guza, wpływem czynników epigenetycznych, jak również dowolną kombinacją wymienionych czynników [22, 23]. Należy także pamiętać o roli mechanizmów epigenetycznych zaangażowanych w utratę adekwatnej odpowiedzi na leczenie, w tym regulacji ekspresji genów przez cząsteczki miRNA [29].

Utratę odpowiedzi na leczenie odnotowano m.in. w nowotworach ginekologicznych, w tym w raku endometrium, podkreślając wieloczynnikowy charakter obserwowanych zmian [30, 31].

Obiecującym lekiem w terapii przeciwnowotworowej wydaje się salinomycyna, której jeden z mechanizmów działania jest związany z indukcją nieprawidłowej równowagi jonowej pomiędzy jonami sodu i potasu w błonach komórkowych, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych [16].

Dane dotyczące wpływu salinomycyny na molekularne mechanizmy związane ze zjawiskiem lekooporności i udziałem szlaku kaspaz w raku endometrium są słabo poznane.

Głównym celem pracy było wyznaczenie profilu ekspresji mRNA i miRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności i szlaków sygnałowych zależnych od kaspaz w komórkach raka endometrium linii Ishikawa traktowanych salinomycyną w porównaniu do hodowli kontrolnej oraz określenie znaczenia SEMA3B w angiogenezie w kontekście raka endometrium.

Ponadto dla realizacji celu nadrzędnego przyjęto następujące zadania badawcze:

- Ocena wpływu salinomycyny na zmiany stężenia wybranych białek związanych ze zjawiskiem lekooporności w komórkach raka endometrium linii Ishikawa.
- Ocena wpływu salinomycyny na zmiany aktywności kaspazy- 3, -8 i -9 w komórkach raka endometrium linii Ishikawa.

- Ocena zmian ekspresji SEMA3B w materiale klinicznym – próbkach raka endometrium w stopniach histopatologicznego zróżnicowania G1-G3 i preparatach uzyskanych od grupy kontrolnej.

3. Materiał i metody

3.1. Hodowla komórkowa raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na salinomycynę

Komórki raka endometrium linii Ishikawa (European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC 99040201) traktowano salinomycyną w stężeniu 1 μM przez 12, 24 i 48 godzin. Kontrolę stanowiły komórki raka endometrium nie eksponowane na działanie salinomycyny. Hodowlę prowadzono w warunkach 37°C w atmosferze 5% CO₂ z wykorzystaniem dedykowanego dla niniejszej linii komórkowej medium hodowlanego Minimum Essential Medium (MEM), które zostało wzbogacone o 2 mM glutaminy, 1% roztwór niezbędnych aminokwasów (NEAA, ang. non-essential amino acid) oraz 5% roztwór płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. fetal bovine serum). Eksperyment został wykonany w trzech powtórzeniach technicznych w 6-dołkowych szalkach.

3.2. Ekstrakcja całkowitego RNA wraz z oceną jakościową i ilościową ekstraktów

Do ekstrakcji całkowitego RNA z komórek raka endometrium traktowanych salinomycyną wykorzystano zmodyfikowaną metodę Chomczyńskiego-Sacchi i odczynnik TRIzol (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Procedurę izolacji kwasu nukleinowego przeprowadzono zgodnie z rekomendacjami producenta. W pierwszym dniu ekstrakcji RNA do osadów komórkowych dodano 1 ml odczynnika TRIzol, 200 μl chloroformu, 500 μl alkoholu izopropylowego. Następnego dnia po 12 godzinnej inkubacji supernatantu z izopropanolem w temperaturze +4°C, supernatant został zdekantowany, a osad dwukrotnie przemyty 1 ml 70% alkoholu etylowego. W kolejnym etapie którego 1 ml został dodany osadu komórkowego. W dalszej kolejności osady komórkowe pozostawiono do całkowitego wysuszenia w celu całkowitego odparowania alkoholu etylowego. Ostatni etap polegał na oczyszczeniu otrzymanych ekstraktów RNA przy użyciu zestawu firmy Qiagen: RNeasy Mini Kit. Suche ekstrakty RNA były przechowywane w temperaturze -70°C do czasu dalszych analiz.

W celu przeprowadzenia kwalifikacji ekstraktów RNA do dalszych etapów analizy molekularnej suche ekstrakty RNA zostały rozpuszczone w 50 μl sterylnej, dejonizowanej wody (ddH₂O). Ocena jakościowa ekstraktów związana była z przeprowadzeniem rozdziału elektroforetycznego ekstraktów w 1 % żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydydny w celu uwidocznienia w świetle UV-VIS frakcji 18S rRNA i 28S rRNA. Z kolei ocena ilościowa ekstraktów RNA polegała na analizie

spektrofotometrycznej przy długości fali 260nm (A260) oraz określeniu zanieczyszczenia ekstraktów białkiem poprzez określenie stosunku A260/A280.

3.3. Wyznaczenie mikromacierzowego profilu ekspresji mRNA i miRNA w komórkach raka endometrium traktowanych salinomycyną

Wyznaczenie mikromacierzowego profilu wzorca ekspresji transkryptomu mRNA w hodowli raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej przeprowadzono przy użyciu mikromacierzy HG-U 133_A2 (Affymetrix, Santa Clara, CA) i zestawu odczynników GeneChip™ HT 3 'IVT PLUS (Thermo Fisher, numer katalogowy 902416).

Analiza obejmowała użycie 8 µg całkowitego RNA, będącego matrycą do syntezy dwuniciowego cDNA. W drugim etapie przystąpiono do syntezy biotynylowanego cRNA oraz jego pofragmentowania. Kolejny etap był związany z 16-godzinną hybrydyzacją z sondami, umieszczonymi na płycie mikromacierzowej HG-133A_2.0. W dalszych etapach przeprowadzono: płukanie i barwienie kompleksem streptawidyna–fikoerytryna, zgodnie z zaleceniami producenta.

Analiza porównawcza transkryptomu została przeprowadzona dla mRNA reprezentujących geny kodujące białka związane ze zjawiskiem lekooporności (**praca 1**) oraz kaspazami (**praca 2**), które zostały wybrany na podstawie bazy danych Affymetrix NetAffx™ Analysis Center database (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>).

Analizę profilu ekspresji miRNA odpowiedzialnych za regulację wytypowanych genów przeprowadzono z wykorzystaniem mikromacierzy GeneChip miRNA 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA). Pierwszy krok obejmował znakowanie miRNA biotyną poprzez poliadenylację i ligację. Ocenę skuteczności znakowania zweryfikowano przy użyciu testu ELOS QC (FlashTagBiotin HSR RNA Labeling Kit, Affymetrix). Następnie przeprowadzono hybrydyzację wyznakowanych cząsteczek miRNA i sond znajdujących się na płycie. W ostatnim etapie mikromacierze miRNA zostały zeskanowane z wykorzystaniem skanera GeneArray Scanner 3000 7G (Agilent Technologies, CA).

3.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją

W oparciu o łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzonej odwrotną transkrypcją (RTqPCR) określono zmiany profilu ekspresji mRNA *TUFT1*,

MTMR11, *SLC30A5* (praca 1) oraz *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *Bcl-2l*, *Bcl-w*, *Bax* i *Bak* (praca 2).

W obu pracach, beta-aktyna (*ACTB*) została wykorzystana jako kontrola endogenna, a zmiany aktywności transkrypcyjnej wytypowanych genów w hodowli komórek raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na salinomycynę w porównaniu do kontroli przedstawiono jako wielokrotność zmiany ekspresji genu (FC, ang. Fold Change; $2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Profil termiczny reakcji był następujący: odwrotna transkrypcja (45°C przez 10 min), aktywacja polimerazy DNA (95°C przez 2 min), 40 trzyetapowych cykli: denaturacja (95°C przez 5 s), przyłączenie starterów (60°C przez 10 s), elongacja (72°C przez 5 s).

W reakcji RTqPCR wykorzystano zestaw odczynników SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Kit (Bioline, London, UK). W tabeli I przedstawiono sekwencje nukleotydowe starterów wykorzystanych w reakcji RTqPCR.

Tabela I Sekwencja nukleotydowa starterów wykorzystanych w reakcji RTqPCR

mRNA	Sekwencja nukleotydowa starterów
<i>TUFT1</i>	Forward 5' - ATTTTGGTTTTGAATGATTTGTAG- 3' Reverse 5' - AACACACCTATAATCCCAACTACTC- 3'
<i>MTMR11</i>	Forward 5' - TGGATGGTAGTGGAATTAGGATATT - 3' Reverse 5' - AACCTCAAAACCAACTCTAAACAAC - 3'
<i>SLC30A5</i>	Forward 5' - GTTTTTGTATGGGGGAGTGA - 3' Reverse 5' - CAACTTTTAAAAAATCATATAATTC - 3'
<i>CASP3</i>	Forward 5' - AGGATGGTTTTTGGTTTATTTAGT- 3' Reverse 5' - AAACCTCAAATTCTATTACCACCTTTC- 3'
<i>CASP8</i>	Forward 5' - TTTTTTTGATTGATGGTGTATTTT- 3' Reverse 5' - AACCCCTATAATCCCAACTACTC- 3'
<i>CASP9</i>	Forward 5' - TGAGTATGGAGTTTTGTGGTTATTG- 3' Reverse 5' - AACCAACACCATTTTCTTAACAATC- 3'
<i>Bcl-2l</i>	Forward 5' - ATTTAGAGTTTTGGATTTAGGAGAA- 3' Reverse 5' - ACTAAAAAATAAACCCAACAAAACC- 3'
<i>Bcl-w</i>	Forward 5' - AGATGGAATTATTGGTGGGATAAG- 3' Reverse 5' - AAAAAACCCCTACAATTACCAAAAC- 3'
<i>Bax</i>	Forward 5' - TTGTTTTAGGGTTTTATTTAGGATC- 3' Reverse 5' - ACTCCATATTACTATCCAATTCGTC- 3'
<i>Bak</i>	Forward 5' - ATTTAGATGTCGGGAATGTATTGAC- 3' Reverse 5' - ATAAAAACGAAATCAACCTACCG- 3'
<i>ACTB</i>	Forward: 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' Reverse: 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'.

Forward – starter sensowny, Reverse – starter antysensowny

3.5. Test immunoenzymatyczny ELISA

Test immunoenzymatyczny ELISA został przeprowadzony w celu oceny zmiany profilu stężeń TUFT1 (TUFT ELISA kit Human Tuftelin (TUFT) ELISA Kit; # MBS2104898), MTMR11 (MTMR11, Polyclonal Antibody; #MBS7000832) and SLC30A5 (SLC30A5, Monoclonal Antibody; MBS6001665) zgodnie z protokołem producenta (MyBioSource, Inc. ,San Diego, CA, USA). Oznaczenia zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej, a stężenie wymienionych białek zostało oznaczone z wykorzystaniem krzywej wzorcowej przy długości fali 450 nm.

3.6. Aktywność kaspazy-3, -8 i -9

Aktywność kaspazy-3, -8 i -9 została oznaczona kolorymetrycznie w lizacie komórkowym z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu odczynników. Do oceny aktywności kaspazy 8 i 9 wykorzystano zestaw Caspase-8/Caspase-9 Colorimetric Assay Kit (RD Systems, Minneapolis, USA), podczas gdy dla kaspazy 9 został użyty zestaw EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1 (Molecular Probes. Minneapolis. Willow Creek Rd. USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Aktywność kaspazy 8 i 9 oznaczono przy długości fali $\lambda = 405$ nm, a kaspazy 9 przy długości fali $\lambda = 520$ nm.

3.7. Materiał kliniczny – próbki endometrium zmienione nowotworowo i prawidłowe

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach nr: KNW/0022/KB/237/16.

3.7.1. Grupa badana

Do grupy badanej włączonych zostało 45 pacjentek z rozpoznaniem rakiem endometroidalnym endometrium, w wieku powyżej 45 lat, w tym 17 pacjentek z rakiem w stopniu histopatologicznego zróżnicowania G1, 15 pacjentek z rakiem w stopniu G2 i 13 pacjentek z rakiem w stopniu G3. Próbki zostały uzyskane w trakcie zabiegu histerektomii i następnie ocenione pod względem histopatologicznym, co pozwoliło na podział preparatów względem stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium.

Kryteria włączania z grupy badanej były następujące:

- Wiek powyżej 45 lat;
- Rozpoznanie raka endometroidalnego endometrium, potwierdzone w badaniu histopatologicznym;
- BMI<40;
- Potwierdzenie braku rozsiewu nowotworowego w przedoperacyjnych badaniach obrazowych;
- Niestosowanie hormonalnej terapii zastępczej w okresie ostatnich 5 lat;
- Wyrażenie świadomej, dobrowolnej zgody na udział w badaniu.

Kryteria wyłączenia z grupy badanej były następujące:

- Wiek poniżej 45 lat;
- Przerost endometrium z antypią lub bez niej;
- Rozpoznanie raka innego niż gruczolakorak endometrium;
- Skrajna otyłość (BMI>40);
- Stosowanie hormonalnej terapii zastępczej w okresie ostatnich 5 lat;
- Stwierdzenie nieoperacyjności nowotworu;
- Potwierdzenie rozsiewu nowotworowego w przedoperacyjnych badaniach obrazowych;
- Brak wyrażenia świadomej, dobrowolnej zgody na udział w badaniu.

3.7.2. Grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej włączono 15 pacjentek, u których preparaty endometrium zostały pobrane w trakcie histerektomii wykonanej z powodów nieonkologicznych.

Kryteria włączania z grupy kontrolnej były następujące:

- Wiek powyżej 45 lat;
- Wykluczenie chorób nowotworowych;
- BMI<40;
- Niestosowanie hormonalnej terapii zastępczej w okresie ostatnich 5 lat;
- Wyrażenie świadomej, dobrowolnej zgody na udział w badaniu.

Kryteria wyłączenia z grupy badanej były następujące:

- Wiek poniżej 45 lat;
- Rozpoznanie choroby nowotworowej;
- Skrajna otyłość (BMI>40);
- Stosowanie hormonalnej terapii zastępczej w okresie ostatnich 5 lat;
- Brak wyrażenia świadomej, dobrowolnej zgody na udział w badaniu.

3.8. Badanie immunohistochemiczne

W niniejszej pracy wykorzystałem gotowe bloczki parafinowe, zdeponowane w archiwum Pracowni Patomorfologii Beskidzkiego Centrum Onkologii w Bielsku-Białej, na co uzyskałem stosowne zgody. Z tych bloczków parafinowych wykonano preparaty do barwienia immunohistochemicznego z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych dla SEMA3B. Z uwagi na retrospektywny charakter badania, uzyskanie dodatkowej zgody Komisji Bioetycznej nie było konieczne.

Z każdego bloczka parafinowego zostały wykonane trzy preparaty mikroskopowe. W pierwszym etapie preparaty inkubowano w łaźni wodnej w buforze cytrynianowym o pH 6 w temperaturze 95⁰C, a następnie preparaty schłodzono. Następnie preparaty przemywano roztworem soli fizjologicznej (PBS, ang. Phosphate-buffered saline), a miejsca niespecyficznego związania przeciwciała blokowano wykorzystując 1% roztwór surowiczej albuminy wołowej (ang. BSA, ang. Bovine Serum Albumin) w PBS przez 30 minut w temperaturze pokojowej. W dalszej kolejności, na skrawki naniesiono poliklonalne pierwszorzędne królicze przeciwciało anty-SEMA3B (Novus Biological, Warszawa, Polska) i inkubowano przez 20 godziny w temperaturze 40⁰C. Po tym czasie, aktywność endogennej persoksydazy została zablokowana poprzez inkubację w 0,3% (v/v) roztworze nadtlenu wodoru w 0,1% roztworze NaN₃ w PBS przez 10 minut. W celu uwidocznienia związanych przeciwciał SEMA3B wykorzystano kompleks awidyna-biotynyłowana peroksydaza (ABC; Vectastatin, Elite ABC Kit, Vector Laboratories). W celu wizualizacji kompleksu ABC wykorzystano substrat peroksydazy zawierający 3,3-diaminobenzodynę (DAB) i nadtlenek wodoru zgodnie z rekomendacją producenta. W ostatnim etapie preparaty podbarwiono hematoksyliną Gilla, odwodniono i zamykano.

Równolegle wykonano kontrolę negatywną na każdym szkiełku, co pozwoliło uwidocznić niespecyficzne wiązanie przeciwciała pierwszorzędowego.

Mikroskop Nikon Eclipse E200 z kamerą cyfrową DS.-Fil (Nikon) został wykorzystany do wykonania dokumentacji fotograficznej. Z każdego odczytu wykonano 15 zdjęć (powiększenie 200x; obiektyw 20x; okular 10x).

Natomiast, w oparciu o program komputerowy NIS-AIR (Nikon) wyznaczono gęstość optyczną produktu reakcji immunoenzymatycznej.

3.9. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona z wykorzystaniem Transcriptome Analysis Console (Thermo Fisher, USA) oraz programu STATISTICA 13 (StatSoft, Kraków, Polska). Wszystkie analizy statystyczne przyjęto przy założeniu progu istotności statystycznej na poziomie $p < 0,05$.

W pierwszej kolejności oceniono spełnienie założeń normalności rozkładu uzyskanych danych testem Shapiro-Wilka. W związku z tym, że dla danych mikromacierzowych, uzyskanych z testu RTqPCR i ELISA założenia testu zostały spełnione, dalsze etapy analizy statystycznej przeprowadzono z wykorzystaniem metod parametrycznych – jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu post-hoc Tukey'a. Homogenność wariancji zweryfikowano testem Levene'a.

Analizę predykcyjną oddziaływania pomiędzy mRNA i miRNA przeprowadzono w oparciu o algorytm miRanda-mirSVR (microrna.org), przyjmując wartość $\text{mirSVR} \leq 0,1$ jako punkt odcięcia.

Z kolei w przypadku oceny stężenia SEMA3B w preparatach raka endometrium i kontrolnych wykorzystano nieparametryczne metody statystyczne.

Wyniki przedstawiono jako mediana (Me), kwartył dolny (Q1) i górny (Q3). W celu wskazania statystycznie istotne różnice w ekspresji SEMA3B w próbkach badanych i kontrolnych wykorzystano test Kruskala-Wallisa, stanowiący nieparametryczny odpowiednik analizy wariancji ANOVA, a następnie test post-hoc Dunn'a.

4. Wyniki

4.1. Analiza profilu ekspresji ocenianych mRNA w hodowli komórkowej raka endometrium linii Ishikawa eksponowanych na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej.

4.1.1. Aktywność transkrypcyjna genów związana ze zjawiskiem lekooporności w komórkach raka endometrium pod wpływem salinomycyny w porównaniu do komórek nietraktowanych lekiem

Na podstawie bazy danych Affymetrix stwierdzono, że 47 z 22227 mRNA obecnych na płycie mikromacierzowej jest związanych ze zjawiskiem lekooporności. W celu porównania wszystkich badanych grup transkryptomów z hodowlą kontrolną i stwierdzenia dla których mRNA różnice ekspresji są znamienne ($p < 0,05$) przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z poprawką Benjamini-Hochberg'a. Zaobserwowano, że jest 17 mRNA różnicujących hodowlę eksponowaną na salinomycynę w porównaniu z do hodowli kontrolnej raka endometrium ($p < 0,05$). Następnie przeprowadzono test post-hoc Tukeya. Ten etap analizy statystycznej pozwolił na wskazanie liczby mRNA specyficznie różnicujących hodowlę komórkową raka endometrium z lekiem od kontroli. Odnotowano, że liczba mRNA różnicujących komórki raka endometrium eksponowanych na salinomycynę w porównaniu z hodowlą kontrolną dla każdego czasu inkubacji komórek z lekiem jest następująca: H_12 vs K - 9 mRNA, H_24 vs K - 7 mRNA, H_48 vs K - 1 mRNA.

Zaobserwowano, że 4 z 9 różnicujących mRNA były charakterystyczne dla 12-godzinnej ekspozycji komórek na salinomycynę i odpowiadały genom: *TUFT1*, *ABCB1*, *MTMR11*, *MX2*.

Dla 24 godzinnej inkubacji komórek z lekkim charakterystyczne były geny *TUFT1*, *MYD88*, natomiast dla hodowli raka endometrium eksponowanej na lek przez 48 godzin w porównaniu z hodowlą kontrolną charakterystyczny był gen *SLC30A5*. Nie było wspólnego mRNA różnicującego hodowlę raka endometrium z salinomycyną od kontroli niezależnie od czasu ekspozycji komórek na lek.

Wzorzec ekspresji mRNA *TUFT1*, *ABCB1*, *MTMR11* wyznaczonych półilościową techniką mikromacierzy ekspresyjnych potwierdzono techniką RTqPCR.

4.1.2. Aktywność transkrypcyjna genów szlaku kaspaz w komórkach raka endometrium pod wpływem salinomycyny w porównaniu do komórek nietraktowanych lekiem

Na podstawie bazy danych Affymetrix stwierdzono, że 59 z 22227 mRNA obecnych na płycie mikromacierzowej jest związanych ze szlakami sygnalizacyjnymi zależnymi od kaspaz. W celu porównania wszystkich badanych grup transkryptomów z hodowlą kontrolną i stwierdzenia dla których mRNA różnice ekspresji są znamienne ($p < 0,05$) przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z poprawką Benjamini-Hochberg'a. Zaobserwowano, że 14 mRNA różnicuje hodowlę eksponowaną na salinomycynę w porównaniu z do hodowli kontrolnej raka endometrium ($p < 0,05$). Następnie przeprowadzono test post-hoc Tukeya. Ten etap analizy statystycznej pozwolił na wskazanie liczby mRNA specyficznie różnicujących hodowlę komórkową raka endometrium z lekiem od kontroli. Odnotowano, że liczba mRNA różnicujących komórki raka endometrium eksponowanych na salinomycynę w porównaniu z hodowlą kontrolną dla każdego czasu inkubacji komórek z lekiem jest następująca: H_12 vs K - 8 mRNA, H_24 vs K - 10 mRNA, H_48 vs K - 3 mRNA.

Zaobserwowano, że 5 z 14 różnicujących mRNA różnicowało hodowlę raka endometrium linii Ishikawa niezależnie od czasu inkubacji komórek z lekiem i odpowiadały genom: *CASP3*, *CASP8*, i *CASP9*.

Profil ekspresji mRNA *CASP3*, *CASP8* i *CASP9* wyznaczonych techniką mikromacierzy potwierdzono techniką RTqPCR.

4.1.3. Zmiany profilu ekspresji wybranych genów pro- i antyapoptotycznych w hodowli komórek raka endometrium eksponowanej na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej

W celu potwierdzenia lub wykluczenia indukcji przez salinomycynę apoptozy poprzez szlak mitochondrialnych w hodowli raka endometrium linii Ishikawa oceniono profil ekspresji genów *Bcl-2l* i *Bcl-w* (antyapoptotyczne) oraz *Bax* i *Bak* (proapoptotyczne).

Stwierdzono, że dodanie salinomycyny do hodowli komórkowej związane było ze zwiększeniem aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka proapoptotyczne z równoczesnym wyciszeniem ekspresji genów kodujących białka antyapoptotyczne.

Analiza statystyczna wykazała, że ekspresja genów należących do rodziny białek BCL-2 była istotnie statystycznie wyższa w hodowli komórek raka endometrium eksponowanej na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej ($p < 0,05$). Ta część analizy molekularnej sugeruje, że salinomycyną indukuje zaprogramowaną śmierć komórki głównie poprzez ścieżkę zależną od mitochondriów.

4.2. Mikromacierzowy profil miRNA różnicujących hodowlę raka endometrium linii Ishikawa eksponowaną na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej

4.2.1. Profil ekspresji miRNA potencjalnie regulujących ekspresję wybranych mRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności w komórkach raka endometrium eksponowanych na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej

Na podstawie analizy mikromacierzowego profilu ekspresji miRNA różnicujących hodowlę komórkową Ishikawa eksponowaną na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej i uwzględniając wartość parametru miRSVR największe prawdopodobieństwo wpływu stwierdzono między mRNA *TUFT1* a hsa-miR-3188 (FC + 2,48), mRNA *MTMR11* i hsa-miR-16 (FC -1,74) oraz między mRNA *SLC30A5* a hsa-miR-30d (FC -2,01).

4.2.2. Profil ekspresji miRNA potencjalnie regulujących ekspresję *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* w komórkach raka endometrium eksponowanych na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej

Najwyższe prawdopodobieństwo wpływu oddziaływani na ekspresję mRNA *CASP3* zaobserwowano dla hsa-miR-30d (średnia wartość FC -2,01).

Z kolei największe prawdopodobieństwo wpływu na profil ekspresji mRNA *CASP8* odnotowano dla hsa-miR-21 (średnia wartość FC +1,31) a ekspresja mRNA *CASP9* wydaje się być potencjalnie regulowana przez hsa-miR-1271 (średnia wartość FC +1,71).

4.3. Ocena aktywności kaspazy-3, -8 i -9 w komórkach raka endometrium traktowanych salinomycyną w porównaniu do hodowli kontrolnej

Zaobserwowano, że salinomycyna istotnie statystycznie zmienia aktywność kaspazy-3 i -9 ($p < 0,05$), podczas gdy aktywność kaspazy-8 pozostaje na zbliżonym poziomie jak w hodowli kontrolnej.

12-godzinna inkubacja komórek z lekiem skutkowała wzrostem aktywności kaspazy-3 o $36,52 \pm 0,46\%$ w porównaniu do kontroli. Dalszy wzrost aktywności tej kaspazy został odnotowany także dla dłuższej ekspozycji komórek na lek, a mianowicie po 24 godzinach obserwuje się wzrost o $46,89 \pm 1,52\%$ w porównaniu do kontroli a po 48 godzinach o $56,63 \pm 0,53\%$ w porównaniu do hodowli kontrolnej.

Również dla kaspazy-9 stwierdzono wzrost jej aktywności niezależnie od czasu ekspozycji komórek na lek w porównaniu do hodowli kontrolnej, po 12 godzinach o $25,33 \pm 0,48\%$, po 24 godzinach o $41,41 \pm 2,11\%$ a po 48 godzinach o $31,04 \pm 0,09\%$.

4.4. Profil stężeń białek TUFT1, MTMR11, SLC30A5 w hodowli raka endometrium eksponowanej na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczony metodą ELISA

Na podstawie uzyskanych wyników można zaobserwować, iż dodanie salinomycyny do hodowli raka endometrium linii Ishikawa skutkowało obniżeniem stężenia białek TUFT1 i MTMR11 i zwiększeniem stężenia białka SLC30A ($p < 0,05$).

W odniesieniu do białka TUFT1 w hodowli kontrolnej jego stężenie wynosiło ok. 7 ng/ml, podczas gdy po 12 i 24 godzinnej inkubacji komórek z lekiem odnotowano stężenie tego białka na poziomie ok. 3 ng/ml. Z kolei, 48 godzinna ekspozycja komórek na lek wiązała się z relatywnie niewielkim zwiększeniem stężenia białka TUFT1 do 4,2 ng/ml.

Również w przypadku białka MTMR11 po 12 godzinach ekspozycji komórek raka endometrium na salinomycynę zaobserwowano spadek jego stężenia o ok. 9 ng/ml w porównaniu do kontroli. Po 24 godzinach stężenie białka MTMR11 wynosiło ok. 3,7 ng/ml a po 48 godzinach inkubacji komórek z lekiem 4 ng/ml.

Z kolei stężenie białka SLC30A uległo zwiększeniu pod wpływem salinomycyny (K- 4 ng/ml, 12h – 12,2 ng/ml, 24h – ok. 8 ng/ml, 48h – ok. 6 ng/ml).

4.5. Zmiany profilu ekspresji SEMA3B w próbkach raka endometrium i kontrolnych.

Ekspresję SEMA3B zaobserwowano w błonie macicy komórek gruczołowych tylko w próbkach kontrolnych. Jednakże w komórkach nowotworowych ekspresję SEMA3B odnotowano niezależnie od stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium ($G1 > G2 > G3$). Stwierdzono, że gęstość optyczna produktu reakcji immunohistochemicznej SEMA3B w komórkach nowotworowych preparatów raka endometrium w stopniu G1 była na zbliżonym poziomie co w błonie macicy komórek gruczołowych preparatów kontrolnych ($Me = 159,09$ vs. $162,26$). Można także zaobserwować, iż w próbkach G2 i G3 gęstość optyczna produktu reakcji uwidoczniła w komórkach rakowych jest niższa niż w preparatach G1 i kontroli, osiągając odpowiednio 85% i 70% kontroli. Wykazano także ekspresję SEMA3B w komórkach śródbłonna i zrębu zarówno w próbkach badanych i kontrolnych. W przypadku komórek śródbłonna zaobserwowano następującą tendencję zmiany wzorca ekspresji ocenianego białka, tj. $G3 > G1 > G2 > K$, a dla komórek zrębu $G2 > G1 > G3 > C$.

W komórkach śródbłonna gęstość optyczna produktu reakcji SEMA3B w preparatach G1 była wyższa o ok. 20% w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy w próbkach zakwalifikowanych do stopnia zróżnicowania G2 ekspresja SEMA3B była podobna jak w kontroli, a w preparatach G3 wyższa niż w pozostałych grupach.

Natomiast, gęstość optyczna produktu reakcji SEMA3B w komórkach zrębu próbek G1 była o 40% wyższa niż w grupie kontrolnej i około 50% wyższa w próbkach raka endometrium G2 niż w próbkach stanowiących kontrolę. Z kolei w preparatach raka endometrium z stopniu zróżnicowania G3 poziom ekspresji SEMA3B w komórkach zrębu był na poziomie obserwowanym w preparatach G1.

5. Dyskusja

Problemem efektywnej terapii w chorobach nowotworowych jest nabywanie przez komórki tworzące guz oporności na stosowane leczenie [2, 3]. Rozwój biologii molekularnej, w tym upowszechnienie technik pozwalających określać zmiany na poziomie genomu, transkryptomu i proteomu pozwalają dokładniej poznać molekularny mechanizm działania cytostatyków oraz wskazać zmiany leżące u podstaw utraty wrażliwości na leczenie [18]. Lekiem, z którym wiązane są ogromne nadzieje przezwyciężenia lekooporności jest salinomycyna [19, 20].

Niemniej jednak ważnym wydaje się określenie czy i jeśli tak, w jaki sposób salinomycyna wpływa na profil ekspresji mRNA kodujących białka związane z lekoopornością oraz miRNA regulujących ich ekspresję. W tym celu przeprowadzono analizę mikromacierzową transkryptomu mRNA i miRNA mających związek z opornością lekową. Prezentowane wyniki wydają się być pierwszymi dotyczącymi oceny zmian ekspresji genów związanych z lekoopornością w raku endometrium podczas stosowania salinomycyny.

Zaobserwowano zmniejszenie liczby różnicujących mRNA hodowle komórek raka endometrium eksponowanych na lek w porównaniu do hodowli kontrolnej wraz z wydłużaniem czasu inkubacji, co może wynikać ze zmniejszającego się stężenia leku w środowisku komórek nowotworowych. Wykazano, że tylko dla 3 mRNA, mianowicie *TUFT1*, *MTMR11*, *SLC30A5* spośród 17 zdefiniowanych jako różnicujące, krotność zmiany ekspresji była na poziomie równym lub większym niż 2,0.

mRNA *TUFT1* koduje tuftelinę, białko pełniące istotną rolę w procesach przebudowy, mineralizacji szkliva. Wskazuje się jednak na udział *TUFT1* w procesie kancerogenezy. Dou i wsp. opisują podwyższoną ekspresję *TUFT1* w komórkach raka wątroby, co koreluje z niekorzystnym rokowaniem. Zaobserwowali oni także, iż istotny w procesie indukcji i utrwaleniu stanu hipoksji w mikrośrodowisku guza promotor genu *HIF1 α* (ang. Hypoxia-inducible factor 1 α) wykazuje powinowactwo do *TUFT1*. Wskazują oni, że tuftelina nasila ekspresję *HIF1 α* , co sprzyja proliferacji komórek nowotworowych oraz indukcji przejścia EMT poprzez aktywację szlaków Ca^{2+} /PI3K/AKT and Snail. Dlatego też zahamowanie ekspresji tego genu wydaje się być interesującym celem terapii anty-nowotworowej [56].

Stwierdzenie zmniejszenia aktywności transkrypcyjnej *TUFT1* pod wpływem salinomycin sugeruje, że lek ten wykazuje zdolność do indukowania zmian

w mikrośrodowisku otaczającym komórki nowotworowe, zmniejszając stopień niedotlenienia.

Z kolei Schulten i wsp. odnotowali wzrost ekspresji TUFT1 w nowotworowych liniach komórkowych indukowany metforminą [57], co wskazuje na plejotropowe działanie tufteliny i jej udział w kontroli metabolizmu.

Liu i wsp. analizowali zmiany wzorca ekspresji w potrójnie negatywnym raku piersi. Również oni odnotowali wzrost jej aktywności w próbkach nowotworowych. Przeanalizowali oni także mechanizm działania tufteliny na komórki, stwierdzając, że białko to jest inhibitorem szlaku zależnego od czynnika kappa B (NFkB) i czynników proapoptotycznych [58].

Uwzględniając zatem te spostrzeżenia [56-58] wraz z zakwalifikowaniem na podstawie ontologii genowych mRNA *TUFT1* do genów oporności lekowej, zasadnym wydaje się wniosek, że analiza ekspresji tego transkryptu może być użytecznym markerem molekularnym oceny efektywności leczenia antynowotworowego. Uzyskane wyniki mogą wskazywać również, że salinomycyna zapobiega wystąpieniu lekooporności. Nie można także, że ekspresja *TUFT1* może być jednym z bardziej czułych markerów monitorowania warunków panujących w mikrośrodowisku guza [59].

Drugim z genów różnicującym hodowlę komórek raka endometrium z lekiem od kontroli był mRNA *MTMR11* kodujące białko rodziny związane myotubularin (ang. myotubularin related protein 11). Ostatnie badania pokazują, że białka tej rodziny wykazują aktywność fosfatazy lipidowej wpływając na ekspresję 3-monofosforanu fosfatydyloinozytolu związanego ze szlakiem PI3K (ang. Phosphatidylinositol 3-kinase) [60]. Niewiele natomiast wiadomo na temat roli genu *MTMR11* i kodowanego przez nie białka w kancerogenezie. Niemniej jednak w wielu typach nowotworów [61], w tym raku endometrium opisano nadmierne pobudzenie szlaku sygnalizacyjnego PI 3-kinase [62].

Tym samym zmniejszenie ekspresji *MTMR11* sugeruje wywieranie wpływu przez salinomycynę na kaskadę PI3K, która wydaje się atrakcyjnym nowym celem terapeutycznym w przypadku raka endometrium [63].

Trzecim genem dla którego stwierdzono największą zmianę ekspresji był *SLC30A5*, kodujący białko uczestniczące w kontroli wypływu jonów cynku z komórki [64]. Białko to jest częścią większej rodziny transporterów cynku uczestniczących w nowotworzeniu i progresji raka.

Odnotowano, że podwyższona ekspresja SLC39A6, SLC30A5, SLC39A7, SLC39A9, SLC39A10 i SLC39A11 stanowi część mechanizmu adaptacyjnego komórek nowotworowych charakteryzujących się zwiększonym zapotrzebowaniem na cynk [65]. Singh i wsp. [66] zaobserwowali obniżenie ekspresji SLC30A5 w przypadku raka prostaty, które było większe w bardziej zaawansowanych klinicznie przypadkach raka stercza [66].

Dlatego też zaobserwowany wzorzec ekspresji *SLC30A5* w komórkach raka endometrium traktowanych salinomycyną potwierdza antynowotworowe działanie leku oraz dążenie komórek do osiągnięcia stanu homeostazy.

Druga część analizy mikromacierzowej związanej ze zjawiskiem lekooporności miała na celu określić, które cząsteczki miRNA spośród różnicujących hodowlę raka endometrium eksponowaną na salinomycynę w porównaniu do hodowli kontrolnej są potencjalnie zaangażowane w regulację ekspresji mRNA *TUFT1*, *MTMR11*, *SLC30A5*.

Na podstawie przeprowadzonej analizy predykcyjnej, największe powinowactwo stwierdzono pomiędzy *TUFT1* i hsa-miR-3188 (FC + 2.48), *MTMR11* i has-miR-16 (FC -1.74) oraz pomiędzy *SLC30A5* i hsa-miR-30d (FC -2.01). Zestawiając ze sobą profil ekspresji mRNA i miRNA można potwierdzić regulacyjną rolę mechanizmu interferencji RNA na geny uczestniczące w indukcji lekooporności.

Zhao i wsp. w swoich badaniach kierują uwagę, że zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej miR-3188 jest niekorzystnym czynnikiem, gdyż sprzyja nadmiernej proliferacji komórek nowotworowo zmienionych oraz nabywaniu przez nie oporności na chemioterapeutyki [67].

Z drugiej strony analiza Zhou i wsp. [68] wskazują, że to nadekspresja hsa-miR-3188 jest związana z procesem przerzutowania [68]. Nie wykluczone zatem, że rola miR-3188 w procesie nowotworzenia jest niejednoznaczna, i może zależeć od kontekstu biologicznego czy rodzaju tkanki objętej procesem transformacji nowotworowej.

Wyciszenie ekspresji stwierdzono także w stosunku do hsa-miR-30d, opisywanego jako supresor proliferacji komórek nowotworowych i aktywator apoptozy [69]. Zmniejszona ekspresja hsa-miR-30d jest charakterystyczna dla procesu nowotworzenia i aktywacji procesu przejścia EMT [70].

Niemniej jednak odnotowana w hodowli raka endometrium eksponowanego na salinomycynę w porównaniu do hodowli zmniejszona ekspresja tego miRNA koresponduje ze wzrostem ekspresji *SLC30A5*, co jest oczekiwanym rezultatem terapii

salinomycyną. Może to sugerować niewielki negatywny wpływ hsa-miR-30d na proliferację komórek raka endometrium.

Ostatnim z różnicujących miRNA związanych z genami kodującymi białka, które uczestniczą w procesie nabywania oporności na leki przez komórki był hsa-miR-16d. Stwierdzono wyciszenie jego ekspresji, czemu towarzyszyło równoczesne obniżenie ekspresji genu *MTMR11*. Może to być związane z tym, że ekspresja tego genu najprawdopodobniej podlega regulacji w większej mierze przez metylację DNA [71].

Sromek i wsp. [72] wskazali, że podwyższony poziom hsa-miR-16 w surowicy jest charakterystyczny dla nowotworzenia i ulega zmniejszeniu po usunięciu zmian nowotworowych w przypadku raka płuca [72]. Dlatego też mniejsza aktywność tego miRNA spowodowana salinomycyną jest zjawiskiem korzystnym.

Przeprowadzona analiza mikromacierzowego profilu mRNA i miRNA związanych z lekoopornością potwierdza złożoność mechanizmów o kluczowej roli w procesie nowotworzenia i odpowiedzi na leczenie antynowotworowe.

W kolejnym etapie badań przeanalizowano wpływ salinomycyny na szlaki sygnalizacyjne zależne od kaspaz, które zaangażowane są w proces apoptozy komórek w hodowli raka endometrium inkubowanych z lekiem w porównaniu do hodowli kontrolnej. Ponadto podjęto próbę określenia, który ze szlaków śmierci komórki – wewnętrzny czy zewnętrzny jest dominującym w przypadku raka endometrium podczas terapii salinomycyną oraz jakie jest znaczenie szlaku kaspaz w pojawieniu się utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie.

Oceniając mikromacierzowy profil ekspresji genów szlaku kaspaz zaobserwowano, że *CASP3*, *CASP8* i *CASP9* kodujące odpowiednio kaspazę 3, 8 i 9 w największym stopniu zmieniają swoją aktywność pod wpływem salinomycyny dodanej do hodowli komórek raka endometrium.

Ho i wsp. w badaniach nad wpływem berberyny w kontekście raka języka stwierdzili, że wraz ze wzrostem czasu ekspozycji komórek raka języka na berberynę wzrost aktywności kaspazy 3, 8 i 9 jest większy w porównaniu do kontroli i krótszego czasu inkubacji, co jest po części zbieżne z wynikami uzyskanymi w ramach niniejszej pracy [73]. Z tego względu wydaje się, że salinomycyna indukuje apoptozę poprzez szlak wewnętrzny (mitochondrialny) [74].

Istotnym z punktu oceny efektywności terapii salinomycyną w przypadku raka endometrium jest fakt, że na podstawie uzyskanych wyników mikromacierzowego

profilu ekspresji wydaje się, że salinomycyna w trwały sposób indukuje zmiany w komórkach, w tym proces zaprogramowanej śmierci komórki.

Zhang i wsp. oceniali wpływ salinomycyny na profil ekspresji kaspaz i innych białek szlaku apoptozy w modelu raka prostaty. Stwierdzili oni podwyższony poziom kaspazy 12 pod wpływem salinomycyny oraz obniżenie ekspresji kaspazy 3 pod wpływem traktowania komórek równocześnie salinomycyną i 4-fenylomaślanem, co wskazuje, że antybiotyk jonoforowy nasila stres komórkowy, co prowadzi w konsekwencji do zmian w retikulum endoplazmatycznym i apoptozy [75].

Zmiany w poziomie ekspresji i aktywności kaspaz zostały zaobserwowane już po 12- godzinnej inkubacji komórek raka endometrium linii Ishikawa z lekiem w porównaniu do hodowli kontrolnej. Widać również, że transkryptom to układ charakteryzujący się dynamizmem i plastycznością, a wybrany model badawczy – linia komórkowa Ishikawa jest użytecznym modelem badawczym.

Ciekawe są także obserwacje Gao i wsp. [76], którzy odnotowali wzrost ekspresji kaspazy 3 i 9 na poziomie genu i białka w porównaniu do ekspresji kaspazy 8 [76]. Zatem, można przypuszczać, że salinomycyna powoduje apoptozę komórek poprzez szlak wewnętrzny (mitochondrialny) nie tylko niezależnie od rodzaju nowotworu, ale również rodzaju komórek czy wyboru modelu doświadczalnego. Jest to ważne doniesienie, gdyż wskazuje, że zmiany ekspresji kaspazy 3 i 9 mogą być rozważane jako nowe uzupełniające markery odpowiedzi na terapię salinomycin.

W dalszej kolejności oceniono regulacyjny wpływ cząsteczek miRNA na ekspresję mRNA *CASP-3*, *CASP-8* i *CASP-9*.

Największe prawdopodobieństwo oddziaływania mRNA:miRNA zaobserwowano pomiędzy *CASP3* (nadekspresja) i hsa-miR-30d (FC -2.01), *CASP8* (wyciszenie ekspresji) i hsa-miR-21 (FC +1.39) oraz pomiędzy *CASP9* (nadekspresja) i hsa-miR-1271 (FC +1.71).

Wskazuje się, że hsa-miR-30d jest ważnym, użytecznym markerem oceny zaawansowania zmian nowotworowych w raku prostaty. Nadekspresję tej cząsteczki miRNA odnotowano w grupie pacjentów z gorszym rokowaniem, którzy wymagali bardziej agresywnego leczenia [77].

Zaobserwowana w ramach niniejszej pracy obniżona ekspresja hsa-miR-30d wskazuje na skuteczność salinomycyny, wrażliwość komórek raka endometrium na nią oraz indukcję przez lek apoptozy komórek nowotworowych. Poza tym rola miR-30d jest szeroko omawiana w kontekście regulacji proliferacji komórek, co z kolei może

sugerować, że również sama cząsteczka miRNA wpływa na proliferację, różnicowanie i śmierć komórkową [78,79].

Z kolei dla dwóch kolejnych cząsteczek miRNA - hsa-miR-21 i hsa-miR-1271 różnicujących hodowlę raka endometrium eksponowaną na salinomycynę od kontroli, odnotowano wzrost ich ekspresji. Rola hsa-miR-21 opisywana jest w kontekście receptorowego szlaku śmierci, aktywowanego przez ligand FAS, podczas gdy hsa-miR-1271 związany jest z nabywaniem oporności na leczenie cisplatiną [80]. Jednak tylko w stosunku do hsa-miR-21 potwierdzono pierwotnie scharakteryzowaną funkcję miRNA, jako negatywnego regulatora ekspresji genu, w tym wypadku *CASP8*.

Xu i wsp. [81] opisują bezpośredni związek między ekspresją hsa-miR-21 a *CASP8*, podkreślając, że nadekspresja hsa-miR-21 wiązała się ze wzrostem przeżycia i proliferacji komórek nowotworowych z równoczesną inhibicją apoptozy [81]. Z tego względu, choć wydaje się, że salinomycyna wpływa przede wszystkim na mitochondrialny szlak śmierci, można przypuszczać, że w mniejszym stopniu przyczynia się regulacji szlaku receptorowego. Tym bardziej, że Liu i wsp. na podstawie swoich badań również postulują za rolę hsa-miR-21 w dwóch rodzajach szlaków apoptozy [82]. Pokazuje to złożony obraz pro-esu nowotworowego oraz wielokierunkowe działanie salinomycin.

Ostatnim z różnicujących miRNA dla którego zaobserwowano największe prawdopodobieństwo oddziaływania z *CASP9* jest hsa-miR-1271, wskazywany jako cząsteczka, której zmiany ekspresji są odzwierciedleniem wrażliwości komórek nowotworowych na chemioterapeutyki, proliferacji, apoptozy i przerzutowania komórek nowotworowych [83,84].

W niniejszej pracy porównano także ekspresję SEMA3B w bioptatach uzyskanych podczas zabiegu histerektomii od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem endometrium i tych, uzyskanych od pacjentek operowanych z przyczyn innych niż onkologiczne. Na podstawie przeprowadzonych badań odnotowano ekspresję SEMA3B w komórkach nowotworowych endometrium, śródbłonna naczyniowego oraz zrębu guza, przy czym w komórkach raka endometrium największą ekspresję stwierdzono w stopniu G1, w komórkach zrębu w wycinkach G2, a w komórkach śródbłonna w próbkach raka o stopniu zróżnicowania G3.

Ferrira i wsp. [85] przeanalizowali zmiany ekspresji SEMA3B w próbkach raka endometrium w fazie proliferacyjnej i wydzielniczej cyklu miesięczkowego. Zaobserwowali relatywnie wyższy poziom SEMA3B w bioptatach endometrium w fazie

proliferacyjnej. Jednakże zmiany nie były znamienne statystycznie [85]. W badaniu immunohistochemicznym największą ekspresję SEMA3B zaobserwowałem w stopniu zróżnicowania G3 raka endometrium, co potwierdza udział niniejszego białka jako supresora wzrostu guza [86]. W stopniu G3 komórki endometrium pozbawione antyproliferacyjnego wpływu SEMA3B charakteryzują się największą hiperproliferacją. Obserwowany poziom ekspresji SEMA3B w próbkach raka G3 może być także wynikiem znacznego odróżnicowania komórek endometrium, a tym samym utraty prawidłowego fenotypu i metabolizmu [87]. W konsekwencji dochodzi do zaburzenia transdukcji sygnału wzdłuż szlaków sygnalizacyjnych, uczestniczących w utrzymaniu homeostazy komórek. Potwierdza to złożony i plejotropowy charakter kaskad sygnałowych i procesów związanych z transformacją nowotworową [88,89,90].

Nguyen i wsp. [91] na podstawie przeprowadzonych badań dotyczących zmiany ekspresji SEMA3B i SEMA3F stwierdzili, iż ekspresja obu semaforyn zmniejsza się wraz ze wzrostem potencjału metastatycznego raku endometrium [91]. Także Osada i wsp. [92] stwierdzili istotne wyciszenie ekspresji SEMA3B w IV stopniu zaawansowania raka endometrium, stanowiąc niekorzystny marker rokowniczy progresji nowotworu [92]. Poza tym Joseph i wsp. [93] wykazali, iż zmiany profilu ekspresji SEMA3B mogą być brane pod uwagę jako uzupełniający marker molekularny w chorobach nowotworowych. Podkreślają także, że ta semaforyna pełni istotną rolę w uzyskaniu przez komórki raka jajnika potencjału do przerzutowania, jak także wskazują na istotne znaczenie estrogenów i gonadotropin w angiogenezie nowotworowej [93]. Obserwacja ta wydaje się tym bardziej istotna, gdyż oceniane przeze mnie wycinki raka endometroidalne endometrium są estrogenozależne [94,95].

Varshavsky i wsp. [96] podkreślają rolę SEMA3B w hamowaniu angiogenezy [96], co w zestawieniu z otrzymanymi przeze mnie wynikami ekspresji w komórkach śródbłonna sugeruje, że wraz ze wzrostem stopnia odróżnicowania komórek raka endometrium (G1>G2>G3) nasileniu ulegają procesy neowaskularyzacji [97-101]. Należy mieć także na uwadze fakt, że SEMA3B nasila sekrecję interleukiny 8 (IL-8), wpływającej na zwiększenie migracji makrofagów do mikrośrodowiska guza, promując proces przerzutowania komórek tworzących masę guza. Podwyższony poziom IL-8 dodatkowo hamują antyangiogenne właściwości SEMA3B [102]. W konsekwencji istnieje niekontrolowany, samonapędzający się proces umożliwiający dalszy wzrost guza i promujący jego agresywność [103].

Podsumowując, analiza molekularna przeprowadzona w ramach niniejszej pracy wskazuje, że salinomycyna dodana do hodowli komórek raka endometrium indukuje zmiany ekspresji cząsteczek mRNA i miRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności i zaprogramowanej śmierci komórki. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że w przypadku raka endometrium salinomycyna przeciwdziała wystąpieniu utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie oraz indukuje apoptozę komórek głównie przez szlak mitochondrialny. Stwierdzono także, iż w przebiegu raka endometrium ekspresja SEMA3B jest odmienna niż w warunkach fizjologicznych. Potwierdzony został ścisły związek między potencjałem do przerzutowania a nasileniem procesu angiogenezy oraz występowanie interakcji pomiędzy szlakami sygnałowymi w procesie transformacji nowotworowej.

6. Wnioski

1. Potwierdzono, że salinomycyna dodana do hodowli komódek raka endometrium linii Ishikawa indukuje zmiany w transkryptomie mRNA i miRNA, w tym związanym ze zjawiskiem lekooporności i szlaku kaspaz.
2. Potwierdzono, że salinomycyna w największym stopniu zmienia profil ekspresji trzech genów związanych z utratą adekwatnej odpowiedzi na leczenie, mianowicie: *TUFT1*, *MTMR11*, *SLC30A5*.
3. Potwierdzono wpływ salinomycyny na szlak sygnałowy zależny od kaspaz. Największe zmiany ekspresji zaobserwowano dla *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*.
4. Potwierdzono, że salinomycyna indukuje proces apoptozy komórek raka endometrium w głównej mierze przez szlak mitochondrialny.
5. Największy związek pomiędzy mRNA i miRNA odnotowano dla par: *TUFT1* i hsa-miR-3188, *MTMR11* i has-miR-16, *SLC30A5* i hsa-miR-30d, *CASP3* i hsa-miR-30d, *CASP8* i hsa-miR-21 oraz pomiędzy *CASP9* i hsa-miR-1271.
6. Potwierdzono, iż w raku endometrium profil ekspresji SEMA3B jest odmienny niż w warunkach fizjologicznych i zależy od stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka oraz rodzaju komórek, w których oceniono ekspresję SEMA3B.
7. Ocenione w niniejszej pracy geny, cząsteczki miRNA i białka mogą być użytecznymi uzupełniającymi markerami w diagnostyce raka endometrium i detekcji lekooporności na leczenie.

7. Piśmiennictwo

1. Kolbl AC, Birk AE, Kuhn C, Jeschke U, Andergassen U. Influence of VEGFR and LHCGR on endometrial adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2016; 12: 2092-2098.
2. Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, Jemal A. International patterns and trends in endometrial cancer incidence, 1978–2013. *JNCI* 2018; 110(4): 354-361.
3. Coll-de la Rubia E, Martinez-Garcia E, Dittmar G, Gil-Moreno A, Cabrera S, Colas E. Prognostic biomarkers in endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Med* 2020; 9(6): 1900.
4. Linkov F, Goughnour SL, Ma T, Xu Z, Edwards RP, Lokshin AE, Ramanathan RC, Hamad GG, McCloskey C, Bovbjerg DH. Changes in inflammatory endometrial cancer risk biomarkers in individuals undergoing surgical weight loss. *Gynecol Oncol* 2017; 147(1): 133-138.
5. Raglan O, Kalliala I, Markozannes G, Cividini S, Gunter MJ, Nautiyal J, Gabra H, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Tsilidis KK, Kyrgiou M. Risk factors for endometrial cancer: an umbrella review of the literature. *IJC* 2019; 145(7): 1719-1730.
6. Gompel A. Progesterone and endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2020; 69:95-107.
7. Rodriguez AC, Blanchard Z, Maurer KA, Gertz J. Estrogen signaling in endometrial cancer: a key oncogenic pathway with several open questions. *Hormones and Cancer* 2019; 10(2-3): 51-63.
8. Pakish JB, Lu KH, Sun CC, Burzawa JK, Greisinger A, Smith FA, Fellman B, Urbauer DL, Soliman PT. Endometrial cancer associated symptoms: a case-control study. *J Womens Health* 2016; 25(11): 1187-1192.
9. Mørch LS, Kjær SK, Keiding N, Løkkegaard E, Lidegaard Ø. The influence of hormone therapies on type I and II endometrial cancer: a nationwide cohort study. *Int J Cancer* 2016; 138(6): 1506-1515.
10. Suarez AA, Felix AS, Cohn DE. Bokhman Redux: Endometrial cancer “types” in the 21st century. *Gynecol. Oncol* 2017; 144(2): 243-249.
11. Mang C, Birkenmaier A, Cathomas G, Humburg J. Endometrioid endometrial adenocarcinoma: an increase of G3 cancers? *Arch. Gynecol. Obstet* 2017; 295(6): 1435-1440.
12. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *The Lancet* 2016; 387(10023): 1094-1108.

13. Sznurkowski JJ, Knapp P, Bodnar L, i wsp. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej dotyczące diagnostyki i leczenia raka endometrium. *Curr. Gynecol. Oncol* 2017; 15(1): 34-44.
14. Kozak J, Wdowiak P, Maciejewski R, Torres A. A guide for endometrial cancer cell lines functional assays using the measurements of electronic impedance. *Cytotechnology* 2018; 70(1): 339-350.
15. Miyazaki Y, Shibuya M, Sugawara H, Kawaguchi O, Hirsoe C. Salinomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 1974; 27: 814–821.
16. Huczyński A, Markowska J, Ramlau R, Sajdak S, Szubert S, Stencel K. Salinomycyna–przełom w leczeniu raka jajnika?. *Curr Gynecol Oncol* 2016; 14(3): 156-161.
17. Antoszczak M, Huczyński A, Brzezinski B. Synteza i aktywność biologiczna pochodnych salinomycyny. *Wiad Chem* 2017; 71:630-661.
18. Naujokat C, Fuchs D, Opelz G. Salinomycin in cancer: a new mission for an old agent. *Mol Med Rep* 2010; 3: 555–559.
19. Webb BJ, Sorensen J, Mecham I, Buckel W, Ooi L, Jephson A, Dean NC. Antibiotic Use and Outcomes After Implementation of the Drug Resistance in Pneumonia Score in ED Patients With Community-Onset Pneumonia. *Chest* 2019; 156(5): 843-851.
20. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(10): 714.
21. Smith AG, Macleod KF. Autophagy. cancer stem cells and drug resistance. *J. Pathol* 2019; 247(5): 708-718.
22. Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol. Biotechnol* 2010; 46(3): 308-316.
23. Soares FS, Lettnin AP, Wagner EF, et al. Multidrug resistance phenotype: Relation between phenotype induction and its characteristics in erythroleukemia cells. *Cell Biol. Int* 2019; 43(2): 214-219.
24. Zhang RX, Wong HL, Xue HY, Eoh JY, Wu XY. Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy–Strategies and perspectives. *J Control Release.* 2016; 240: 489-503.
25. Macanas-Pirard P, Broekhuizen R, González A, et al. Resistance of leukemia cells to cytarabine chemotherapy is mediated by bone marrow stroma. involves cell-surface

- equilibrative nucleoside transporter-1 removal and correlates with patient outcome. *Oncotarget* 2017; 8(14): 23073.
26. Tsui DWY, Murtaza M, Wong ASC, et al. Dynamics of multiple resistance mechanisms in plasma DNA during EGFR-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *EMBO Mol Med* 2018; 10(6): e7945.
 27. Smith B, Bhowmick N. Role of EMT in metastasis and therapy resistance. *J Clin Med* 2016; 5(2): 17.
 28. Loret N, Denys H, Tummers P, Berx G. The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers (Basel)* 2019;11(6): 838.
 29. Emran AA, Marzese DM, Menon DR, Hammerlindl H, Ahmed F, Richtig E, Duijf P, Hoon DS, Schaidler H. Commonly integrated epigenetic modifications of differentially expressed genes lead to adaptive resistance in cancer. *Epigenomics*. 2019; 11(7): 732-737.
 30. Chaudhry P, Asselin E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; 16(2): 363-80.
 31. Jerzak KJ, Duska L, MacKay HJ. Endocrine therapy in endometrial cancer: An old dog with new tricks. *Gynecol Oncol*. 2019; 153(1): 175-183.
 32. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017; 24(8): 1380-1389.
 33. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol* 2018; 28(6): 475-493.
 34. Poreba M, Groborz K, Navarro M, Snipas SJ, Drag M, Salvesen GS. Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ* 2019; 26(2): 229-244.
 35. Kopeina GS, Prokhorova EA, Lavrik IN, Zhivotovsky B. Alterations in the nucleocytoplasmic transport in apoptosis: Caspases lead the way. *Cell Prolif* 2018; 51(5): e12467.
 36. Slattery ML, Mullany LE, Sakoda LC, Wolff RK, Samowitz WS, Herrick JS. Dysregulated genes and miRNAs in the apoptosis pathway in colorectal cancer patients. *Apoptosis* 2018; 23(3-4): 237-250.
 37. Anderson GR, Wardell SE, Cakir M, Yip C, Ahn YR, Ali M, Yllanes AP, Chao CA, McDonnell DP, Wood KC. Dysregulation of mitochondrial dynamics proteins are a targetable feature of human tumors. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1677.

38. Chen X, Wang L, Qu J, Guan NN, Li JQ. Predicting miRNA-disease association based on inductive matrix completion. *Bioinformatics* 2018; 34(24): 4256-4265.
39. Vannini I, Fanini F, Fabbri M. Emerging roles of microRNAs in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2018; 48:128-133.
40. Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477(1-2): 299-306.
41. Man SM, Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(1): 7-21.
42. Parajuli B, Shin SJ, Kwon SH, Cha SD, Chung R, Park WJ, Lee HG, Cho CH. Salinomycin induces apoptosis via death receptor-5 up-regulation in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2013; 33(4): 1457-1462.
43. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA* 2019; 25(1): 1-16.
44. Arbeille E, Reynaud F, Sanyas I, Bozon M, Kindbeiter K, Causeret F, Pierani A, Falk J, Moret F, Castellani V. Cerebrospinal fluid-derived Semaphorin3B orients neuroepithelial cell divisions in the apicobasal axis. *Nat Commun.* 2015; 6: 6366.
45. Ito D, Nojima S, Kumanogoh A. The role of semaphorin family in immune systems. [In:] *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2014; 37: 1–10.
46. Sabag AD, Smolkin T, Mumblat Y, Ueffing M, Kessler O, Gloeckner CJ, Neufeld G. The role of the plexin-A2 receptor in Sema3A and Sema3B signal transduction. *J Cell Sci.* 2014; 127(Pt 24): 5240-5452.
47. Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, Minna JD. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(31): 11432-11437.
48. Fonseca FP, Bingle L, Santos-Silva AR, Lopes MA, de Almeida OP, de Andrade BA, Mariano FV, Kowalski LP, Rangel AL, Martins MD, Meurer L, Speight PM, Vargas PA. Semaphorins and neuropilins expression in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 2016; 45(2): 119-26.
49. Tse C, Xiang RH, Bracht T, Naylor SL. Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.* 2002; 62(2): 542-546.
50. T Tischoff I, Markwarth A, Witzigmann H, Uhlmann D, Hauss J, Mirmohammadsadegh A, Wittekind C, Hengge UR, Tannapfel A. Allele loss and

- epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors. *Int J Cancer*. 2005; 115(5): 684-689.
51. Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24): 13954-13959.
 52. Deuster E, Jeschke U, Ye Y, Mahner S, Czogalla B. Vitamin D and VDR in Gynecological Cancers-A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 2017; 18(11): 2328.
 53. Sang C, Zhang Y, Chen F, Huang P, Qi J, Wang P, Zhou Q, Kang H, Cao X, Guo L. Tumor necrosis factor alpha suppresses osteogenic differentiation of MSCs by inhibiting semaphorin 3B via Wnt/ β -catenin signaling in estrogen-deficiency induced osteoporosis. *Bone* 2016; 84: 78-87.
 54. Huang HY, Cheng YY, Liao WC, Tien YW, Yang CH, Hsu SM, Huang PH. SOX4 transcriptionally regulates multiple SEMA3/plexin family members and promotes tumor growth in pancreatic cancer. *PLoS One*. 2012; 7(12): e48637.
 55. Tang H, Wu Y, Liu M, Qin Y, Wang H, Wang L, Li S, Zhu H, He Z, Luo J, Wang H, Wang Q, Luo S. SEMA3B improves the survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma by upregulating p53 and p21. *Oncol Rep* 2016; 36(2): 900-908.
 56. Dou C, Zhou Z, Xu Q, Liu Z, Zeng Y, Wang Y, Li Q, Wang L, Yang W, Liu Q, Tu K. Hypoxia-induced TUFT1 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activating the Ca²⁺/PI3K/AKT pathway. *Oncogene* 2019; 38(8): 1239-1255.
 57. Schulten HJ, Bakhashab S. Meta-Analysis of Microarray Expression Studies on Metformin in Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2019; 20(13): 3173.
 58. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res* 2019; 79(18): 4557-4566.
 59. Shen L, Zhou Y, He H, Chen W, Lenahan C, Li X, Deng Y, Shao A, Huang J. Crosstalk between Macrophages, T Cells, and Iron Metabolism in Tumor Microenvironment. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 8865791.
 60. Laporte J, Blondeau F, Buj-Bello A, Mandel JL. The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism. *Trends Genet* 2001; 17(4): 221-228.
 61. Pascual J, Turner NC. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2019; 30(7): 1051-1060.

62. Li, Y., Zhang, Z., Zhang, X., Lin, Y., Luo, T., Xiao, Z., Zhou, Q. (2016). A dual PI3K/AKT/mTOR signaling inhibitor miR-99a suppresses endometrial carcinoma. *American journal of translational research*, 8(2), 719.
63. Wang Y, Ren F, Li B, Song Z, Chen P, Ouyang L. Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. *J Cancer*. 2019; 10(15): 3303-3314.
64. Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* 2017; 67(2): 283-301.
65. B Barresi V, Valenti G, Spampinato G, Musso N, Castorina S, Rizzarelli E, Condorelli DF. Transcriptome analysis reveals an altered expression profile of zinc transporters in colorectal cancer. *J Cell Biochem* 2018; 119(12): 9707-9719.
66. Singh CK, Malas KM, Tydrick C, Siddiqui IA, Iczkowski KA, Ahmad N. Analysis of Zinc-Exporters Expression in Prostate Cancer. *Sci Rep* 2016; 6: 36772.
67. Zhao M, Luo R, Liu Y, Gao L, Fu Z, Fu Q, Luo X, Chen Y, Deng X, Liang Z, Li X, Cheng C, Liu Z, Fang W. miR-3188 regulates nasopharyngeal carcinoma proliferation and chemosensitivity through a FOXO1-modulated positive feedback loop with mTOR-p-PI3K/AKT-c-JUN. *Nat Commun* 2016; 7: 11309.
68. Zhou SJ, Deng YL, Liang HF, Jaoude JC, Liu FY. Hepatitis B virus X protein promotes CREB-mediated activation of miR-3188 and Notch signaling in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ* 2017; 24(9): 1577-1587.
69. Zhang R, Xu J, Zhao J, Bai J. Mir-30d suppresses cell proliferation of colon cancer cells by inhibiting cell autophagy and promoting cell apoptosis. *Tumour Biol* 2017; 39(6):1010428317703984.
70. Hosseini SM, Soltani BM, Tavallaei M, Mowla SJ, Tafsiri E, Bagheri A, Khorshid HRK. Clinically Significant Dysregulation of hsa-miR-30d-5p and hsa-let-7b Expression in Patients with Surgically Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Avicenna J Med Biotechnol* 2018; 10(2): 98-104.
71. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res* 2016; 76(12): 3446-3450.
72. Sromek M, Glogowski M, Chechlinska M, Kulinczak M, Szafron L, Zakrzewska K, Owczarek J, Wisniewski P, Wlodarczyk R, Talarek L, Turski M, Siwicki JK. Changes in plasma miR-9, miR-16, miR-205 and miR-486 levels after non-small cell lung cancer resection. *Cell Oncol (Dordr)* 2017; 40(5): 529-536.

73. Ho YT, Lu CC, Yang JS, Chiang JH, Li TC, Ip SW, Hsia TC, Liao CL, Lin JG, Wood WG, Chung JG. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer Res* 2009; 29(10): 4063-4070.
74. Zhou J, Liu S, Wang Y, Dai W, Zou H, Wang S, Zhang J, Pan J. Salinomycin effectively eliminates cancer stem-like cells and obviates hepatic metastasis in uveal melanoma. *Mol Cancer* 2019; 18(1): 159.
75. Zhang Y, Li F, Liu L, Jiang H, Hu H, Du X, Ge X, Cao J, Wang Y. Salinomycin triggers endoplasmic reticulum stress through ATP2A3 upregulation in PC-3 cells. *BMC Cancer* 2019; 19(1): 381.
76. Gao X, Zheng Y, Ruan X, Ji H, Peng L, Guo D, Jiang S. Salinomycin induces primary chicken cardiomyocytes death via mitochondria mediated apoptosis. *Chem Biol Interact* 2018; 282: 45-54.
77. Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y, Ishiguro H. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget* 2012; 3(11): 1455-1471.
78. Lin ZY, Chen G, Zhang YQ, He HC, Liang YX, Ye JH, Liang YK, Mo RJ, Lu JM, Zhuo YJ, et al. MicroRNA-30d promotes angiogenesis and tumor growth via MYPT1/c-JUN/VEGFA pathway and predicts aggressive outcome in prostate cancer. *Mol Cancer* 2017; 16(1): 48.
79. Zhang Z, He T, Huang L, Ouyang Y, Li J, Huang Y, Wang P, Ding J. Two precision medicine predictive tools for six malignant solid tumors: from gene-based research to clinical application. *J Transl Med* 2019; 17(1): 405.
80. Pileczki V, Cojocneanu-Petric R, Maralani M, Neagoe IB, Sandulescu R. MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer. *Clujul Med* 2016; 89(1): 50-55.
81. Xu B, Xia H, Cao J, Wang Z, Yang Y, Lin Y. MicroRNA-21 Inhibits the Apoptosis of Osteosarcoma Cell Line SAOS-2 via Targeting Caspase 8. *Oncol Res* 2017; 25(7): 1161-1168.
82. Liu Y, Ren L, Liu W, Xiao Z. MiR-21 regulates the apoptosis of keloid fibroblasts by caspase-8 and the mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway via targeting FasL. *Biochem Cell Biol* 2018; 96(5): 548-555.

83. Sun X, Zhai H, Chen X, Kong R, Zhang X. MicroRNA-1271 suppresses the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by regulating metadherin/Wnt signaling. *J Biochem Mol Toxicol* 2018; 32(2): e22028.
84. Yao H, Sun Q, Zhu J. miR-1271 enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to cisplatin. *Exp Ther Med*. 2019; 17(6): 4363-4370.
85. Ferreira GD, Capp E, Jauckus J, Strowitzki T, Germeyer A. Expression of semaphorin class 3 is higher in the proliferative phase on the human endometrium. *Arch Gynecol Obstet* 2018; 297(5): 1175-1179.
86. Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res* 2006; 312(5): 584-593.
87. Pecorelli S: Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 105: 103–104.
88. Bednarczyk M, Zmarzły N, Grabarek B, Mazurek U, Muc-Wierzoń M. Genes involved in the regulation of different types of autophagy and their participation in cancer pathogenesis. *Oncotarget* 2018; 9(76): 34413-34428.
89. Lorente J, Velandia C, Leal JA, Garcia-Mayea Y, Lyakhovich A, Kondoh H, LLeonart ME. The interplay between autophagy and tumorigenesis: exploiting autophagy as a means of anticancer therapy. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2018; 93(1): 152-165.
90. Mohlin S, Wigerup C, Jögi A, Pählman S. Hypoxia, pseudohypoxia and cellular differentiation. *Exp Cell Res* 2017; 356(2): 192-196.
91. Nguyen H, Ivanova VS, Kavandi L, Rodriguez GC, Maxwell GL, Syed V. Progesterone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibit endometrial cancer cell growth by upregulating semaphorin 3B and semaphorin 3F. *Mol Cancer Res*, 2011; 9: 1479–92
92. Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N, Ohira S, Ota M, Katsuyama Y, Konishi I. Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 2006; 37(11): 1414-1425.
93. Joseph D, Ho SM, Syed V. Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(2): 499-509.
94. Vahrenkamp JM, Yang CH, Rodriguez AC, Almomen A, Berrett KC, Trujillo AN, Guillen KP, Welm BE, Jarboe EA, Janat-Amsbury MM, Gertz J. Clinical and

Genomic Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Estrogen Receptor α In Endometrial Cancer. *Cell Rep* 2018; 22(11): 2995-3005.

95. Swasti. Estrogen and progesterone receptors in endometrial cancer: Where are we today? *Gynecol Obstet* 2018; 8: e127
96. Varshavsky A, Kessler O, Abramovitch S, Kigel B, Zaffryar S, Akiri G, Neufeld G. Semaphorin-3B is an angiogenesis inhibitor that is inactivated by furin-like pro-protein convertases. *Cancer Res* 2008; 68: 6922–6931.
97. Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Tamaya T. Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in uterine endometrial cancers. *Invasion Metastasis*. 1995; 15(5-6): 203-210.
98. Presta M. Sex hormones modulate the synthesis of basic fibroblast growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells: Implications for the neovascularization of normal and neoplastic endometrium. *J Cell Physiol* 1998; 137(3): 593–597.
99. Chopra V, Ding TV, Hanningan EV: Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123(3): 167–72/
100. Ribatti D, Finato N, Crivellato E, Marzullo A, Mangieri D, Nico B, Vacca A, Beltrami CA. Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathologic progression in human endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193(6): 1961-1965.
101. Chiu HC, Li CJ, Yiang GT, Tsai AP, Wu MY. Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Biology of Molecular Regulation in Endometrial Carcinogenesis. *J Clin Med* 2019; 8(4): 439.
102. Rolny C, Capparuccia L, Casazza A, Mazzone M, Vallario A, Cignetti A, Medico E, Carmeliet P, Comoglio PM, Tamagnone L. The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J Exp Med* 2008; 205: 1155–1161.
103. Neufeld G, Mumblat Y, Smolkin T, Toledano S, Nir-Zvi I, Ziv K, Kessler O. The semaphorins and their receptors as modulators of tumor progression. *Drug Resist Updat* 2016; 29: 1-12.

8. Streszczenie

Wstęp: Wystąpienie zjawiska utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie przeciwnowotworowe (lekooporność) związane jest, m.in. z wystąpieniem nowych mutacji DNA, zmianami metabolicznymi w komórkach nowotworowych, inaktywacją leku, hamowaniem apoptozy komórek nowotworowych, przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT), heterogenicznością komórek tworzących masę guza, wpływem czynników epigenetycznych, jak również dowolną kombinacją wymienionych czynników.

Należy także pamiętać o roli mechanizmów epigenetycznych zaangażowanych w utratę adekwatnej odpowiedzi na leczenie, w tym regulacji ekspresji genów przez cząsteczki miRNA.

Obiecującym lekiem w terapii przeciwnowotworowej wydaje się być salinomycyna, której jeden z mechanizmów działania jest związany z indukcją nieprawidłowej równowagi jonowej pomiędzy jonami sodu i potasu w błonach komórkowych, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych.

Semaforyny (SEMA) należą do grupy błonowych białek uczestniczących w regulacji takich procesów komórkowych jak: proliferacja, migracja komórek nowotworowych, angiogeneza. Uczestniczą także w procesie powstawania zjawiska lekooporności.

Pomimo badań nad rolą SEMA3B w nowotworzeniu, na podstawie dostępnej literatury, związek między ekspresją SEMA3B a wskaźnikiem przeżycia całkowitego u pacjentów z rakiem endometrium nie został jeszcze ustalony.

Cel: Głównym celem pracy było wyznaczenie profilu ekspresji mRNA i miRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności i szlaków sygnałowych zależnych od kaspaz w komórkach raka endometrium linii Ishikawa traktowanych salinomycyną w porównaniu do hodowli kontrolnej.

Materiał i metody: Hodowlę komórek raka endometrium linii Ishikawa eksponowano na salinomycynę w stężeniu 1 μM przez okres 12, 24 i 48 godzin w porównaniu do hodowli kontrolnej, którą stanowiły komórki nietraktowane lekiem.

Do grupy badanej włączonych zostało 45 pacjentek z rozpoznaniem raka endometroidalnym endometrium, w wieku powyżej 45 lat, w tym 17 pacjentek z rakiem

w stopniu histopatologicznego zróżnicowania G1, 15 pacjentek z rakiem w stopniu G2 i 13 pacjentek z rakiem w stopniu G3. Próbkę zostały uzyskane w trakcie zabiegu histerektomii i następnie ocenione pod względem histopatologicznym, co pozwoliło na podział preparatów względem stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium.

Do grupy kontrolnej włączono 15 pacjentek, u których preparaty endometrium zostały pobrane w trakcie histerektomii wykonanej z powodów nieonkologicznych.

Analiza molekularna obejmowała ekstrakcję całkowitego RNA z komórek raka endometrium, ocenę jakościową i ilościową ekstraktów, wyznaczenie profilu ekspresji mRNA związanych ze zjawiskiem lekooporności i szlakiem kaspaz techniką mikromacierzy oligonukleotydowych oraz wytypowanie mikro RNA (miRNA) potencjalnie regulujących ekspresję ocenianych transkryptów z zastosowaniem mikromacierzy miRNA. W materiale klinicznym ekspresję SEMA3B wyznaczono techniką barwienia immunohistochemicznego.

Wyniki: Oceniając mikromacierzowy profil ekspresji genów związanych z lekoopornością zaobserwowano, że liczba różnicujących mRNA hodowlę inkubowaną z lekiem od kontroli w zależności od czasu ekspozycji komórek na salinomycynę jest następujący: H_12 vs K - 9 mRNA, H_24 vs K - 7 mRNA, H_48 vs K - 1 mRNA. Największe zmiany ekspresji stwierdzono dla genów: *TUFT1*, *ABCBI*, *MTMR11*, *SLC30A5*.

Na podstawie przeprowadzonej analizy predykcyjnej, największe powinowactwo stwierdzono pomiędzy *TUFT1* i hsa-miR-3188 (FC + 2.48), *MTMR11* i has-miR-16 (FC -1.74) oraz pomiędzy *SLC30A5* i hsa-miR-30d (FC -2.01).

Z kolei dla szlaku kaspaz zaobserwowano, że liczba mRNA różnicujących komórki raka endometrium eksponowanych na salinomycynę w porównaniu z hodowlą kontrolną dla każdego czasu inkubacji komórek z lekiem jest następująca: H_12 vs K - 8 mRNA, H_24 vs K - 10 mRNA, H_48 vs K - 3 mRNA. Ponadto zaobserwowano, że 5 z 14 różnicujących mRNA różnicowało hodowlę raka endometrium linii Ishikawa niezależnie od czasu inkubacji komórek z lekiem i odpowiadały genom: *CASP3*, *CASP8*, i *CASP9*.

Najwyższe prawdopodobieństwo wpływu oddziaływani na ekspresję mRNA *CASP3* zaobserwowano dla hsa-miR-30d (średnia wartość FC -2,01). Z kolei największe prawdopodobieństwo wpływu na profil ekspresji mRNA *CASP8* odnotowano dla

hsa-miR-21 (średnia wartość FC +1,31) a ekspresja mRNA *CASP9* wydaje się być potencjalnie regulowana przez hsa-miR-1271 (średnia wartość FC +1,71).

Na podstawie przeprowadzonych badań odnotowano ekspresję SEMA3B w komórkach nowotworowych endometrium, śródbłonna naczyniowego oraz zrębu guza, przy czym w komórkach raka endometrium największą ekspresję stwierdzono w stopniu G1, w komórkach zrębu w wycinkach G2, a w komórkach śródbłonna w próbkach raka o stopniu zróżnicowania G3.

Wnioski: Na podstawie przeprowadzonych badań w ramach niniejszej pracy potwierdzono, że salinomycyna dodana do hodowli komódek raka endometrium linii Ishikawa indukuje zmiany w transkryptomie mRNA i miRNA, w tym związanym ze zjawiskiem lekooporności i szlaku kaspaz. Ponadto zaobserwowano, że salinomycyna indukuje proces apoptozy komórek raka endometrium w głównej mierze przez szlak mitochondrialny. Stwierdzono także, iż w przebiegu raka endometrium ekspresja SEMA3B jest odmienna niż w warunkach fizjologicznych. Potwierdzony został ścisły związek między potencjałem do przerzutowania a nasileniem procesu angiogenezy oraz występowanie interakcji pomiędzy szlakami sygnałowymi w procesie transformacji nowotworowej.

Słowa kluczowe: rak endometrium, lekooporność, kaspazy, miRNA, SEMA3B

9. Abstract

Introduction: The occurrence of the phenomenon, where loss of an adequate response to anti-cancer treatment is observed, or drug resistance, is connected with, among other things: the occurrence of new DNA mutations; metabolic changes in cancer cells; drug inactivation; inhibition of cancer cell apoptosis; the epithelial-mesenchymal transition (EMT); heterogeneity of the cells constituting the tumor mass; the influence of epigenetic factors; as well as any combination of the listed factors.

The role of epigenetic mechanisms engaged in the loss of an adequate response to treatment should be remembered, including the regulation of gene expression through miRNA molecules.

A promising drug in anti-cancer therapy seems to be salinomycin, a mechanism of which is related to the induction of an improper ion balance between sodium and potassium in cell membranes, which consequently leads to cancer cell apoptosis.

Semaphorins (SEMA) belong to a group of membrane proteins which participate in the regulation of such cell processes like: proliferation; cancer cell migration; angiogenesis. They also participate in the process of the drug resistance phenomenon occurring.

Despite research into the role of SEMA3B in cancer formation, based on the current available literature, the relationship between the expression of SEMA3B and the overall survival rate in endometrial cancer patients has as of yet, not been established.

Aim: The main aim of this study was to determine the expression profile of mRNA and miRNA related with the drug resistance phenomenon as well as the signaling pathways dependent on caspases in Ishikawa line endometrial cancer cells treated with salinomycin compared to the control culture.

Materials and Methods: Ishikawa line endometrial cancer cells were exposed to salinomycin at a concentration of 1 μ M over a period of 12,24 and 48 hours, compared to a control culture, which was formed of cells untreated by the drug.

The study group consisted of 45 patients diagnosed with endometrial cancer, above 45 years of age, including 17 patients with a cancer at a histopathological differentiation grade of G1, 15 patients with a cancer at a grade of G2, and 13 patients with a cancer at a grade of G3. Samples were obtained during a hysterectomy and afterwards were assessed in histopathological terms, which allowed for the separation of the samples based on the endometrial cancer histopathological differentiation grade.

The control group consisted of 15 patients, in which endometrial samples were taken during hysterectomy, conducted due to non-oncological reasons.

Molecular analysis included the extraction of whole RNA from endometrial cancer cells, assessing the quality and quantity of the extracts, determining an expression profile of the mRNA related with the occurrence of the drug resistance phenomenon and the caspase pathway through the oligonucleotide microarray technique as well as determining the micro-RNA (miRNA) potentially regulating the expression of the assessed transcripts using miRNA microarrays. In the clinical material, the expression of SEMA3B was determined using immunohistochemical staining.

Results: Assessing the microarray expression profile of genes related to drug resistance, it was observed that the number of mRNA differentiating the culture incubated with the drug from the control, depending on the exposition time of the cells to salinomycin was the following: H_12 vs C – 9 mRNA; H_24 vs C - 7 mRNA; H_48 vs C - 1 mRNA. The largest changes in gene expression were determined for: TUFT1; ABCB1; MTMR11; SLC30A5.

On the basis of the predictive analysis carried out, the strongest relationship was noted between: *TUFT1* and hsa- miR-3188 (FC + 2.48); *MTMR11* and has-miR-16 (FC - 1.74); as well as between *SLC30A5* and hsa-miR-30d (FC -2.01).

In turn, for the caspase pathway, it was observed that the number of mRNA differentiating the endometrial cancer cells exposed to salinomycin compared with the control culture for each incubation time of the cells with the drug were: H_12 vs C - 8 mRNA; H_24 vs C - 10 mRNA; H_48 vs C - 3 mRNA. Furthermore, it was observed that 5 out of the 14 differentiating mRNA differentiated the Ishikawa line endometrial cancer cell culture regardless of the incubation time of the cells with the drug and corresponded to the genes: *CASP3*; *CASP8*; *CASP9*.

The highest probability of influencing the *CASP3* mRNA expression was observed for hsa-miR-30d (average FC value – 2.01). In turn, the highest probability of influencing the expression profile of the *CASP8* mRNA was noted for hsa-miR-21 (average FC value +1.31), while the expression of the *CASP9* mRNA seems to be potentially regulated by hsa-miR-1271 (average FC value +1.71).

Based on the conducted research, the expression of SEMA3B was noted in endometrial cancer, vascular endothelium, and tumor stroma cells, of which, the highest expression determined in endometrial cancer cells was at a G1 grade, in tumor stroma cell

clippings it was G2, while in endothelial cells in cancer samples, the grade of differentiation was G3.

Conclusions: Based on the conducted research as part of this study, it was confirmed that salinomycin added to the Ishikawa line endometrial cancer cell culture induces changes in the mRNA and miRNA transcriptome related to the drug resistance phenomenon and caspase pathway. Furthermore, we observed that salinomycin induces apoptosis in endometrial cancer cells, mainly through the mitochondrial pathway. It was also determined that during endometrial cancer, the expression of SEMA3B is different than under physiological conditions. A close relationship between the metastatic potential and the intensity of angiogenesis was confirmed as well as the occurrence of an interaction between the signaling pathways in the neoplastic transformation process.

Keywords: endometrial cancer; drug resistance; caspases; miRNA; SEMA3B

10. Oświadczenia współautorów publikacji na podstawie której oparta jest rozprawa doktorska

Oświadczenie o wkładzie pracy – publikacja nr 1

Analysis of the Differences in the Expression of mRNAs and miRNAs Associated with Drug Resistance in Endometrial Cancer Cells Treated with Salinomycin. Curr Pharm Biotech 2020; 21: 1-8.

Tytuł publikacji, czasopismo, rok wydania, strony

Januszyk P, Januszyk K, Wierzbik-Strońska M, Boroń D, Grabarek B.

Imiona i nazwiska autorów publikacji

Oświadczenie o wkładzie pracy w wyżej wymienioną publikację (publikacja nr 1) i wyrażenie zgody na wykorzystanie pracy w rozprawie doktorskiej

imię i nazwisko autora rozprawy doktorskiej

Piotr Januszyk

Lp.	Autor	Zakres wkładu w pracę	Podpis
1	Piotr Januszyk	konceptcja pracy, zbieranie danych, analiza danych, przygotowanie publikacji, korespondencja z Redakcją czasopisma	<i>Piotr Januszyk</i>
2	Krzysztof Januszyk	Wykonanie analiz statystycznych	<i>Krzysztof Januszyk</i>
3	Magdalena Wierzbik-Strońska	analiza piśmiennictwa	<i>M. Wierzbik-Strońska</i>
4	Dariusz Boroń	zbieranie danych, selekcja materiału klinicznego, nadzór ogólny	<i>BOROŃ</i>
5	Beniamin Grabarek	Opracowanie wniosków, nadzór nad częścią molekularną, korekta pracy	<i>Beniamin Grabarek</i>

Oświadczenie o wkładzie pracy – publikacja nr 2

The Influence of Salinomycin on the Expression Profile of mRNAs Encoding Selected Caspases and MiRNAs Regulating their Expression in Endometrial Cancer Cell Line. Curr Pharm Biotech 2019; 21: 1-11.

Tytuł publikacji, czasopismo, rok wydania, strony

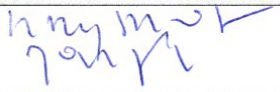
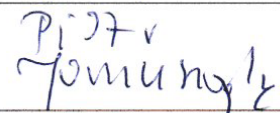

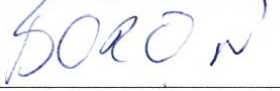
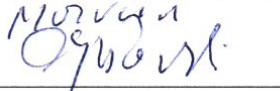
Januszyk K, **Januszyk P**, Grabarek BO, Boroń D, Oplawski M.

Imiona i nazwiska autorów publikacji

Oświadczenie o wkładzie pracy w wyżej wymienioną publikację (publikacja nr 2) i wyrażenie zgody na wykorzystanie pracy w rozprawie doktorskiej

imię i nazwisko autora rozprawy doktorskiej

Piotr Januszyk

Lp.	Autor	Zakres wkładu w pracę	Podpis
1	Krzysztof Januszyk	konceptja pracy, zbieranie danych, analiza danych, przygotowanie publikacji, korespondencja z Redakcją czasopisma	
2	Piotr Januszyk	Współtworzenie koncepcji pracy, zbieranie danych, analiza danych, przygotowanie publikacji, współtworzenie odpowiedzi na uwagi Recenzentów	
3	Beniamin Oskar Grabarek	nadzór nad częścią molekularną pracy	
4	Dariusz Boroń	zbieranie danych, selekcja materiału klinicznego, nadzór ogólny	
5	Marcin Oplawski	selekcja materiału klinicznego, graficzne opracowanie pracy	

Oświadczenie o wkładzie pracy – publikacja nr 3

Expression of Semaphorin 3B (SEMA3B) in Various Grades of Endometrial Cancer. Med Sci Monit. 2019; 25: 4569-4574.

Tytuł publikacji, czasopismo, rok wydania, strony

Dziobek K, Oplawski M, Grabarek B, Zmarzły N, **Januszyk P**, Adwent I, Dąbrus D, Leśniak E, Kielbasiński R, Kieszkowski P, Boroń D.

Imiona i nazwiska autorów publikacji

Oświadczenie o wkładzie pracy w wyżej wymienioną publikację (publikacja nr 3) i wyrażenie zgody na wykorzystanie pracy w rozprawie doktorskiej

imię i nazwisko autora rozprawy doktorskiej

Piotr Januszyk

Lp.	Autor	Zakres wkładu w pracę	Podpis
1	Konrad Dziobek	Koncepcja pracy, zbieranie danych, przygotowanie publikacji, prowadzenie korespondencji z Redakcją czasopisma	Konrad Dziobek
2	Marcin Oplawski	Koncepcja pracy, zbieranie danych, przygotowanie publikacji	Marcin Oplawski
3	Beniamin Grabarek	Wykonanie analizy statystycznej, analiza danych, przygotowanie publikacji	Beniamin Grabarek
4	Nikola Zmarzły	analiza danych, przygotowanie publikacji	Nikola Zmarzły
5	Piotr Januszyk	Przygotowanie publikacji	Piotr Januszyk
6	Iwona Adwent	Analiza danych	Iwona Adwent
7	Dariusz Dąbrus	Wykonanie analizy statystycznej	Dariusz Dąbrus
8	Ewa Leśniak	Zebranie danych	Ewa Leśniak
9	Robert Kielbasiński	Wykonanie analizy statystycznej	Robert Kielbasiński
10	Przemysław Kieszkowski	Analiza piśmiennictwa	P. Kieszkowski
11	Dariusz Boroń	Współtworzenie koncepcji pracy	Dariusz Boroń

RESEARCH ARTICLE

Analysis of the Differences in the Expression of mRNAs and miRNAs Associated with Drug Resistance in Endometrial Cancer Cells Treated with Salinomycin

Piotr Januszyk^{1,*}, Krzysztof Januszyk², Magdalena Wierzbik-Strońska³, Dariusz Boron^{1,3,4} and Benjamin Grabarek^{3,4}

¹Department of Gynecology and Obstetrics with Gynecologic Oncology, Ludwik Rydygier Memorial Specialized Hospital, Kraków, Poland; ²Faculty of Health Science, Public Higher Medical Professional School in Opole, Poland; ³Department of Histology, Cytophysiology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Technology in Katowice, Zabrze, Poland; ⁴Department of Clinical Trials, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology Krakow Branch, Poland

Abstract: Background: It is important to understand the molecular mechanisms involved in cancer drug resistance and to study the activity of new drugs, e.g. salinomycin.

Objective: The purpose of the study was to analyze changes in the expression of genes associated with drug resistance in the Ishikawa endometrial cancer cell line when treated with salinomycin. In addition, changes in the level of miRNA potentially regulating these mRNAs were evaluated.

Materials and Methods: Endometrial cancer cells were treated with 1 μM of salinomycin for 12, 24 and 48 hours periods. Untreated cells were a control culture. The molecular analysis consists of mRNA and miRNA microarray analysis and the RTqPCR technique.

Results: The following was observed about the number of mRNAs differentiating the cell culture exposed to the drug compared to a control culture: H-12 vs. C - 9 mRNAs, H_24 vs. C - 6 mRNAs, and H_48 vs. C - 1 mRNA. It was noted that 4 of the 9 differentiating mRNAs were characteristic for 12 hours of exposure to salinomycin and they correspond to the following genes: *TUFT1*, *ABCB1*, *MTMR11*, and *MX2*. After 24 hours, 2 mRNAs were characteristic for this time of incubation cells with salinomycin: *TUFT1* and *MYD88* and after 48 hours, *SLC30A5* could also be observed. The highest differences in expression were indicated for *TUFT1*, *MTMR11*, and *SLC30A5*. The highest influence probability was determined between *TUFT1* and hsa-miR-3188 (FC + 2.48), *MTMR11* and hsa-miR-16 (FC -1.74), and between *SLC30A5* and hsa-miR-30d (FC -2.01).

Conclusions: Salinomycin induces changes in the activity of mRNA and miRNA participating in drug resistance; however, the observed changes in character are the expected result of anti-cancer treatment.

ARTICLE HISTORY

Received: February 04, 2020
Revised: March 26, 2020
Accepted: May 29, 2020

DOI:
10.2174/1389201021666200629151008

Keywords: Cancer drug resistance, salinomycin, micro RNA, endometrial cancer cells, molecular analysis.

1. INTRODUCTION

The occurrence of drug resistance was first observed in relation to the loss of sensitivity by bacterial cells to antibiotics [1]. In order to get a better understanding of etiopathogenesis, for many inflammatory illnesses, the understanding of drug resistance was widened also for other drugs, not just antibiotics, and therefore also non-bacterial illnesses. The

loss of an adequate answer to treatment is observed in oncology [2, 3]. It is suggested that the described occurrence is connected with the appearance of new genetic mutations, metabolic changes in cancer cells, the inactivation of the drug, changes in the molecular focus of treatment, terminating the process of programmed cell death, the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), cell heterogeneity, the influence of epigenetic factors, as well as any mixture of the aforementioned factors [4, 5].

For this reason, it is indicated that a combined therapy using more than one drug simultaneously could be a better therapeutic strategy option in comparison to monotherapy.

*Address correspondence to this author at the Department of Gynecology and Obstetrics with Gynecologic Oncology, Ludwik Rydygier Memorial Specialized Hospital, Kraków, Poland;
E-mail: piotrganuszyk233@gmail.com

This procedure depends on the synergistic effect of drugs, whose therapeutic effect is greater than if each of the drugs were used separately [6].

One of the mechanisms connected with resistance to treatment is a lowered activation of the drug. This situation was noted, among others, for therapy of acute myeloid leukemia, in treatment where cytarabine is used (AraC), being a representative of nucleoside drugs, activated by a range of phosphorylation reactions. A disorder of this cascade results in an inability to transform AraC to the active metabolite - a triphosphate of AraC [7]. Another potential mechanism that induces drug resistance is changes in the expression levels of cytokines, growth factors, receptors connected with the signaling pathway towards which the used treatment is directed, such as members of the epidermal growth factor receptor family (EGFR) and other molecules connected with the cascade activated by it, and mainly Ras, Src, Raf and MEK [8]. A relatively new area of research into drug resistance to chemotherapeutics is the role of EMT in it, during which changes in the expression of adhesion receptors of cells is observed - integrin and cadherin as well as metalloproteinases [9, 10]. It is also worth remembering the role of epigenetic mechanisms involved in the loss of an adequate response to treatment [11]. The phenomenon of drug resistance was observed also in gynecological tumors, including endometrial cancer, highlighting the multi-factor character of the observed changes [12, 13]. Better knowledge and understanding regarding molecular organisms, which undergo modifications during oncological treatment as well as those which are connected with the appearance of drug resistance incline towards not only finding new detection marker systems of this process but also adding new drugs to the treatment. One of the drugs with a promising anticancer effect is salinomycin, an ionophore antibiotic expressing an effect towards microorganisms and also cancer stem cells [14, 15]. However, as of now, not much research has been done assessing the effect of salinomycin on endometrial cancer cells. One of the most popular and recommended *in vitro* study endometrial cancer cell lines is the Ishikawa cell line which is characterized by the highest proliferation properties compared to other endometrial cancer lines, such as RL95-2 and KLE. It is also important that their resistance to anti-cancer drugs is described for Ishikawa cells [16-18].

The purpose of the study was to analyze the variances in the expression pattern of genes associated with drug resistance in the Ishikawa endometrial cancer cell line when treated with salinomycin. Additionally, the changes in the level of miRNA potentially regulating these mRNAs were evaluated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell Culture

As material in this project, the Ishikawa endometrial cancer cell line was used. The culture was carried out in the Minimum Essential Medium (MEM) with 2 mM of glutamine, 1% Non-Essential Amino Acids (NEAA), and 5% Fetal Bovine Serum (FBS), according to the manufacturer's protocol. The cells were incubated at a constant temperature of 37°C with a 5% CO₂ enriched atmosphere. All reagents

were purchased from the Sigma Aldrich company (St Louis, MO, USA).

In order to indicate the influence of salinomycin on both mRNA and miRNA expression, 1 µM of the drug was added to the cells and cultured for 12, 24 and 48 hours. Control cells were not treated with salinomycin.

2.2. RNA Extraction

Total ribonucleic acid extraction was carried out with TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Next, extracts of RNA were purified by using DNase I enzyme. The last step was associated with diluting extracts in 20 µl of sterile water and frozen at -70°C to the time when the molecular analysis was done.

Total RNA extracts were qualitatively assessed by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with 0.5 mg/ml ethidium bromide (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Based on the analysis of the image of the electropherogram in the light of the UV transilluminator, two bands corresponding to the 28S and 18S rRNA fractions were visualized. The concentration and purity of the extracts were assessed by spectrophotometry. The concentration was determined assuming that 1 OD₂₆₀ = 40 µg RNA in 1 ml of extract. Absorbance increase at other wavelengths indicated contamination (230 nm - carbohydrate contamination, ethanol residues, EDTA; 280 nm - protein; 320 nm - cellular particles, degradation of the genetic material in the sample). The degree of purity of the extracts was assessed based on the value of the ratio A₂₆₀/A₂₈₀ (standard 1.8-2.0). Extracts that met the qualitative and quantitative assessment assumptions were considered at the later stages of the molecular analysis.

2.3. Microarray Analysis

Evaluation of expression pattern of mRNAs associated with the drug resistance was performed with the use of oligonucleotide microarrays HG-U133A 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) as suggested by the manufacturer. Assessment of the expression profile of miRNAs participating in the regulation of drug resistance of genes was carried out using GeneChip® miRNA 2.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). The detailed protocol for molecular analysis was described previously [19].

2.4. RTqPCR

In the third step of the molecular analysis, the RTqPCR reaction was performed to validate changes in transcriptional activity of mRNA *TUFT1*, *MTMR11*, and *SLC30A5*. For these genes, a 2.5 or higher fold change in expression was observed in microarray analysis. It was conducted using SensiFAST™ SYBR No-ROX One-Step Kit, (Bioline, London, UK). β-actin (*ACTB*) was used as an endogenous control. Expression was presented as a fold change of gene expression compared to control (the 2^{-ΔΔCt} method).

Nucleotide sequence of primers used in RTqPCR analysis were as follows: *TUFT1* (Forward 5' - ATTTTGGTTTTGAATGATTTTGTAG - 3'; Reverse 5' - AACACACCTATAATCCCACTACTC - 3'); *MTMR11* (Forward

5'-TGGATGGTAGTGGGAATTAGGATATT-3'; Reverse 5'-AACCTCAAACCAACTCTAAACAAC-3'; *SLC30A5* (Forward 5'-GTTTTTGTATGGGGGAGTGA-3'; Reverse 5'-CAACTTTTAAAAAATCATATAATTC-3'; *ACTB* (Forward: 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'; Reverse: 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3').

2.5. ELISA Assay

The last stage of molecular analysis was associated with determining differences in the expression of TUFT1 protein (TUFT ELISA kit Human Tuftelin (TUFT) ELISA Kit; Catalog # MBS2104898); MTMR11 (MTMR11, Polyclonal Antibody; Catalog #MBS7000832) and SLC30A5 (SLC30A5, Monoclonal Antibody; #MBS6001665) via the ELISA technique (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) according to the manufacturer's protocol (MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA).

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis of the microarray data was carried out using the Transcriptome Analysis Console (Thermo Fisher, USA) and STATISTICA 13 PL (Cracow, Poland) software to analyze the results obtained by RTqPCR. The one-way ANOVA and Tukey's post-hoc tests were used to determine differentially expressed genes ($|FC| > 1$; $p < 0.05$). In order to show which of miRNAs are engaged with regulating the expression of selected mRNAs, the microRNA database (<http://microrna.org>) was used as suggested in the protocol [20].

3. RESULTS

Based on the Affymetrix database, it was confirmed that 47 from 22227 mRNAs present on the microarray plate are associated with the drug resistance phenomenon. The one-way analysis using the ANOVA variance test with Benjamini-Hochberg's procedure was used to compare all examined transcriptome groups to the control group and ascertain which of the noted variances in mRNA expression were statistically significant ($p < 0.05$). It was observed that 17 mRNAs differentiated the cell culture when exposed to salinomycin compared to a control of endometrial cancer culture ($p < 0.05$). Next, the post-hoc Tukey test was performed. This step of the statistical analysis allowed to indicate the number of mRNAs specifically differentiating the culture with the drug from the control. Based on the obtained results, it might be noted that the number of mRNAs differentiating endome-

trial cancer cells exposed to salinomycin, compared with the control cell culture for each time of cell incubation with the drug is as follows: H-12 vs. C - 9 mRNAs, H_24 vs. C - 6 mRNAs, H_48 vs. C - 1 mRNA (Table 1).

Black - 17 mRNA determined by ANOVA, which differentiated the analyzed groups of transcriptomes; Blue color - number of mRNA representative for the differentiation of the tested transcriptome groups assuming $p < 0.05$; Red - number of unrepresentative mRNAs in differentiating compared groups; H-C - control culture; H-12, H-24, H-48 - Ishikawa cell culture exposed to cisplatin for 12, 24, 48 hours.

It was observed that 4 of 9 differentiating mRNAs were characteristic for 12 hour-long exposure of cells to salinomycin and they correspond to the following genes: *TUFT1*, *ABCB1*, *MTMR11*, and *MX2*. After 24 hours, 2 mRNAs were characteristic for this incubation time of the cells with salinomycin: *TUFT1*, *MYD88* and after 48 hours the same could be observed for *SLC30A5*. No mRNA differentiating the Ishikawa culture with the drug depending on the exposition time was determined (Fig. 1). In Table 2, changes in expression of mRNAs differentiating the cell cultures exposed to salinomycin compared to a control, untreated cells, are shown.

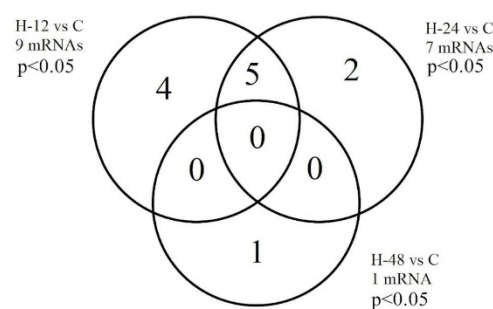


Fig. (1). Venn diagram showing microarray results.

Differences in transcriptional activity of *TUFT1*, *MTMR11*, and *SLC30A5* depending on the exposure of the cells to salinomycin obtained by RTqPCR. The expression pattern of these three genes designated via microarray technique was confirmed using the RTqPCR technique (Fig. 2).

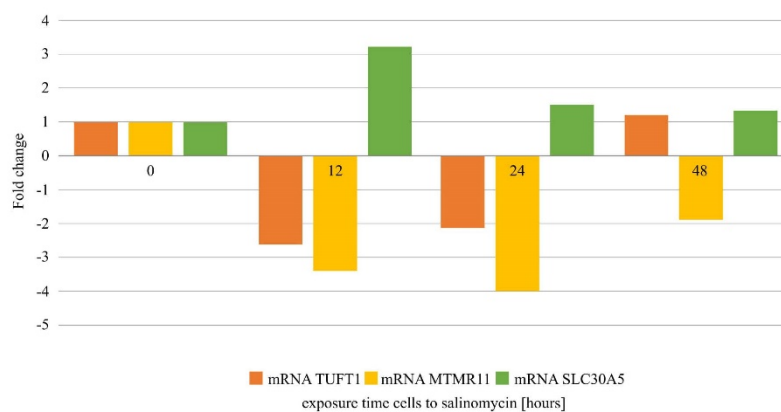
Table 1. The number of mRNAs differentiating the individual transcriptome groups indicated with the use of the post-hoc multi-comparison Tukey's test ($p < 0.05$).

Transcriptome Group	H-C	H-24	H-48	H-12
H-C	17	6	1	9
H-24	8	17	8	7
H-48	16	8	17	9
H-12	11	10	9	17

Table 2. List of mRNAs associated with the drug resistance phenomenon, differentiating endometrial cancer cells treated with salinomycin, compared to the control culture.

ID	Gene Symbol	12 Hours (Up/Down)	FC (12 Hours vs. C)	24 Hours (Up/Down)	FC (24 Hours vs. C)	48 Hours (Up/Down)	FC (48 Hours vs. C)
205807_s_at	<i>TUFT1</i>	Down	-2.78	Down	-2.46	Up	+1.08
209993_at	<i>ABCB1</i>	Down	-1.42	Down	-1.36	Up	+1.19
209994_s_at	<i>ABCB1</i>	Down	-1.48	Down	-1.22	Up	+1.09
205076_s_at	<i>MTMR11</i>	Down	-3.01	Down	-3.99	Down	-2.01
204994_at	<i>MX2</i>	Up	+1.22	Up	+1.24	Down	-1.08
209124_at	<i>MYD88</i>	Up	+1.14	Up	+1.15	Down	-1.01
204928_s_at	<i>SLC30A5</i>	Up	+3.25	Up	+1.36	Up	+1.41
207095_at	<i>SLC10A2</i>	Down	-1.25	Down	-1.14	Up	-1.16
207185_at	<i>SLC10A1</i>	Up	+1.43	Down	-1.03	Up	+1.17
207293_s_at	<i>AGTR2</i>	Down	-1.19	Up	+1.07	Up	+1.04
207294_at	<i>AGTR2</i>	Down	-1.11	Up	+1.12	Up	+1.05
222046_at	<i>SRRT</i>	Down	-1.04	Up	+1.38	Up	+1.08
222047_s_at	<i>SRRT</i>	Down	-1.05	Down	-1.10	Down	-1.19
208220_x_at	<i>AMELY</i>	Down	-1.10	Up	+1.06	Up	+1.23
208410_x_at	<i>AMELX</i>	Up	+1.33	Up	+1.19	Up	+1.33
205075_at	<i>SERPINF2</i>	Up	+1.25	Down	-1.16	Up	+1.03
206024_at	<i>HPD</i>	Up	+1.06	Up	+1.17	Up	+1.17

(+) Overexpression of gene (increased level of mRNAs); (-) suppressed gene expression (decreased level of mRNAs); ID - ID of the probe on a microarray; FC - fold change; C - control culture; 12h, 24h, 48h time of exposure to salinomycin.

**Fig. (2).** Expression level of *TUFT1*, *MTMR11* and *SLC30A5* depending on the exposure time of the Ishikawa cell line to salinomycin (RT-qPCR). (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

The next step of our analysis was focused on analyzing changes in the level of TUFT1, MTMR11, and SLC30A5 at the protein level. The results showed a decreasing expression of the selected protein in cell culture exposed to salinomycin for 12, 24 and 48 hours periods in comparison to a control

Ishikawa cell culture. The highest level can be observed for TUFT in control and SLC30A5 in endometrial cells treated with the drug for 48 hours (Fig. 3). The changes in expression at the protein level has the same tendency as at the transcriptome level (Table 1, Fig. 2, and 3).

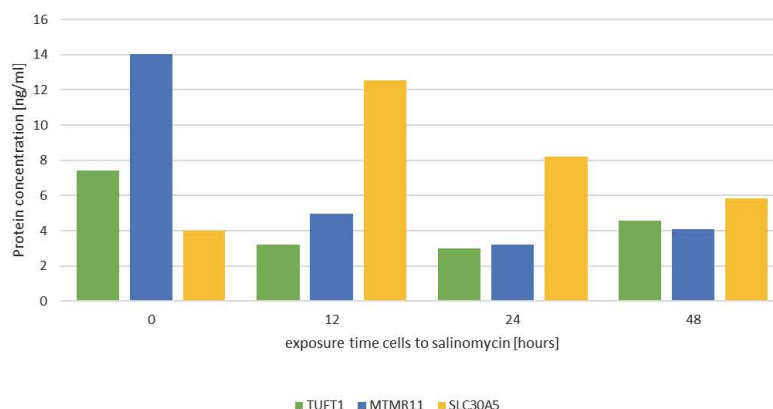


Fig. (3). Expression level of TUFT1, MTMR11 and SLC30A5 depending on the exposure time of the Ishikawa cell line to salinomycin (ELISA assay). (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

The last part of this research involved identifying the micro RNA molecules (miRNAs) that potentially regulate the expression of *TUFT1*, *MTMR11* and *SLC30A5*. Taking into account, the miRNA SVR score parameter relation between the respective miRNA and mRNA was concluded. The highest influence probability was determined between *TUFT1* and hsa-miR-3188 (FC + 2.48). *MTMR11* and hsa-miR-16 (FC -1.74), and between *SLC30A5* and hsa-miR-30d (FC -2.01).

4. DISCUSSION

Problems of effective therapy in neoplastic illnesses are the cells that make up the tumor gaining resistance to the used treatment [2,3]. The development of molecular biology, including the spread of techniques allowing to determine changes on the genome, transcriptome and proteome levels allow for more knowledge to be gained on the topic of molecular mechanisms of cytostatics as well as indicate changes lying at the basis of the loss of sensitivity to treatment [21]. The drug to which huge hopes are tied to regarding overcoming drug resistance is salinomycin. This antibiotic was first used for bacterial infections, it affects the ion equilibrium in a cell, inducing the process of apoptosis. It was determined that salinomycin decreases the expression of adenosine triphosphate-binding cassette transporter in multidrug resistance cells, as well as also influencing signaling pathways: Akt signaling pathway; Wnt/ β -catenin; Hedgehog; and Notch pathways [22, 23].

Nonetheless, however, it seems important to determine whether and if so in what way salinomycin affects the expression profile of mRNA encoding proteins connected with drug resistance as well as miRNA regulating their expression. As part of this goal and as part of this work, a screening microarray analysis was carried out on the transcriptomes of mRNA and miRNA having a connection to drug resistance. According to our knowledge, it is the first work in regards to assessing the changes in the expression of genes involved with drug resistance in endometrial cancer during the use of salinomycin.

It was observed that salinomycin affects the expression of the analyzed panel of genes as well as miRNA involved in the regulation of their transcriptional activity. Based on the obtained results, it was determined that the largest number of differentiating mRNA appears with the shortest exposure time of the cells to the drug and decreases paired with an extension of the time of salinomycin working on endometrial cancer cells. A reduction in the number of differentiating mRNA together with the time could be a result of a decreasing concentration of the drug in the environment of the cancer cells. Furthermore, it is worth noting that the influence of salinomycin on the expression of the analyzed genes seems to be relatively low. This is supported by the fact that the observed changes in the transcriptional activity are small. In principle, only for 3 transcripts, *TUFT1*, *MTMR11* and *SLC30A5*, from the 17 defined as differentiating, the fold change in the expression was on a level equal to or higher of 2.0.

TUFT1 encodes tuftelin, a protein that has a significant role in the process of reconstruction and enamel mineralization. The role of *TUFT1* in the process of carcinogenesis was indicated. Dou *et al.* describe the increased expression of *TUFT1* in hepatocellular cancer, which correlates with an unfavorable prognosis. Furthermore, they observed that in the induction and fixation of hypoxia in the microenvironment of a tumor, the gene *HIF1 α* (*Hypoxia-inducible factor 1 α*) plays an important role and has an affinity for *TUFT1*. They indicate that tuftelin increases the expression of *HIF1 α* , which favors the proliferation of cancer cells as well as the induction of the epithelial-mesenchymal transition through the activation of the Ca²⁺/PI3K/AKT and Snail pathways. Therefore, also stopping the expression of this gene seems to be an interesting target of anticancer therapy [24]. The determination of a lowered transcriptional activity of *TUFT1* under the influence of salinomycin suggests that the drug shows an ability to induce changes in the microenvironment surrounding the cancer cells, decreasing the level of hypoxia. In turn, Schulten *et al.* noted an increase in the expression of *TUFT1* in cancer cell lines induced by metformin [25], which indicates the pleiotropic effect of tuftelin and its role

in controlling the metabolism. Liu *et al.* analyzed changes in the expression pattern in triple-negative breast cancer. They noted that its activity increases in cancer samples. They also analyzed the mechanism of tuftelin working on cells, determining that the protein is an inhibitor of a pathway dependent on the kappa B factor (NFkB) and pro-apoptotic factors [26]. Taking into account, therefore these observations [24-26] along with classifying *TUFT1* mRNA, based on the ontology of the genes, to genes of drug resistance, it seems reasonable to assume that the analysis of the expression of this transcript could be a beneficial molecular marker of assessing the effectiveness of anticancer treatment, and thereby the possibility of drug resistance manifestation. This also suggests that salinomycin counteracts the appearance of drug resistance. It is also not out of question that the expression *TUFT1* could be one of the most sensitive markers for monitoring the conditions in the microenvironment of the tumor. This microenvironment of cancer cells plays a key role in the induction of progression and metastasis [27].

The second of the two genes whose expression after 12 and 24 hours from adding salinomycin into the culture is over 3 times higher than in the control is the *MTMR11* mRNA which encodes myotubularin related protein 11. A further extension of the incubation of the cells with salinomycin to 48 hours continued to cause overexpression of the gene at a level of 2-fold compared to the control culture. The participation of proteins of the myotubularin protein family is described mainly in the context of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Recent research indicates that these proteins show a lipid phosphatase activity affecting the phosphatidylinositol 3-monophosphate associated with the phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI 3-kinase) [28]. Not much, however, is known about the subject of the role of the *MTMR11* gene and the encoded proteins in carcinogenesis. Nonetheless, however, in many types of cancer [29], including endometrial cancer, excessive stimulation of the signaling pathway was described (PI 3-kinase) [30]. In turn, a decrease in the expression of *MTMR11* suggests that salinomycin has an effect on the PI 3-kinase cascade, which is a new therapeutic target in terms of endometrial cancer [31].

The third gene for which the largest change in expression was determined was *SLC30A5*, which codes for the transporter of zinc (Zn) located on the surface of endoplasmic reticulum membranes, which controls the influence of zinc ions on cells [32]. This protein is a part of a larger family of zinc transporters that take part in neoplasia and the progression of cancer. Increased expression of *SLC39A6*, *SLC30A5*, *SLC39A7*, *SLC39A9*, *SLC39A10* and *SLC39A11* was noted, which makes up part of the adaptation mechanism for cancerous cells characterized by an increased need for zinc [33]. Singh *et al.* observed a decreased expression for *SLC30A5* in the case of prostate cancer, which appeared alongside the progression of cancer [34]. Therefore, also the noted expression pattern of *SLC30A5* in endometrial cancer cells treated with salinomycin confirms the anticancer effects of the drug as well as the pursuit of cells to achieve homeostasis.

The second part of microarray analysis was connected with the assessment of the expression of miRNA potentially regulating the expression of three previously discussed genes.

The highest influence probability was determined between *TUFT1* and hsa-miR-3188 (FC +2.48), *MTMR11* and hsa-miR-16 (FC -1.74), and between *SLC30A5* and hsa-miR-30d (FC -2.01). Comparing with each other, mRNA and miRNA profiles can be confirmed with the regulatory role of the RNA interference mechanism in genes taking part in the induction of drug resistance.

Zhao *et al.* in their research highlight that a decrease in the transcriptional activity of miR-3188 is an unfavorable factor, stimulating the proliferation of differentiated cancer cells as well as gaining resistance to chemotherapy [35]. On the other hand, the analysis of Zhou *et al.* shows that the overexpression of hsa-miR-3188 is connected with the process of metastasis [36]. It is not out of question therefore that the role of miR-3188 in the cancerous process is ambiguous, depending on the biological context, such as the type of tissue involved in carcinogenesis. This shows that the cancerous transformation process is complex, and dependent on many factors of the process. The silencing of the expression was determined also in relation to hsa-miR-30d, described as a suppressor of proliferation for cancer cells and activators of apoptosis [37]. A decreased expression of hsa-miR-30d is characteristic of the cancerous process and the activation of the mesenchymal-epithelial transition (EMT) [38]. Nonetheless, however, a silenced expression of this miRNA corresponds with an increase in the expression of *SLC30A5*, which is an expected result of salinomycin therapy, which suggests a marginally negative effect of hsa-miR-30d on the proliferation of endometrial cancer cells. The last of the differentiating miRNA connected with the genes for which differences in expression were the largest is hsa-miR-16d. The silencing of its expression was determined, which accompanies a simultaneous decrease in the expression of the *MTMR11* gene. This could be connected with the fact that the expression of this gene most likely is regulated to a greater degree by the methylation of DNA [39]. Sromek *et al.* indicated that an increased level of hsa-miR-16 is characteristic of neoplasia and undergoes a decrease after removing neoplastic changes in the case of lung cancer [40]. Therefore, also decreased activity of this miRNA caused by salinomycin is a beneficial phenomenon.

The carried out microarray analysis of the mRNA and miRNA profile connected with drug resistance confirms the complexity of mechanisms that play a key role in the cancerous process and answer to anti-cancer treatment. However, further analysis of the influence of salinomycin in the context of other endometrial cancer cell lines, for example, RL95-2 and KLE are necessary. Furthermore, data obtained through the ELISA method need to be validated by Western Blott analysis.

CONCLUSION

In summary, salinomycin causes changes in the transcriptome of genes connected with drug resistance as well as miRNA molecules engaged in the regulation of their expression. The analysis conducted using the microarray suggests that the appearance of an adequate response to treatment in the case of endometrial cancer using salinomycin is relatively small. This conclusion seems reasonable although this drug induces changes in the activity of genes that play a role

in drug resistance. The observed character of changes in the expression profile is an expected result of anti-cancer therapy using salinomycin. Moreover, the complexity of the character of the observed changes was demonstrated and more research is required.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The data used to support the findings of this study are included in the article. The data will not be shared due to third-party rights and commercial confidentiality.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

All authors are responsible for the concept and design of the study, collection and collation of data, analysis and interpretation of data, writing of the article, reviewing, and final reviewing of this article and graphics performance.

We would like to thank Mr. Oskar Ogłoszka for checking and correcting English.

REFERENCES

- [1] Webb, B.J.; Sorensen, J.; Mecham, I.; Buckel, W.; Ooi, L.; Jephson, A.; Dean, N.C. Antibiotic Use and Outcomes After Implementation of the Drug Resistance in Pneumonia Score in ED Patients With Community-Onset Pneumonia. *Chest*, **2019**, *156*(5), 843-851. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2019.04.093> PMID: 31077649
- [2] Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D.B.; Johnston, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer*, **2013**, *13*(10), 714-726. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3599> PMID: 24060863
- [3] Smith, A.G.; Macleod, K.F. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. *J. Pathol.*, **2019**, *247*(5), 708-718. <http://dx.doi.org/10.1002/path.5222> PMID: 30570140
- [4] Baguley, B.C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol. Biotechnol.*, **2010**, *46*(3), 308-316. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-010-9321-2> PMID: 20717753
- [5] Soares, F.S.; Lettnin, A.P.; Wagner, E.F.; Mattozo, F.H.; Carrett-Dias, M.; Rumjanek, V.M.B.D.; Filgueira, D.M.V.B.; de Souza Votto, A.P. Multidrug resistance phenotype: Relation between phenotype induction and its characteristics in erythroleukemia cells. *Cell Biol. Int.*, **2019**, *43*(2), 214-219. <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11095> PMID: 30597722
- [6] Zhang, R.X.; Wong, H.L.; Xue, H.Y.; Eoh, J.Y.; Wu, X.Y. Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy - Strategies and perspectives. *J. Control. Release*, **2016**, *240*, 489-503. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.012> PMID: 27287891
- [7] Macanas-Pirard, P.; Brockhuizen, R.; González, A.; Oyanadel, C.; Ernst, D.; Garcia, P.; Montecinos, V.P.; Court, F.; Ocueteau, M.; Ramirez, P.; Nervi, B. Resistance of leukemia cells to cytarabine chemotherapy is mediated by bone marrow stroma, involves cell-surface equilibrative nucleoside transporter-1 removal and correlates with patient outcome. *Oncotarget*, **2017**, *8*(14), 23073-23086. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.14981> PMID: 28160570
- [8] Tsui, D.W.Y.; Murtaza, M.; Wong, A.S.C.; Rueda, O.M.; Smith, C.G.; Chandrananda, D.; Soo, R.A.; Lim, H.L.; Goh, B.C.; Caldas, C.; Forshev, T.; Gale, D.; Liu, W.; Morris, J.; Marass, F.; Eisen, T.; Chin, T.M.; Rosenfeld, N. Dynamics of multiple resistance mechanisms in plasma DNA during EGFR-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *EMBO Mol. Med.*, **2018**, *10*(6)e7945 <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201707945> PMID: 29848757
- [9] Smith, B.N.; Bhowmick, N.A. Role of EMT in metastasis and therapy resistance. *J. Clin. Med.*, **2016**, *5*(2), 17. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm5020017> PMID: 26828526
- [10] Loret, N.; Denys, H.; Tummers, P.; Berx, G. The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers (Basel)*, **2019**, *11*(6), 838. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11060838> PMID: 31213009
- [11] Emran, A. A.; Marzese, D. M.; Menon, D. R.; Hammerlindl, H. Ahmed, F.; Richtig, E. ... & Schaidler, H. Commonly integrated epigenetic modifications of differentially expressed genes lead to adaptive resistance in cancer. *Epigenomics*, **2019**.
- [12] Chaudhry, P.; Asselin, E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, **2009**, *16*(2), 363-380. <http://dx.doi.org/10.1677/ERC-08-0266> PMID: 19190080
- [13] Jerzak, K.J.; Duska, L.; MacKay, H.J. Endocrine therapy in endometrial cancer: An old dog with new tricks. *Gynecol. Oncol.*, **2019**, *153*(1), 175-183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.12.018> PMID: 30616900
- [14] Huczynski, A.; Markowska, J.; Ramlau, R.; Sajdak, S.; Szubert, S.; Stencel, K. Salinomycyna-przełom w leczeniu raka jajnika? *Current Gynecologic Oncology*, **2016**, *14*(3), 156-161.
- [15] Fuchs, D.; Heindl, A.; Opelz, G.; Daniel, V.; Naujokat, C. Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, *390*(3), 743-749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.042> PMID: 19835841
- [16] Kozak, J.; Wdowiak, P.; Maciejewski, R.; Torres, A. A guide for endometrial cancer cell lines functional assays using the measurements of electronic impedance. *Cytotechnology*, **2018**, *70*(1), 339-350. <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-017-0149-5> PMID: 28988392
- [17] Chitcholtan, K.; Sykes, P.H.; Evans, J.J. The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *J. Transl. Med.*, **2012**, *10*(1), 38. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-10-38> PMID: 22394685
- [18] Sun, M.Y.; Zhu, J.Y.; Zhang, C.Y.; Zhang, M.; Song, Y.N.; Rahman, K.; Zhang, L.J.; Zhang, H. Autophagy regulated by lncRNA HOTAIR contributes to the cisplatin-induced resistance in endometrial cancer cells. *Biotechnol. Lett.*, **2017**, *39*(10), 1477-1484. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-017-2392-4> PMID: 28721581
- [19] D, Weislo-Dziadecka, B.; Grabarek, Z.; Zmarzly, N.; Skubis, A.; Sikora, B. Kruszniewska-Rajs, C. ... & Kucharz, E. Influence of Adalimumab on the Expression Profile of Genes Associated with the Histaminergic System in the Skin Fibroblasts *In Vitro*. *BioMed Res. Int.*, **2018**.
- [20] Betel, D.; Wilson, M.; Gabow, A.; Marks, D. S.; Sander, C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic acids research*, **2008**, *36*(suppl_1), D149-D153.
- [21] Washio, I.; Nakanishi, T.; Ishiguro, N.; Bister, B.; Tamai, I. Effect of endogenous multidrug resistance 1 and P-glycoprotein expression on anticancer drug resistance in colon cancer cell lines. *Biopharm. Drug Dispos.*, **2019**, *40*(1), 32-43. PMID: 30556139

- [22] Dewangan, J.; Srivastava, S.; Rath, S.K. Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumour Biol.*, **2017**, *39*(3), 1010428317695035
<http://dx.doi.org/10.1177/1010428317695035> PMID: 28349817
- [23] Mao, Z.; Wu, Y.; Zhou, J.; Xing, C. Salinomycin reduces epithelial-mesenchymal transition-mediated multidrug resistance by modifying long noncoding RNA HOTTIP expression in gastric cancer cells. *Anticancer Drugs*, **2019**, *30*(9), 892-899.
<http://dx.doi.org/10.1097/CAD.0000000000000786> PMID: 30882398
- [24] Dou, C.; Zhou, Z.; Xu, Q.; Liu, Z.; Zeng, Y.; Wang, Y.; Li, Q.; Wang, L.; Yang, W.; Liu, Q.; Tu, K. Hypoxia-induced TUF1 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activating the Ca²⁺/PI3K/AKT pathway. *Oncogene*, **2019**, *38*(8), 1239-1255.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0505-8> PMID: 30250300
- [25] Schulten, H.J.; Bakhshab, S. Meta-Analysis of Microarray Expression Studies on Metformin in Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*(13), 3173.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms20133173> PMID: 31261735
- [26] Hinshaw, D.C.; Shevde, L.A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res.*, **2019**, *79*(18), 4557-4566.
<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962> PMID: 31350295
- [27] Hinshaw, D.C.; Shevde, L.A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res.*, **2019**, *79*(18), 4557-4566.
<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962> PMID: 31350295
- [28] Laporte, J.; Blondeau, F.; Buj-Bello, A.; Mandel, J.L. The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism. *Trends Genet.*, **2001**, *17*(4), 221-228.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02245-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02245-4) PMID: 11275328
- [29] Pascual, J.; Turner, N. C. 2019. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology.*,
<http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdz133>
- [30] Li, Y.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Lin, Y.; Luo, T.; Xiao, Z.; Zhou, Q. A dual PI3K/AKT/mTOR signaling inhibitor miR-99a suppresses endometrial carcinoma. *Am. J. Transl. Res.*, **2016**, *8*(2), 719-731. PMID: 27158364
- [31] Wang, Y.; Ren, F.; Li, B.; Song, Z.; Chen, P.; Ouyang, L. Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. *J. Cancer*, **2019**, *10*(15), 3303-3314.
<http://dx.doi.org/10.7150/jca.29738> PMID: 31293633
- [32] Hara, T.; Takeda, T.A.; Takagishi, T.; Fukue, K.; Kambe, T.; Fukuda, T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J. Physiol. Sci.*, **2017**, *67*(2), 283-301.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12576-017-0521-4> PMID: 28130681
- [33] Barresi, V.; Valenti, G.; Spampinato, G.; Musso, N.; Castorina, S.; Rizzarelli, E.; Condorelli, D.F. Transcriptome analysis reveals an altered expression profile of zinc transporters in colorectal cancer. *J. Cell. Biochem.*, **2018**, *119*(12), 9707-9719.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcb.27285> PMID: 30129075
- [34] Singh, C.K.; Malas, K.M.; Tydrick, C.; Siddiqui, I.A.; Iczkowski, K.A.; Ahmad, N. Analysis of zinc-exporters expression in prostate cancer. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 36772.
<http://dx.doi.org/10.1038/srep36772> PMID: 27833104
- [35] Zhao, M.; Luo, R.; Liu, Y.; Gao, L.; Fu, Z.; Fu, Q.; Luo, X.; Chen, Y.; Deng, X.; Liang, Z.; Li, X.; Cheng, C.; Liu, Z.; Fang, W. miR-3188 regulates nasopharyngeal carcinoma proliferation and chemosensitivity through a FOXO1-modulated positive feedback loop with mTOR-p-PI3K/AKT-c-JUN. *Nat. Commun.*, **2016**, *7*, 11309.
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11309> PMID: 27095304
- [36] Zhou, S.J.; Deng, Y.L.; Liang, H.F.; Jaoude, J.C.; Liu, F.Y. Hepatitis B virus X protein promotes CREB-mediated activation of miR-3188 and Notch signaling in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.*, **2017**, *24*(9), 1577-1587.
<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.87> PMID: 28574502
- [37] Zhang, R.; Xu, J.; Zhao, J.; Bai, J. Mir-30d suppresses cell proliferation of colon cancer cells by inhibiting cell autophagy and promoting cell apoptosis. *Tumour Biol.*, **2017**, *39*(6), 1010428317703984
<http://dx.doi.org/10.1177/1010428317703984> PMID: 28651493
- [38] Hosseini, S.M.; Soltani, B.M.; Tavallaee, M.; Mowla, S.J.; Tafsiiri, E.; Bagheri, A.; Khorshid, H.R.K. Clinically Significant Dysregulation of *hsa-miR-30d-5p* and *hsa-let-7b* Expression in Patients with Surgically Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, **2018**, *10*(2), 98-104. PMID: 29849986
- [39] Klutstein, M.; Nejman, D.; Greenfield, R.; Cedar, H. DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Res.*, **2016**, *76*(12), 3446-3450.
<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3278> PMID: 27256564
- [40] Sromek, M.; Glogowski, M.; Chechlinska, M.; Kulinczak, M.; Szafron, L.; Zakrzewska, K.; Owczarek, J.; Wisniewski, P.; Wlodarczyk, R.; Talarek, L.; Turski, M.; Siwicki, J.K. Changes in plasma miR-9, miR-16, miR-205 and miR-486 levels after non-small cell lung cancer resection. *Cell Oncol. (Dordr.)*, **2017**, *40*(5), 529-536.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13402-017-0334-8> PMID: 28634901

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

RESEARCH ARTICLE

Analysis of the Differences in the Expression of mRNAs and miRNAs Associated with Drug Resistance in Endometrial Cancer Cells Treated with Salinomycin

Piotr Januszyk^{1,*}, Krzysztof Januszyk², Magdalena Wierzbik-Strońska³, Dariusz Boron^{1,3,4} and Benjamin Grabarek^{3,4}

¹Department of Gynecology and Obstetrics with Gynecologic Oncology, Ludwik Rydygier Memorial Specialized Hospital, Kraków, Poland; ²Faculty of Health Science, Public Higher Medical Professional School in Opole, Poland; ³Department of Histology, Cytophysiology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Technology in Katowice, Zabrze, Poland; ⁴Department of Clinical Trials, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology Krakow Branch, Poland

Abstract: Background: It is important to understand the molecular mechanisms involved in cancer drug resistance and to study the activity of new drugs, e.g. salinomycin.

Objective: The purpose of the study was to analyze changes in the expression of genes associated with drug resistance in the Ishikawa endometrial cancer cell line when treated with salinomycin. In addition, changes in the level of miRNA potentially regulating these mRNAs were evaluated.

Materials and Methods: Endometrial cancer cells were treated with 1 µM of salinomycin for 12, 24 and 48 hours periods. Untreated cells were a control culture. The molecular analysis consists of mRNA and miRNA microarray analysis and the RTqPCR technique.

Results: The following was observed about the number of mRNAs differentiating the cell culture exposed to the drug compared to a control culture: H-12 vs. C - 9 mRNAs, H_24 vs. C - 6 mRNAs, and H_48 vs. C - 1 mRNA. It was noted that 4 of the 9 differentiating mRNAs were characteristic for 12 hours of exposure to salinomycin and they correspond to the following genes: *TUFT1*, *ABCB1*, *MTMR11*, and *MX2*. After 24 hours, 2 mRNAs were characteristic for this time of incubation cells with salinomycin: *TUFT1* and *MYD88* and after 48 hours, *SLC30A5* could also be observed. The highest differences in expression were indicated for *TUFT1*, *MTMR11*, and *SLC30A5*. The highest influence probability was determined between *TUFT1* and hsa-miR-3188 (FC + 2.48), *MTMR11* and hsa-miR-16 (FC -1.74), and between *SLC30A5* and hsa-miR-30d (FC -2.01).

Conclusions: Salinomycin induces changes in the activity of mRNA and miRNA participating in drug resistance; however, the observed changes in character are the expected result of anti-cancer treatment.

ARTICLE HISTORY

Received: February 04, 2020
Revised: March 26, 2020
Accepted: May 29, 2020

DOI:
10.2174/1389201021666200629151008

Keywords: Cancer drug resistance, salinomycin, micro RNA, endometrial cancer cells, molecular analysis.

1. INTRODUCTION

The occurrence of drug resistance was first observed in relation to the loss of sensitivity by bacterial cells to antibiotics [1]. In order to get a better understanding of etiopathogenesis, for many inflammatory illnesses, the understanding of drug resistance was widened also for other drugs, not just antibiotics, and therefore also non-bacterial illnesses. The

loss of an adequate answer to treatment is observed in oncology [2, 3]. It is suggested that the described occurrence is connected with the appearance of new genetic mutations, metabolic changes in cancer cells, the inactivation of the drug, changes in the molecular focus of treatment, terminating the process of programmed cell death, the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), cell heterogeneity, the influence of epigenetic factors, as well as any mixture of the aforementioned factors [4, 5].

For this reason, it is indicated that a combined therapy using more than one drug simultaneously could be a better therapeutic strategy option in comparison to monotherapy.

*Address correspondence to this author at the Department of Gynecology and Obstetrics with Gynecologic Oncology, Ludwik Rydygier Memorial Specialized Hospital, Kraków, Poland;
E-mail: piotrijanuszyk233@gmail.com

the transcriptional activity of genes in the context of carcinogenesis [7, 8].

The activation of procaspases occurs as part of two different mechanisms: homoactivation and heteroactivation. The first of these involves the activation of initiator caspases such as -8/-10 and -9 through autoproteolysis and is connected with the formation of complexes, such as death-inducing signaling complex (DISC), which is significant in the course of the receptor and mitochondrial pathways of apoptosis, as well as Apoptosome. In the process of the forming of these complexes, the oligomerization of caspase molecules is observed. After that, molecular reorganization takes place of the remaining complexes, which results in autoproteolysis of initiator procaspases and the formation of their active heterotetramers. Full activation of caspases through oligomerization increases their activity, which results in the activation of further caspases (or caspase cascades). Whereas heteroactivation leads to the catalytic attack of initiator caspases (e.g. -8/-10,-9), or other proteases, such as granzyme B or calpain on exclusive caspases, as a consequence, the formation of active enzymatic caspases takes place.

Molecular reorganization of the DISC complex leads to the autoproteolysis of initiator procaspases (-2, -8, -9,-10) and the creation of their active forms (heterotetramers), through which the activation of regulator procaspases occurs. These last enzymes, either individually or together with other caspases, take part in protein proteolysis of cell substrates, which leads to the damaging of the structure and function of the cells as well as their death [9, 10]. Recent findings indicate that a promising anticancer strategy is a treatment using an ionophore antibiotic- salinomycin, its high effectiveness was observed in the treatment of gynecological cancers such as breast and ovarian cancer, among others, and also in the case of tumors characterized by a high risk of developing drug resistance to chemotherapy [11].

As of now, the exact mechanism through which salinomycin affects the apoptosis of changed cancer cells is not understood fully. Nonetheless, however, what has been described are the overexpression of caspases 3,8 and 9 of the proapoptotic protein Bax; the decrease in the expression of the anti-apoptotic protein Bcl2; nuclear factor kappa B (NFkB) under the influence of salinomycin [12].

The endometrial cancer cell lines, such as Ishikawa (correspond to histological grade 1 - G1 and type I endometrial cancer), EC-1-A, HEC-1-B (correspond to histological grade 2 – G2 and type II endometrial cancer) and KLE (correspond to histological grade 3 – G3 and type II endometrial cancer) are well-described, useful models for *in vitro* analysis. The Ishikawa cell line was originally obtained from a 39-year-old Japanese patient suffering from an endometrial adenocarcinoma. Cells of Ishikawa culture are estrogens and progesterone receptor positive. In turn, HEC-1-A and HEC-1-B were obtained from a 71-year-old patient with diagnosed endometrial adenocarcinoma, while the KLE culture was obtained from a 65-year-old woman in advanced disease [13].

Not much is known about the molecular working of salinomycin on endometrial cancer cells. This has become a premise for conducting research as part of this work.

The aim of this study was to analyze the variances in the expression pattern of signaling pathways that are caspase-dependent in endometrial cancer cells of the Ishikawa cell line when under the influence of salinomycin during treatment using the drug. Additionally, changes in the miRNA level that could potentially regulate these mRNAs were evaluated.

2. MATERIAL AND METHODS

As material in this project, endometrial cancer cells from cell line Ishikawa were used. The culture was carried out in Minimum Essential Medium (MEM) with 2 mM of glutamine, 1% Non-Essential Amino Acids (NEAA), and 5% Fetal Bovine Serum (FBS), as recommended by the manufacturer. The cells were in a 5% CO₂ enriched atmosphere at a constant temperature of 37°C. All reagents that were used were purchased from the Sigma Aldrich company (St Louis, MO, USA).

In all parts of this study (cell culture, isolation of RNA, microarray, RTqPCR, evaluation of caspases activity) for each biological replicate, three technical replicates were performed.

The data represents the mean +/- SD of 3 separate experiments, each performed in triplicate.

In order to indicate and then assess the influence of salinomycin on the expression of mRNAs and miRNAs, 1 µM of the drug was added to the cells, and then the cells were cultured together with the drug for 12, 24 and 48 hours. The control culture was that cells were untreated by the drug. The total ribonucleic acid extraction was carried out using the TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. The evaluation of the expression pattern of mRNAs associated with the drug resistance was completed using oligonucleotide microarrays HG-U133A 2_0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) just as the manufacturer recommended. The assessment of the expression profile of miRNAs that participated in the regulation of drug resistance genes was carried out using GeneChip® miRNA 2.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). The detailed protocol that was used by us for molecular analysis is described previously [14].

The third step of molecular analysis included the RTqPCR reaction, and it was performed to validate the changes observed in the transcriptional activity of mRNAs: *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, and the miRNAs: *hsa-miR-30d*, *hsa-miR-21*, *h-miR-1271*.

CASP3, *CASP8*, and *CASP9* were chosen for further molecular analysis because they differentiate endometrial cancer cells exposed to salinomycin compared to a control cell culture regardless of the incubation time of the cells with the drug.

In addition, in order to confirm the apoptosis via mitochondrial path or not, the changes in transcriptional activity of Bcl-2 genes family: *Bcl-2l* and *Bcl-w* (anti-apoptotic), *Bax* and *Bak* (pro-apoptotic) were evaluated via microarray and RTqPCR methods.

The reaction was conducted with the use of SensiFAST™ SYBR No-ROX One-Step Kit, (Bioline, London, UK),

where β -actin was used as the endogenous control, and the expression was presented as a fold change of the gene expression and compared to the control (the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method).

The evaluation of caspases -3, -8 and -9 was carried out using the caspase-8, -9 activity assays (Caspase-8/Caspase-9 Colorimetric Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA), the caspase-3 activity was determined in cell lysates (EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1 (Molecular Probes, Minneapolis, Willow Creek Rd. USA) in accordance with the manufacturer's protocol. The measurement of the absorbance at $\lambda = 405$ nm (caspase-8 and 9) and $\lambda = 520$ nm (caspase-3) permitted the level of caspase activity in cell lysates to be determined.

Statistical analysis of the microarray data was carried out with the use of the Transcriptome Analysis Console (Thermo Fisher, USA) and STATISTICA 13 PL (Cracow, Poland) software to analyze the results obtained using RTqPCR. The one-way ANOVA and Tukey post-hoc tests were used in order to determine the differentially expressed genes ($|FC| \geq 1$; $p < 0.05$). In order to show which of the miRNAs indicated in microarray analysis were engaged in the regulation of the expression of the selected mRNAs, the microRNA database (<http://microrna.org>) was used as suggested in the protocol. The miRanda-mirSVR algorithm was used to find a relation to target mRNA for the relevant miRNA molecules (miRanda) and designate a potential interaction between mRNA: miRNA (mirSVR). miRanda target sites and mirSVR scores are available at <http://www.microRNA.org>. Based on the miRNA SVR score parameter, the relationship between the respective miRNA and the mRNA was determined. The cut-off of -0.1 or lower is used as the cut-off point for this parameter based on the data from the literature [15].

3. RESULTS

Based on the Affymetrix database, it was confirmed that 59 from the 22227 mRNAs present on the microarray plate were connected to caspase-dependent signaling pathways. The one-way analysis using the ANOVA variance test with Benjamini-Hochberg's procedure was used for the comparison of all examined transcriptome groups with the control and determining which of these noted variances in the expression of mRNA were statistically significant ($p < 0.05$). It was observed that out of 59 mRNAs, 14 mRNAs differentiated the cell culture when exposed to salinomycin in comparison to the control endometrial cancer culture ($p < 0.05$). After that, the post-hoc Tukey test was carried out. This step of the

statistical analysis allowed the indication of the number of mRNAs that specifically differentiated the culture with the drug in comparison to the control (Table 1).

Based on the displayed results, it is worth noting that the number of mRNAs differentiating the endometrial cancer cells exposed to salinomycin, and compared with the control cell culture for every incubation time of the cells with the drugs are as follows: H-12 vs. C - 8 mRNAs, H_24 vs. C -10 mRNAs, H_48 vs. C - 3 mRNA.

It was observed that 5 of the 14 differentiating mRNAs were common for all of the incubation time of the cells, and they correspond with the following genes: *CASP3*, *CASP8*, and *CASP9* (Differentially Expressed Genes - DEG). For this reason, further molecular analysis was focused on the three caspases mentioned.

After 12 hours of exposition of the endometrial cancer cells to the drug, only 2 mRNAs (*CASP1*, *CASP2*) were specifically differentially expressed genes (DEG). After 24 hours, only 1 of the mRNAs was characteristic for this incubation time of the cells with salinomycin: *CASP6* (DEG). No mRNA characteristic for 48-hours of incubation of the cells with the drug was noted (Table 2).

Differences in the transcriptional activity of *CASP3*, *CASP8*, and *CASP9*, depending on the exposition of cells to salinomycin obtained through RTqPCR are shown in Figs. (1-3). The expression pattern of these three genes designated using the microarray technique was verified using the RTqPCR technique.

The next stage was connected with the indication of micro RNA molecules (miRNAs) that could potentially regulate the expression of *CASP3*, *CASP8*, and *CASP9*. It should be noted that the miRNA SVR score parameter relation between the respective miRNA and mRNA was conclusive. The highest probability of influence was determined between *CASP3* and hsa-miR-30d (average FC -2.01, miRSVR score -0.3918), *CASP8* and hsa-miR-21 (average FC +1.39, miRSVR score -0.7787), and between *CASP9* and hsa-miR-1271 (average FC +1.71, miRSVR score -0.5220). The validation of the microarray expression profile of three miRNAs (hsa-miR-30d, hsa-miR-21, hsa-miR-1271) that most likely regulate expression (miRanda: miRSVR algorithm) of *CASP3*, *CASP8* and *CASP9* was determined through the RTqPCR method (Table 3).

The last step of our analysis was associated with evaluating caspase-3, -8 and -9 activity in endometrial cancer cells

Table 1. List of the mRNAs differentiating the individual transcriptome groups indicated with the use of the post-hoc multi comparison Tukey test ($p < 0.05$).

Transcriptome Group	H-C	H-12	H-24	H-48
H-C	14	8	10	3
H-12	9	14	10	9
H-24	7	7	14	10
H-48	13	8	7	14

Table 2. List of the mRNAs associated with the caspase-dependent signaling path, differentiating endometrial cancer cells treated with salinomycin, compared to the control culture.

ID	Gene Symbol	12 Hours (Up/Down)	FC (12 Hours vs. C)	24 Hours (Up/Down)	FC (24 Hours vs. C)	48 Hours (Up/Down)	FC (48 Hours vs. C)
202763_at	<i>CASP3</i>	up	+2.11	up	+2.08	up	+1.74
207686_s_at	<i>CASP8</i>	down	-1.41	down	-1.55	up	+1.08
213373_s_at	<i>CASP8</i>	down	-1.45	down	-1.43	up	+1.02
203984_s_at	<i>CASP9</i>	up	+2.16	up	+2.84	up	+2.55
210775_x_at	<i>CASP9</i>	up	+1.89	up	+2.41	up	+2.44
206011_at	<i>CASP1</i>	up	+1.36	up	+1.22	down	-1.01
211366_x_at	<i>CASP1</i>	up	+1.32	up	+1.25	down	-1.06
211367_s_at	<i>CASP1</i>	up	+1.38	up	+1.21	up	+1.02
211368_s_at	<i>CASP1</i>	up	+1.32	up	+1.33	up	+1.08
208050_s_at	<i>CASP2</i>	up	+1.22	up	+1.02	down	-1.09
209811_at	<i>CASP2</i>	up	+1.18	up	+1.03	down	-1.07
34449_at	<i>CASP2</i>	up	+1.19	up	+1.05	down	-1.01
211464_x_at	<i>CASP6</i>	down	-1.26	down	-1.09	up	+1.12
205467_at	<i>CASP10</i>	up	+1.11	up	+1.19	up	+1.04

(+) overexpression of gene (increased level of mRNAs); (-) suppressed gene expression (decreased level of mRNAs); ID - ID of the probe on a microarray; FC - fold change, C - control culture; 12h. 24h. 48h of exposure to salinomycin.

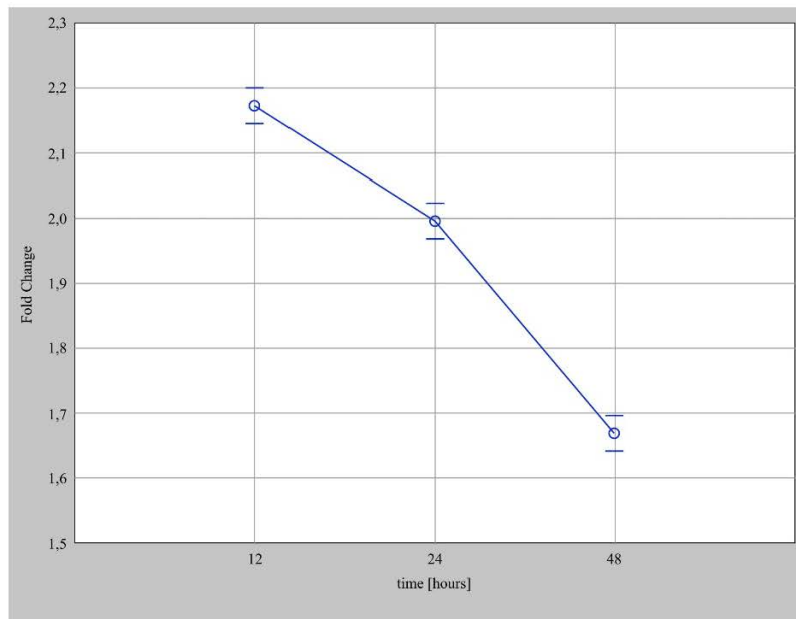


Fig. (1). Expression of CASP3, depending on the exposure time of the Ishikawa line cells to salinomycin (RT-qPCR). [The data represents the mean \pm SD of 3 separate experiments, each performed in triplicate. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

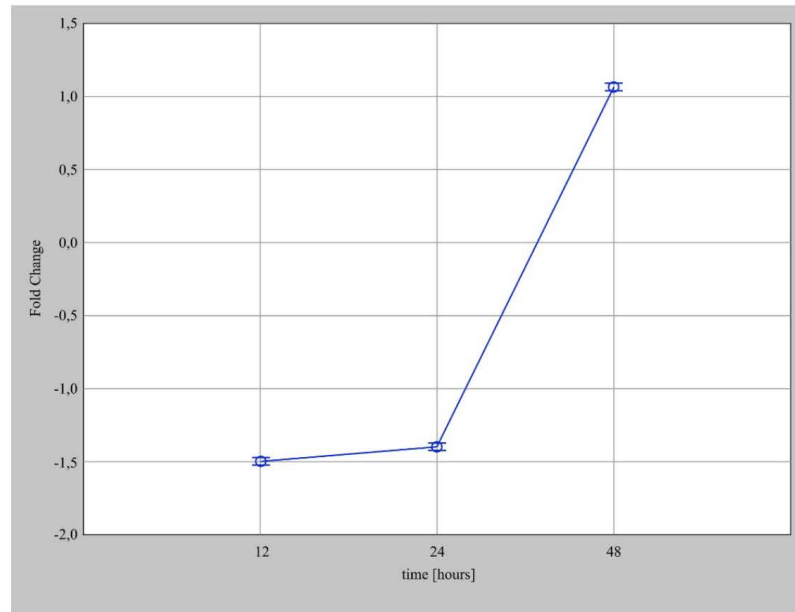


Fig. (2). Expression of CASP8, depending on the exposure time of the Ishikawa line cells to salinomycin (RT-qPCR). [The data represents the mean \pm SD of 3 separate experiments, each performed in triplicate. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

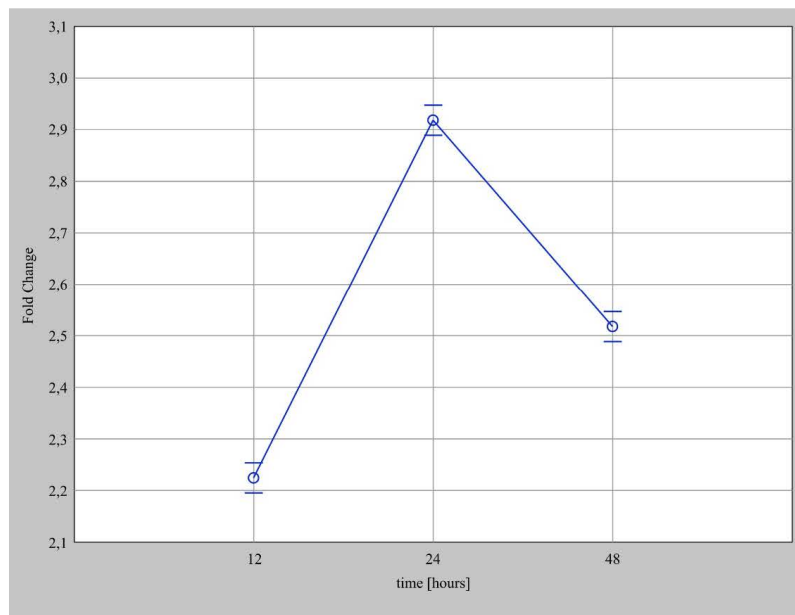


Fig. (3). Expression of CASP9, depending on the exposure time of Ishikawa line cells to salinomycin (RT-qPCR). [The data represents the mean \pm SD of 3 separate experiments, each performed in triplicate. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Table 3. The expression profile of hsa-miR-30d, hsa-miR-21, hsa-miR-1271 obtained by microarray and RTqPCR assays.

Compared Group	miRNA	Expression (FC)	
		Microarray	RTqPCR
H_12 vs. C	hsa-miR-30d	-1.04	-1.11
H_24 vs. C		-2.01	-2.06
H_48 vs. C		-2.98	-2.96
H_12 vs. C	hsa-miR-21	+1.38	+1.32
H_24 vs. C		+1.27	+1.28
H_48 vs. C		+1.52	+1.44
H_12 vs. C	hsa-miR-1271	+4.96	+4.83
H_24 vs. C		-4.41	-4.69
H_48 vs. C		+4.58	+4.32

Table 4. The activity of caspases 3, 8 and 9 in endometrial cancer cells treated with 1 μ M salinomycin for 12, 24 and 48 hours in comparison to a control culture ($p < 0.05$; Control – cells treated with PBS; 100%).

Time [Hours]	Caspase-3 [%]	Caspase-8 [%]	Caspase-9 [%]
12	136.52 \pm 0.46*	102.70 \pm 0.71	125.33 \pm 0.48*
24	146.89 \pm 1.52*	101.89 \pm 0.13	141.41 \pm 2.11*
48	156.53 \pm 0.42*	101.19 \pm 0.23	131.04 \pm 0.09*

* - $p < 0.05$ when compared with a control.

exposed to salinomycin for 12, 24 and 48 hours. To determine the level of these caspases, commercially available assays were used. This stage allowed us to examine the pro-apoptotic properties of salinomycin. Statistically significant differences were observed in the level of caspase-3 and -9 ($p < 0.05$). However, changes in caspase-8 were not statistically significant ($p > 0.05$). In Table 4 and Fig. (4), the results of caspase activity obtained by using commercially available assays were presented.

The last stage of our work was associated with confirming or exclusion induce apoptosis via mitochondrial path by salinomycin. Therefore, expression changes of Bcl-2 genes family: *Bcl-2l* and *Bcl-w* (anti-apoptotic), *Bax* and *Bak* (pro-apoptotic) were assessed (Table 5).

The obtained results indicated that after adding salinomycin to endometrial cancer cell culture, pro-apoptotic members of Bcl-2 genes family were overexpressed, while anti-apoptotic members were silenced. The statistical analysis showed that changes in expression of selected BCL-2 genes family were significant in comparison with a control (untreated with salinomycin cell culture) (Table 5; $p < 0.05$). This part of the molecular analysis suggests that salinomycin induces the programmed cell death via mainly mitochondrial-related pathway.

4. DISCUSSION

Research carried out as part of this work aimed to define the effect of salinomycin on the expression profile of caspa-

ses and miRNA molecules that are potentially engaged in the regulation of their expression in endometrial cancer. Currently, the largest number of studies on the effect of salinomycin in the course of neoplastic illnesses concentrates around ovarian and breast cancer carried out on an *in vitro* and *in vivo* model [11, 12]. However, there is a lack of studies about salinomycin in endometrial cancer, which is the sixth most commonly diagnosed gynecological cancer in women after the endometrium. It was confirmed that salinomycin effectively decreases the number of cancerous cells, including cancer stem cells, however, the induction mechanism of programmed cell death by this drug remains unclear [16].

Caspases are proteolytic enzymes with a significant role in the course of apoptosis. This process could take place through an external pathway induced by the interaction with a ligand, such as the tumor necrosis factor α with the death receptor, which in the next stage undergoes trimerization, and allows the activation of the death pathway. The activation of caspases -8/-10 begins the proteolysis of enzymes and proteins of cell structure, which is cascading. Whereas in the interior pathway (mitochondrial), a key role is played by caspases - as well as the executive caspases -3, -6, -7. The activation of procaspase 9 in the result of proteolysis leads to the activation of procaspase -3 or -7 which in turn activates the caspase cascades and proteolysis of cell proteins, in which calpains and also caspase-activated DNase are engaged [17].

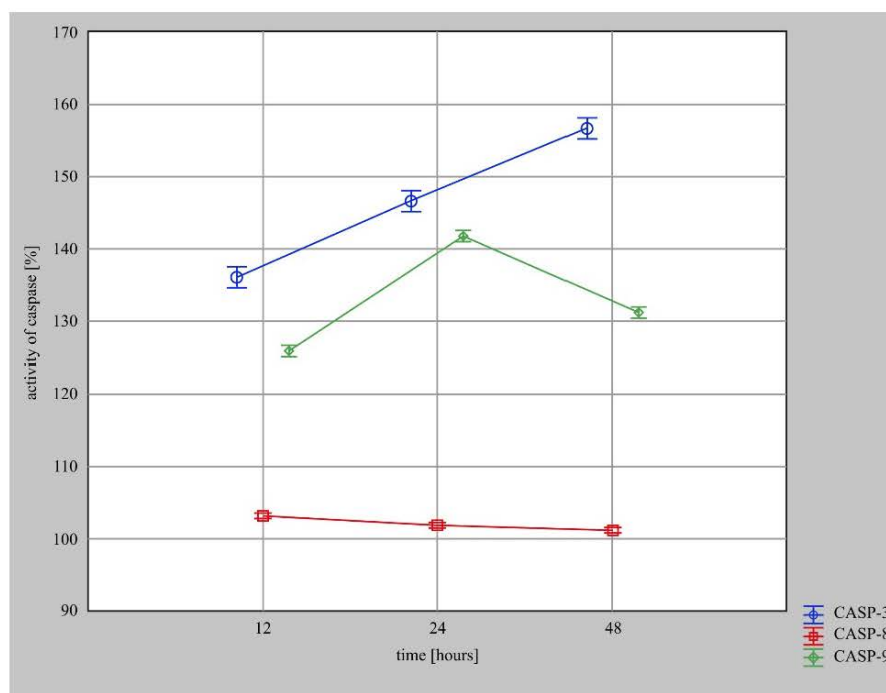


Fig. (4). Evaluating caspase-3, 8 and 9 activity in endometrial cancer cells exposed to salinomycin for 12, 24 and 48 hours. [The data represents the mean \pm SD of 3 separate experiment, each performed in triplicate].

Table 5. Expression profile of *Bcl-2l* and *Bcl-w* (anti-apoptotic), *Bax* and *Bak* (pro-apoptotic) genes in endometrial cancer cells treated with μ M salinomycin for 12, 24 and 48 hour periods in comparison to a control culture ($p < 0.05$).

Compared Group	H_12 vs. C		H_24 vs. C		H_48 vs. C	
	Microarrays	RTqPCR	Microarrays	RTqPCR	Microarrays	RTqPCR
	Fold Change		Fold Change		Fold Change	
<i>Bcl2l</i>	-8.09	-7.46	-11.07	-11.98	-10.69	-10.03
<i>Bcl-w</i>	-6.11	-5.14	-8.14	-7.35	-8.99	-9.65
<i>Bax</i>	+12.44	+11.74	+13.09	+12.89	+12.11	+9.97
<i>Bak</i>	+14.36	+12.74	+15.02	+14.01	+13.84	+12.26

Microarray analysis of the profile indicated that *CASP3*, *CASP8* and *CASP9*, which encode caspases -3,-8 and -9 respectively, change their activity under the influence of 1 μ M of salinomycin added to the *in vitro* endometrial cancer cell culture to the largest degree. The results were confirmed using the RTqPCR technique. Ho *et al.*, in research regarding the influence of berberine in the context of tongue cancer, also observed statistically significant changes in the expressions of the same caspases as we did in our research. They determined that together with an increase in the exposition time of the tongue cancer cells to berberine, an increase in the activity of caspases -3,-8 and -9 in comparison to the

control and shorter incubation time, which is partly convergent with our observations [18]. As a result, it might seem that salinomycin induces apoptosis through the interior pathway (mitochondrial) [16]. Observations on the transcriptome level were also confirmed on the protein level, where only caspases -3 and -9 were noted to have a significant increase in their activity, whereas the changes in the expression of caspase-8 were not statistically significant. What is significant, from the point of assessing the effectiveness of salinomycin therapy as a result of endometrial cancer, is that *in vitro* analysis suggests that this ionophore antibiotic permanently induces changes, including cell death, as even with

the longest exposition time of the cells to salinomycin, the overexpression of the caspases -3 and -9 continues in comparison to the control culture. Zhang *et al.* were assessing the influence of salinomycin on the expression profile of caspases and other proteins of the apoptosis pathway in a prostate cancer model. They determined that an increased level in caspase-12 under the influence of salinomycin as well as a decreased expression of caspase-3 when the cells were treated simultaneously with salinomycin and 4-phenylbutyrate. Based on the obtained results, Zhang *et al.* confirmed that salinomycin increases cell stress, which leads to changes in the endoplasmic reticulum and apoptosis. Fu *et al.* also indicate an increase in the concentration of caspase-3 in the case of breast cancer as a result of treating the cancer cells with salinomycin. They determined that the expression of caspases was over 4 times higher in comparison to cells unexposed to the drug [20], whereas our analysis indicated a 2-fold change higher than the expression in the Ishikawa cell culture with salinomycin. The potential cause of these differences in the fold change of the expression of caspase-3 presented in the research by Fu *et al.* [20] and our research could be, not only a different cell model, but also with a longer incubation time with salinomycin, which lasted 6 days. The concentration of salinomycin - 1 μM - in the cited work [20] and in our research was identical. Moreover, it can be determined that salinomycin is characterized by the speed of action, as changes in the expression of the assessed mRNA could be observed already after 12 hours of incubation. It can also be seen that the transcriptome is a compound characterized by dynamism and plasticity, and the chosen experimental model- the Ishikawa cell line - is a useful experimental model.

The observations of Gao *et al.* are also interesting, as they confirmed the induction of cell death of cardiomyocytes by salinomycin on an animal model - that of chickens. They also determined that the drug most strongly caused changes in the expression of caspases -3 and -9 (increase in activity) on the gene and protein levels in comparison to the expression of caspase-8 [21]. Therefore, it may be assumed that salinomycin causes cell apoptosis through the interior pathway (mitochondrial) not only regardless of the type of cancer, but also the type of cell and the chosen experimental model. This is an important report, as it indicates that changes in the expression of caspases -3 and -9 could be considered as new supplementary markers of the answer to salinomycin treatment. However, further analysis using caspase-3 or -9 inhibitor is necessary to confirm this point of view.

The second part of our research included checking whether salinomycin affects miRNA transcriptome of endometrial cancer cells exposed to salinomycin as well as what is the regulatory effect of the chosen miRNA of expression proliferation *CASP3*, *CASP8*, and *CASP9*. MiRNA affects mRNA on the basis of nucleotide sequence complementarity, wherein the effect of their action could be both a decrease as well as an increase in the transcriptional activity of the target transcript [22]. Based on microarray analysis of the miRNA profile, it can be determined that salinomycin affects the epigenomes as well as that the determined changes in the expression pattern of the chosen caspases could be a result of not only the workings of the drug but also a result of the regulatory role of the miRNAs.

The fact that the selected miRNAs can have a real effect on the expression of target mRNA in the experiment is also evidenced by the fact that the mRNA:miRNA relationship was determined based on the moRSVR Score parameter, providing information about the complementarity between the hybrid molecules [15].

The highest impact probability was determined between *CASP3* (up-regulated) and hsa-miR-30d (FC -2.01), *CASP8* (down-regulated) and hsa-miR-21 (FC +1.39), and between *CASP9* (up-regulated) and hsa-miR-1271 (FC +1.71).

In relation to hsa-miR-30d, a decrease in its expression was determined which was accompanied by an increase in the activity of *CASP3*. The observed expression relationship between the mRNA *CASP3* and the hsa-miR-30d mRNA and the level of *CASP3* protein suggests that salinomycin may affect the level of methylation of CpG islands within the *CASP3* nucleotide sequence, which translates into reduced mRNA expression. In contrast, accompanying a decrease in *CASP3* expression at the transcriptome level, an increase in protein concentration may be the result of a decrease in the activity of hsa-miR-30d, which is potentially involved in the regulation of mRNA *CASP3* expression [22].

It was confirmed that hsa-miR-30d is an important, useful marker for assessing the advancement of neoplastic changes in prostate cancer. An increase in the level of this miRNA molecule was described in patients with worse prognosis, which demanded a more aggressive treatment [23]. Moreover, it was noted that the expression pattern of hsa-miR-30d indicates the effectiveness of salinomycin, the sensitivity of cells to salinomycin as well as an increase in *CASP3*, contributing to changed cancer cell apoptosis. Furthermore, the role of hsa-miR-30d is broadly discussed in the context of its effect on the proliferation of cells. The observation that the miRNA molecule alone affects the proliferation, differentiation and cell death seems reasonable [24,25]. Whereas, the observation made by Muhammad *et al.* in the context of large intestine cancer indicates that a decreased expression of hsa-miR30d was a factor that promoted the proliferation of cancer cells [26]. Therefore it suggests the dualism of action that hsa-miR30d possesses in the process of the neoplastic transformation. Ipso facto, when assessing whether an increase or rather silencing in the activity of hsa-miR30d is a useful factor, should include the biological context, as well as the type of tumor, and also the location, such as in relation to the representatives of the transforming growth factor-beta (TGF β) superfamily [27]. Similar observations are presented by Kuo *et al.*, who assessed the effect of salinomycin on the expression profile of miRNA in head and neck squamous cell carcinoma stem cells [28].

In turn, for two of the following differentiating cultures exposed to salinomycin compared to the control, an increase in the expression of miRNA molecules - hsa-miR-21 and hsa-miR-1271 was noted. The role of hsa-miR-21 is described in the context of the death pathway receptor, activated by the FAS ligand, whereas hsa-miR-1271 is connected with the gaining of resistance to treatment with cisplatin [29]. However, only concerning hsa-miR-21 was the first characterized function of mRNA confirmed, as a negative regulator of gene expression, including in the case of *CASP8*.

An increased expression of hsa-miRNA-21 (FC=2.3) was observed by Torres *et al.* in endometrial cancer, comparing biopsies to each other obtained from 20 female patients with clippings obtained from 10 volunteers (control) [30]. Our analysis indicates overexpression of this mRNA in comparison to the control on the level of FC=1.3, which would suggest that the difference in the fold change on the expression between observations of Torres *et al.* [30] and those obtained in this work could be a result of the effect of salinomycin. Also, Bin *et al.* describe the direct relationship between hsa-miR-21 and *CASP8* and the effect of them on its expression caused by this miRNA molecule. An overexpression of hsa-miR-21 was connected with the increase in the survival and proliferation of cancer cells with the simultaneous inhibition of apoptosis [31]. As a result of this, although it seems that salinomycin affects, above all, on the mitochondrial death pathway, it can be assumed that, to a lesser extent, it affects the regulation of the receptor pathway. Furthermore, Liu *et al.*, based on their research, postulate that the role of hsa-miR-21 in two types of pathways leading to cell apoptosis as a consequence [32]. This shows the complex picture of the cancer process as well as the multidirectional effect of salinomycin.

The last of the differentiating miRNA for which the largest probability of effecting *CASP9* was observed is hsa-miR-1271, indicated as a molecule, whose changes in expression are a reflection of the cancer cell's sensitivity to chemotherapy, and also in proliferation, apoptosis and metastasis [33,34]. Moreover, Yao *et al.* noted an increase in the proapoptotic activity of the Bax protein and caspase 9, with a simultaneous decrease in the expression of anti-apoptotic proteins, such as Bcl-2 in miR-1271-mimic-treated colorectal cancer cells [34]. Observations on the role of hsa-miR-1271 in comparison to the expression of caspase-9 are also confirmed in the research done by Xie *et al.* [35]. It is worth noting that the obtained results of hsa-miR-1271 expression in the endometrial cell culture exposed to salinomycin showed that after 12 and 48 hours, the level of hsa-miR-1271 is higher than in a control culture while after 24 hours incubation the silencing of hsa-miR-1271 expression can be observed. Silencing the expression of hsa-miR-1271 consequently leads to a higher level of *CASP9* after 24 hours incubation cells with salinomycin, this may result from the activation of adaptive mechanisms by cells or/and the effect of other signaling pathways on the expression of the analyzed mRNA and miRNA.

In conclusion, the molecular analysis carried out as part of this work indicates that salinomycin induces the apoptosis of endometrial cancer cells.

It should be noted that in the process of programmed cell death, in addition to the caspase pathway, other signaling pathways are involved, including with p21 or p53 protein. Therefore, it is reasonable to conduct further molecular analyses regarding the effect of salinomycin on the process of apoptosis in endometrial cancer.

CONCLUSION

Salinomycin induces the apoptosis of endometrial cancer cells. The largest increase in activity was noted for caspases

3 and 9, while the expression of caspase 8 was decreased. Salinomycin causes a regulatory effect on the transcriptomes of mRNA and miRNA in *in vitro* endometrial cancer cells. It was also confirmed that the influence of 3 mRNA molecules on the expression profile of the mentioned caspases namely: *CASP3* (up-regulated) and hsa-miR-30d (FC -2.01); *CASP8* (down-regulated) and hsa-miR-21 (FC+1.39); between *CASP9* (up-regulated) and hsa-miR-1271 (FC +1.71).

The carried out analysis indicated that salinomycin has a regulatory effect on mRNA and miRNA transcriptomes in *in vitro* endometrial cancer cells. Further studies are suggested, including those based on an *in vivo* model.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The authors confirm that the data supporting the findings of this research are available within the article.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

All authors were responsible for the concept and design of the study, collection and collation of data, analysis and interpretation of data, writing of the article, reviewing and final reviewing of this article and graphics performance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's website along with the published article.

REFERENCES

- [1] Julien, O.; Wells, J.A. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.*, **2017**, *24*(8), 1380-1389. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.44> PMID: 28498362
- [2] McArthur, K.; Kile, B.T. Apoptotic caspases: multiple or mistaken identities? *Trends Cell Biol.*, **2018**, *28*(6), 475-493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.003> PMID: 29551258
- [3] Poreba, M.; Groborz, K.; Navarro, M.; Snipas, S.J.; Drag, M.; Salvesen, G.S. Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ.*, **2019**, *26*(2), 229-244. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-018-0110-y> PMID: 29748600

- [4] Kopeina, G.S.; Prokhorova, E.A.; Lavrik, I.N.; Zhivotovsky, B. Alterations in the nucleocytoplasmic transport in apoptosis: Caspases lead the way. *Cell Prolif.*, **2018**, *51*(5), e12467. <http://dx.doi.org/10.1111/cpr.12467> PMID: 29947118
- [5] Slattery, M.L.; Mullany, L.E.; Sakoda, L.C.; Wolff, R.K.; Samowitz, W.S.; Herrick, J.S. Dysregulated genes and miRNAs in the apoptosis pathway in colorectal cancer patients. *Apoptosis*, **2018**, *23*(3-4), 237-250. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-018-1451-1> PMID: 29516317
- [6] Anderson, G.R.; Wardell, S.E.; Cakir, M.; Yip, C.; Ahn, Y.R.; Ali, M.; Yllanes, A.P.; Chao, C.A.; McDonnell, D.P.; Wood, K.C. Dysregulation of mitochondrial dynamics proteins are a targetable feature of human tumors. *Nat. Commun.*, **2018**, *9*(1), 1677. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04033-x> PMID: 29700304
- [7] Chen, X.; Wang, L.; Qu, J.; Guan, N.N.; Li, J.Q. Predicting miRNA-disease association based on inductive matrix completion. *Bioinformatics*, **2018**, *34*(24), 4256-4265. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bty503> PMID: 29939227
- [8] Vannini, I.; Fanini, F.; Fabbri, M. Emerging roles of microRNAs in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2018**, *48*, 128-133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2018.01.001> PMID: 29429825
- [9] Stennicke, H.R.; Salvesen, G.S. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1477*(1-2), 299-306. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00281-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00281-2) PMID: 10708865
- [10] Man, S.M.; Kanneganti, T.D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **2016**, *16*(1), 7-21. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2015.7> PMID: 26655628
- [11] Chung, H.; Kim, Y.H.; Kwon, M.; Shin, S.J.; Kwon, S.H.; Cha, S.D.; Cho, C.H. The effect of salinomycin on ovarian cancer stem-like cells. *Obstet. Gynecol. Sci.*, **2016**, *59*(4), 261-268. <http://dx.doi.org/10.5468/ogs.2016.59.4.261> PMID: 27462592
- [12] Gupta, P. B.; Onder, T. T.; Jiang, G.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Weinberg, R. A.; Lander, E. S. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, **2009**, *138*(4), 645-659.
- [13] Kozak, J.; Wdowiak, P.; Maciejewski, R.; Torres, A. A guide for endometrial cancer cell lines functional assays using the measurements of electronic impedance. *Cytotechnology*, **2018**, *70*(1), 339-350. <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-017-0149-5> PMID: 28988392
- [14] Parajuli, B.; Shin, S.J.; Kwon, S.H.; Cha, S.D.; Chung, R.; Park, W.J.; Lee, H.G.; Cho, C.H. Salinomycin induces apoptosis via death receptor-5 up-regulation in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Anticancer Res.*, **2013**, *33*(4), 1457-1462. PMID: 23564786
- [15] Wcislo-Dziadecka, D.; Grabarek, B.; Zmarzly, N. Influence of Adalimumab on the Expression Profile of Genes Associated with the Histaminergic System in the Skin Fibroblasts *In Vitro*. *BioMed Res. Int.*, **2018**.
- [16] Betel, D.; Wilson, M.; Gabow, A.; Marks, D. S.; Sander, C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic acids research*, **2008**, *36*(suppl_1), D149-D153.
- [17] Zhou, J.; Liu, S.; Wang, Y.; Dai, W.; Zou, H.; Wang, S.; Zhang, J.; Pan, J. Salinomycin effectively eliminates cancer stem-like cells and obviates hepatic metastasis in uveal melanoma. *Mol. Cancer*, **2019**, *18*(1), 159. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-019-1068-1> PMID: 31718679
- [18] Kazmierczuk, A.; Kilińska, Z.M. Rola białek szoku cieplnego w apoptozie komórek. Role of heat shock proteins in cell apoptosis. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **2010**, *64*, 273-283. [online].
- [19] Ho, Y.T.; Lu, C.C.; Yang, J.S.; Chiang, J.H.; Li, T.C.; Ip, S.W.; Hsia, T.C.; Liao, C.L.; Lin, J.G.; Wood, W.G.; Chung, J.G. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer Res.*, **2009**, *29*(10), 4063-4070. PMID: 19846952
- [20] Zhang, Y.; Li, F.; Liu, L.; Jiang, H.; Hu, H.; Du, X.; Ge, X.; Cao, J.; Wang, Y. Salinomycin triggers endoplasmic reticulum stress through ATP2A3 upregulation in PC-3 cells. *BMC Cancer*, **2019**, *19*(1), 381. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-019-5590-8> PMID: 31023247
- [21] Fu, C.; Wang, L.; Tian, G.; Zhang, C.; Zhao, Y.; Xu, H.; Su, M.; Wang, Y. Enhanced anticancer effect of oncostatin M combined with salinomycin in CD133⁺ HepG2 liver cancer cells. *Oncol. Lett.*, **2019**, *17*(2), 1798-1806. PMID: 30675240
- [22] Gao, X.; Zheng, Y.; Ruan, X.; Ji, H.; Peng, L.; Guo, D.; Jiang, S. Salinomycin induces primary chicken cardiomyocytes death via mitochondria mediated apoptosis. *Chem. Biol. Interact.*, **2018**, *282*, 45-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.009> PMID: 29331652
- [23] Vasudevan, S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **2012**, *3*(3), 311-330. <http://dx.doi.org/10.1002/wrna.121> PMID: 22072587
- [24] Kobayashi, N.; Uemura, H.; Nagahama, K.; Okudela, K.; Furuya, M.; Ino, Y.; Ito, Y.; Hirano, H.; Inayama, Y.; Aoki, I.; Nagashima, Y.; Kubota, Y.; Ishiguro, H. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget*, **2012**, *3*(11), 1455-1471. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.696> PMID: 23231923
- [25] Lin, Z.Y.; Chen, G.; Zhang, Y.Q.; He, H.C.; Liang, Y.X.; Ye, J.H.; Liang, Y.K.; Mo, R.J.; Lu, J.M.; Zhuo, Y.J.; Zheng, Y.; Jiang, F.N.; Han, Z.D.; Wu, S.L.; Zhong, W.D.; Wu, C.L. MicroRNA-30d promotes angiogenesis and tumor growth via MYPT1/c-JUN/VEGFA pathway and predicts aggressive outcome in prostate cancer. *Mol. Cancer*, **2017**, *16*(1), 48. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-017-0615-x> PMID: 28241827
- [26] Zhang, Z.; He, T.; Huang, L.; Ouyang, Y.; Li, J.; Huang, Y.; Wang, P.; Ding, J. Two precision medicine predictive tools for six malignant solid tumors: from gene-based research to clinical application. *J. Transl. Med.*, **2019**, *17*(1), 405. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-019-02151-8> PMID: 31796117
- [27] Muhammad, S.; Tang, Q.; Wei, L.; Zhang, Q.; Wang, G.; Muhammad, B.U.; Kaur, K.; Kamchedalova, T.; Gang, Z.; Jiang, Z.; Liu, Z.; Wang, X. miRNA-30d serves a critical function in colorectal cancer initiation, progression and invasion via directly targeting the GNA13 gene. *Exp. Ther. Med.*, **2019**, *17*(1), 260-272. PMID: 30651791
- [28] Soleimani, A.; Khazaei, M.; Ferns, G.A.; Ryzhikov, M.; Avan, A.; Hassani, S.M. Role of TGF- β signaling regulatory microRNAs in the pathogenesis of colorectal cancer. *J. Cell. Physiol.*, **2019**. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28169> PMID: 30684274
- [29] Kuo, S.Z.; Blair, K.J.; Rahmy, E.; Kiang, A.; Abhold, E.; Fan, J.B.; Wang-Rodriguez, J.; Altuna, X.; Ongkeko, W.M. Salinomycin induces cell death and differentiation in head and neck squamous cell carcinoma stem cells despite activation of epithelial-mesenchymal transition and Akt. *BMC Cancer*, **2012**, *12*(1), 556. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-556> PMID: 23176396
- [30] Pileczki, V.; Cojocneanu-Petric, R.; Maralani, M.; Neagoe, I.B.; Sandulescu, R. MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer. *Clujul Med.*, **2016**, *89*(1), 50-55. PMID: 27004025
- [31] Torres, A.; Torres, K.; Paszkowski, T.; Radej, S.; Stašiewicz, G.J.; Ceccaroni, M.; Pesci, A.; Maciejewski, R. Highly increased maspin expression corresponds with up-regulation of miR-21 in endometrial cancer: a preliminary report. *Int. J. Gynecol. Cancer*, **2011**, *21*(1), 8-14. <http://dx.doi.org/10.1097/IGC.0b013e318200050e> PMID: 21330826
- [32] Xu, B.; Xia, H.; Cao, J.; Wang, Z.; Yang, Y.; Lin, Y. MicroRNA-21 inhibits the apoptosis of osteosarcoma cell line SAOS-2 via targeting caspase 8. *Oncol. Res.*, **2017**, *25*(7), 1161-1168. <http://dx.doi.org/10.3727/096504017X14841698396829> PMID: 28109080
- [33] Liu, Y.; Ren, L.; Liu, W.; Xiao, Z. MiR-21 regulates the apoptosis of keloid fibroblasts by caspase-8 and the mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway via targeting FasL. *Biochem. Cell Biol.*, **2018**, *96*(5), 548-555. <http://dx.doi.org/10.1139/bcb-2017-0306> PMID: 29527928
- [34] Sun, X.; Zhai, H.; Chen, X.; Kong, R.; Zhang, X. MicroRNA-1271 suppresses the proliferation and invasion of colorectal cancer cells

- by regulating metadherin/Wnt signaling. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **2018**, 32(2)e22028
<http://dx.doi.org/10.1002/jbt.22028> PMID: 29315995
- [35] Yao, H.; Sun, Q.; Zhu, J. miR-1271 enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to cisplatin. *Exp. Ther. Med.*, **2019**, 17(6), 4363-4370.

- <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2019.7501> PMID: 31086572
- [36] Xie, F.; Huang, Q.; Liu, C.H.; Lin, X.S.; Liu, Z.; Liu, L.L.; Huang, D.W.; Zhou, H.C. MiR-1271 negatively regulates AKT/MTOR signaling and promotes apoptosis via targeting PDK1 in pancreatic cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **2018**, 22(3), 678-686. PMID: 29461595

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

Received: 2019.04.04
 Accepted: 2019.05.19
 Published: 2019.06.20

Expression of Semaphorin 3B (SEMA3B) in Various Grades of Endometrial Cancer

Authors' Contribution:
 Study Design: A
 Data Collection: B
 Statistical Analysis: C
 Data Interpretation: D
 Manuscript Preparation: E
 Literature Search: F
 Funds Collection: G

ABE 1 Konrad Dziobek
ABE 2 Marcin Oplawski
CDE 3 Benjamin Grabarek
DF 3 Nikola Zmarzły
E 4 Piotr Januszyk
D 4 Iwona Adwent
C 4 Dariusz Dąbrus
B 4 Ewa Leśniak
C 5 Robert Kiełbasiński
F 6 Przemysław Kieszkowski
A 1,4,7 Dariusz Boroń

1 Center of Oncology, M. Skłodowska-Curie Memorial Institute, Cracow Branch, Cracow, Poland
 2 Department of Gynecology and Obstetrics with Gynecologic Oncology, Ludwik Rydygier Memorial Specialized Hospital, Cracow, Poland
 3 Department of Molecular Biology, Medical University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland
 4 Department Midwifery, Opole Medical High School, Opole, Poland
 5 Department of Obstetrics and Gynecology Ward, Health Center in Mikołów, Mikołów, Poland
 6 Voivodeship Specialist Hospital in Wrocław, Wrocław, Poland
 7 Department of Histology and Cell Pathology, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Medical University of Silesia in Katowice, Zabrze, Poland

Corresponding Author: Konrad Dziobek, e-mail: konraddziobek28@gmail.com

Source of support: The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Silesia in Katowice (KNW/0022/KB/237/16)

Background: SEMA3B is known as an inhibitor of angiogenesis and cell proliferation. During carcinogenesis, the loss of SEMA3B function is observed, which results in the progression of neoplastic changes. The aim of this study was to evaluate the expression profile of SEMA3B in endometrial cancer (G1-G3) in comparison to the control group and to assess whether the observed changes in expression could become a molecular marker in endometrial cancer.

Material/Methods: The study group consisted of 45 patients diagnosed with endometrial cancer (G1, 17; G2, 15; G3, 13). The control group included 15 patients. SEMA3B expression was assessed using the immunohistochemical method. Statistical analysis was carried out using the Statistica 12 PL program (StatSoft, USA). It included the Kruskal-Wallis test and post hoc Dunn's test ($p < 0.05$).

Results: Statistically significant differences in the level of SEMA3B expression were observed between all analyzed groups. The expression pattern of SEMA3B was as follows: cancer cells $G1 > G2 > G3$; endothelial cells: $G3 > G1 > G2$; stromal cells: $G2 > G1 > G3$.

Conclusions: Analysis of the SEMA3B expression profile shows the complexity of neoplastic transformation, which confirms the different expression of SEMA3B in endometrial cancer cells and endothelial cells. The present results and data in the literature data suggest that SEMA3B expression indicates the progression of carcinogenesis in the context of endometrial cancer.

MeSH Keywords: **Angiogenesis Inducing Agents • Apoptosis • Endometrial Neoplasms**

Full-text PDF: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/916762>

 2181  1  1  38



Background

Semaphorins (SEMA) belong to a group of membrane or secretory proteins that influence proliferation, cancer cell migration, angiogenesis, and occurrence of drug resistance [1]. Among the semaphorin family, 8 subgroups can be distinguished, and the occurrence of 3–7 subgroups has been confirmed in vertebrates. The SEMA domain, common to all semaphorins, is key in signal transduction and is responsible for binding semaphorins to receptors [2,3]. Semaphorin 3B (SEMA3B) is a tumor growth suppressor. The biological activity of SEMA3B results from its interaction with neuropilin receptors (NRP1 and NRP2), which leads to reduced secretion of vascular endothelial growth factor and inhibition of formation of new blood vessel networks through which nutrients and oxygen are supplied to the tumor mass [4,5]. The abnormal expression pattern of SEMA3B has been reported in breast cancer [4], ovarian cancer [6], hepatocellular carcinoma [7], lung cancer [8], and endometrial cancer [9]. Recent studies indicate that SEMA3B plays an important role in osteoporosis, where its reduced level is observed. It is therefore suggested that SEMA3B is a promising new therapeutic target for osteoporosis caused by estrogen deficiency [10]. In stomach cancer, the relationship between SEMA3B level and prognosis, as well as the severity of clinical symptoms, has been reported [11].

Modern forms of diagnostics and therapy focus on molecular targets, enabling detection of abnormalities at an early stage, when the chances of successful therapy are greatest. It is also possible to quickly and early observe the loss of response to treatment before phenotypic changes occur. Thus, the chosen therapeutic strategy can be revised in a timely manner, which significantly increases the chances of inhibiting pathological processes [12–14]. Despite intensified studies of SEMA3B, based on the available literature, the relationship between SEMA3B expression and overall survival rate in patients with endometrial cancer has not yet been determined. Observations of Huang et al. on the expression of SEMA3B and overall survival rate (OSR) in patients with pancreatic cancer showed that the OSR was 19 months in patients with low levels of SEMA3B, while in patients with high SEMA3B expression, OSR was 41 months. The authors did not find a correlation between expression of SEMA3B and metastatic potential [15]. Tang et al. indicated that reduced SEMA3B expression in patients with esophageal cancer was associated with a higher OSR (41 months) compared to patients with normal levels of SEMA3B (19 months). Their results also suggest that as the degree of tumor cell differentiation decreases, the reduction in SEMA3B expression gradually increases [16].

The present study investigated the differences in SEMA3B expression depending on the degree of endometrial cancer differentiation (G1–G3) in comparison to controls. We also assessed

the role of SEMA3B in endometrial cancer and angiogenesis as related to cancer processes.

Material and Methods

The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Silesia in Katowice (KNW/0022/KB/237/16).

The evaluation of SEMA3B expression at the protein level was carried out in the study group, consisting of 45 patients diagnosed with endometrial cancer (G1, 17; G2, 15; G3, 13), and in a control group of 15 patients without neoplastic changes who were sampled during routine gynecological examinations. Exclusion criteria for the study group were: non-endometrioid endometrial cancer, diagnosed endometriosis or adenomyosis, co-existing cervical cancer, BMI >40, and hormone replacement therapy within 24 months prior to surgery.

The analysis of SEMA3B level changes was performed based on the immunohistochemical reaction with rabbit polyclonal anti-SEMA3B antibody (Novus Biological). The Laboratory of Pathomorphology of Beskid Center of Oncology in Bielsko-Biala provided paraffin blocks from which slides were prepared. They were incubated in citrate buffer (pH 6, 30 min at 95°C) in a water bath to retrieve antigen, then treated with 3% (v/v) H₂O₂ in water for 10 min to block endogenous peroxidase activity. To block non-specific binding (30 min at room temperature), 1% BSA solution in PBS was used. The next step was incubation with anti-SEMA3B antibody in a humidified chamber (20 h at 4°C). The avidin-biotin complex (ABC) method was used according to the manufacturer's instructions (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories). Diaminobenzidine (DAB) was used to visualize the bound antibodies. The slides were stained with Gill's hematoxylin, dehydrated, and coverslipped. Negative control was performed by replacing the primary antibody with rabbit IgG. An Eclipse E200 light microscope with DS-Fi1 digital camera (Nikon) was used to prepare photographic documentation (15 photos for each paraffin block, 200× magnification). To assess the optical density of a reaction product in fields where a positive reaction occurred, the NIS-AR (Nikon) program was used.

Statistical analysis was performed using the Statistica 12 PL program (StatSoft, USA). It was carried out at the statistical significance level $p < 0.05$. The first step was to check the normality of the distribution of the obtained data with the Shapiro-Wilk test. On its basis, observing that the distribution of data does not meet the normal distribution assumptions ($p > 0.05$), further statistical analysis was carried out using nonparametric methods. The results of changes in SEMA3B level in analyzed groups are presented as median (Me), lower quartile (Q1), and

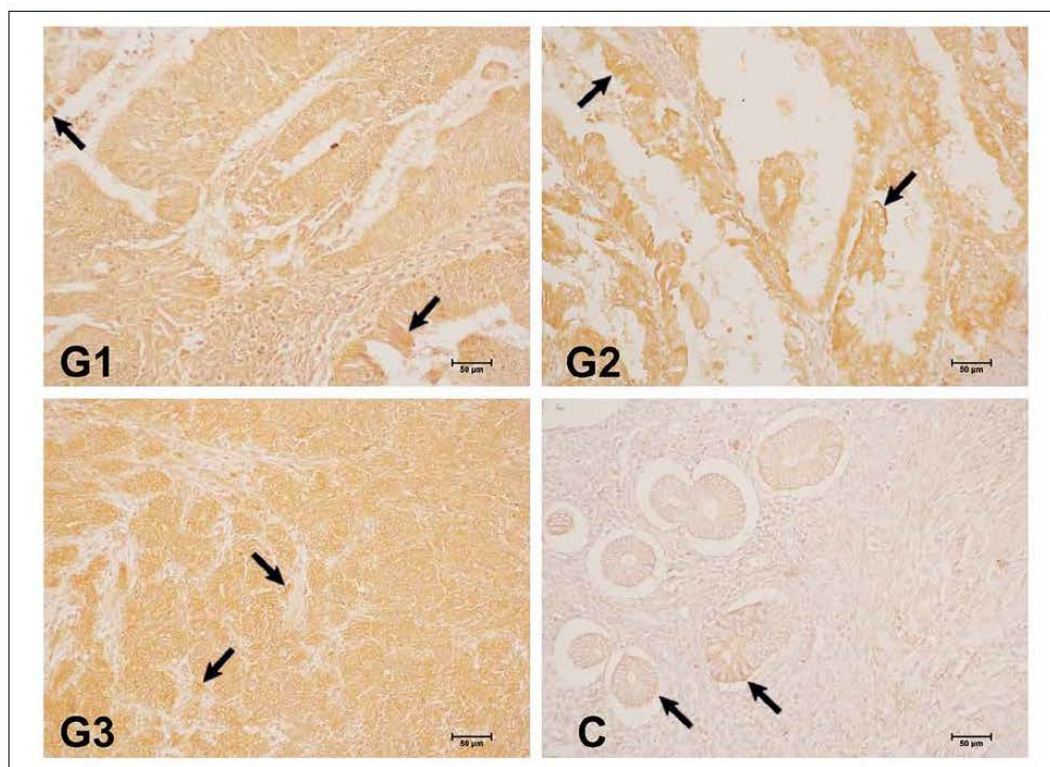


Figure 1. Immunohistochemical localization of SEMA3B in different grades of endometrial cancer. C – control; G – grade of endometrial cancer. 200× magnification.

upper quartile (Q3). The Kruskal-Wallis test (nonparametric alternative to the analysis of variance) was performed to indicate statistically significant differences in SEMA3B expression between data in independent groups (C, G1-G3). To determine groups in which differences in expression were statistically significant, a post hoc Dunn's test was performed.

Results

SEMA3B expression was observed in the membrane of uterine gland cells in samples from patients in the control group, but such expression was not observed in the endometrial cancer samples. On the other hand, within the tumor cells, SEMA3B expression was observed regardless of the degree of endometrial cancer differentiation (G1>G2>G3). We demonstrated that the optical density of the immunohistochemical reaction product of this protein in G1 cancer cells was similar to that in the membrane of uterine gland cells of the control group. Analyzing the level of SEMA3B in G2 endometrial cancer cells, we found that it was slightly lower than in grade 1 (about 85% of its level). In addition, we showed that the optical density of

the reaction product of SEMA3B was the lowest in G3 samples, reaching 70% of that in the control group.

There were also changes in SEMA3B concentration in the vascular endothelium and stromal cells, both in control and G1-G3 endometrial cancer samples. In the case of the vascular endothelium, the dependence of SEMA3B expression was G3>G1>G2>C, and for the stromal cells the differences in protein level were G2>G1>G3>C. In grade 1, we observed that the optical density of the SEMA3B reaction product in endothelial cells was about 20% higher than in the control group. In grade 2, the expression of SEMA3B was similar to that observed in G1, whereas in G3 samples, the optical density was higher than in the other groups. The optical density of the SEMA3B reaction product in G1 stromal cells was 40% higher than in the control group and about 50% higher in G2 than in the control group. In contrast, in G3, the level of SEMA3B expression in stromal cells was at the level observed in G1 (Figure 1, Table 1). The arrows in Figure 1 show the places where the expression of SEMA3B was observed.

Table 1. The optical density of the reaction product of SEMA3B in control and different grades of endometrial cancer.

Localization		C	G1	G2	G3
The membrane of uterine gland cells	Me	162.26			
	Q1	151.77			
	Q3	172.22			
Cancer cells	Me		159.09	140.52 ^{b,d}	105.44 ^{c,e,f}
	Q1		149.32	132.74	100.21
	Q3		170.37	149.67	111.78
Vascular endothelium	Me	117.89	141.79 ^a	140.54 ^b	154.77 ^{c,e,f}
	Q1	108.52	132.18	133.09	147.72
	Q3	126.07	150.66	148.42	164.74
Stromal cells	Me	131.33	179.38 ^a	198.82 ^{b,d}	177.67 ^{c,f}
	Q1	122.32	166.97	189.73	163.39
	Q3	145.29	189.49	215.13	186.69

Symbols indicate statistically significant changes at $p < 0.05$ between: a – control and G1 endometrial cancer; b – control and G2 endometrial cancer; c – control and G3 endometrial cancer; d – G1 and G2 endometrial cancer; e – G1 and G3 endometrial cancer; f – G2 and G3 endometrial cancer.

The exact values of SEMA3B expression (Me, Q1, Q3) are presented in Table 1 according to the structure in which its expression was observed, along with an indication of statistical significance of differences between the compared groups.

Discussion

The present study focused on the analysis of changes in the expression pattern of SEMA3B in 45 samples of endometrial cancer depending on the degree of its differentiation. The detection was based on immunohistochemical staining. In order to determine whether the observed changes in SEMA3B expression are characteristic of endometrial cancer, the level of this protein was also evaluated in the control group. This study is also a valuable addition to our previous observations. Analysis of the SEMA3B expression using microarrays showed the following direction and fold change in the transcriptional activity of this gene: G1 vs. C=+1.3; G2 vs. C=+1.50; G3 vs. C=+1.25. Regardless of the cancer grade, SEMA3B was over-expressed, but in the case of G3 endometrial cancer, the expression of the transcript begins to approach the level observed in grade 1 [17].

We found that SEMA3B was expressed in cancer cells, in stromal cells, and within the vascular endothelium. However, the expression profile of the analyzed protein in a given grade differed depending on the localization: G1>G2>G3 in tumor cells, G3>G1>G2 in vascular endothelium, and G2>G1>G3 in tumor stromal cells. In the stromal cells, the same direction of SEMA3B expression was observed as in the microarray analysis.

Evaluation of the mRNA expression indicated that the lowest level of SEMA3B was in G3 endometrial cancer, as was also found for cancer cells and stromal cells. Combining analyses at the transcriptome and proteome levels allowed us to obtain an overall expression profile of the analyzed gene/protein.

Using SEMA3B *in vitro*, the proliferative capacity was reduced, while the process of programmed death of breast, lung, and ovarian cancer cells was induced [4,6,18]. Ferrira et al. analyzed changes in SEMA3B expression in samples of endometrial cancer in the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle. They observed a relatively higher level of SEMA3B in biopsies obtained from patients in the proliferative phase of the cycle, although the differences were statistically insignificant [19]. In the present study, the lowest SEMA3B expression was noted in G3 endometrial cancer, which confirms its role as a tumor growth suppressor [1,4,20]. In grade 3, cancer cells lacking the regulatory role of SEMA3B undergo the most severe, uncontrolled proliferation. The observed level of expression may also result from the significant de-differentiation of endometrial cells in G3 [21], which may lead to the activation or inhibition of signaling pathways that show the opposite activity under physiological conditions. This indicates the complexity and pleiotropic nature of the processes associated with neoplastic transformation [22–24]. In relation to endometrial cancer, a close link is suggested between the activity of SEMA3B and VEGF₁₆₅, which significantly reduced the pro-apoptotic and antimetastatic effects of SEMA3B. SEMA3B acts as an inhibitor of VEGF₁₆₅, an autocrine survival factor [4]. Nguyen et al. found a reduction in the level of SEMA3B and SEMA3F in endometrial cancer depending on its severity.

With the increase in the aggressiveness of changes, the activity of these 2 semaphorins decreased [25]. These observations are consistent with ours. Osada et al. also demonstrated the association of the neoplastic process with SEMA3B expression. They observed a significantly lower expression of SEMA in stage IV carcinomas and concluded that the reduction of SEMA3B is an unfavorable prognostic marker [26]. This agrees with the study by Joseph et al., who indicated that the decrease in SEMA expression could be used as a molecular marker for the progression of neoplastic lesions. They also emphasize that gonadotropins and estrogens are involved in the control of angiogenesis and the metastatic potential of ovarian cancer with SEMA [27]. This is also important for our research because endometrial cancer is estrogen-dependent [28,29].

In the present study, the opposite situation was observed for SEMA3B concentration in the vascular endothelium than in tumor and stromal cells. The highest expression of SEMA3B was reported in G3 endometrial cancer. SEMA3B also plays a very important role in inhibiting angiogenesis [30]. Therefore, the changes in the level of SEMA3B in the vascular endothelium of tumor biopsies found in this work indicate that with the increase of endometrial cancer grade and cell de-differentiation, the processes of neovascularization are intensified [31–35]. Moreover, considering the pro-apoptotic role of the analyzed protein in the context of tumor angiogenesis, it is possible that there is a reduction in the percentage of normal vascular endothelial cells in endometrial cancer, with the simultaneous promotion of cell proliferation with accumulated mutations [4,5].

It should not be forgotten that SEMA3B affects the expression of interleukin 8 (IL-8), which helps in the influx of macrophages to the tumor microenvironment, promoting the metastatic activity of cancer. Elevated levels of IL-8 additionally suppress the anti-angiogenic properties of SEMA3B [36]. As a consequence, there is an uncontrollable, self-perpetuating process allowing further tumor growth and promoting its aggressiveness [37]. Therapy aimed at restoring the normal expression pattern of semaphorins, including SEMA3B, warrants further research [38].

Conclusions

The results of the present study, in comparison with the observations of other researchers, indicate that in endometrial cancer, SEMA3B activity is deregulated compared to the physiological state. We found that with the increase of the endometrial cancer grade, the SEMA3B level within the tumor and stromal cells was reduced, whereas in the vascular endothelium it was elevated. This indicates a close link between metastasis and angiogenesis and emphasizes the complexity of processes and interactions occurring in carcinogenesis. Moreover, the SEMA3B expression assay is simple and imposes no additional burden on the patient. Our results and data reported in the literature suggest that SEMA3B expression indicates increased carcinogenesis in endometrial cancer. A better understanding of the various signaling mechanisms associated with the actions semaphorins is crucial for better understanding of carcinogenesis and endometrial cancer.

Conflict of interest

None.

References:

1. Arbellé E, Reynaud F, Sanyas I et al: Cerebrospinal fluid-derived Semaphorin 3B orients neuroepithelial cell divisions in the apicobasal axis. *Nat Commun*, 2015; 6: 6366
2. Ito D, Nojima S, Kumanogoh A: [The role of semaphorin family in immune systems.] *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2014; 37: 1–10 [In Japanese]
3. Sabag AD, Smolkin T, Mumbhat Y et al: The role of the plexin-A2 receptor in Sema3A and Sema3B signal transduction. *J Cell Sci*, 2014; 127: 5240–52
4. Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P et al: Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 11432–37
5. Fonseca FP, Bingle L, Santos-Silva AR et al: Semaphorins and neuropilins expression in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*, 2016; 45: 119–26
6. Tse C, Xiang RH, Bracht T et al: Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res*, 2002; 62: 542–46
7. Tischhoff J, Markwarth A, Witzigmann H et al: Allele loss and epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors. *Int J Cancer*, 2005; 115: 684–89
8. Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M et al: Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 13954–59
9. Attar R, Gasparri ML, Halim TA et al: Legacy of vitamin D: Role of vitamin D in prevention of gynecological cancers. In: Farooqi A, Ismail M (eds.), *Molecular oncology: Underlying mechanisms and translational advancements*. Springer, Cham, 2017
10. Sang C, Zhang Y, Chen F et al: Tumor necrosis factor alpha suppresses osteogenic differentiation of MSCs by inhibiting semaphorin 3B via Wnt/ β -catenin signaling in estrogen-deficiency induced osteoporosis. *Bone*, 2016; 84: 78–87
11. Chen R, Zhuge X, Huang Z et al: Analysis of SEMA3B methylation and expression patterns in gastric cancer tissue and cell lines. *Oncol Rep*, 2014; 31: 1211–18
12. Agrawal SN: The basic molecular biology of angiogenesis and its implication in anticancer therapeutics. *Arch Int Surg*, 2015; 5: 121–30
13. Biankin VA, Piantadosi S, Hollingsworth SJ: Patient-centric trials for therapeutic development in precision oncology. *Nature*, 2015; 526: 361–70
14. Wcislo-Dziadecka D, Gola J, Grabarek B et al: Effect of adalimumab on the expression of genes encoding TNF- α signal paths in skin fibroblasts *in vitro*. *Postepy Dermatol Alergol*, 2018; 35: 413–22
15. Huang HY, Cheng YY, Liao WC et al: SOX4 transcriptionally regulates multiple SEMA3/plexin family members and promotes tumor growth in pancreatic cancer. *PLoS One*, 2002; 7(12): e48637

16. Tang H, Wu Y, Liu M et al: SEMA3B improves the survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma by upregulating p53 and p21. *Oncol Rep*, 2016; 36(2): 900–8
17. Oplawski M, Michalski M, Witek A et al: Identification of a gene expression profile associated with the regulation of angiogenesis in endometrial cancer. *Mol Med Rep*, 2017; 16: 2547–55
18. Shahi P, Wang CY, Chou J et al: GATA3 targets semaphorin 3B in mammary epithelial cells to suppress breast cancer progression and metastasis. *Oncogene*, 2017; 36: 5567–75
19. Ferreira GD, Capp E, Jauckus J et al: Expression of semaphorin class 3 is higher in the proliferative phase on the human endometrium. *Arch Gynecol Obstet*, 2018; 297: 1175–79
20. Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S et al: Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function. *Exp Cell Res*, 2006; 312: 584–93
21. Pecorelli S: Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009; 105: 103–4
22. Bednarczyk M, Zmarzły N, Grabarek B et al: Genes involved in the regulation of different types of autophagy and their participation in cancer pathogenesis. *Oncotarget*, 2018; 9: 34413–28
23. Lorente J, Velandia C, Leal JA et al: The interplay between autophagy and tumorigenesis: Exploiting autophagy as a means of anticancer therapy. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2018; 93: 152–65
24. Mohlin S, Wigerup C, Jögi A et al: Hypoxia, pseudohypoxia and cellular differentiation. *Exp Cell Res*, 2017; 356: 192–96
25. Nguyen H, Ivanova VS, Kavandi L et al: Progesterone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibit endometrial cancer cell growth by upregulating semaphorin 3B and semaphorin 3F. *Mol Cancer Res*, 2011; 9: 1479–92
26. Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N et al: Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: Increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum Pathol*, 2006; 37: 1414–25
27. Joseph D, Ho SM, Syed V: Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, 2010; 9: 499–509
28. Vahrenkamp JM, Yang CH, Rodriguez AC et al: Clinical and genomic cross-talk between glucocorticoid receptor and estrogen receptor α in endometrial cancer. *Cell Rep*, 2018; 22: 2995–3005
29. Swasti: Estrogen and progesterone receptors in endometrial cancer: Where are we today? *Gynecol Obstet*, 2018; 8: e127
30. Varshavsky A, Kessler O, Abramovitch S et al: Semaphorin-3B is an angiogenesis inhibitor that is inactivated by furin-like pro-protein convertases. *Cancer Res*, 2008; 68: 6922–31
31. Fujimoto J, Hori M, Ichigo S, Tamaya T: Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in uterine endometrial cancers. *Invasion Metastasis*, 1995; 15(5–6): 203–10
32. Presta M: Sex hormones modulate the synthesis of basic fibroblast growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells: Implications for the neovascularization of normal and neoplastic endometrium. *J Cell Physiol*, 1998; 137(3): 593–97
33. Chopra V, Ding TV, Hannigan EV: Serum levels of interleukins, growth factors and angiotensin in patients with endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997; 123(3): 167–72
34. Ribatti D, Finato N, Crivellato E et al: Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathologic progression in human endometrial cancer. *Am J Obstet Gynaecol*, 2005; 193(6): 1961–65
35. Chiu HC, Li CJ, Yang GT et al: Epithelial to mesenchymal transition and cell biology of molecular regulation in endometrial carcinogenesis. *J Clin Med Res*, 2019; 8(4): pii: E439
36. Rohy C, Capparuccia L, Casazza A et al: The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J Exp Med*, 2008; 205: 1155–71
37. Neufeld G, Mumblat Y, Smolkin T et al: The semaphorins and their receptors as modulators of tumor progression. *Drug Resist Updat*, 2016; 29: 1–12
38. Mishra R, Kumar D, Tomar D et al: The potential of class 3 semaphorins as both targets and therapeutics in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2015; 19: 427–42