

**Uniwersytet Rzeszowski**  
**Kolegium Nauk Medycznych**

**lek. med. Robert Kielbasiński**

**Zmiany wzorca ekspresji genów kodujących wybrane  
adipokiny i czynniki prozapalne  
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. Krzysztof Balawender**

Rzeszów 2021

lek. med. Robert Kielbański  
Centrum Zdrowia w Mikołowie Sp Z o. o.  
ul. Waryńskiego 2, 43-190 Mikołów  
e- mail: kielbasinskir@gmail.com

## Spis treści

<b>WYKAZ SKRÓTÓW</b> .....	5
<b>WYKAZ TABEL</b> .....	8
<b>WYKAZ RYCIN</b> .....	9
<b>1. Wstęp</b> .....	10
<i>1.1. Epidemiologia i etiologia raka endometrium</i> .....	10
<i>1.2. Ocena zaawansowania raka endometrium według klasyfikacji FIGO</i> .....	11
<i>1.3. Cechy histopatologiczne raka endometrium</i> .....	12
<i>1.4. Objawy raka endometrium</i> .....	13
<i>1.5. Badania z zastosowaniem hodowli komórkowych in vitro</i> .....	13
<b>1.5.1. Modele in vitro wykorzystywane w badaniach nad rakiem endometrium</b> .....	14
<i>1.6. Czynniki prozapalne i ich znaczenie w procesach nowotworowych</i> .....	15
<b>1.6.1. Ścieżka sygnalizacyjna JAK/STAT w procesie nowotworowym</b> .....	16
<b>1.6.2. Znaczenie interleukiny 6 w nowotworzeniu</b> .....	18
<i>1.7. Adipokiny</i> .....	20
<b>1.7.1. Leptyna</b> .....	20
<b>1.7.2. Adiponektyna</b> .....	23
<i>1.8. Cisplatyna</i> .....	25
<b>1.8.1. Mechanizm działania cisplatyny</b> .....	25
<b>1.8.2. Cisplatyna w raku endometrium</b> .....	28
<b>2. Cel pracy i hipotezy badawcze</b> .....	30
<b>3. Materiał i metody</b> .....	31
<i>3.1. Hodowla raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na cisplatynę</i> .....	31
<i>3.2. Ocena cytotoksyczności cisplatyny względem komórek raka endometrium</i> .....	31
<i>3.3. Ekstrakcja całkowitego RNA z hodowli komórkowej</i> .....	32
<b>3.3.1. Analiza jakościowa ekstraktów RNA</b> .....	33

3.3.2. Analiza ilościowa ekstraktów RNA .....	33
3.4. Wyznaczenie transkryptomu mRNA techniką mikromacierzyoligonukleotydowych HG-UI133_A2 .....	34
3.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją (RTqPCR) .....	35
3.6. Test immunoenzymatyczny ELISA.....	36
3.7. Analiza statystyczna .....	38
4. Wyniki.....	39
4.1. Wyniki testu cytotoksyczności z sulforodaminą A .....	39
4.2. Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów na poziomie transkryptomu w hodowli raka endometrium eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	40
4.3. Zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych na poziomie transkryptomu w hodowli raka endometrium eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	44
4.4. Zmiany profilu stężeń leptyny i adiponektyny na poziomie proteomu w hodowli raka endometrium eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	47
4.5. Zmiany profilu stężeń wybranych czynników prozapalnych na poziomie proteomu w hodowli raka endometrium eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej.....	49
4.6. Zależności ekspresji wybranych adipokin i czynników prozapalnych na poziomie mRNA i białka.....	50
5. Dyskusja.....	52
6. Wnioski.....	60
7. Piśmiennictwo .....	61
8. Streszczenie .....	78
9. Abstract .....	83

## WYKAZ SKRÓTÓW

AAPL1 – białko adaptorowe 1

ACS – Amerykańskie Towarzystwo Onkologiczne, ang. American Cancer Society

ACTB –  $\beta$ -aktyna

ADIPOR1 – receptor 1 dla adiponektyny

ADIPOR2 – receptor 2 dla adiponektyny

ADP – adiponektyna

ADSC – komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej, ang. adipose stem cells

Akt – kinaza Akt

AMP – adenozybonomonofosforan

AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP

AMT – ang. Ataxia Telangiectasia Mutated protein

ATR – ATM- and Rad3-related protein

BID – białko BID

BMI – wskaźnik masy ciała, ang. Body Mass Index

cAMP – cykliczny adenozybonomonofosforan

CNTF – rzęskowy czynnik neurotrofowy, ang. ciliary neurotrophic factor

CT-1 – kardiotropina 1

DDP – cisplatyna; cis-diamino-dichloro-roplatyna II; cis-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

ECD – domena zewnątrzkomórkowa, ang. ExtraCellular Domain

ELISA – test immunoenzymatyczny, ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu

ERK – kinazy regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi, ang. Extra-cellular signal-Regulated Kinase

FBS – płodowa surowica bydłęca, fetal bovine serum

FC – wielokrotność zmiany ekspresji, ang. Fold Change

FIGO – Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa, ang. International Federation of Gynecology and Obstetrics

Forward – starter sensowny

HGM – High-mobility group proteins

IC<sub>50</sub> – średnie stężenie hamujące, and. average inhibitory concentration

ICAM-1 – międzykomórkowa molekula adhezyjna-1, ang. intercellular adhesion

molecule-1

ICD – domena wewnątrzkomórkowa, ang. IntraCellular Domain

IKK – kinaza Kb

IL – interleukina, ang. Interleukin

INF- $\gamma$  – interferon gamma

IRS – substrat receptora insuliny 1

IRS1/2 – substrat receptora insuliny 1/2

JAK – kinaza Janusowa

JAK2 – kinaza Janusa 2

K – kontrola

LEP – leptyna

LEPR – receptory dla leptyny

*LEPROT* – ang. Leptin receptor overlapping transcript

*LEPROTL1* – ang. Leptin receptor overlapping transcript-like 1

LIF – czynnik hamujący białaczkę, ang. leukaemia inhibitory factor

LKB1 – ludzki antyonkogen kodujący białko kinazy treoninowo-serynowej, ang. serine–threonine kinase

MAPK – kinazy aktywowane mitogenem, ang. mitogen-activated protein kinases

MEK – kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami

MEM – medium hodowlane Minimum Essential Medium

MMP – metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej, ang. Matrix MetalloProteinases

MMR – system naprawy niesparowanych zasad, ang. MisMatch Repair

MOMP – utrata integralności błony mitochondrialnej, ang. Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

NEAA – niezbędne aminokwasy, Non-Essential Amino Acid

NER – naprawa poprzez wycinanie nukleotydów, ang. Nucleotide Excision Repair

NF $\kappa$ B – jądrowy czynnik kappa B, ang. nuclear factor kappa B

NF $\kappa$ B – jądrowy czynnik kappa B, ang. nuclear factor beta

OS – czas przeżycia całkowitego, ang. overall survival

OSM – onkostatyna M

p – poziom istotności statystycznej

p- reszta fosforanowa

PDE3B – fosfatydyloesteraza 3

PFS – czas przeżycia wolny od progresji, ang. progression-free survival

PI3K – szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, ang. Phosphoinositide 3-Kinase

PPAR- $\alpha$  – Receptor alfa aktywowany przez proliferatory peroksysomów, ang. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha

PTEN – phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten.

PTGO – Polskie Towarzystwo Ginekologii Onkologicznej

r – współczynnik korelacji Pearsona

Rab5 – białko Rab5

Reverse – starter antysensowny

RNA – kwas rybonukleinowy

RTqPCR - łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją, ang. Real-Time Quantitative Reverse Transcription Reaction

siRNA – małe interferujące RNA, ang. small interfering RNA

SOCS3 – Supresor sygnalizacji cytokin 3

STAT3 – czynnik indukcji transkrypcji 3

TMD – domena transbłonowa, ang. TransMembrane Domain

TNFR1 – receptor 1 dla czynnika martwicy nowotworu alfa

TNFR2 – receptor 2 dla czynnika martwicy nowotworu alfa

TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu alfa, ang. tumor necrosis factor alpha),

Tyk2 – kinaza tyrozynowa 2

VCAM-1 – molekula adhezyjna-1 komórki naczyniowej, ang. vascular cell adhesion molecule-1

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, ang. vascular endothelial growth factor

$x \pm SD$  – średnia  $\pm$  odchylenie standardowe

## WYKAZ TABEL

Tabela 1 Klasyfikacja zaawansowania klinicznego raka endometrium według klasyfikacji FIGO .....	11
Tabela 2 Sekwencja nukleotydowa starterów wykorzystanych w reakcji RTqPCR .....	36
Tabela 3 Nazwy zestawów wykorzystane do przeprowadzenia testu ELISA .....	37
Tabela 4 Mikromacierzowy profil ekspresji adipokin w hodowli Ishikawa eksponowanej na cisplatynę w porównaniu do kontroli .....	41
Tabela 5 Mikromacierzowy profil ekspresji wybranych czynników prozapalnych .....	45
Tabela 6 Stężenie leptyny w zależności od stężenia cisplatyny i czasu ekspozycji komórek raka endometrium .....	48
Tabela 7 Stężenie leptyny w zależności od stężenia cisplatyny i czasu ekspozycji komórek raka endometrium .....	48
Tabela 8 Stężenie czynnika martwicy nowotworu alfa, kinazy Janusa 2, czynnika indukcji transkrypcji 3, interleukiny 6 w zależności od stężenia cisplatyny i czasu ekspozycji komórek raka endometrium .....	49
Tabela 9 Stężenie czynnika martwicy nowotworu alfa, kinazy Janusa 2, czynnika indukcji transkrypcji 3, interleukiny 6 w zależności od stężenia cisplatyny i czasu ekspozycji komórek raka endometrium .....	51
Tabela 10 Korelacje pomiędzy ekspresją wybranych adipokin i czynników zapalnych na poziomie białka .....	51

## WYKAZ RYCIN

Rycina 1 Ścieżka sygnalizacyjna JAK/STAT .....	17
Rycina 2 Szlaki sygnałowe zależne od leptyny .....	21
Rycina 3 Szlaki sygnalizacyjne i procesy biologiczne zależne od adiponektyny .....	24
Rycina 4 Molekularny mechanizm działania cisplatyny .....	26
Rycina 5 Wyniki testu cytotoksyczności cisplatyny w zakresie stężeń 2,5 $\mu$ M-10 $\mu$ M względem hodowli raka endometrium linii Ishikawa.....	40
Rycina 6 Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatynę w stężeniu 2,5 $\mu$ M w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.....	42
Rycina 7 Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatynę w stężeniu 5 $\mu$ M w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.....	43
Rycina 8 Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatynę w stężeniu 5 $\mu$ M w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.....	44
Rycina 9 Zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatynę w stężeniu 2,5 $\mu$ M w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.....	46
Rycina 10 Zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatynę w stężeniu 5 $\mu$ M w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.....	46
Rycina 11 Zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatynę w stężeniu 10 $\mu$ M w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.....	47

## 1. Wstęp

### 1.1. Epidemiologia i etiologia raka endometrium

Rak endometrium, inaczej rak trzonu macicy jest najczęstszym nowotworem ginekologicznym u kobiet w wieku około- i postmenopauzalnym [1,2]. Jak podaje Amerykańskie Towarzystwo Onkologiczne (ACS, ang. American Cancer Society) w 2021 roku liczba nowych przypadków wyniesie 66750, z czego 12940 kobiet umrze. Zachorowalność na ten typ nowotworu jest najwyższa w krajach rozwiniętych [3,4].

W Europie w 2012 roku wykryto 100 000 nowych zachorowań a standaryzowany współczynnik to – 13,6/100 000 kobiet.

W Polsce do 2003 roku najczęściej diagnozowano raka szyjki macicy. Dopiero w kolejnych latach zachorowalność na raka endometrium była zbliżona do opisywanej w krajach Europy Zachodniej [5].

Dane z 2010 roku pokazują iż w Polsce liczba zachorowań na raka macicy to ponad 5000 (standaryzowany współczynnik 14,8/100 000 kobiet) co daje mu czwarte miejsce, po raku sutku, jelita grubego i płuca.

Obecnie największa liczba przypadków raka trzonu macicy diagnozowana jest w Ameryce Północnej i Europie, gdzie standaryzowane współczynniki zachorowalności wynoszą 22 i 11,8-12,5. Największy przyrost nowych przypadków odnotowuje się w krajach Europy wschodniej w porównaniu do pozostałych regionów kontynentu [6,7].

Do czynników ryzyka zachorowania na raka endometrium można zaliczyć: wiek, wydłużenie czasu życia kobiet, stosowanie preparatów zawierających estrogeny bez zapewnienia równowagi progesteronem, otyłość, cukrzyca, choroby metaboliczne, terapia onkologiczna raka piersi z zastosowaniem antiestrogenów, wczesne rozpoczęcie miesiączkowania, późna menopauza, zespół policystycznych jajników, dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego, poprawa statusu socjoekonomicznego [8,9].

Niemalże 90% przypadków raka trzonu macicy występuje u kobiet, które ukończyły 50 rok życia, a największą zachorowalność obserwuje się między szóstą a siódmą dekadą życia [10]. W około 4 % przypadków rak trzonu macicy zostaje zdiagnozowany u pacjentek przed 40 r.ż. [11].

## 1.2. Ocena zaawansowania raka endometrium według klasyfikacji FIGO

W 1951 roku Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa (FIGO, ang. International Federation of Gynecology and Obstetrics) zaproponowała IV-stopniową ocenę klinicznego zaawansowania raka endometrium [12].

Wraz z postępem medycyny, diagnostyki i zrozumieniem podłoża raka trzonu macicy klasyfikacja ulegała zmianom. Jest to istotne, ponieważ powszechnie stosowana w onkologii skala TNM, w onkologii ginekologicznej nie ma praktycznego znaczenia. Jednakże w dalszym ciągu zwraca się uwagę na trudności w kwalifikacji pacjentek z rakiem endometrium do poszczególnych stopni klinicznego zaawansowania tego nowotworu i brak możliwości przeprowadzenia spersonalizowanej oceny zaawansowania [12,13].

Aktualnie obowiązuje klasyfikacja opracowana w 2009 roku (tabela I) [13]. Wprowadzone zmiany oparte na analizie współczynnika 5-letniego przeżycia pacjentek dotyczyły czterech obszarów, mianowicie [13]:

1. połączono w 1 stopień rak ograniczony tylko do endometrium i naciekający mniej niż połowę grubości mięśniówki endometrium;
2. pomniejszono znaczenie zmianom wewnątrzkanalowym;
3. rozróżniono występowanie przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych okołoaortalnych i miednicznych;
4. odstąpiono od oceny cytologicznej wymazu z jamy otrzewnowej jako czynnika w kwalifikacji chirurgicznej.

Tabela 1 Klasyfikacja zaawansowania klinicznego raka endometrium według klasyfikacji FIGO [13]

<b>Stopień I: rak ograniczony do trzonu macicy i/lub nacieka gruczoły szyjkowe</b>	
IA	Rak ograniczony do błony śluzowej trzonu macicy lub nacieka < ½ grubości mięśniówki macicy
IB	Rak nacieka > ½ grubości mięśniówki macicy
<b>Stopień II rak nacieka podścielisko szyjki macicy, ale nie wykracza poza macicę</b>	
<b>Stopień III lokalne i/lub regionalne rozprzestrzenia się nowotworu</b>	
IIIA	Rak nacieka surowicówkę i/lub przydatki
IIIB	Przerzuty do pochwy i/lub przymacicz
IIIC	Przerzuty do węzłów chłonnych miednicznych i/lub węzłów okołoaortalnych
<b>Stopień IV</b>	
IVA	Nacieki błony śluzowej pęcherza moczowego i/lub odbytnicy
IVB	Przerzuty odległe (wyłączając wewnątrzbrzuszne węzły chłonne poza okołoaortalnymi i/lub pachwinowe węzły chłonne)

### 1.3. Cechy histopatologiczne raka endometrium

Wyróżnia się dwa główne rodzaje histopatologiczne raka trzonu macicy. Pierwszy, endometrioidalny dotyczy 80% wszystkich przypadków, pozostałe 20% to nieendometrioidalny rak endometrium [14,15].

Postać endometrioidalna, określana także jako typ I, rak estrogenozależny rozwija się na podłożu rozrostu atypowego endometrium. Występuje częściej u kobiet w wieku okołomenopauzalnym, z otyłością, hiperlipidemią, z objawami hiperestrogenizmu, u których menopauza wystąpiła w późniejszym wieku. Molekularnie obserwuje się mutacje protoonkogenu K-ras oraz genu supresorowego PTEN [16].

Z kolei, nieendometrioidalny rak endometrium (estrogenoniezależny, typ II) powstaje na podłożu zmienionego endometrium bez stymulacji estrogenowej. Molekularnie nie obserwuje się ekspresji receptorów progesteronowych na powierzchni komórek. Jego rozwój związany jest z mutacją genu p53, określanego też jako strażnik genomu. Częściej występuje u starszych kobiet, w wieku postmenopauzalnym. Charakteryzuje się agresywnym charakterem i niekorzystnym rokowaniem [16,17].

#### **Typy histologiczne raka endometrium są następujące [18]:**

- rak endometrioidalny;
- rak śluzowy;
- rak surowiczy;
- rak jasnokomórkowy;
- rak płaskonabłonkowy;
- rak niezróżnicowany;
- typ mieszany.

Na podstawie oceny histopatologicznej raka endometrium opartej na ocenie zróżnicowania komórek tworzących masę guza można wyróżnić 3 stopnie zróżnicowania histopatologicznego [18,19]:

- G1- wysokozróżnicowany, poniżej 5% utkania litego, niepłaskonabłonkowego;
- G2- średniozróżnicowany, gdzie stwierdza się od 6 do 50% utkania litego, niepłaskonabłonkowego;

- G3- niskozróżnicowany, gdzie utkanie lite, niepłaskonabłonkowe jest powyżej 50%.

Wraz ze zmniejszeniem stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium (G1>G2>G3) tym mniej optymistyczne rokowanie, konieczność zastosowania bardziej agresywnej terapii i krótszy okres 5-letniego przeżycia [19].

W większości wypadków rak endometrium zostaje zdiagnozowany w I etapie, gdzie współczynnik 5-letniego przeżycia wynosi około 95%, podczas gdy w stopniu IV waha się od 16%-45% [20,21].

#### **1.4. Objawy raka endometrium**

U 9 na 10 kobiet pierwszym i dominującym objawem raka endometrium jest nieprawidłowe krwawienie z dróg rodnych o nasileniu od bardzo skąpego do obfitego. Odnotowuje się również upławy surowicze, surowiczo-krwiste, krwistopropne o nieprzyjemnym zapachu [23,24].

Z kolei, w grupie kobiet w wieku przedmenopauzalnym obserwuje się obfite i przedłużające się krwawienia miesięczne oraz niekiedy krwawienia międzymiesiączkowe. Dolegliwości bólowe jamy brzusznej występują rzadko w początkowych etapach rozwoju nowotworu [23,24].

Należy mieć na uwadze, że u ok. 15% kobiet nie odnotowuje się klinicznej manifestacji choroby. W takich wypadkach stwierdzenie zmian w obrębie endometrium możliwe jest tylko dzięki wczesnej diagnostyce z wykorzystaniem skringowej ultrasonografii przezpochwowej [25].

#### **1.5. Badania z zastosowaniem hodowli komórkowych *in vitro***

Badania opierające się na wykorzystaniu hodowli komórkowych odgrywają istotną rolę w badaniach związanych z naukami medycznymi i farmaceutycznymi. Stanowią również pierwszy etap przedkliniczny związany z opracowywaniem nowych substancji, leków o możliwości ich komercjalizacji. Badania tego rodzaju pozwalają określić mechanizmy związane z przenikaniem a następnie wychwytem substancji do komórki, co z kolei przekłada się na wytypowanie ksenobiotyków o najlepszych właściwościach biofarmaceutycznych [26,27].

Czynnikiem determinującym wybór określonej linii komórkowej do badań jest

charakter planowanych eksperymentów. W sytuacji, gdy hodowla komórkowa *in vitro* ma stanowić model komórek zdrowych, obecnych w warunkach fizjologicznych, istotne jest odzwierciedlenie warunków panujących *in vivo*.

Takie postępowanie umożliwia uzyskanie wyników silnie skorelowanych z wynikami, jakie zostałyby uzyskane w badaniach *in vivo*. Dlatego też w opisanym przypadku, fenotyp komórek w hodowli powinien być jak najbardziej zbliżony do komórek prawidłowych [28].

Z kolei, w przypadku, gdy celem prowadzonych badań jest określenie cytotoksyczności związku, w pierwszej kolejności badania są prowadzone na modelach komórkowych nowotworowo zmienionych [29].

Przy wyborze odpowiedniego modelu komórkowego należy uwzględnić także: typ komórek, szybkość wzrostu, wymagania hodowli oraz koszt jej prowadzenia [28,29].

Hodowle komórkowe prowadzi się w specjalnych naczynkach hodowlanych w obecności dedykowanego dla danej hodowli medium hodowlanego, w którego skład wchodzi niezbędne aminokwasy, węglowodany, sole, surowicę bydlęcą i antybiotyki. Regularna wymiana pożywki połączona z przepasażowywaniem komórek po osiągnięciu przez nie stanu subkonfluencji pozwala utrzymać optymalne warunki do prowadzenia badań z wykorzystaniem substancji, leków na działanie których ekspozuje się komórki [30].

### **1.5.1. Modele *in vitro* wykorzystywane w badaniach nad rakiem endometrium**

W badaniach dotyczących raka endometrium w układzie *in vitro* zasadniczo wykorzystuje się trzy następujące linie komórkowe [31,32]:

- Linia Ishikawa – fenotyp komórek nowotworowych odpowiada stopniowi histopatologicznego zróżnicowania G1 i typowi I, które zostały pozyskane od 39-letniej pacjentki z rakiem błony śluzowej trzonu macicy. Na powierzchni komórek obecne są receptory estrogenowe i progesteronowe [31,32];
- Linie EC-1-A, HEC-1-B – fenotyp komórek odpowiada stopniowi zróżnicowania G2. Komórki uzyskano od 71-letniej pacjentki z rozpoznaniem gruczolakoraka endometrium [31,32];
- Linia KLE – fenotyp komórek odpowiada stopniowi zróżnicowania

histopatologicznego G3, pozyskana od 65-letniej kobiety z zaawansowaną postacią raka trzonu macicy [31,32].

## 1.6. Czynniki prozapalne i ich znaczenie w procesach nowotworowych

Szczególną rolę wśród mediatorów procesu zapalnego zajmują cytokiny, które wykazują wysoką aktywność w niskich stężeniach, syntetyzowane są przez różne komórki, wywierają różną, niekiedy przeciwstawną plejotropową aktywność poprzez interakcję ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek [33].

Cytokiny względem komórek zmienionych nowotworowo wykazują działanie zarówno pro- i przeciwnowotworowe, często uzależnione od stężenia w jakim zostaną wydzielone. Tym samym z jednej strony wzmacniają odpowiedź przeciwnowotworową, a z drugiej przyczyniają się do promowania procesu powstawania nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza) za pośrednictwem których może dojść do przerzutowania do okolicznych węzłów chłonnych, a w dalszej kolejności narządów odległych [34,35,36].

Przewlekłe zapalenie, podczas którego obserwuje się utratę równowagi pomiędzy stężeniem czynników prozapalnych i przeciwzapalnych stanowi niezwykle istotny czynnik predysponujący rozwój procesu nowotworowego [37,38].

Zostało to potwierdzone między innymi wśród pacjentów chorujących na chorobę Leśniowskiego-Crohna, u których odnotowuje się wyższe ryzyko rozwoju raka jelita grubego [39].

Istotną właściwością cytokin jest ich zdolność do tworzenia sieci wzajemnych oddziaływań, które przypominają tzw. „błędne koło”, podczas którego oddziaływanie jednej cytokiny ze swoistymi receptorami aktywuje kaskadę lub kaskady sygnalizacyjne, których wynikiem jest zmiana profilu ekspresji innych cytokin, które mogą wzmacniać sekrecję pierwszej [40,41].

Wykazano, iż wzrost i proliferacja komórek nowotworowych pobudzana jest poprzez mechanizmy autokrynne za pośrednictwem cytokin prozapalnych, np. interleukina (IL) 1 w raku jajnika [42], IL-6 w raku gruczołu krokowego, nerki, okrężnicy [43], IL-8 w raku trzustki, gruczołu krokowego, czerniaku [44].

### 1.6.1. Ścieżka sygnalizacyjna JAK/STAT w procesie nowotworowym

Przyjęto, iż cytokinami aktywującymi ścieżkę sygnalizacyjną JAK/STAT jest IL-12 i IL-23, wykazujące budowę podjednostkową. Wspólną dla tych dwóch interleukin jest podjednostka p40 [45]. W wyniku interakcji IL-12 i IL-23 z receptorami aktywowana zostaje kaskada JAK/STAT, której pierwszym etapem jest autofosforylacja związanych z częścią cytoplazmatyczną receptorów kinaz Janusa (JAK), co z kolei prowadzi do przyłączenia się i fosforylacji białek rodziny STAT. W takiej postaci białka STAT ulegają dimeryzacji i następnie zostają przetransportowane z terenu cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie działają jako czynniki transkrypcyjne, modulując ekspresję innych cytokin, m.in. czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ , ang. tumor necrosis factor alpha), IL-17, interferonu gamma (INF- $\gamma$ ) [46,47].

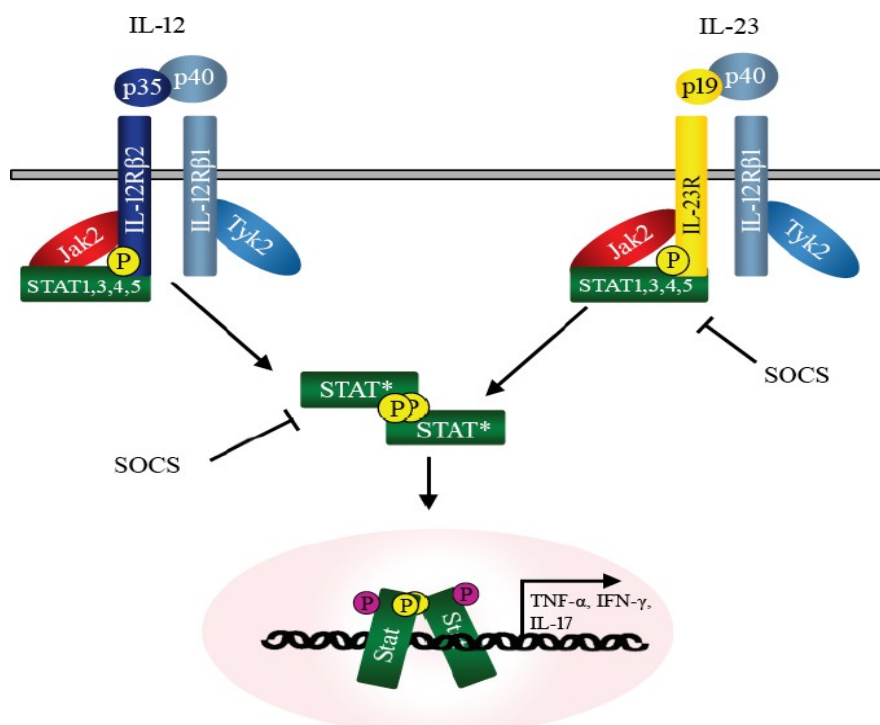
Do kinaz JAK należą między innymi: JAK1, JAK2, Jak3 i Tyk2, a do białek typu STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6 [48].

Ekspresja kinaz JAK1, JAK2 i Tyk2 ma miejsce w każdym rodzaju komórek, podczas gdy ekspresję JAK3 odnotowano tylko w komórkach układu immunologicznego. Charakteryzują się budową domenową. Wyróżniamy następujące domeny w budowie kinazy JAK: C-końcową białkową domenę kinazową, przylegającą domenę kinazopodobną i pięć dodatkowych domen, warunkujących wiązanie białko- białko [48].

Z kolei, białka rodziny STAT posiadają dwie domeny: SH2 i SH3.

Proces aktywacji białek STAT jest zależny od fosforylacji konserwatywnej domeny przy C-końcu białka, co w dalszej kolejności skutkuje homo- lub heterodimeryzacją białka bez udziału innych cząsteczek. Proces translokacji białek STAT z cytoplazmy do jądra komórkowego jest zależny od związania się swoistych importyn na powierzchni tych białek [46,47,48,49].

Należy mieć także na względzie, iż IL-6 pełni kluczową rolę w transdukcji sygnału wzdłuż ścieżki JAK/STAT [50]. Zaobserwowano, że inkubacja komórek Hep3B z IL-6 skutkowało tym, iż ufosforylowane białko STAT1 i STAT3 pozostawało na terenie cytoplazmy razem z formami nieufosforylowanymi [51]. Na rycinie 1 przedstawiono graficzną interpretację przebiegu kaskady sygnalizacyjnej JAK/STAT [52].



Rycina 1 Ścieżka sygnalizacyjna JAK/STAT [52].

JAK – kinaza Janusowa; IL – interleukina; Tyk2- kinaza tyrozynowa 2; STAT – czynnik indukcji transkrypcji 3; p- reszta fosforanowa; TNF-  $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu alfa; IFN- $\gamma$  – interferon gamma

### 1.6.1.1. Znaczenie białek STAT w nowotworzeniu

Podkreśla się, że w procesie nowotworzenia istotną rolę odgrywa białko STAT3, które działając jako czynnik transkrypcyjny przyczynia się do zmiany wzorca ekspresji czynników promujących wzrost komórek nowotworowych poprzez aktywację szlaków sygnalizacyjnych zależnych od IL-6 czy czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor) [53,54].

Białko STAT3 pełni także ważną rolę modulatora w mikrośrodowisku guza oraz wpływa modulująco na układ immunologiczny. W konsekwencji obserwuje się zahamowanie procesu zapalnego z równoczesnym nasileniem ekspresji czynników wpływających negatywnie na dojrzewanie komórek dendrytycznych [55].

Inaktywacja szlaku sygnałowego, w który zaangażowane jest białko STAT3 skutkowało zmniejszeniem proliferacji komórek guza, z równoczesnym nasileniem procesu apoptozy i zmniejszeniem ryzyka metastazy [56].

Potwierdzają to obserwacje Wang i wsp. [57], którzy na zwierzęcych modelach linii komórkowych czerniaka potwierdzili regresję zmian nowotworowych i zwiększenie infiltracji limfocytów T do mikrośrodowiska guza po zablokowaniu aktywności białka STAT3 [57].

Poza tym stwierdzono, że białko STAT3 przyczynia się do akumulowania limfocytów regulatorowych w obrębie guza, co również podkreśla rolę omawianego białka w procesie nowotworzenia i podkreśla jego prozapalną przyczynę.

Wskazuje się także, iż stosunek ekspresji ufosforylowanych białek STAT1 do STAT3 może być wykorzystany jako uzupełniający marker molekularny progresji choroby nowotworowej [58].

### **1.6.2. Znaczenie interleukiny 6 w nowotworzeniu**

Do czynników IL-6- podobnych zalicza się: IL-6, IL-11, czynnik hamujący białaczkę (LIF, ang. leukaemia inhibitory factor), rzęskowy czynnik neurotrofowy (CNTF, ang. ciliary neurotrophic factor), onkostatynę M (OSM) i kardiotropinę 1 (CT- 1) [59]. Interleukina-6 to cytokina plejotropowa, uczestnicząca w procesie zapalnym i modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, charakteryzująca się aktywnością zarówno pro- jak i przeciwzapalną. IL-6 wpływa na limfocyty B w powstawaniu przeciwciał, jak także wspólnie z IL-1 uczestniczy w aktywacji limfocytów T rozpoznających antygen, co przekłada się na reakcję ostrej fazy [60].

Efekty biologiczne wywierane przez IL-6 są wynikiem jej interakcji ze swoistymi receptorami: IL-6 R $\alpha$ , gp80. Wyróżnia się dwa szlaki sygnałowe zależne od IL-6: klasyczny, który jest związany z błonowym IL-6R i „trans-przebieżnikowy” związany z rozpuszczalną formą receptora (sIL-6R) [61].

W klasycznym szlaku sygnałowym zależnym od IL-6, powstały kompleks IL-6/sIL- 6R wiąże w dalszej kolejności dwie cząsteczki gp130, czego efektem jest powstanie heksamerycznej struktury kompleksu IL-6/IL-6 R $\alpha$ /gp130.

Skutkuje to wystąpieniem zmian konformacyjnych w obrębie gp130 i autofosforylacją kinazy JAK, która następnie fosforyluje gp130. Konsekwencją tego jest uruchomienie dwóch kolejnych szlaków: zależnych od białka STAT3 lub kinaz aktywowanych mitogenem MAPK (ang.mitogen-activated protein kinases) [62,63].

Rola IL-6 w procesie nowotworowym związana jest przede wszystkim z jej właściwościami wpływania na układ immunologiczny, który pełni istotną rolę

w progresji choroby nowotworowej [64]. Potwierdzono, że IL-6 nasila proliferację komórek śródbłonna naczyń oraz jest ważnym czynnikiem chemotaktycznym dla limfocytów T [65]. Ponadto należy zauważyć, że IL-6 nasila ekspresję cząsteczek adhezyjnych: międzykomórkowej molekuly adhezyjnej-1 (ICAM-1, ang. intercellular adhesion molecule-1), molekuly adhezyjnej-1 komórki naczyniowej (VCAM-1, ang. vascular cell adhesion molecule-1) i E-selektyny, które ściśle związane są z procesem zapalnym [66].

### **1.6.1.3. Znaczenie czynnika martwicy nowotworu alfa w nowotworzeniu**

Aktywną biologiczną formą TNF- $\alpha$  jest homotrimer, który może oddziaływać z receptorem TNFR1 lub TNFR2. Skutkiem wspomnianej interakcji jest aktywacja dwóch szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do apoptozy komórki (szlak śmierci) lub jej proliferacji (szlak zależny od jądrowego czynnika kappa B, NFkB, ang. nuclear factor kappa B). Domeny: zewnątrzkomórkowa (ECD, ang. ExtraCellular Domain), transbłonowa (TMD, ang. TransMembrane Domain) i wewnątrzkomórkowa (ICD, ang. IntraCellular Domain) występują w obu receptorach. Jednakże tylko w TNFR1 występuje domena śmierci (DD, ang. death domain) [67].

TNF- $\alpha$  wykazuje równocześnie działanie pro- i przeciwnowotworowe, co jest zależne, m.in. od stężenia cytokiny, w jakim została wydzielona do środowiska. Gdy stężenie jest niewielkie, TNF- $\alpha$  działa jako czynnik proangiogeny, promując nowotworzenie i przerzutowanie [68].

Cytokina ta wpływa na wzrost ekspresji metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP) oraz zwiększoną adhezję komórek nowotworowych od śródbłonna naczyń [69].

Stężenie TNF- $\alpha$  w surowicy pacjentów z rakiem gruczołu krokowego lub pacjentek z rakiem piersi było istotnie mniejsze po chemioterapii [70], co wskazuje na możliwość wykorzystania zmian profilu stężeń tej cytokiny jako markera oceny skuteczności terapii i pojawienia się ewentualnej lekooporności na stosowaną farmakoterapię [71].

Z kolei efekt przeciwnowotworowy zależny jest od tego, iż ekspresja TNFR1 zasadniczo jest większa od TNFR2, a tym samym występuje większa szansa związania się TNF- $\alpha$  z TNFR1. Poza tym omawiana cytokina promuje napływ neutrofilów, monocytów i limfocytów do nabłonka naczyń oraz indukuje przeciwnowotworową

odpowieź układu odpornościowego. W działanie przeciwnowotworowe zaangażowany jest także TNFR2, który pośredniczy w ekspresji tlenu azotu, co przekłada się na inhibicję angiogenezy nowotworowej [72].

## **1.7. Adipokiny**

Adipokinami nazywamy heterogenną grupę białek, cytokin, wydzielaną przez tkankę tłuszczową o aktywności hormonalnej. Niektóre z nich syntetyzowane są przez adipocyty, inne przez pozostałe komórki tworzące tkankę tłuszczową, takich jak: komórki endotelium, makrofagi i monocyty, tkanki łącznej podścieliska [73].

Zmiany profilu wydzielania adipokin są związane z rozwojem otyłości i towarzyszącej jej insulinooporności, którą należy rozpatrywać zarówno jako mechanizm adaptacyjny organizmu chroniący przed nadmiernym gromadzeniem się trójglicerydów w tkance tłuszczowej, a z drugiej nasilać biosyntezę kwasów tłuszczowych w hepatocytach i kardiomiocytach. Do najlepiej poznanych i opisanych adipokin zalicza się: leptyna, adiponektyna, wisfatyna, rezystyna i omentyna [74].

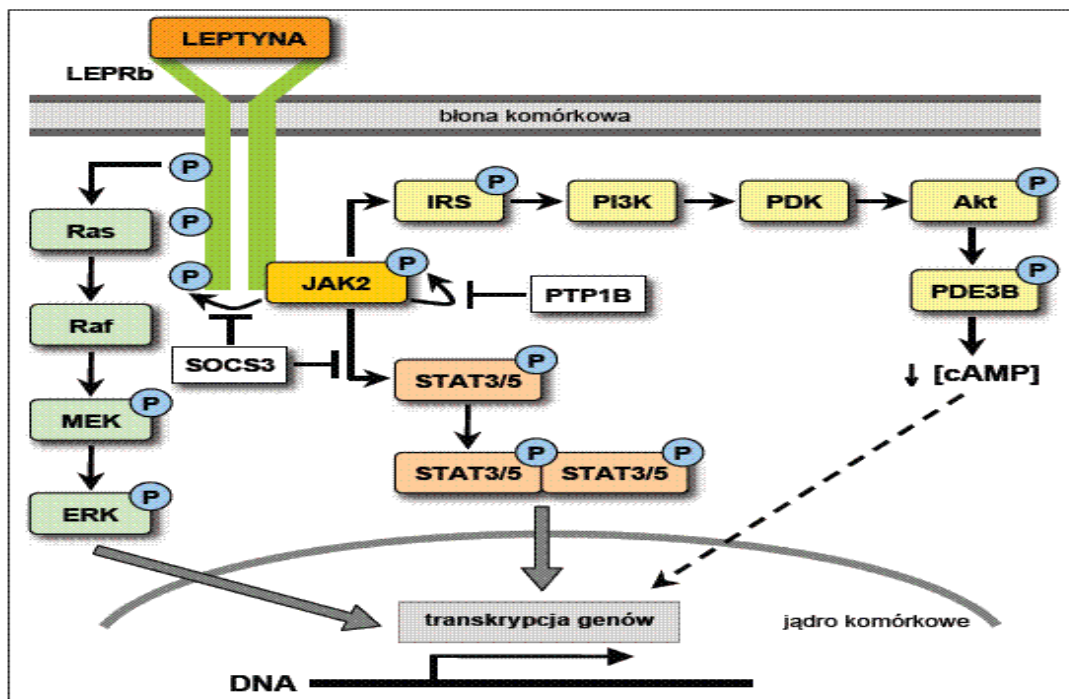
### **1.7.1. Leptyna**

Leptyna (LEP) jest wydzielana przede wszystkim przez zróżnicowane adipocyty. Wykazuje działanie stymulujące proces lipolizy wewnątrzkomórkowych trójglicerydów w miocytach, natomiast w wątrobie i trzustce hamuje proces lipogenezy [75].

Nasiloną ekspresję leptyny obserwuje się pod wpływem insuliny i glikokortykoidów, natomiast jej obniżenie jest obserwowane pod wpływem glukagonu i amin katecholowych. Ilość wydzielonej leptyny zależy także od masy tkanki tłuszczowej i wielkości adipocytów. U osób otyłych odnotowano istotnie wyższe stężenie leptyny w porównaniu z osobami szczupłymi [76]. Poza tym stężenie tej adipokiny ulega zmniejszeniu po głodzeniu i wzrasta po spożyciu posiłku, stąd nazywa bywa hormonem sytości. Jest też silnie skorelowane ze wskaźnikiem masy ciała (BMI, ang. Body Mass Index), stężeniem insuliny i masą tkanki tłuszczowej [76,77].

Aktywność biologiczna wywierana przez leptynę jest związana jest z jej interakcją ze swoistymi receptorami (LEPR), co przekłada się na aktywację głównie kaskady sygnalizacyjnej JAK/STAT i MAPK. Poza aktywacją ścieżki sygnałowej JAK2/STAT3, interakcja LEP z receptorem aktywuje także inne kaskady sygnałowe, m.in. kaskadę kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ERK, ang. Extra-cellular signal-Regulated Kinase) oraz szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. Phosphoinositide 3-Kinase) [78,79,80,81].

Można wyróżnić 6 izoform receptora leptynowego, które powstają w wyniku alternatywnego splicingu i/lub proteolitycznego cięcia białka. Posiadają one budowę domenową, gdzie wyróżnia się domenę zewnątrzkomórkową, transbłonową i cytoplazmatyczną. W zależności od obecności tych domen i ich długości wyodrębnia się rozpuszczalną formę receptora, który zbudowany jest tylko z domeny zewnątrzkomórkowej oraz formę transbłonową. Zaobserwowano, że domena cytoplazmatyczna jest zmienna, podczas gdy domena zewnątrzkomórkowa charakteryzuje się budową konserwatywną. Aktywacja szlaków sygnałowych inicjowanych przez LEP rozpoczyna się od dimeryzacji receptora (rycina 2) [82,83].



Rycina 2 Szlaki sygnałowe zależne od leptyny [83].

MEK – kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami; ERK – kaskada kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi; STAT-czynnik indukcji transkrypcji; IRS- substrat receptora insuliny 1; PI3K - szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu; Akt- kinaza Akt; PDE3B – fosfatydyloesteraza 3; cAMP- cykliczny adenozybonofosforan; DNA – kwas deoksyrybonukleinowy; LEPR – receptor leptyny; SOCS3 – Supresor sygnalizacji cytokin 3; JAK2 – kinaza Janusa 2.

### 1.7.1.1. Znaczenie leptyny w procesach nowotworzenia

Istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko indukcji a następnie rozwoju procesu nowotworowego jest otyłość. Pierwsze doniesienia łączące LEP z kancerogenezą pojawiły się w 1998 roku, gdy Nakao i wsp. [84] opisali ekspresję LEPR w komórkach białaczki limfoblastycznej [84]. Ponadto odnotowano, że ekspozycja komórek białaczkowych z leptyną jest czynnikiem promującym proliferację komórek nowotworowych z równoczesnym zahamowaniem procesu programowanej śmierci komórki [85]. Polimorfizm -2548 G/A w genie kodującym leptynę, skutkuje zwiększoną ekspresją LEP zarówno na poziomie transkryptomu, jak i proteomu. Ponadto, u kobiet będących homozygotami AA istotnie częściej stwierdzano rak gruczołu piersiowego w porównaniu do homozygot GG [86].

Leptyna wpływa również na angiogenezę nowotworową poprzez aktywację ścieżki JAK/STAT, co skutkuje wzmożoną proliferacją komórek śródbłonna naczyń oraz zwiększeniem ekspresji VEGF, czynnika wzrostu fibroblastów (FGF, ang. fibroblast growth factor) i białek antyapoptycznych, m.in. Bcl-2 [87].

Opisano także istotną rolę LEP w przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT, ang. epithelial–mesenchymal transition), promując proces przerzutowania. LEP jest zaangażowana w proces stabilizacji  $\beta$ -kateniny i jej translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z E-kadheryną tworząc połączenia międzykomórkowe oraz przyczynia się do aktywacji genów specyficznych dla komórek prezentujących fenotyp mezenchymalny [88].

U kobiet, których BMI jest wyższe niż 25 ryzyko zachorowania na raka trzonu macicy wzrasta 2-krotnie, a u tych, gdzie BMI jest powyżej 30 ryzyko wzrasta 3-krotnie. Potwierdzono także wyższe stężenie LEP w surowicy kobiet z rakiem endometrium w porównaniu do zdrowych ochotniczek [89]. Ekspresję LEP odnotowano także w komórkach błony śluzowej trzonu macicy, w ektopowych ogniskach błony śluzowej macicy (endometrioza) [90].

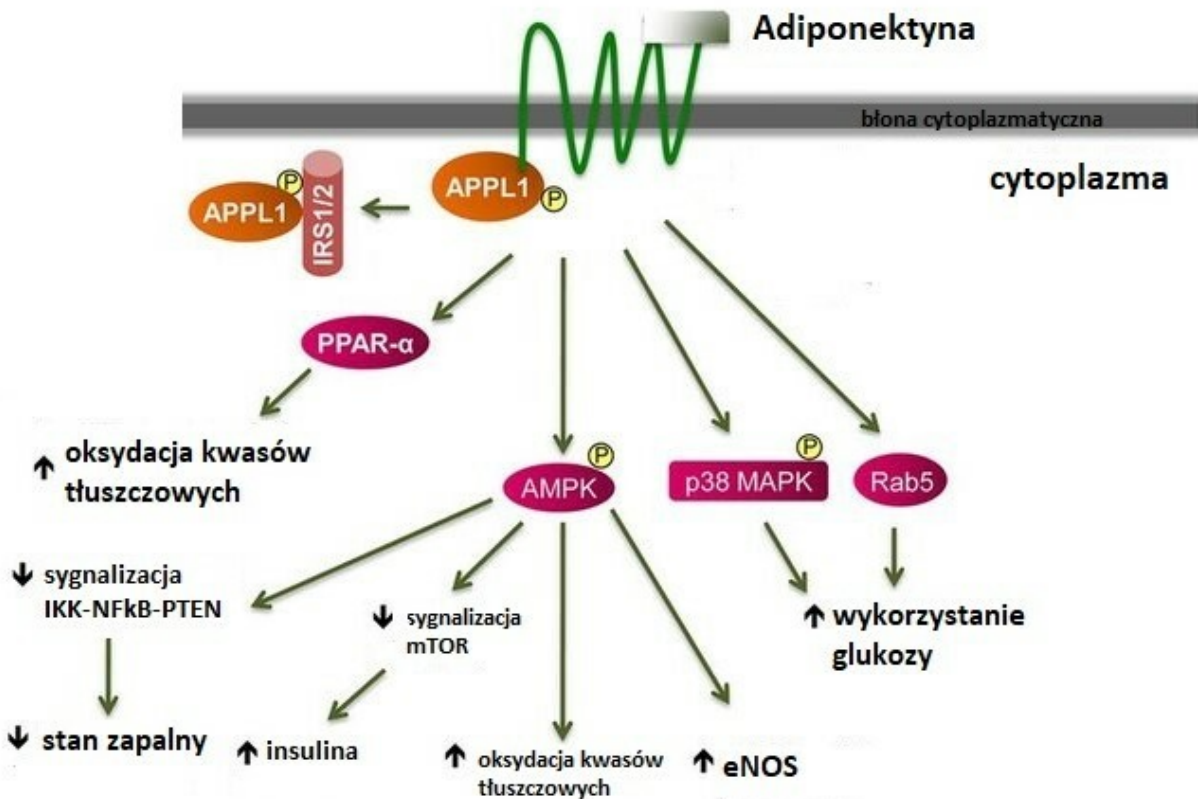
Koshihara i wsp. [91] stwierdzili ekspresję LEPR w prawidłowym i nowotworowo zmienionym endometrium, przy czym ulegała ona obniżeniu pod wpływem progesteronu [91]. Z kolei Bogusiewicz i wsp. [92] wskazują, że wraz ze wzrostem histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium ( $G1 < G2 < G3$ ) ekspresja LEPR była mniejsza [92].

### 1.7.2. Adiponektyna

Adiponektyna (ADP) jest hormonem odkrytym w 1995 roku o masie cząsteczkowej 30 kDa syntetyzowanym przez adipocyty tkanki tłuszczowej. Adipokina ta wykazuje działanie uwrażliwiające na insulinę, wzmacnia ekspresję syntazy tlenku azotu oraz posiada aktywność przeciwzapalną poprzez hamowanie ekspresji TNF- $\alpha$  i IL-6 [93,94]. Niemalże 90% ADP, która krąży w krwioobiegu u ludzi wiąże się w struktury o wysokiej masie cząsteczkowej, zbudowane z 12-18 cząsteczek ADP oraz w struktury o niskiej masie cząsteczkowej, zbudowane z 6 cząsteczek ADP. Pozostałe 10% ADP krąży w formie trimeru [95].

Adipokina ta wywiera efekt biologiczny za pośrednictwem szlaku sygnałowego p38 MAPK oraz kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK), w wyniku interakcji ADP z dwoma receptorami -ADIPOR1 i ADIPOR2. Aktywacja pierwszej kaskady uwarunkowana jest bodźcami pozakomórkowymi, np. światłem UV, ciepłem, cytokinami prozapalnymi, czynnikami wzrostu. W konsekwencji obserwuje się zmiany ekspresji czynników transkrypcyjnych, do których zalicza się: aktywujący czynnik transkrypcyjny 1, 2 i 6 (ATF-1/2/6), białko SRF (Sap1), CHOP (GADD153), p53, C/EBP $\beta$ , wzmacniający czynnik miocytów 2C (MEF2C, MEF2A), i białko grupowe 1 o wysokiej mobilności 1 (HBP1), AP-1 (rycina 3) [94,96,97].

Natomiast szlak zależny od AMPK aktywowany przez ADP wpływa modulująco na proces angiogenezy, zarówno wzmacniając ją w odpowiedzi na hipoksję, jak i także hamując [94,95,96,97].



Rycina 3 Szlaki sygnalizacyjne i procesy biologiczne zależne od adiponektyny [94]

APPL1 – białko adaptorowe 1; IRS1/2 - substrat receptora insuliny 1/2; PPAR-α - Receptor alfa, aktywowany przez proliferatory peroksyosomów; AMPK - kinaza białkowej aktywowanej przez AMP; Rab5 – białko Rab5; eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; IKK - kinaza κB; NFκB- jądrowy czynnik kappa B; PTEN - phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten.

### 1.7.2.1. Znaczenie adiponektyny w procesach nowotworzenia

Związek pomiędzy stężeniem adiponektyny a ryzykiem wystąpienia zmian nowotworowych został udokumentowany, w szczególności w odniesieniu do nowotworów związanych z insulinoopornością i otyłością.

Korelację tą szczególnie dobrze można zaobserwować u pacjentek poniżej 65 r.ż [98,99]. Odnotowano 6-krotnie wyższe ryzyko rozwoju nowotworu u osób otyłych, u których stężenie ADP było niższe niż w grupie zdrowych ochotników.

Podkreśla się, że to właśnie ta adipokina jest najsilniej związana z ryzykiem wystąpienia raka błony śluzowej trzonu macicy [100].

Warto zauważyć, że już samo obniżenie stężenia ADP (hipoadiponektynemii) stanowi niekorzystny marker rokowniczy przebiegu choroby nowotworowej. Stężenie ADP jest istotnie niższe u pacjentek z rakiem endometrium [101].

Poza tym należy podkreślić, że u kobiet z prawidłowym BMI i dużym stężeniem adiponektyny ryzyko indukcji i rozwoju procesu nowotworowego jest niemal

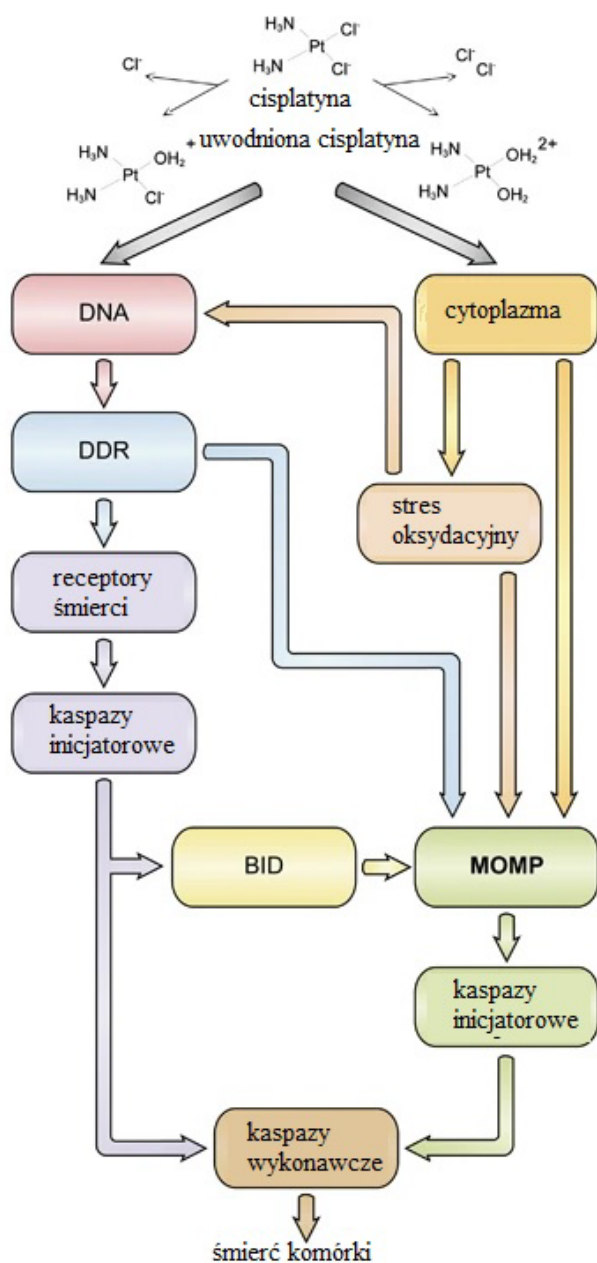
6-krotnie mniejsze niż u pacjentek z wysokim BMI [102]. Wskazuje się także, że u pacjentek z rakiem endometrium nisko zróżnicowanym (G3) stężenie ADP jest niższe niż u pacjentek z rakiem endometrium wysoko zróżnicowanym (G1) [103].

## **1.8. Cisplatyna**

Cisplatyna (DDP; cis-diamino-dichloroplatyna II; cis-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) jest związkiem nieorganicznym zawierającym metal ciężki – platynę, stosowanym od lat 70-tych XX wieku w chorobach nowotworowych (masa molowa 300,05 g/mol). Do chemioterapeutyków zawierających platynę, aktualnie stosowanych w onkologii zalicza się karboplatynę i oksaliplatynę. Lek ten stosuje się w monoterapii lub w leczeniu skojarzonym z innymi lekami o działaniu antynowotworowym w następujących wskazaniach: rak jąder, rak jajnika, nowotwory szyjki i trzonu macicy, zaawansowany rak pęcherza moczowego, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi oraz rak płuca [104,105].

### **1.8.1. Mechanizm działania cisplatyny**

Mechanizm działania cisplatyny związany jest z oddziaływaniem związków platyny z materiałem genetycznym komórki, czyli kwasem deoksyrybonukleinowym (DNA), z którym tworzą wiązania krzyżowe w obrębie cząsteczki DNA, jak i pomiędzy cząsteczkami. W konsekwencji dochodzi do zaburzenia struktury DNA, powstawania pęknięć, nieprawidłowej syntezy DNA i kwasu rybonukleinowego (RNA) oraz zahamowania podziałów komórkowych (rycina 4) [104,105].



Rycina 4 Molekularny mechanizm działania cisplatyny [rycina własna].

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy; BID- białko BID; MOMP- utrata integralności błony mitochondrialnej, ang. Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

Ze względu na to, że stężenie jonów chlorkowych (około 4 mM) we wnętrzu komórki jest mniejsze niż poza nią (około 100 mM), cisplatyna po wnikięciu do komórki ulega chemicznej modyfikacji. Jej atomy Cl w konfiguracji *cis* zostają zastąpione cząsteczkami wody, dzięki czemu zyskuje ona możliwość reagowania z miejscami nukleofilowymi makromolekuł, czego konsekwencją są powstające addukty z grupami sulfhydryłowymi cysteiny i metioniny białek lub z zasadami purynowymi kwasów nukleinowych. Cząsteczki wody są szybko zastępowane przez wiązania kowalencyjne powstające między atomem platyny a N7 guaniny lub adeniny

i tworzone są monoaddukty w obrębie jednego łańcucha. Jeśli w obrębie nowo powstałego monoadduktu występują inne miejsca reaktywne obserwuje się powstawanie wiązań krzyżowych. Oddziaływania pomiędzy adduktami cisplatyny powodują dalsze zmiany w konformacji DNA i pęknięć cząsteczki, co przyczynia się do zahamowania replikacji i transkrypcji [104,105]. W usuwanie adduktów cisplatyny z cząsteczek DNA zaangażowany jest mechanizm naprawy poprzez wycinanie nukleotydów (NER, ang. Nucleotide Excision Repair) oraz system naprawy niesparowanych zasad (MMR, ang. MisMatch Repair). W sytuacji, gdy zakres uszkodzeń DNA jest ograniczony obserwuje się zatrzymanie cyklu komórkowego pomiędzy fazą S/G2, co pozwala mechanizmom naprawy DNA na usunięcie uszkodzeń, zapobieżenie nieprawidłowym lub nieudanym podziałom mitotycznym komórki. Natomiast, jeśli uszkodzenia DNA nie są możliwe do naprawienia komórka kierowana jest na drogę śmierci (najczęściej apoptozę). Nerozpoznanie uszkodzeń w DNA wywołanych przez cisplatynę jest związane z wiązaniem się białek HGM (high-mobility group proteins) do wytworzonych przez cisplatynę wiązań krzyżowych [106].

Efekt działania cisplatyny jest wzmacniany poprzez nasilenie immunogenności nowotworu oraz poprzez zwiększenie jego wrażliwości na radioterapię [104,105].

Niemniej należy mieć na uwadze doniesienia wskazujące, że tylko 1% wewnątrzkomórkowej cisplatyny wiąże się do DNA [107] oraz że efekt cytotoksyczny leku był obserwowany także w komórkach bez jądra komórkowego, tzw. cytoplasmach [108].

Cisplatyna aktywuje przede wszystkim szlaki sygnałowe zależne od białka p53, określanego także jako „strażnik genomu” oraz szlak MAPK [109].

W odniesieniu do szlaku zależnego od białka p53, pierwszym etapem jest aktywacja kinaz, regulujących stabilność i aktywność transkrypcyjną supresora p53, a które są aktywowane przez białko AMT (ang. Ataxia Telangiectasia Mutated protein) oraz ATR (ATM- and Rad3-related protein). Cisplatyna wykazuje większe powinowactwo do białka ATR, który powoduje fosforylację reszt seryny białka p53 i je aktywuje [110].

Wang i wsp. [111] wykazali, że cisplatyna aktywuje trzech członków rodziny MAPK kinaz, a mianowicie kinazy ERK, kinazy c-Jun N-końcowe (JNK) i kinazy p38. Zwracają przy tym uwagę, że szlak zależny od ERK jest kluczowy w aktywacji białka p53 i aktywacji procesu apoptozy komórki [111]. Yeh i wsp. [112] stwierdzili, że hamowanie szlaku MEK–ERK prowadzi do wystąpienia oporności

na cisplatynę [112], podczas gdy Den i wsp. [113] zaobserwowali, że aktywacja kaskad ERK i JNK MAPK przez cisplatynę antagonizuje apoptozę [113]. Niewykluczone zatem, że opisywana rozbieżność może mieć związek z kontekstem biologicznym i zależeć od zakresu uszkodzeń DNA wywołanych przez cisplatynę [112,113].

Programowana śmierć komórki wywoływana przez cisplatynę zachodzi zarówno poprzez mechanizm zależny od mitochondrium, podczas którego obserwuje się uwolnienie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy komórki i aktywację prokaspazy 3 i 9, jak również poprzez szlak zależny od receptorów śmierci Fas/FasL i kaspazę 8 [107,108].

Pomimo korzystnego efektu terapeutycznego wywieranego przez cisplatynę, lek ten charakteryzuje się działaniem neurotoksycznym, ototoksycznym i nefrotoksycznym, zależnym od dawki, które może nasilać się wraz z dawką skumulowaną. Lek podawany jest we wlewach, w 90% wiąże się z białkami osocza i wydalany jest głównie z moczem, w niewielkiej ilości również z żółcią [104,105].

### **1.8.2. Cisplatyna w raku endometrium**

Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej (PTGO) z 2017 roku w przypadku raka endometrium stosowana w stężeniu 60 mg/m<sup>2</sup> w terapii adjuwantowej [114].

W randomizowanym badaniu przeprowadzonym przez Gynecologic Oncology Group (GOG) 122 396 pacjentek z rakiem endometrium w stopniu III i IV zostało losowo przydzielonych do grupy, u której stosowano radioterapię (202 kobiety) lub chemioterapię (194 kobiety) w postaci połączenia doksorubicyny i cisplatyny. W grupie, u której zastosowano chemioterapię 5-letni czas przeżycia wolny od progresji (PFS, ang. progression-free survival), czyli od rozpoczęcia leczenia do wystąpienia progresji choroby lub zgonu, jak także czas przeżycia całkowitego (OS, ang. overall survival), definiowany jako czas od rozpoznania choroby lub rozpoczęcia leczenia do zgonu był istotnie wyższy w porównaniu do grupy poddanej radioterapii (PFS 50% vs. 38%; p<0,01, OS 55% vs. 42%; p< 0,01). Wyniki te przyczyniły się do powszechnego stosowania uzupełniającej chemioterapii u kobiet w Stanach Zjednoczonych z rakiem endometrium w III stopniu zaawansowania [115].

Jednak we włoskim randomizowanym badaniu przeprowadzonym na grupie 345 pacjentek z rakiem endometrium w stopniu IC, II i III nie wykazano istotnej

statystycznie różnicy we wskaźnikach PFS i OS pomiędzy grupą 174 pacjentek zakwalifikowanych do radioterapii a grupą 166 kobiet, które otrzymały chemioterapię składającą się z cisplatyny, doksorubicyny i cyklofosfamidu (PFS 63% vs. 63%;  $p=0,64$ , OS 69% vs. 66%;  $p=0,85$ ) [116]. W trzecim badaniu przeprowadzonym przez Japanese Gynecologic Oncology Group zrandomizowano 385 pacjentek do radioterapii ( $n=193$ ) lub chemioterapii z użyciem doksorubicyny i cyklofosfamidu ( $n=192$ ) w stadium IC, II i III. Również tutaj różnice nie były znamienne statystycznie (PFS 83,5% vs. 81,8%;  $p=0,788$ , OS 85,3% vs. 86,7%;  $p=0,268$ ) [117].

W badaniach porównywano także skuteczność mieszaniny różnych leków, w tym cisplatyny w chemioterapii u kobiet z rakiem endometrium w III stadium.

Thigpen et al. [118] skuteczność doksorubicyny ( $n=150$ ) w porównaniu do mieszanki doksorubicyny i cisplatyny ( $n=131$ ), gdzie mediana przeżycia wyniosła 3,8 miesiąca vs. 5,7 miesiąca (PFS  $p=0,014$ ) [118].

Z kolei, Fleming et al. [119] porównał efektywność chemioterapii, gdy stosowano doksorubicynę z cisplatyną ( $n=156$ ) lub doksorubicynę i paclitaxel ( $n=157$ ). Mediana przeżycia pacjentek w pierwszej grupie wyniosła 7,2 miesiąca, a w drugiej 6 miesięcy i różnica między nimi nie była istotna statystycznie (PFS  $p=0,46$ ) [119].

Natomiast gdy porównano efektywność w grupie pacjentek otrzymujących doksorubicynę i cisplatynę ( $n=129$ ) z grupą otrzymującą doksorubicynę, cisplatynę i paclitaxel ( $n=134$ ) mediana przeżycia wyniosła odpowiednio 5,3, miesiąca vs. 8,3 miesiąca (PFS  $p<0,01$ ) [120].

## **2. Cel pracy i hipotezy badawcze**

Nadrzędnym celem pracy była ocena zmian wzorca ekspresji genów kodujących wybrane adipokiny i czynniki prozapalne w hodowli komórkowej raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej.

W niniejszej pracy wyodrębniono następujące zadania badawcze:

1. Ocena cytotoksyczności cisplatyny względem komórek raka trzonu macicy w porównaniu do hodowli nietraktowanej lekiem (kontrola);
2. poszukiwanie korelacji pomiędzy ekspresją wybranych genów na poziomie transkryptomu i proteomu.

W pracy zostaną zweryfikowane następujące hipotezy badawcze:

1. cisplatyna charakteryzuje się efektem cytotoksycznym wobec komórek raka endometrium linii Ishikawa w zależności od dawki i czasu ekspozycji komórek na lek;
2. cisplatyna wpływa na ekspresję wybranych genów kodujących czynniki prozapalne w hodowli raka endometrium linii Ishikawa;
3. cisplatyna wpływa na profil ekspresji genów kodujących wybrane adipokiny w hodowli raka endometrium linii Ishikawa;
4. istnieje zależność pomiędzy profilem ekspresji genów kodujących czynniki prozapalne i adipokiny.

### **3. Materiał i metody**

#### **3.1. Hodowla raka endometrium linii Ishikawa ekspozowanej na cisplatynę**

Komórki raka endometrium linii Ishikawa (European Collection of Authenticated Cell Cultures; ECACC 99040201) były ekspozowane na działanie cisplatyny w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  przez okres 12, 24 i 48 godzin w porównaniu do hodowli kontrolnej (K), którą tworzą komórki nietraktowane cisplatyną.

Hodowlę komórkową prowadzono w sześciodołkowych naczynkach z wykorzystaniem dedykowanego dla linii Ishikawa medium hodowlanego, tj. Minimum Essential Medium (MEM), które wzbogacono 2 mM glutaminy, 1% roztworem niezbędnych aminokwasów (NEAA, ang. non-essential amino acid) i 5% roztworem płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. fetal bovine serum). Wykorzystano standardowe warunki prowadzenia hodowli komórkowej, tj. temperatura 37°C, atmosfera wysycenia dwutlenkiem węgla 5%.

Dla każdego czasu ekspozycji i stężenia cisplatyny przeprowadzono trzy powtórzenia techniczne.

#### **3.2. Ocena cytotoksyczności cisplatyny względem komórek raka endometrium**

Do zbadania cytotoksycznego wpływu cisplatyny względem hodowli komórkowej raka endometrium linii Ishikawa wykorzystano test z sulforodaminą B (Sigma Aldrich, Merck, numer CAS: 3520-42-1). Wykorzystano hodowlę komórkową w fazie logarytmicznego wzrostu ekspozowaną na działanie cisplatyny w zakresie stężeń 2,5  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$  przez okres 12, 24 i 48 godzin oraz hodowlę kontrolną, nietraktowaną lekiem.

Sulforodamina B to anionowy barwnik, wykazujący zdolność do wiązania się z resztami aminokwasowymi białek komórkowych. Oznaczenie cytotoksyczności w tym teście opiera się na podstawie ilości białka komórkowego.

W pierwszym etapie hodowla komórkowa Ishikawa w fazie logarytmicznego wzrostu została przepasażowana do 24-dołkowego naczynka w ilości 20000 komórek/2 ml pożywki na studzienkę i inkubowano w temperaturze 37°C, 5% CO<sub>2</sub> przez 1 dobę.

Następnie, po zakończonej inkubacji przyklejone do dna naczynka komórki utrwalono poprzez dodanie 500  $\mu$ l 50% roztworu kwasu trójchlorowego (TCA) w temperaturze 4<sup>o</sup>C przez 60 minut. Kolejnym etapem było pięciokrotne przepłukanie każdej studzienki wodą apirogenną. Po tym etapie do każdej studzienki dodano 500  $\mu$ l 0,4% roztworu sulforodaminy rozpuszczonego w 1% kwasie octowym i pozostawiono na 30 minut. Po tym czasie, w celu odpłukania nadmiaru niezwiązanego barwnika, płytkę odwrócono do góry nogami oraz przepłukano czterokrotnie płytkę 1% roztworem kwasu octowego. Następnie płytka była suszona na powietrzu przez okres 5 minut. W dalszej kolejności, związany barwnik rozpuszczono w każdej studziencie poprzez dodanie 1500  $\mu$ l 10 mM buforu Tris i wytrząsanie przez 5 minut.

W ostatnim etapie analizy, komórki raka endometrium przepasażowano do szalek 96-dołkowych i odczytano absorbancję przy długości fali 490-530 nm. Zostało przyjęte, że wartość absorbancji odczytana dla hodowli kontrolnej odpowiada 100% żywotności komórek nowotworowych. Natomiast w przypadku hodowli eksponowanej na cisplatynę wartość absorbancji stanowi procent z hodowli kontrolnej.

### **3.3. Ekstrakcja całkowitego RNA z hodowli komórkowej**

Ekstrakcja całkowitego kwasu rybonukleinowego (RNA) z hodowli raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na cisplatynę i hodowli kontrolnej została przeprowadzona z wykorzystaniem odczynnika TRIzol® (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).

W pierwszej kolejności 1 ml odczynnika TRIzol został dodany do osadu komórkowego. Po trwającej 5 minut inkubacji w temperaturze pokojowej dodano 0,2 ml schłodzonego chloroformu, następnie zworteksowano i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbki zwirowano, przyjmując następujące parametry 15 min., 12000 RPM, temperatura 4<sup>o</sup>C. Pozwoliło to na rozdzielenie się warstw, przy czym górna warstwa, w której zawarte było RNA została przeniesiona do nowego ependorfa. Do supernatantu dodano 0,5 ml alkoholu izopropylowego i wymrażano w temperaturze -20<sup>o</sup>C przez 12 godzin.

Po tym czasie, próbki zostały zwirowane, przyjmując następujące parametry 10 min., 12500 RPM, 4<sup>o</sup>C, a supernatant zdekantowano. Następnie osady RNA przemyto dwukrotnie 70% alkoholem etylowym i zwirowano przy parametrach:

6 min., 9000 RPM, 4<sup>0</sup>C. W kolejnym etapie w celu odparowania etanolu osady suszono pod komorą laminarną przez ok. 30 min. Ostatni etap związany był z oczyszczeniem wyekstrahowanego RNA przy użyciu zestawu firmy Qiagen: RNeasy Mini Kit.

Po tych czynnościach, suche ekstrakty RNA były przechowywane w warunkach niskotemperaturowych -80<sup>0</sup>C do momentu następných analiz.

### **3.3.1. Analiza jakościowa ekstraktów RNA**

W celu przeprowadzenia oceny jakościowej wyizolowanych ekstraktów RNA wykorzystano technikę elektroforezy agarozowej z dodatkiem bromku etydyny. Do obciążenia ekstraktów RNA wykorzystano mieszaninę: 0,25% m/v roztwór błękitu bromofenolowego, 0,25% m/v roztwór ksylenu cyjanolowego SF, 40% m/v roztwór sacharozy w wodzie.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono w temperaturze pokojowej i przy stałym napięciu 40V do chwili pokonania przez próbki odległości 2/3 żelu (20-30 minut).

Do dalszej analizy wykorzystano tylko te ekstrakty, dla których w rozdziale elektroforetycznym uwidoczniło dwa prążki odpowiadające frakcjom 18S rRNA i 28S rRNA.

### **3.3.2. Analiza ilościowa ekstraktów RNA**

Ilościowej analizie otrzymanych ekstraktów kwasu nukleinowego RNA dokonano poprzez przeprowadzenie pomiarów spektrofotometrycznych.

Po rozmrożeniu i zworteksowaniu 1 μl ekstraktu został naniesiony na kryształ spektrofotometru w celu odczytania wartości absorbancji przy długości fali 230 nm, 260nm, 280nm i 320nm.

Stosunek absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm (A<sub>260/280</sub>) posłużył jako wyznacznik zanieczyszczenia izolatów białkiem. Do dalszych etapów analizy wykorzystano ekstrakty, dla których wartość A<sub>260/280</sub> był w zakresie 1,8-2,0.

### **3.4. Wyznaczenie transkryptomu mRNA techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133\_A2**

Technika mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133\_A2 została wykorzystana do oceny profilu ekspresji genów wybranych czynników prozapalnych i adipokin w hodowli Ishikawa eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do kontroli.

W pierwszej kolejności przygotowano egzogenną kontrolę poly-A RNA, którą dodano do matrycy kwasu nukleinowego. Ten etap umożliwia kontrolowanie procesu przygotowania i hybrydyzacji RNA. W dalszej kolejności z wykorzystaniem zestawu odczynników GeneChip 3'IVT Express Kit (ThermoFisher Scientific, USA) zainicjowano proces syntezy dwuniciowego cDNA na matrycy kwasu rybonukleinowego. Następnie 5 µl mieszaniny całkowitego RNA inkubowano w temperaturze 42°C przez 2 godziny z kontrolą poly-A i 5µl First Strand Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA). W dalszej kolejności do mieszaniny reakcyjnej dodano 20µl Second Strand Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA) i poddano inkubacji przez 1 godzinę w 16°C i przez 10 minut w 65°C. Później, do 30µl IVT Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA) dodano cDNA, a całość inkubowano w temperaturze 40°C przez 16 godzin. Kolejne etapy obejmowały oznakowanie aRNA biotyną, oczyszczanie z zastosowaniem aRNA Binding Mix (ThermoFisher Scientific, USA), następnie pofragmentowanie z użyciem buforu Array Fragmention Buffer (ThermoFisher Scientific, USA) przez 35 minut w 94°C. Po zakończeniu tego etapu przeprowadzono syntezę biotynyłowego aRNA i następnie hybrydyzację z mikromacierzą HG-U133A\_2 przez 16 godzin w 45°C. Mieszanina hybrydyzacyjna została sporządzona z wykorzystaniem zestawu Gene Chip Hybridization, Wash i Stain Kit (ThermoFisher Scientific, USA).

Skaner Affymetrix Gene Array Scanner 3000 7G i GeneChip® Command Console® Software wykorzystano w celu analizy intensywności fluorescencji transkryptów. Geny do analizy mikromacierzowej zostały wytypowane w oparciu o bazę danych AffymetrixNetAffx™ Analysis Center database (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>).

### 3.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją (RTqPCR)

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją (RTqPCR, ang. Real-Time Quantitative Reverse Transcription Reaction) została wykorzystana w celu potwierdzenia obserwowanych zmian wytypowanych techniką mikromacierzy. Ten etap analizy jest istotny, gdyż eksperyment mikromacierzowy jest badaniem przesiewowym, półilościowym, stąd konieczne jest potwierdzenie wyników techniką ilościową. Do przeprowadzenia reakcji RTqPCR wykorzystano odczynnik SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Kit (Bioline, London, UK) oparty o barwnik SybrGreen i specyficzne pary starterów (tabela 2). Jako kontrolę endogenną reakcji wykorzystano  $\beta$ -aktynę (*ACTB*). Reakcja była prowadzona w 50  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej.

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).

Specyficzność przeprowadzonej reakcji została potwierdzona temperaturą topnienia produktu reakcji PCR.

Zmiany w aktywności transkrypcyjnej ocenianych genów przedstawiono wykorzystaniem metody relatywnej (metoda  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) jako wielokrotność zmiany ekspresji genu w hodowli komórkowej traktowanej cisplatiną w porównaniu z hodowlą kontrolną (FC, ang. Fold Change).

Przyjęto, że:

- FC = 1 - komórki nietraktowane (kontrola);
- FC > 1 - nadekspresja w porównaniu z kontrolą;
- FC < 1; obniżenie ekspresji w porównaniu z kontrolą.

Tabela 2 Sekwencja nukleotydoma starterów wykorzystanych w reakcji RTqPCR

mRNA	Sekwencja nukleotydoma starterów
<i>ADP</i>	Forward GTTTTATTGGTTTTAAGGGAGATAT Reverse TCCAATCCCACACTAAATACTAAAC
<i>ADIPOR1</i>	Forward TTTTGTTAGAAGAGAAGGGTAAACG Reverse TCATATAAAATAACCTCCAACGTC
<i>ADIPOR2</i>	Forward TAGCGGTGGTTTTTAAGAAGTTC Reverse CCAATCGATTTTCTATTAACCTCGTT
<i>LEP</i>	Forward GAAGACCACATCCACACACG Reverse AGCTCAGCCAGACCCATCTA
<i>LEPROT</i>	Forward GCTTGGAGAGGCAGATAACG Reverse AATGTCCTGGGTCCAGAGTG
<i>LEPROTL1</i>	Forward TGCAATGTGGAAGAAATGA Reverse AAGGAGGAAGCAGAGGAAGG
<i>LEPR</i>	Forward ACAGTCCCTTTGTGGGTCAG Reverse TATCCGAGCTCCAGCGTACT
<i>JAK2</i>	Forward AGTAAAAGTCCACCAGCGGA Reverse AGGAGGGGCGTTGATTTACA
<i>STAT3</i>	Forward AAAGCAGCAAAGAAGGAGGC Reverse CTGGCCGACAATACTTTCCG
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Forward GAGTATTGAAAGTATGATTCCGGGAC Reverse CAAAATACAACAAACAAAAAACGTA
<i>IL-6</i>	Forward TTAGGAGAAGATTTTAAAGATGTAGT Reverse TCTCCTTTCTCAAACTAAATACC
<i>ACTB</i>	Forward :5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' Reverse:5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

Forward – starter sensowny, Reverse – starter antysensowny; *ADP* – adiponektyna; *ADIPOR1* – receptor 1 dla adiponektyny; *ADIPOR2* – receptor 2 dla adiponektyny; *LEP* – leptyna; *LEPR* – receptor leptyny; *LEPROT* – ang. Leptin receptor overlapping transcript; *LEPROTL1* – ang. Leptin receptor overlapping transcript-like 1; *JAK2* – kinaza janusowa 2; *STAT3* – czynnik indukcji transkrypcji 3; *TNF- $\alpha$*  – czynnik martwicy nowotworu alfa; *IL-6*- interleukina 6; *ACTB* –  $\beta$ -aktyna

### 3.6. Test immunoenzymatyczny ELISA

Ostatnim etapem analizy molekularnej była ocena zmian stężenia wybranych białek w medium hodowlanym komórek raka endometrium linii Ishikawa do których dodano cisplatynę w porównaniu do hodowli kontrolnej, czyli komórek nieekspozowanych na lek. W tym celu przeprowadzono kanapkową odmianę testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) w 96-dołkowych szalkach zgodnie z rekomendacją producenta.

W tabeli 3 przedstawiono nazwy kitów wykorzystane w analizie ELISA. Odczyt absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm z wykorzystaniem czytnika  $\mu$ Quant (Vermont, USA).

Tabela 3 Nazwy zestawów wykorzystane do przeprowadzenia testu ELISA

<b>Nazwa oznaczonego Białka</b>	<b>Nazwa zestawu i numer katalogowy</b>	<b>Zakres Oznaczeń</b>
Leptyna	Human Leptin PicoKine ELISA Kit MBS175890	156pg/ml-10000pg/ml
Adiponektyna	Human Adiponectin PicoKine ELISA Kit MBS175955	1,56ng/ml-100ng/ml
Czynnik martwicy nowotworu alfa	TNF alpha ELISA Kit MBS175820	15,6pg/ml-1000pg/ml
Interleukina 6	Human IL-6 PicoKine ELISA Kit MBS175877	4,69 pg/ml-300pg/ml
Kinaza Janusa 2	JAK2 ELISA Kit ab253224	390,60 pg/ml-25000 pg/ml
Czynnik transdukcji transkrypcji 3	STAT3 ELISA Kit ab126427	15 µg/ml - 1500 µg/ml

### 3.7. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wyników wykorzystano program the Transcriptome Analysis Console program (Thermo Fisher Scientific) oraz licencjonowaną wersję programu STATISTICA 13.3 (StatSoft, Kraków, Polska). Dla wszystkich analiz przyjęto próg istotności statystycznej  $p < 0,05$ .

Zgodność rozkładu otrzymanych danych z rozkładem normalnym zweryfikowano testem Shapiro-Wilka i na podstawie uzyskanego wyniku ( $p > 0,05$ ) dalsze analizy przeprowadzono z wykorzystaniem metod parametrycznych.

Homogenność wariancji została zweryfikowana testem Levene'a ( $p < 0,05$ ). W celu określenia czy obserwowane różnice ekspresji genów i białek w hodowli komórkowej eksponowanej na cisplatinę w porównaniu do kontroli przeprowadzono test wariancji ANOVA a następnie test post – hoc Tukey'a ( $p < 0,05$ ).

Współczynnik korelacji Pearsona ( $r$ ) wykorzystano w celu poszukiwania zależności pomiędzy ekspresją ocenianych adipokin i czynników prozapalnych o potencjalnym znaczeniu w raku trzonu macicy. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.

## 4. Wyniki

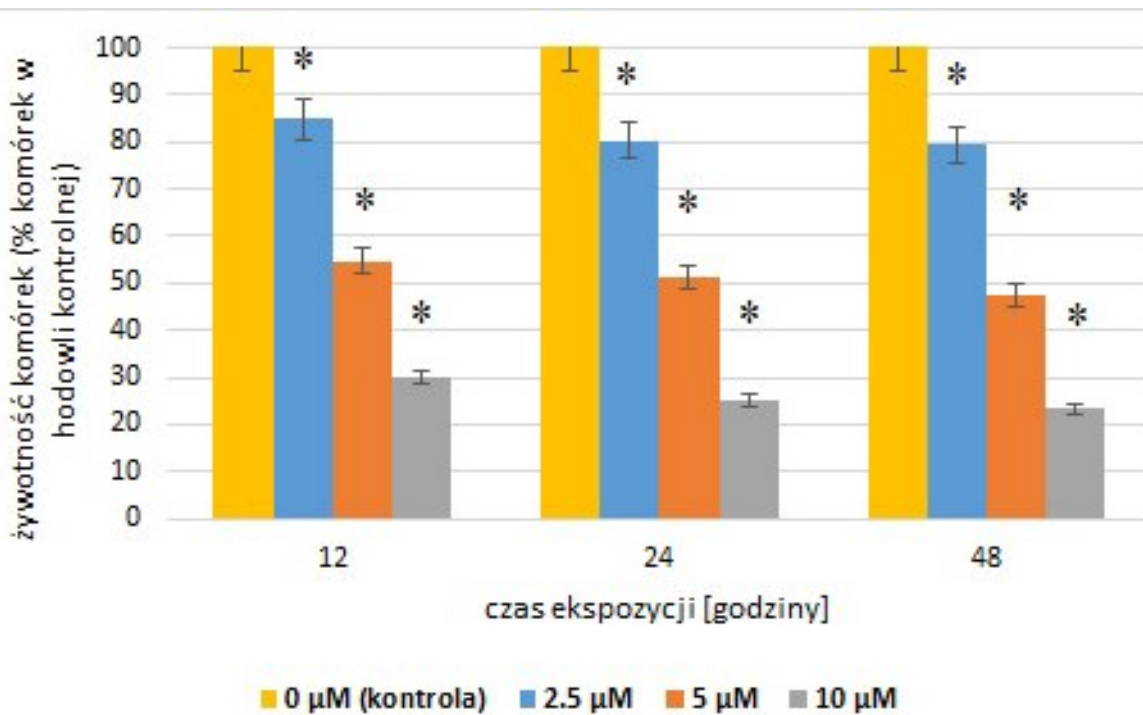
### 4.1. Wyniki testu cytotoksyczności z sulforodaminą A

Na podstawie uzyskanych wyników testu cytotoksyczności można zaobserwować, iż niezależnie od stężenia cisplatyny, którą dodano do hodowli komórkowej następuje spadek liczby żywych komórek w porównaniu do hodowli kontrolnej (rycina 1).

Dla stężenia 2,5  $\mu\text{M}$  cisplatyny po 12, 24 i 48 godzinach od jej dodania do hodowli, żywotność komórek wynosi ok. 80% kontroli. Dalsze zwiększenie stężenia leku do 5  $\mu\text{M}$  spowodowało zahamowanie proliferacji niemalże o 50%. Z tego względu, na podstawie wykresu dawka-efekt (rycina 1) stężenie 5  $\mu\text{M}$  jest średnim stężeniem hamującym (IC<sub>50</sub>, ang. average inhibitory concentration) wzrost komórek raka endometrium linii Ishikawa.

Z kolei, gdy hodowlę eksponowano na działanie cisplatyny w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , procent żywych komórek zmniejszył się o 70-80% w porównaniu do hodowli nietraktowanej lekiem (rycina 5). Różnice w procencie żywych komórek raka endometrium eksponowanych na różne stężenia cisplatyny przez różny czas w porównaniu do hodowli kontrolnej były znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

Dla najniższego stężenia leku statystycznie istotne różnice odnotowano pomiędzy czasem: 12 godzin vs. K  $p = 0,001$ ; 24 godziny vs. K  $p = 0,001$ ; 48 godzin vs. K  $p = 0,001$ . Również przy zastosowaniu IC<sub>50</sub> cisplatyny odnotowano znamienności statystyczne w żywotności komórek (12 godzin vs. K  $p = 0,00001$ ; 24 godziny vs. K  $p = 0,00002$ ; 48 godzin vs. K  $p < 0,00001$ ). Taką samą tendencję odnotowano dla stężenia 10  $\mu\text{M}$  cisplatyny (12 godzin vs. K  $p < 0,00001$ ; 24 godziny vs. K  $p < 0,00001$ ; 48 godzin vs. K  $p < 0,00001$ ).



Rycina 5 Wyniki testu cytotoksyczności cisplatyny w zakresie stężeń 2,5 µM-10 µM względem hodowli raka endometrium linii Ishikawa

\* - istotne statystycznie różnice (test post – hoc Tukey`a;  $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów na poziomie transkryptomu w hodowli raka endometrium eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej

W pierwszej kolejności oceniono mikromacierzowy profil ekspresji leptyny, adiponektyny i jej receptorów w hodowli raka endometrium linii Ishikawa, którą inkubowano z cisplatyną w stężeniu 2,5 µM, 5 µM i 10 µM przez 12, 24 i 48 godzin w porównaniu do hodowli kontrolnej (tabela 3;  $p < 0,05$ ). Na podstawie uzyskanych wyników można zaobserwować, iż pod wpływem cisplatyny następuje obniżenie aktywności transkrypcyjnej leptyny i jej trzech receptorów. Odnotowano tym mniejszą ekspresję omawianych genów, im wyższe było stężenie leku dodanego do hodowli oraz dłuższy czas ekspozycji komórek na niego (tabela 4;  $p < 0,05$ ).

Z kolei dla adiponektyny i jej receptorów można zaobserwować odmienny do obserwowanego dla leptyny i jej receptorów profil ekspresji w zależności od stężenia cisplatyny i czasu traktowania nią komórek raka endometrium. Im wyższe stężenie leku i czas ekspozycji komórek, tym większa nadekspresja adiponektyny i jej receptorów (tabela 4;  $p < 0,05$ ).

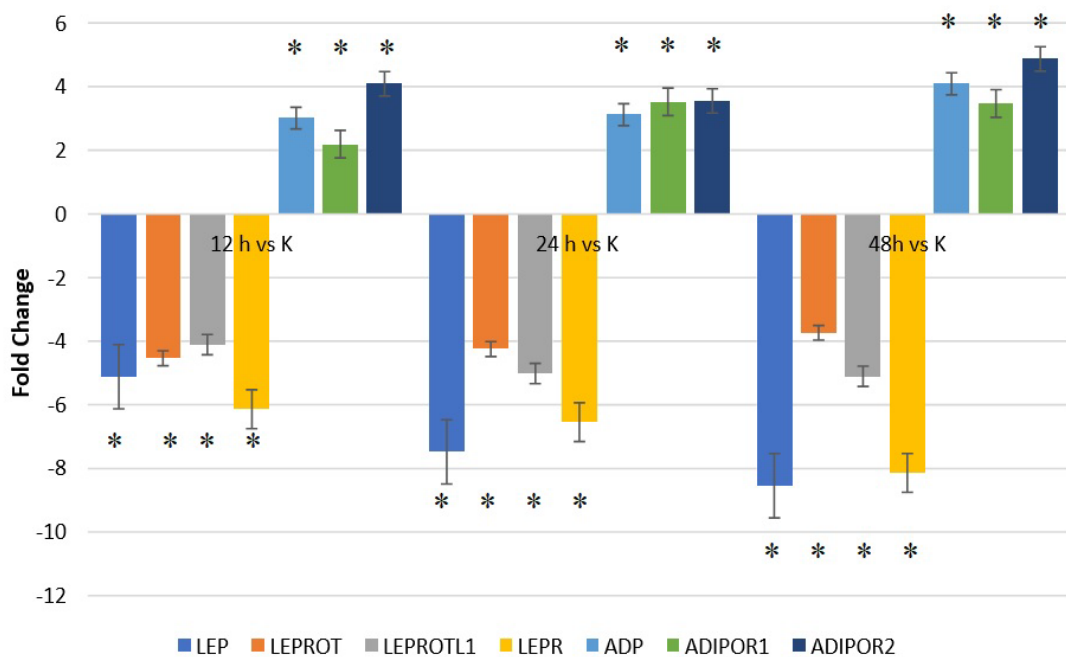
Tabela 4 Mikromacierzowy profil ekspresji adipokin w hodowli Ishikawa eksponowanej na cisplatinę w porównaniu do kontroli.

stężenie leku [μM]	Gen	ID	12 h vs K (FC)	24 h vs K (FC)	48h vs K (FC)
2,5	<i>LEP</i>	207092_at	-4,96	-7,89	-9,01
	<i>LEPROT</i>	202377_at	-3,47	-4,01	-3,66
		202378_s_at	-3,44	-4,11	-3,25
	<i>LEPROTL1</i>	202594_at	-4,05	-4,99	-5,04
		202595_s_at	-3,54	-4,58	-5,11
	<i>LEPR</i>	209894_at	-6,12	-6,99	-8,07
		209959_at	-6,10	-7,01	-8,14
		211167_s_at	-6,55	-6,47	-7,49
		211354_s_at	-7,36	-6,20	-7,99
		211355_x_at	-6,98	-6,99	-7,25
	211356_x_at	-8,01	-7,58	-9,06	
	<i>ADP</i>	207175_at	2,59	3,05	4,11
	<i>ADIPOR1</i>	217748_at	2,14	3,66	3,98
<i>ADIPOR2</i>	201346_at	4,01	3,58	4,74	
5	<i>LEP</i>	207092_at	-11,69	-13,55	-17,01
	<i>LEPROT</i>	202377_at	-4,85	-6,14	-5,98
		202378_s_at	-5,01	-6,25	-6,09
	<i>LEPROTL1</i>	202594_at	-7,58	-8,55	-8,47
		202595_s_at	-8,05	-8,41	-8,99
	<i>LEPR</i>	209894_at	-11,02	-14,96	-11,55
		209959_at	-10,58	-13,58	-12,99
		211167_s_at	-11,41	-14,01	-14,10
		211354_s_at	-11,01	-14,66	-13,54
		211355_x_at	-11,25	-14,98	-13,55
	211356_x_at	-11,69	-14,02	-13,41	
	<i>ADP</i>	207175_at	12,58	15,22	13,48
	<i>ADIPOR1</i>	217748_at	7,25	8,69	8,98
<i>ADIPOR2</i>	201346_at	10,01	14,87	15,21	
10	<i>LEP</i>	207092_at	-18,58	-19,03	-21,48
	<i>LEPROT</i>	202377_at	-5,99	-6,25	-4,58
		202378_s_at	-6,34	-6,14	-5,02
	<i>LEPROTL1</i>	202594_at	-11,02	-11,58	-11,66
		202595_s_at	-12,25	-10,99	-11,58
	<i>LEPR</i>	209894_at	-13,69	-14,55	-15,02
		209959_at	-14,01	-14,69	-14,99
		211167_s_at	-14,22	-15,02	-15,69
		211354_s_at	-13,98	-14,28	-14,69
		211355_x_at	-13,58	-14,01	-16,01
	211356_x_at	-13,47	-11,69	-16,48	
	<i>ADP</i>	207175_at	14,58	15,98	17,01
	<i>ADIPOR1</i>	217748_at	10,01	11,36	10,98
<i>ADIPOR2</i>	201346_at	12,58	17,41	13,11	

*ADP* – adiponektyna; *ADIPOR1* – receptor 1 dla adiponektyny; *ADIPOR2* – receptor 2 dla adiponektyny; *LEP* – leptyna; *LEPR* – receptor leptyny; *LEPROT* – ang. Leptin receptor overlapping transcript; *LEPROTL1* – ang. Leptin receptor overlapping transcript-like 1; (+) - nadekspresja w porównaniu do kontroli; FC – wielokrotność zmiany ekspresji, ang. Fold Change; (-) – obniżenie ekspresji w porównaniu do kontroli.

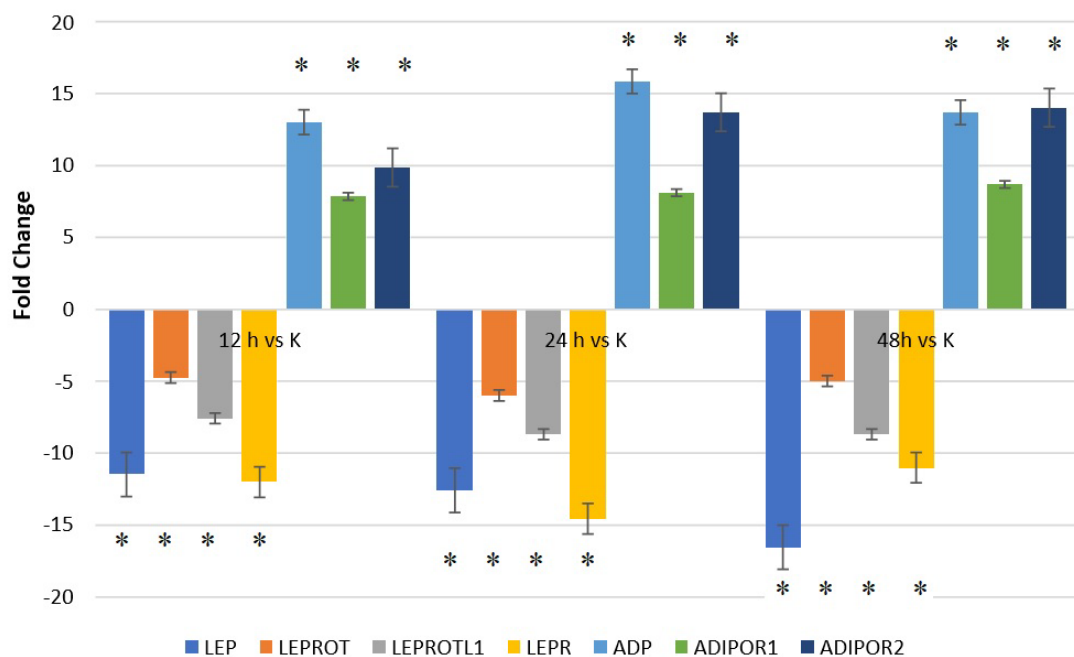
W kolejnym etapie, uzyskane podczas eksperymentu mikromacierzowego wyniki zmian wzorca ekspresji leptyny, adiponektyny i jej receptorów zostały zwalidowane reakcją RTqPCR (ryciny 6-8;  $p < 0,05$ ).

Uzyskane w tym etapie wyniki potwierdziły obserwowany w eksperymencie mikromacierzowym profil ekspresji omawianych transkryptów mRNA.



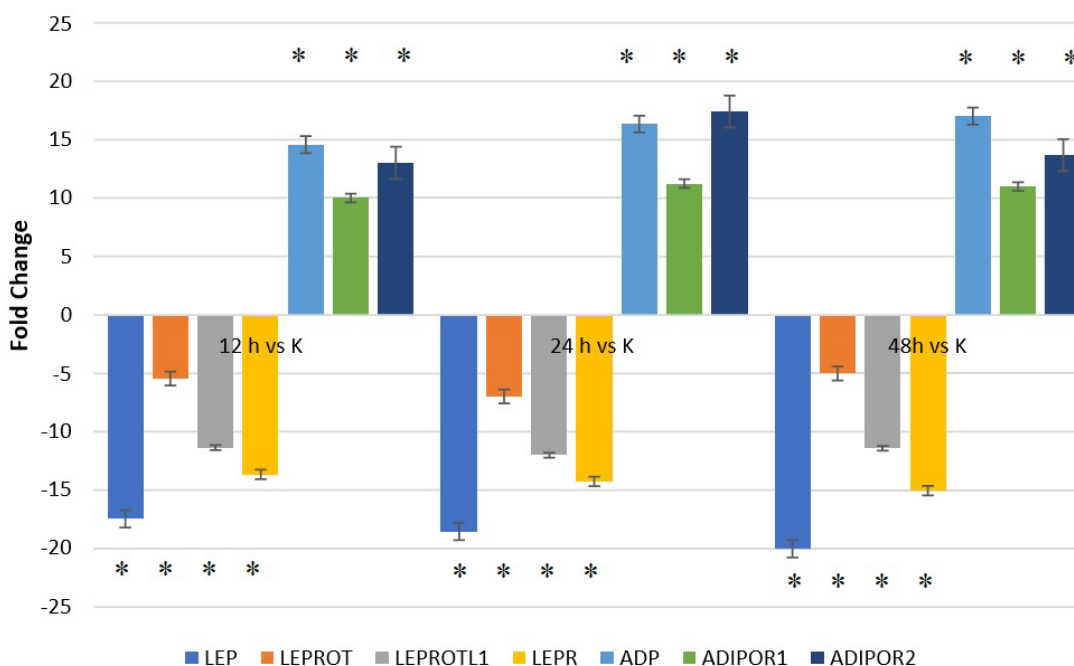
Rycina 6 Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatinę w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.

\* - istotne statystycznie różnice ekspresji w porównaniu do hodowli kontrolnej ( $p < 0,05$ ); *ADP* – adiponektyna; *ADIPOR1* – receptor 1 dla adiponektyny; *ADIPOR2* – receptor 2 dla adiponektyny; *LEP* – leptyna; *LEPR* – receptor leptyny; *LEPROT* – ang. Leptin receptor overlapping transcript; *LEPROTL1* – ang. Leptin receptor overlapping transcript-like 1; średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.



Rycina 7 Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów w hodowli raka endometrium eksponowanej na cisplatynę w stężeniu 5  $\mu$ M w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.

\* - istotne statystycznie różnice ekspresji w porównaniu do hodowli kontrolnej ( $p < 0,05$ ); *ADP* – adiponektyna; *ADIPOR1* – receptor 1 dla adiponektyny; *ADIPOR2* – receptor 2 dla adiponektyny; *LEP* – leptyna; *LEPR* – receptor leptyny; *LEPROT* – ang. Leptin receptor overlapping transcript; *LEPROTL1* – ang. Leptin receptor overlapping transcript-like 1; średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.



Rycina 8 Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów w hodowli raka endometrium eksponowanej na cisplatynę w stężeniu 5  $\mu$ M w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.

\* - istotne statystycznie różnice ekspresji w porównaniu do hodowli kontrolnej ( $p < 0,05$ ); *ADP* – adiponektyna; *ADIPOR1* – receptor 1 dla adiponektyny; *ADIPOR2* – receptor 2 dla adiponektyny; *LEP* – leptyna; *LEPR* – receptor leptyny; *LEPROT* – ang. Leptin receptor overlapping transcript; *LEPROTL1* – ang. Leptin receptor overlapping transcript-like 1; średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.

#### 4.3. Zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych na poziomie transkryptomu w hodowli raka endometrium eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej

W kolejnym etapie analizy molekularnej oceniono zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych w hodowli raka endometrium pod wpływem cisplatyny z zastosowaniem mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133\_A2. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 4 ( $p < 0,05$ ).

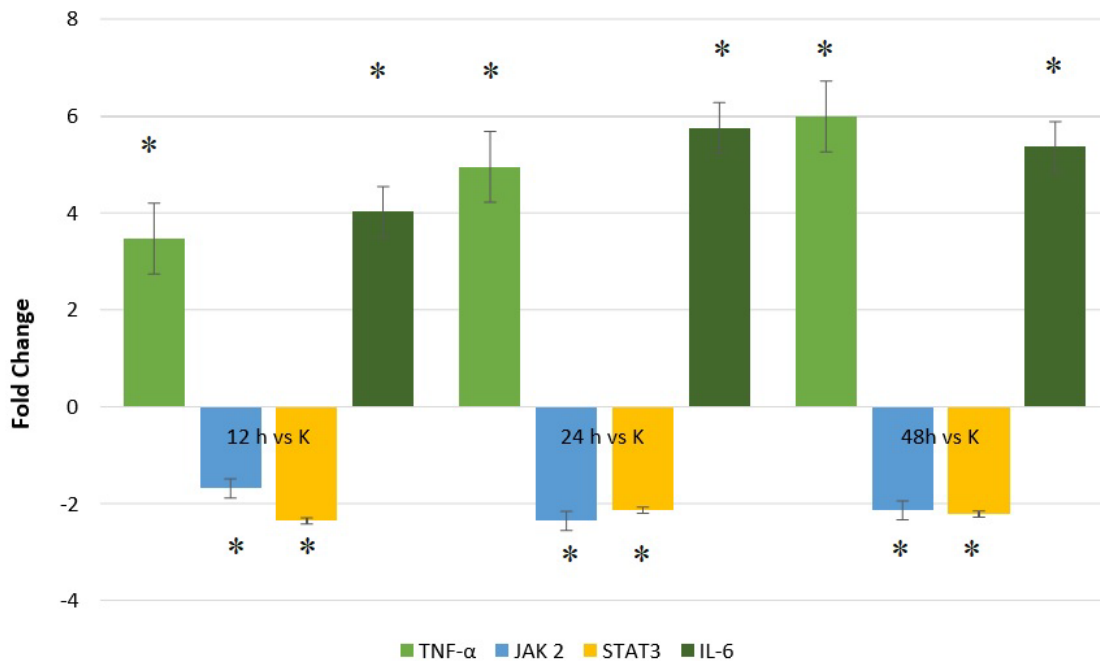
Można zaobserwować, iż dodanie cisplatyny do hodowli komórkowej spowodowało nadekspresję *TNF- $\alpha$*  i *IL-6* z równoczesnym obniżeniem ekspresji *STAT3* i *JAK2* (tabela 4;  $p < 0,05$ ). Różnice aktywności transkrypcyjnej ocenianych genów były bardziej widoczne, im wyższe zastosowano stężenie cisplatyny i czas inkubacji (tabela 5;  $p < 0,05$ ).

Tabela 5 Mikromacierzowy profil ekspresji wybranych czynników prozapalnych

stężenie leku [μM]	Gen	ID	12 h vs K (FC)	24 h vs K (FC)	48h vs K (FC)
2,5	<i>TNF-α</i>	207113_s_at	+3,66	+4,98	+6,33
	<i>JAK2</i>	205841_at	-1,69	-1,99	-2,19
		205842_s_at	-1,67	-2,03	-1,95
	<i>STAT3</i>	208991_at	-2,36	-2,14	-2,22
		208992_s_at	-2,41	-2,01	-1,99
<i>IL-6</i>	205207_at	+3,69	+5,96	+5,25	
5	<i>TNF-α</i>	207113_s_at	+5,69	+11,01	+12,54
	<i>JAK2</i>	205841_at	-1,74	-1,71	-1,81
		205842_s_at	-1,72	-1,54	-2,01
	<i>STAT3</i>	208991_at	-2,03	-1,98	-1,47
		208992_s_at	-2,15	-1,87	-1,55
<i>IL-6</i>	205207_at	+7,01	+9,69	+11,99	
10	<i>TNF-α</i>	207113_s_at	+6,36	+11,22	+13,89
	<i>JAK2</i>	205841_at	-1,98	-2,03	-2,11
		205842_s_at	-1,58	-1,78	-2,14
	<i>STAT3</i>	208991_at	-3,01	-2,58	-2,99
		208992_s_at	-2,98	-2,66	-3,02
<i>IL-6</i>	205842_s_at	+12,01	+14,25	+15,03	

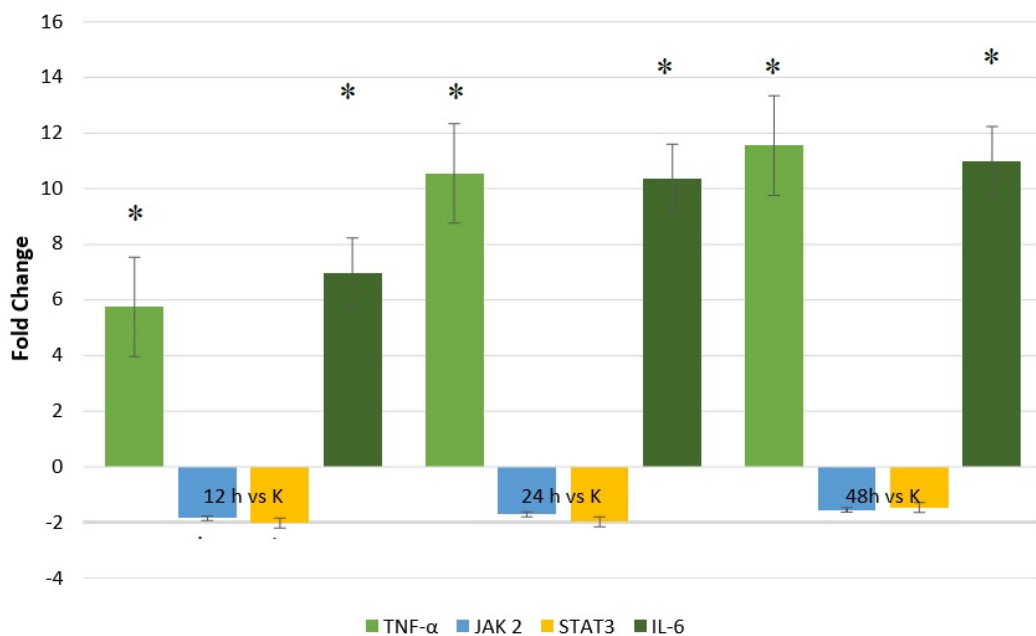
*JAK2* – kinaza janusowa 2; *STAT3* – czynnik indukcji transkrypcji 3; *TNF-α* – czynnik martwicy nowotworu alfa; *IL-6*- interleukina 6; (+) - nadekspresja w porównaniu do kontroli; FC – wielokrotność zmiany ekspresji, ang. Fold Change; (-) – obniżenie ekspresji w porównaniu do kontroli.

Następnie w celu potwierdzenia otrzymanych wyników przeprowadzono reakcję RTqPCR. Uzyskane w tym etapie wyniki potwierdziły obserwowany w eksperymencie mikromacierzowym profil ekspresji omawianych transkryptów (ryciny 9-11;  $p < 0,05$ ).



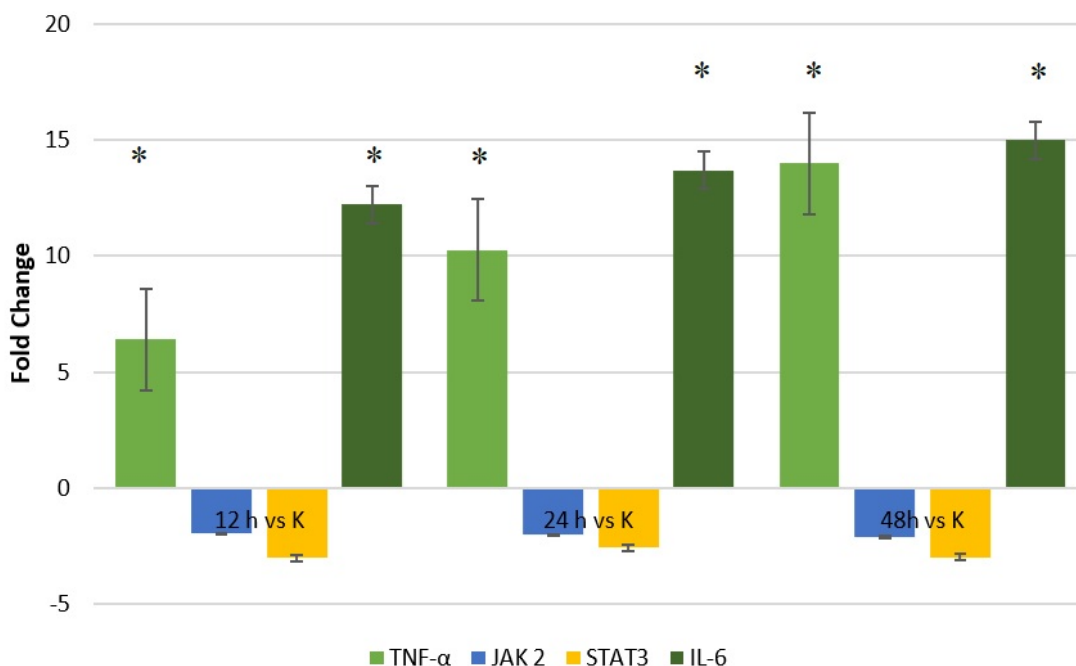
Rycina 9 Zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatynę w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.

\* - istotne statystycznie różnice ekspresji w porównaniu do hodowli kontrolnej ( $p < 0,05$ ); *JAK2* – kinaza janusowa 2; *STAT3* – czynnik indukcji transkrypcji 3; *TNF- $\alpha$*  – czynnik martwicy nowotworu alfa; *IL-6*- interleukina 6; średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.



Rycina 10 Zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych w hodowli raka endometrium ekspozowanej na cisplatynę w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.

\* - istotne statystycznie różnice ekspresji w porównaniu do hodowli kontrolnej ( $p < 0,05$ ); *JAK2* – kinaza janusowa 2; *STAT3* – czynnik indukcji transkrypcji 3; *TNF- $\alpha$*  – czynnik martwicy nowotworu alfa; *IL-6*- interleukina 6; średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.



Rycina 11 Zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych w hodowli raka endometrium eksponowanej na cisplatynę w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  w porównaniu do hodowli kontrolnej wyznaczone reakcją RTqPCR.

\* - istotne statystycznie różnice ekspresji w porównaniu do hodowli kontrolnej ( $p < 0,05$ ); *JAK2* – kinaza janusowa 2; *STAT3* – czynnik indukcji transkrypcji 3; *TNF- $\alpha$*  – czynnik martwicynowotworu alfa; *IL-6* – interleukina 6; średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.

#### 4.4. Zmiany profilu stężeń leptyny i adiponektyny na poziomie proteomu w hodowli raka endometrium eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej

W dalszej kolejności oceniono wpływ cisplatyny na stężenie leptyny w hodowli raka endometrium linii Ishikawa (tabela 5;  $p < 0,05$ ). Przy stężeniu cisplatyny równym 2,5  $\mu\text{M}$  statystycznie istotną różnicę odnotowano po 24 i 48-godzinnej ekspozycji na lek w porównaniu do kontroli ( $p < 0,05$ ). Najkrótszy czas ekspozycji nie wiązał się ze znamienym spadkiem stężenia leptyny.

Jednakże przy wyższych stężeniach cisplatyny na które eksponowano komórki raka endometrium zaobserwowano znamienne statystycznie różnice w jej stężeniu niezależnie od czasu inkubacji (tabela 6;  $p > 0,05$ ). Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała także istotne różnice w ekspresji leptyny na poziomie białka również pomiędzy poszczególnymi czasami ekspozycji (tabela 6;  $p < 0,05$ ).

Tabela 6 Stężenie leptyny w zależności od stężenia cisplatyny i czasu ekspozycji komórek raka endometrium.

czas ekspozycji stężenie leku [ $\mu\text{M}$ ]	12 godzin [pg/ml]	24 godzin [pg/ml]	48 godzin [pg/ml]
0 (kontrola)	921,977 $\pm$ 0,345	916,458 $\pm$ 0,298	947,011 $\pm$ 0,396
2,5	899,553 $\pm$ 0,518	820,800 $\pm$ 0,318 <sup>a</sup>	800,380 $\pm$ 0,532 <sup>a, d</sup>
5	704,453 $\pm$ 0,402 <sup>a</sup>	585,997 $\pm$ 1,721 <sup>a, b</sup>	401,317 $\pm$ 0,938 <sup>a, c, d</sup>
10	300,209 $\pm$ 0,180 <sup>a</sup>	205,909 $\pm$ 0,992 <sup>a, b</sup>	253,673 $\pm$ 1,773 <sup>a, c</sup>

średnia  $\pm$  odchylenie standardowe; a– statystycznie istotne różnice w stężeniu leptyny między komórkami eksponowanymi na cisplatynę a kontrolą (  $p < 0,05$ ); b– statystycznie istotne różnice w stężeniu leptyny między komórkami eksponowanymi na cisplatynę przez 12 i 24 godziny (  $p < 0,05$ ); c- statystycznie istotne różnice w stężeniu leptyny między komórkami eksponowanymi na cisplatynę przez 24 i 48 godzin (  $p < 0,05$ ); d– statystycznie istotne różnice w stężeniu leptyny między komórkami eksponowanymi na cisplatynę przez 12 i 48 godzin (  $p < 0,05$ ).

W niniejszej pracy oceniono także zmiany profilu stężeń adiponektyny w zależności od stężenia cisplatyny i czasu inkubacji w hodowli raka endometrium linii Ishikawa i kontroli (tabela 7;  $p < 0,05$ ).

Istotne zmiany w stężeniu adiponektyny były widoczne dopiero, gdy do hodowli komórkowej dodano cisplatynę w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ , niezależnie od czasu ekspozycji komórek na lek (tabela 7;  $p < 0,05$ ). Analiza statystyczna wykazała także, że przy stężeniu 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  stężenie leptyny zmieniło się istotnie pomiędzy ekspozycją trwającą 12 i 48 godzin (tabela 7;  $p < 0,05$ ).

Tabela 7 Stężenie leptyny w zależności od stężenia cisplatyny i czasu ekspozycji komórek raka endometrium.

czas ekspozycji stężenie leku [ $\mu\text{M}$ ]	12 godzin [ng/ml]	24 godzin [ng/ml]	48 godzin [ng/ml]
0 (kontrola)	4,036 $\pm$ 0,004	4,021 $\pm$ 0,003	4,032 $\pm$ 0,036
2,5	4,669 $\pm$ 0,001	4,776 $\pm$ 0,003	4,801 $\pm$ 0,002
5	12,669 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	15,778 $\pm$ 0,001 <sup>a, b</sup>	17,011 $\pm$ 0,011 <sup>a, d</sup>
10	20,007 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	20,098 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	21,679 $\pm$ 0,019 <sup>a, d</sup>

średnia  $\pm$  odchylenie standardowe; a– statystycznie istotne różnice w stężeniu adiponektyny między komórkami eksponowanymi na cisplatynę a kontrolą (  $p < 0,05$ ) b– statystycznie istotne różnice w stężeniu adiponektyny y między komórkami eksponowanymi na cisplatynę przez 12 i 24 godziny (  $p < 0,05$ ); c- statystycznie istotne różnice w stężeniu adiponektyny między komórkami eksponowanymi naciplatynę przez 24 i 48 godzin (  $p < 0,05$ ); d– statystycznie istotne różnice w stężeniu adiponektyny między komórkami eksponowanymi na cisplatynę przez 12 i 48 godzin (  $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Zmiany profilu stężeń wybranych czynników prozapalnych na poziomie proteomu w hodowli raka endometrium eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej

Ostatnim etapem analizy molekularnej było wyznaczenie stężenie TNF- $\alpha$ , STAT3, JAK2 i IL-6 na poziomie białka w hodowli raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na cisplatynę w porównaniu do hodowli kontrolnej (tabela 8;  $p < 0,05$ ).

Warto zauważyć, iż w przypadku TNF- $\alpha$ , jego profil ekspresji na poziomie transkryptomu i proteomu jest odmienny. Na poziomie białka można zaobserwować mniejsze stężenie tej cytokiny w hodowli komórkowej eksponowanej na lek w porównaniu do kontroli (tabela 8;  $p < 0,05$ ). W przypadku pozostałych czynników na poziomie mRNA i białka odnotowano ten sam kierunek zmiany ekspresji, przy czym zmiany na poziomie proteomu wydają się być mniej wyraźne niż w przypadku transkryptomu (tabela 8;  $p < 0,05$ ).

Tabela 8 Stężenie czynnika martwicy nowotworu alfa, kinazy Janusa 2, czynnika indukcji transkrypcji 3, interleukiny 6 w zależności od stężenia cisplatyny i czasu ekspozycji komórek raka endometrium.

Białko	czas ekspozycji stężenie leku [ $\mu$ M]	12 godzin [ng/ml]	24 godzin [ng/ml]	48 godzin [ng/ml]
	TNF- $\alpha$	0 (kontrola)	276,69 $\pm$ 11,36	274,22 $\pm$ 10,01
2,5		221,02 $\pm$ 14,02 <sup>a, b</sup>	398,55 $\pm$ 11,36 <sup>a</sup>	358,05 $\pm$ 13,01 <sup>a, d</sup>
5		185,14 $\pm$ 12,41 <sup>a, b</sup>	154,22 $\pm$ 11,04 <sup>a</sup>	154,01 $\pm$ 14,22 <sup>a, d</sup>
10		52,01 $\pm$ 6,66 <sup>a, b</sup>	44,69 $\pm$ 5,14 <sup>a</sup>	25,74 $\pm$ 2,58 <sup>a, d</sup>
JAK2	0 (kontrola)	1202,33 $\pm$ 4,59 <sup>a</sup>	1201,66 $\pm$ 3,69 <sup>a</sup>	1189,33 $\pm$ 4,25 <sup>a</sup>
	2,5	801,36 $\pm$ 7,98 <sup>a</sup>	802,11 $\pm$ 12,66 <sup>a, c</sup>	732,36 $\pm$ 11,01 <sup>a, d</sup>
	5	502,36 $\pm$ 8,74 <sup>a</sup>	501,36 $\pm$ 2,69 <sup>a, c</sup>	488,36 $\pm$ 7,41 <sup>a</sup>
	10	298,66 $\pm$ 3,69 <sup>a</sup>	245,22 $\pm$ 2,74 <sup>a</sup>	248,99 $\pm$ 7,12 <sup>a</sup>
STAT3	0 (kontrola)	845,18 $\pm$ 9,58	844,36 $\pm$ 9,45	836,33 $\pm$ 7,98
	2,5	745,33 $\pm$ 4,58	798,36 $\pm$ 5,66	710,01 $\pm$ 6,98 <sup>a</sup>
	5	499,01 $\pm$ 5,11 <sup>a</sup>	454,88 $\pm$ 3,67 <sup>a</sup>	450,08 $\pm$ 7,69 <sup>a</sup>
	10	211,36 $\pm$ 2,11 <sup>a, b</sup>	150,01 $\pm$ 2,45 <sup>a</sup>	131,01 $\pm$ 2,36 <sup>a, d</sup>
IL-6	0 (kontrola)	10,36 $\pm$ 2,01	11,01 $\pm$ 1,25	10,66 $\pm$ 0,98
	2,5	185,05 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>	198,44 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>	201,01 $\pm$ 3,68 <sup>a</sup>
	5	241,36 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	247,36 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup>	259,66 $\pm$ 3,14 <sup>a</sup>
	10	287,19 $\pm$ 4,25 <sup>a</sup>	285,36 $\pm$ 2,63 <sup>a</sup>	288,36 $\pm$ 3,11 <sup>a</sup>

JAK2 – kinaza janusowa 2; STAT3 – czynnik indukcji transkrypcji 3; TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu alfa; IL-6- interleukina 6; średnia  $\pm$  odchylenie standardowe

a– statystycznie istotne różnice w stężeniu białka między komórkami eksponowanymi na cisplatynę a kontrolą (  $p < 0,05$ ); b– statystycznie istotne różnice w stężeniu białka między komórkami eksponowanymi na cisplatynę przez 12 i 24 godziny (  $p < 0,05$ ); c- statystycznie istotne różnice w stężeniu białka między komórkami eksponowanymi na cisplatynę przez 24 i 48 godzin (  $p < 0,05$ ); d– statystycznie istotne różnice w stężeniu białka między komórkami eksponowanymi na cisplatynę przez 12 i 48 godzin (  $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Zależności ekspresji wybranych adipokin i czynników prozapalnych na poziomie mRNA i białka

W ostatnim etapie analizy otrzymanych wyników poszukiwano zależności pomiędzy ekspresją ocenianych adipokin i czynników prozapalnych na poziomie mRNA (tabela 9;  $p < 0,05$ ) oraz białka (tabela 10;  $p < 0,05$ ).

Na poziomie mRNA odnotowano występowanie istotnych statystycznie dodatnich zależności ekspresji pomiędzy *LEP* a *LEPROT* ( $r=0,72$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *LEPROTL1* ( $r=0,97$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *LEPR* ( $r=0,87$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *LEPROTL1* ( $r=0,76$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *LEPR* ( $r=0,83$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *LEPR* ( $r=0,76$ ;  $p < 0,05$ ); *ADIPOR2* a *TNF- $\alpha$*  ( $r=0,81$ ;  $p < 0,05$ ); *ADIPOR 2* a *IL-6* ( $r=0,87$ ;  $p < 0,05$ ).

Z kolei ujemne zależności odnotowano pomiędzy genami: *LEP* a *ADP* ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *ADIPOR2* ( $r = -0,86$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *TNF- $\alpha$*  ( $r = -0,81$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *IL-6* ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *ADP* ( $r = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *ADIPOR2* ( $r = -0,92$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *IL-6* ( $r = -0,85$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *ADP* ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *ADIPOR2* ( $r = -0,87$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *TNF- $\alpha$*  ( $r = -0,72$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *IL-6* ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPR* a *ADP* ( $r = -0,96$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPR* a *ADIPOR2* ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPR* a *TNF- $\alpha$*  ( $r = -0,74$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPR* a *IL-6* ( $r = -0,85$ ;  $p < 0,05$ ).

Na poziomie białka zaobserwowano występowanie istotnej statystycznie silnej, dodatniej zależności pomiędzy ekspresją *TNF- $\alpha$*  a *LEP* ( $r=0,83$ ;  $p < 0,05$ ); *STAT3* a *LEP* ( $r=0,98$ ;  $p < 0,05$ ); *TNF- $\alpha$*  a *STAT3* ( $r=0,87$ ;  $p < 0,05$ ) oraz jednej ujemnej korelacji pomiędzy *ADP* a *JAK2* ( $r = -0,74$ ;  $p < 0,05$ ).

Tabela 9 Stężenie czynnika martwicy nowotworu alfa, kinazy Janusa 2, czynnika indukcji transkrypcji 3, interleukiny 6 w zależności od stężenia cisplatyny i czasu ekspozycji komórek raka endometrium

	<i>LEP</i>	<i>LEPROT</i>	<i>LEPROTL1</i>	<i>LEPR</i>	<i>ADP</i>	<i>ADIPOR1</i>	<i>ADIPOR2</i>	<i>TNF-α</i>	<i>JAK2</i>	<i>STAT3</i>	<i>IL-6</i>
<i>LEP</i>	1,000000	0,721543*	0,972078*	0,870549*	-0,913679*	-0,358801	-0,859565*	-0,806224*	0,324497	0,396775	-0,937192*
<i>LEPROT</i>	0,721543*	1,000000	0,757463*	0,832437*	-0,828500*	-0,422830	-0,920387*	-0,595559	-0,171524	-0,045644	-0,847611*
<i>LEPROTL1</i>	0,972078*	0,757463*	1,000000	0,925183*	-0,937718*	-0,449789	-0,873927*	-0,722561*	0,249232	0,488507	-0,941078*
<i>LEPR</i>	0,870549*	0,832437*	0,925183*	1,000000	-0,969152*	-0,341440	-0,914231*	-0,739508*	-0,059175	0,302339	-0,848577*
<i>ADP</i>	-0,913679*	-0,828500*	-0,937718*	-0,969152*	1,000000	0,325145	0,941674*	0,777396*	0,002602	-0,237232	0,857096*
<i>ADIPOR1</i>	-0,358801	-0,422830	-0,449789	-0,341440	0,325145	1,000000	0,488818	0,287789	-0,231596	-0,207599	0,444724
<i>ADIPOR2</i>	-0,859565*	-0,920387*	-0,873927*	-0,914231*	0,941674*	0,488818	1,000000	0,810011*	0,065573	-0,057688	0,867892*
<i>TNF-α</i>	-0,806224*	-0,595559	-0,722561*	-0,739508*	0,777396*	0,287789	0,810011*	1,000000	-0,182851	-0,001168	0,663110
<i>JAK2</i>	0,324497	-0,171524	0,249232	-0,059175	0,002602	-0,231596	0,065573	-0,182851	1,000000	0,501480	-0,231195
<i>STAT3</i>	0,396775	-0,045644	0,488507	0,302339	-0,237232	-0,207599	-0,057688	-0,001168	0,501480	1,000000	-0,373359
<i>IL-6</i>	-0,937192*	-0,847611*	-0,941078*	-0,848577*	0,857096*	0,444724	0,867892*	0,663110	-0,231195	-0,373359	1,000000

\* - korelacje istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ); *ADP* – adiponektyna; *ADIPOR1* – receptor 1 dla adiponektyny; *ADIPOR2* – receptor 2 dla adiponektyny; *LEP* – leptyna; *LEPR* – receptor leptyny; *LEPROT* – ang. Leptin receptor overlapping transcript; *LEPROTL1* – ang. Leptin receptor overlapping transcript-like; *JAK2* – kinaza janusowa 2; *STAT3* – czynnik indukcji transkrypcji 3; *TNF-α* – czynnik martwicy nowotworu alfa; *IL-6* – interleukina 6.

Tabela 10 Korelacje pomiędzy ekspresją wybranych adipokin i czynników zapalnych na poziomie białka

	<i>LEP</i>	<i>ADP</i>	<i>TNF-α</i>	<i>JAK2</i>	<i>STAT3</i>	<i>IL-6</i>
<i>LEP</i>	1,000000	-0,417506	0,834834*	0,497318	0,980552*	-0,197826
<i>ADP</i>	-0,417506	1,000000	-0,309858	-0,735039*	-0,481944	-0,009479
<i>TNF-α</i>	0,834834*	-0,309858	1,000000	0,317650	0,886170*	0,121271
<i>JAK2</i>	0,497318	-0,735039*	0,317650	1,000000	0,532467	-0,091646
<i>STAT3</i>	0,980552*	-0,481944	0,886170*	0,532467	1,000000	-0,071677
<i>IL-6</i>	-0,197826	-0,009479	0,121271	-0,091646	-0,071677	1,000000

\* - korelacje istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ); *ADP* – adiponektyna; *ADIPOR1* – receptor 1 dla adiponektyny; *ADIPOR2* – receptor 2 dla adiponektyny; *LEP* – leptyna; *LEPR* – receptor leptyny; *LEPROT* – ang. Leptin receptor overlapping transcript; *LEPROTL1* – ang. Leptin receptor overlapping transcript-like; *JAK2* – kinaza janusowa 2; *STAT3* – czynnik indukcji transkrypcji 3; *TNF-α* – czynnik martwicy nowotworu alfa; *IL-6* – interleukina 6.

## 5. Dyskusja

Poznanie molekularnych mechanizmów związanych z procesem nowotworzenia, w tym w raku endometrium oraz zmian indukowanych przez cisplatynę jest niezwykle istotne w rozwoju nauk medycznych i farmaceutycznych. Jest tak ze względu na fakt, że zmiany molekularne wyprzedzają zmiany fenotypowe [121]. Tym samym w kontekście diagnostyki raka endometrium wykorzystując metody i techniki molekularne, np. mikromacierze mRNA, bioptat zakwalifikowany w badaniu histopatologicznym do stopnia G1 molekularnie odpowiada, np. stopniowi G2 lub G3, co determinuje wybór najlepszej opcji terapii dla pacjentki [121,122].

Z kolei monitoring molekularny stosowanej terapii stwarza możliwość wykrycia utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie (lekooporności) w momencie, gdy fenotypowo w oparciu o dostępne metody nie jest ona widoczna. W związku z tym możliwa staje się zmiana leczenia w odpowiednio wczesnym momencie, a to z kolei maksymalizuje szansę powodzenia terapii, z minimalizacją ryzyka jej stosowania [123].

Wykorzystanie techniki mikromacierzy ekspresyjnych mRNA stwarza możliwość równoczesnego ocenienia zmian wzorca ekspresji wielu tysięcy transkryptów jednorazowo. Stanowi cenne badanie przesiewowe pozwalające ukierunkować dalsze analizy molekularne na bardziej precyzyjne obszary. Ponadto należy wziąć pod uwagę fakt, iż bazy danych, przy użyciu których typuje się określone geny do analizy mikromacierzowej, oparte o ontologię genową są na bieżąco aktualizowane i uzupełniane o nowe geny, które są związane z danym szlakiem sygnałowym lub procesem biologicznym [124]. Niemniej jednak, wyniki mikromacierzowego profilu ekspresji muszą zostać potwierdzone technikami ilościowymi, do których zaliczamy RTqPCR [125]. Istotnym uzupełnieniem badań transkryptomu są analizy na poziomie białka, gdyż dają możliwość oceny zmian ekspresji na dwóch poziomach przepływu informacji genetycznej oraz pozwalają wskazać potencjalny udział czynników epigenetycznych regulujących ekspresję ocenianych genów [122,123,124,125].

W niniejszej pracy wykorzystując model *in vitro* raka endometrium postanowiono ocenić wpływ cisplatyny na zmiany profilu ekspresji wybranych adipokin i czynników prozapalnych związanych ze szlakiem sygnalizacyjnym JAK/STAT.

Zostało potwierdzone, że ryzyko zachorowania na raka trzonu macicy wzrasta 2-3-krotnie u kobiet z nadwagą lub otyłością w wieku około- i postmenopauzalnym. U tych pacjentek następuje zwiększenie ilości tkanki tłuszczowej, wielkości adipocytów, które wydzielają adipokiny, czyli cząsteczki o aktywności hormonalnej

aktywujące lub hamujące szlaki sygnalizacyjne i procesy biologiczne, co w konsekwencji skutkuje utratą homeostazy organizmu [74,89,100,101,102,103].

Ponadto w procesie nowotworzenia obserwuje się utratę równowagi w stężeniu czynników prozapalnych i przeciwzapalnych, co skutkuje niepodlegającym kontroli rozwojowi przewlekłego stanu zapalnego, który również w istotny sposób zwiększa ryzyko nowotworzenia [37,38,40,41].

Dlatego też w niniejszej pracy oceniono nie tylko profil ekspresji czynników prozapalnych i adipokin, ale także oceniono występowanie zależności w ich stężeniach. W pierwszej kolejności oceniono wrażliwość komórek raka endometrium linii Ishikawa, która reprezentuje fenotyp raka w stopniu histopatologicznego zróżnicowania G1, w którym diagnozuje się największy odsetek przypadków na cisplatynę. Wynik testu cytotoksyczności z sulforodaminą B pozwolił zaobserwować, iż cisplatyna wywiera przede wszystkim efekt na żywotność komórek w sposób zależny od stężenia, a nie czasu ekspozycji komórek na lek. Wniosek taki wydaje się zasadny, ponieważ wraz ze wzrostem stężenia cisplatyny odsetek żywych komórek ulegał istotnemu zmniejszeniu ( $p < 0,05$ ), podczas gdy dla danego stężenia na które eksponowano komórki przez 12, 24 lub 48 godzin zmiany żywotności komórek raka endometrium nie były znamienne statystycznie ( $p > 0,05$ ). Ponadto odnotowano, że stężenie cisplatyny wynoszące 5  $\mu\text{M}$  odpowiada  $\text{IC}_{50}$ , czyli takiemu stężeniu, przy odsetek komórek żywych i martwych jest taki sam (50%:50%).

Busch i wsp. [126] w swoich badaniach zastosowali stężenie 1  $\mu\text{g/ml}$  cisplatyny, co odpowiada 3,3  $\mu\text{M}$  cisplatyny [126]. Także Skolekova i wsp. [127] stosowali cisplatynę o stężeniach 0,5-8  $\mu\text{g/ml}$ , przy czym w dalszych etapach badań na linii komórkowej raka piersi stosowali stężenie 1  $\mu\text{g/ml}$  [127]. Na podstawie tych informacji można wnioskować, że powyższymi dawkami cisplatyny można prowadzić skuteczną farmakoterapię raka endometrium.

Moon i wsp. [128] na podstawie przeprowadzonej przez siebie analizy na modelu raka endometrium potwierdzają kluczową rolę adiponektyny w indukcji procesu transformacji nowotworowej [128]. Wskazali, że adiponektyna jest inhibitorem proliferacji zmienionych komórek nowotworowych, a także zwiększa stężenie ludzkiego antyionogenu, kodującego białko kinazy treoninowo-serynowej (LKB1, ang. serine-threonine kinase) [129], co jest niezbędne do aktywacji szlaku AMPK [130,131]. W ten sposób adiponektyna wpływa na proliferację, adhezję i migrację komórek nowotworowych [128]. Obserwacje poczynione przez Cai i wsp. [129] potwierdzają,

że adiponektyna jest mediatorem pomiędzy kaskadami sygnałowymi AMPK/mTOR/S6K1 i hamuje proliferację i migrację komórek raka endometrium [129].

W niniejszej pracy pod wpływem cisplatyny w hodowli komórkowej raka endometrium odnotowano zwiększenie ekspresji adiponektyny na poziomie mRNA i białka. Może to sugerować, że terapia ogólnoustrojowa z użyciem cisplatyny wpływa na wzór ekspresji adiponektyny. Możliwe zatem, że oczekiwana regresja objawów spowodowanych chorobą nowotworową byłaby wynikiem nie tylko bezpośredniego destrukcyjnego działania cisplatyny na DNA czy mitochondria [130,131], ale także zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych, wynikałoby ze wzrostu stężenia adiponektyny [132]. Warto zauważyć, że niezależnie od stężenia cisplatyny i czasu inkubacji komórek z lekiem nie zaobserwowano możliwości utraty adekwatnej odpowiedzi na leczenie, wyrażonej spadkiem poziomu adiponektyny w stosunku do jej poziomu z krótszym czasem ekspozycji. Może to wskazywać na stosunkowo niskie ryzyko lekooporności związanej z terapią cisplatiną z powodu raka endometrium. Niemniej jednak warto wziąć pod uwagę, że obserwacje poczynione w tym badaniu zostały dokonane na modelu *in vitro*.

Chitcholtan i wsp. [133] wykazali, że w powstawaniu zjawiska lekooporności na leki przeciwnowotworowe kluczową rolę odgrywa mikrośrodowisko guza, które ma wpływ na metabolizm komórek nowotworowo zmienionych. Ponadto badacze ci podkreślają, że różnice we wnioskach dotyczących możliwości utraty odpowiedzi na leczenie, np. cisplatiną w przypadku badań *in vitro* raka endometrium są zależne od rodzaju zastosowanej linii komórkowej [133]. Jednocześnie jednak wskazują na zasadność wykorzystania linii komórkowej Ishikawa do badań nad potencjałem terapeutycznym leków przeciwnowotworowych [134].

Interesujące są także badania przeprowadzone przez Wang i wsp. [135], którzy ocenili stężenie adiponektyny na poziomie białka wykorzystując technikę ELISA wśród 53 pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem endometrium w porównaniu do grupy zdrowych ochotniczek, stanowiących kontrolę w tym eksperymencie. Zaobserwowali istotny statystycznie spadek stężenia adiponektyny w grupie z rakiem endometrium w porównaniu z kontrolą (2,09  $\mu\text{g/ml} \pm 1,24 \mu\text{g/ml}$  vs. 7,59  $\mu\text{g/ml} \pm 2,29 \mu\text{g/ml}$ ;  $p < 0,001$ ) [135].

Poza tym zwraca się uwagę na możliwość wykorzystania zmian profilu stężeń adiponektyny jako niezależnego, uzupełniającego diagnostycznego markera molekularnego w raku endometrium [136,137].

Z kolei Ciortea i wsp. [138] ocenili stężenie adiponektyny w kokulturze hodowli raka endometrium linii komórkowej Ishikawa z komórkami macierzystymi pochodzącymi z tkanki tłuszczowej (ADSC, ang. adipose stem cells), jak również w hodowli samych komórek Ishikawa. W modelu kokultury zaobserwowali wyciszenie ekspresji adiponektyny w porównaniu do kontroli. Z kolei w hodowli komórek raka endometrium linii Ishikawa stwierdzili w medium pohodowlanym znamienne wyższe stężenie adiponektyny w porównaniu do hodowli kontrolnej (4,5 ng/ml vs. 3 ng/ml;  $p < 0,05$ ) [138]. Uzyskane przez nich stężenia adiponektyny są zbieżne ze stężeniem odnotowanym w niniejszej pracy w hodowli nietraktowanej cisplatyną (kontrola).

Analiza ekspresji adiponektyny jest istotna nie tylko w przypadku diagnostyki raka trzonu macicy, ale również w monitorowaniu skuteczności terapii przeciwnowotworowej ze względu na udokumentowane antyangiogenne właściwości adiponektyny w modelach *in vitro* i *in vivo* [139,140]. Stanowi to jedną z prawdopodobnych przyczyn obniżenia ekspresji adiponektyny w przypadkach raka endometrium. Rozwój nowotworowej sieci naczyń krwionośnych warunkuje dostarczanie do mikrośrodowiska guza tlenu i substancji odżywczych, co jest niezbędne do utrzymania przez komórki nowotworowe potencjału proliferacyjnego i metastazy [141]. W związku z powyższym, biorąc pod uwagę wyniki ekspresji adiponektyny uzyskane w niniejszej pracy z wraz z obserwacjami innych badaczy [138,139,140] zasadny wydaje się wniosek, że cisplatyna wykazuje aktywność antyangiogenną.

Drugą z ocenianych adipokin w niniejszej pracy była leptyna. Obecnie podkreśla się znaczenie aktywowanych przez leptynę szlaków sygnałowych w uzyskaniu przez komórki nowotworowe zdolności do przerzutowania drogą naczyń krwionośnych lub limfatycznych [142].

W badaniu przeprowadzonym przez Gong i wsp. [143] komórki linii Ishikawa eksponowano na działanie leptyny w stężeniu 100 ng/ml w porównaniu do hodowli kontrolnej, którą stanowiły komórki nie traktowane adipokiną. Zaobserwowali Oni, że leptyna w istotny statystycznie sposób nasila proliferację komórek, co może być wynikiem fosforylacji ERK1/2 [143].

Z kolei obserwacje Liu i wsp. [144] potwierdzają zdolność komórek raka endometrium linii Ishikawa do ekspresji receptorów dla leptyny. Badacze Ci traktowali komórki leptyną w zakresie stężeń 0-150 ng/ml przez 6, 12 i 24 godziny. Zaobserwowali nasilenie proliferacji komórek nowotworowych, który był większy wprost proporcjonalnie do stężenia leptyny i czasu inkubacji komórek z nią.

Wykazano, że leptyna aktywuje fosforylację ERK1/2 oraz STAT3 i jest to proces odwracalny [144].

Również w niniejszej pracy można zaobserwować, że cisplatyna powoduje równoczesne obniżenie stężenia leptyny i STAT3, aczkolwiek statystycznie istotne wyciszenie ekspresji leptyny na poziomie białka odnotowano niezależnie od czasu inkubacji w porównaniu do hodowli kontrolnej zaobserwowano dopiero przy stężeniu 5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). Niewykluczone zatem, że cisplatyna w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$  nie wykazuje wystarczającej aktywności względem leptyny w komórkach raka endometrium linii Ishikawa. Niemniej jednak nie należy zapominać, iż statystycznie istotne różnice ekspresji leptyny zostały odnotowane na poziomie mRNA niezależnie od stężenia chemioterapeutyku i czasu ekspozycji komórek na niego ( $p < 0,05$ ). Sugeruje to, że transkryptom jest układem bardziej wrażliwym na zmiany w środowisku komórkowym w porównaniu do proteomu, choć i tutaj obserwowano wyciszenie ekspresji leptyny. Równoczesnemu obniżeniu ekspresji leptyny towarzyszyło zmniejszenie stężenia jej receptorów, za pośrednictwem których adipokina ta aktywuje szlaki sygnałowe.

Obserwowana zmiana profilu ekspresji leptyny, widoczna jako jej obniżenie wraz ze wzrostem stężenia cisplatyny dodanej do medium hodowlanego w zestawieniu z opisywaną w kancerogenezie rolą tej adipokiny [87,88,89,90] mogłaby sugerować konieczność dalszego obniżenia jej ekspresji lub nawet całkowitego wyciszenia.

Grabowski i wsp. [145] przeprowadzili badanie na grupie 42 pacjentek z rakiem jajnika w porównaniu do 28 osobowej grupy kontrolnej, w którym wykazali znamienne niske stężenie leptyny w grupie badanej w porównaniu do kontroli oraz nie znaleźli korelacji pomiędzy stężeniem leptyny a stopniem zaawansowania choroby [145].

Również Słomian i wsp. [146] zaobserwowali wyższe stężenie zarówno adiponektyny i leptyny, ale tylko w grupie pacjentów, u których uzyskano częściową odpowiedź na leczenie przeciwnowotworowe we wskazaniu raka jelita grubego [146]. Z tego względu rekomendowane jest monitorowanie stężenia leptyny zarówno przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego, w jego trakcie oraz po zakończeniu, co będzie mieć korzystny wpływ na efektywność terapii i utrzymanie remisji choroby.

Interesujące w kontekście znaczenia leptyny w procesie nowotworowym są obserwacje Kumara i wsp. [147], którzy nie stwierdzili różnic w przeżyciu pomiędzy pacjentami z wysoką i niską ekspresją leptyny lub wysoką i niską ekspresją LEPR

w tkance guza. Jednak pacjenci, którzy mieli wyższą koekspresję leptyny i LEPR w tkance nowotworowej mieli znacznie krótsze przeżycie [147].

W przeprowadzonych badaniach stężenie leptyny zaklesie od 253,673 pg/ml  $\pm$  1,773 pg/ml do 947,011 pg/ml  $\pm$  0,396 pg/ml, podczas, podczas gdy Matta i wsp. [148] wykazali w grupie 80 pacjentek z wysokim stopniem surowiczego nabłonkowego raka jajnika, u których wykryto lekooporność stężenie leptyny wynoszące 672 pg/ml [148], co sugeruje, że w przypadku raka endometrium odpowiedź na leczenie związkami platyny będzie satysfakcjonująca.

Poza określeniem zmian stężeń adiponektyny i leptyny w ramach niniejszej pracy oceniono także zmiany ekspresji *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *JAK2* i *STAT3* oraz kodowanych przez nie białek w hodowli raka endometrium pod wpływem endometrium.

W odniesieniu do profilu ekspresji *IL-6* odnotowano jej wzrost zarówno na poziomie mRNA i białka w sposób zależny od stężenia leku i czasu inkubacji z nim. Natomiast w odniesieniu do *TNF- $\alpha$*  na poziomie transkryptomu wraz ze wzrostem stężenia leku i czasu inkubacji, ekspresja tej cytokiny wzrasta, podczas, gdy na poziomie białka odnotowano tendencję odwrotną. Może to wynikać z udziału cząsteczek mikroRNA (miRNA) w regulacji ekspresji *TNF- $\alpha$* .

MiRNA są to jednoniciowe cząsteczki składające się z 21-26 nukleotydów uczestniczące w potranskrypcyjnej regulacji genów. Jeśli pomiędzy cząsteczką mRNA a miRNA występuje pełna komplementarność, dochodzi do degradacji białka kodowanego przez gen. Natomiast, gdy komplementarność pomiędzy cząsteczkami nie jest pełna, w konsekwencji obserwuje się wyciszenie ekspresji białka [149,150]. To właśnie tą drugą sytuację obserwuje się w niniejszej pracy. Wskazuje się, że cząsteczkami miRNA potencjalnie zaangażowanymi w regulację *TNF- $\alpha$*  są: miR-21 [151], mir-224-5p [152], miR-23b [153]. Natomiast w odniesieniu do *JAK2*, *STAT3* odnotowano obniżenie ekspresji na poziomie mRNA i białka.

Che i wsp. [154] przeanalizowali znaczenie *IL-6* i *STAT3* w migracji i przerzutowaniu komórek raka endometrium linii Ishikawa i RL95-2. Autorzy Ci podkreślili kluczową rolę *STAT3* w zyskaniu przez komórki raka endometrium potencjału do przerzutowania, co potwierdzili poprzez transfekcje komórek inhibitorem *STAT3*, co wiązało się z obniżeniem potencjału metastatycznego. Równocześnie wskazują, że *IL-6* jest czynnikiem wzmacniającym ekspresję *STAT3*, a to z kolei przyczyniało się do wzrostu ekspresji *MMP2* i progresji nowotworowej [154]. Zbliżone obserwacje zawarte są w pracy Chu i wsp. [155], którzy także wykazali

zmniejszoną migrację i zdolność do inwazji komórek raka endometrium, gdy do hodowli komórkowej wprowadzono wektor małego interferującego RNA (siRNA, ang. small interfering RNA) STAT3. W ten sposób potwierdzono udział STAT3 w nabywaniu przez komórki raka trzonu macicy zdolności do przerzutowania [155]. Z tego względu obserwowane w niniejszej pracy wyciszenie ekspresji STAT3 pod wpływem cisplatyny sugeruje jej aktywność względem komórek raka endometrium i jest zjawiskiem korzystnym.

Niemniej jednak należałoby spodziewać się równoczesnego spadku ekspresji IL-6, co nie zostało potwierdzone w przeprowadzonym badaniu. IL-6 może indukować oporność na cisplatynę w przypadku raka jamy ustnej, jajnika, płuca i prostaty, poprzez zwiększenie ekspresji czynników antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2, Bcl-xL i cIAP-2 i/ lub indukcję proliferacji komórek [156]. Również Gao i wsp. [157] wskazują, że w przypadku nowotworu głowy i szyi wyższe stężenie IL-6 było niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [157]. Jednakże, gdy uwzględnimy wyniki testu cytotoxyczności oraz obniżenie ekspresji JAK2, którego aktywność jest niezbędna w fosforylacji STAT3 i transdukcji sygnału wzdłuż kaskady sygnałowej, pod wpływem cisplatyny nie wydaje się, by IL-6 w raku endometrium linii Ishikawa wpływała na ekspresję STAT3 i potencjał przerzutowy, jak także powstawanie lekooporności na cisplatynę. Chitcholtan i wsp. [133] wskazuje, że wykazali, że w powstawaniu zjawiska lekooporności na leki przeciwnowotworowe kluczową rolę odgrywa mikrośrodowisko guza. Ponadto badacze ci podkreślają, że różnice we wnioskach dotyczących możliwości utraty odpowiedzi na leczenie, np. cisplatyną w przypadku badań *in vitro* raka endometrium są zależne od rodzaju zastosowanej linii komórkowej. [133].

Uzyskane wyniki zmian profilu stężenia TNF- $\alpha$ , IL-6 pod wpływem cisplatyny są jednak zgodne z obserwacjami poczynionymi przez Kumar i wsp. [158], którzy również odnotowali istotny statystycznie wzrost stężenia omawianych cytokin pod wpływem cisplatyny w komórkach nerki szczura, co było związane z efektem nefrotoksycznym cisplatyny [158]. Z tego względu konieczne są dalsze badania na innych liniach komórkowych raka endometrium oraz w modelu *in vivo*, które potwierdzą lub wykluczą niniejszą obserwację.

Morgan i wsp. [159] podkreślają, że JAK2 jest obiecującym celem molekularnie ukierunkowanych terapii w przypadku raka szyjki macicy HPV+ (wirus brodawczaka ludzkiego, ang. Human Papilloma Virus) [159]. Czynnikiem ten uczestniczy w regulacji

cyklu komórkowego za pośrednictwem różnych mechanizmów [160]. W badaniach przeprowadzonych przez Morgan i wsp. [159] wykorzystano inhibitor JAK1/2 – ruksolitynib oraz inhibitor JAK2 – fedratynib w celu potwierdzenia kluczowej roli tych kinaz w aktywacji STAT3. Zastosowanie któregośkolwiek z inhibitorów skutkowało znacznym zahamowaniem proliferacji komórek i tworzenia kolonii przez komórki raka szyjki macicy. Hamowanie JAK2 zmniejszyło również fosforylację reszty tyrozyny STAT3 i zmniejszyło ekspresję cykliny D1. Wydaje się, że mechanizm indukcji apoptozy po inhibicji JAK2 może być spowodowany zmniejszeniem ekspresji białka Bcl-XL zależnej od STAT3 [159].

Odnotowane w niniejszym badaniu wyciszenie ekspresji TNF- $\alpha$  na poziomie białka jest zbieżne z obserwacjami Liu i wsp. [160] na modelu linii raka jajnika Hey, prostaty LNCaP, nie drobnokomórkowego raka płuca A549 [160]. Potwierdza to również występowanie wzajemnych zależności pomiędzy IL-6-JAK2-STAT3-TNF- $\alpha$ .

Ostatni etap analizy w ramach niniejszej pracy polegał na poszukiwaniu korelacji pomiędzy ekspresją ocenianych adipokin i czynników prozapalnych. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała występowanie istotnych zależności przede wszystkim pomiędzy leptyną a adiponektyną (korelacja ujemna), leptyną a jej receptorami (korelacja dodatnia), adiponektyną a receptorem ADIPOR2 (korelacja dodatnia), leptyną a TNF- $\alpha$  (korelacja ujemna), adiponektyną a TNF- $\alpha$  (korelacja dodatnia), leptyną a IL-6 (korelacja dodatnia), adiponektyną a IL-6 (korelacja ujemna). Nie wykazano zależności w ekspresji pomiędzy poszczególnymi czynnikami prozapalnymi. Niniejsze zależności są silne lub bardzo silne, co podkreśla wzajemną zależność i wpływ poszczególnych adipokin i cytokin na siebie oraz wielowymiarowy efekt działania cisplatyny na komórki raka endometrium linii Ishikawa.

Podsumowując, przy określaniu roli adipokin w procesie transformacji nowotworowej, w tym w raku endometrium należy uwzględnić mikrośrodowisko guza oraz wpływ cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki nowotworowe, np. TNF- $\alpha$ , IL-6, które wpływają na metabolizm komórkowy i aktywność hormonalną tkanki tłuszczowej.

Wydaje się, że zmniejszenie masy guza pod wpływem chemioterapii z użyciem cisplatyny powoduje zmniejszenie uwalniania różnych cytokin prozapalnych, co sugeruje zmianę funkcji endokrynej tkanki tłuszczowej. Konieczne są jednak dalsze analizy, w szczególności na modelach *in vivo*.

## 6. Wnioski

1. Potwierdzono, iż cisplatyna wywiera cytotoksyczny efekt względem komórek raka endometrium linii Ishikawa, a stężenie 5  $\mu$ M cisplatyny odpowiada IC50.
2. Potwierdzono wpływ cisplatyny na profil ekspresji LEP, ADP, IL-6, JAK2, STAT3, TNF- $\alpha$  na poziomie transkryptomu i proteomu.
3. Potwierdzono ten sam kierunek zmian wzorca ekspresji na poziomie mRNA i białka dla LEP, ADP, IL-6, JAK2, STAT3 i odmienny dla TNF- $\alpha$ , co może sugerować udział cząsteczek miRNA w regulacji jego ekspresji.
4. Stwierdzono występowanie silnych korelacji pomiędzy profilem ekspresji ocenianych czynników prozapalnych i adipokin.
5. Zmiany wzorca ekspresji LEP, ADP, IL-6, JAK2, STAT3, TNF- $\alpha$  mogą być wykorzystane jako potencjalne markery molekularne w monitorowaniu odpowiedzi na leczenie cisplatyną w raku endometrium w stopniu histopatologicznego zaawansowania G1.

## 7. Piśmiennictwo

1. Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2020; 7(4): 313.
2. 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.
3. American Cancer Society. Cancer Statistics for USA. 2020. Dostęp on-line: <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/about/key-statistics.html> (data dostępu 12.07.2021).
4. Shaw E, Farris M, McNeil J, Friedenreich C. Obesity and Endometrial Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2016; 208: 107-136.
5. Wojciechowska, U., Czaderny, K., Ciuba, A., Olasek, P., & Didkowska, J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku. Centrum Onkologii–Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa, 2012; 3: 13-21.
6. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007; 18(3): 581-592.
7. Bray F, Dos Santos Silva I, Moller H, Weiderpass E. Endometrial cancer incidence trends in Europe: underlying determinants and prospects for prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(5): 1132-1142.
8. 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. *Int J Cancer.* 2019; 145(7): 1719-1730.
9. Constantine GD, Kessler G, Graham S, Goldstein SR. Increased Incidence of Endometrial Cancer Following the Women's Health Initiative: An Assessment of Risk Factors. *J Womens Health (Larchmt).* 2019; 28(2): 237-243.
10. Braun MM, Overbeek-Wager EA, Grumbo RJ. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am Fam Physician.* 2016; 93(6): 468-474.

11. Son J, Carr C, Yao M, Radeva M, Priyadarshini A, Marquard J, Michener CM, AlHilli M. Endometrial cancer in young women: prognostic factors and treatment outcomes in women aged  $\leq 40$  years. *Int J Gynecol Cancer*. 2020; 30(5): 631-639.
12. Odicino F, Pecorelli S, Zigliani L, Creasman WT. History of the FIGO cancer staging system. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008; 101(2): 205-210.
13. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009; 105(2): 103-104.
14. Suarez AA, Felix AS, Cohn DE. Bokhman redux: Endometrial cancer “types” in the 21st century. *Gynecol. Oncol*. 2017; 144; 243–244.
15. Vellone VG, Peñuela L, Carbone R, Biatta CM, Spina B, Barra F, Ferrero S. Molecular pathology of endometrial carcinoma and its histopathological correlations: Beyond a dualistic vision?. In *Endometrial Cancer: Risk Factors, Management and Prognosis*. Nova Science Publishers, Inc. 2018; 25-68.
16. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum. Pathol*. 2004; 35(6): 649-662.
17. Felix AS, Weissfeld JL, Stone RA, Bowser R, Chivukula M, Edwards RP, Linkov F. Factors associated with Type I and Type II endometrial cancer. *Cancer Causes Control*. 2010; 21(11): 1851-6.
18. Silverberg SG, Kurman RJ, Nogales F, Mutter GL, Kubik-Huch PA, Tavassoli FA. Epithelial tumors and related lesions of endometrium. In: Tavassoli FA, Devilee P (red.) *Pathology & Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon. IARC. 2003; 221-232.
19. Piotto MASB, Focchi GRA, Marques RM, Teixeira AMS, Gonçalves WJ, Nicolau SM. Assessment of Preoperative Endometrial Histopathological Sampling as a Predictor of Final Surgical Pathology in Endometrial Cancer. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2020; 42(10): 642-648.
20. Helpman L, Kupets R, Covens A, Saad RS, Khalifa MA, Ismiil N, Nofech-Mozes S. Assessment of endometrial sampling as a predictor of final surgical pathology in endometrial cancer. *BJC*. 2014; 110(3): 609-615.
21. Gaber C, Meza R, Ruterbusch JJ, Cote ML. Endometrial cancer trends by race and histology in the USA: projecting the number of new cases from 2015 to 2040. *J Racial Ethn Health Disparities*. 2017; 4(5): 895-903.

22. Badowska-Kozakiewicz AM. Wybrane markery nowotworowe w rutynowej diagnostyce raka endometrium i szyjki macicy. *Prz Menopauzalny*. 2012; 3: 168-173.
23. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 1983; 15(1): 10-17.
24. Bardadin K, Powała A, Nasierowska-Guttmejer A. Diagnostyka. Nowości w klasyfikacji i diagnostyce histologicznej schorzeń błony śluzowej trzonu macicy. *Ginekologia Onkologiczna* 2009; 1(7): 19-21.
25. Aggarwal A, Hatti A, Tirumuru SS, Nair SS. Management of asymptomatic postmenopausal women referred to outpatient hysteroscopy service with incidental finding of thickened endometrium - A UK District General Hospital Experience. *J Minim Invasive Gynecol* 2021; S1553-4650(21): 00092-3.
26. Stasiak P, Sznitowska M. Zastosowanie hodowli komórkowych w badaniach biofarmaceutycznych. *Farm Pol.* 2010; 66(3): 228-234.
27. Tudrej P, Kujawa KA, Cortez AJ, Lisowska KM. Charakterystyka modeli in vitro do badań nad rakiem jajnika. *Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja*, 2019; 5(5): 314-328.
28. Emilia M, Roman N, Barbara SM, Urszula M, Krzysztof Ł, Paweł O. Expression profile of Tripartite motif family (TRIM) in human fibroblasts (NHDF) infected with porcine endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* 2021 ; 28(1): e12650.
29. Ghandi M, Huang FW, Jané-Valbuena J, Kryukov GV, Lo CC, McDonald ER 3rd, Barretina J, Gelfand ET, Bielski CM, Li H, Hu K, Andreev-Drakhlin AY, Kim J, Hess JM, Haas BJ, Aguet F, Weir BA, Rothberg MV, Paoletta BR, Lawrence MS, Akbani R, Lu Y, Tiv HL, Gokhale PC, de Weck A, Mansour AA, Oh C, Shih J, Hadi K, Rosen Y, Bistline J, Venkatesan K, Reddy A, Sonkin D, Liu M, Lehar J, Korn JM, Porter DA, Jones MD, Golji J, Caponigro G, Taylor JE, Dunning CM, Creech AL, Warren AC, McFarland JM, Zamanighomi M, Kauffmann A, Stransky N, Imielinski M, Maruvka YE, Cherniack AD, Tsherniak A, Vazquez F, Jaffe JD, Lane AA, Weinstock DM, Johannessen CM, Morrissey MP, Stegmeier F, Schlegel R, Hahn WC, Getz G, Mills GB, Boehm JS, Golub TR, Garraway LA, Sellers WR. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature*. 2019; 569(7757): 503-508.

30. Stokłosowa S. *Hodowla komórek i tkanek*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.
31. Devor EJ, Gonzalez-Bosquet J, Thiel KW, Leslie KK. Genomic characterization of five commonly used endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2020; 57(6): 1348-1357.
32. Skok K, Maver U, Gradišnik L, Kozar N, Takač I, Arko D. Endometrial cancer and its cell lines. *Mol Biol Rep*. 2020; 47(2): 1399-1411.
33. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *IJMS*. 2019; 20(23): 6008.
34. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interferon Cytokine Res*. 2019; 39(1): 6-21.
35. Waldmann, TA. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018; 10(12): a028472.
36. Patra MC, Shah M, Choi S. Toll-like receptor-induced cytokines as immunotherapeutic targets in cancers and autoimmune diseases. *Semin Cancer Biol*. 2020 ; 64: 61-82.
37. Korniluk A, Koper O, Kemonia H, Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Ir J Med Sci* 2018; (1971-), 186(1): 57-62.
38. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann. Afr. Med*. 2019; 18(3): 121.
39. Roda G, Chien Ng S, Kotze PG, Argollo M, Panaccione R, Spinelli A, Kaser A, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2020; 6(1): 22.
40. Meftahi G, Bahari Z, Jangravi Z, Iman M. A vicious circle between oxidative stress and cytokine storm in acute respiratory distress syndrome pathogenesis at COVID-19 infection. *Ukr. Biochem. J*. 2020; 93: 18-29.
41. Grabarek BO, Wcisło-Dziadecka DL, Mazurek U. Signaling pathways associated with interleukins 12 and 23 and epigenetic mechanism of sequential-specific regulation of expression of related genes by miRNAs as molecular markers for assessing the potential of anti-cytokine therapies. *Derm Rev*. 2019; 106(1): 71.
42. Kalamegam G, Sait KHW, Anfinan N, Kadam R, Ahmed F, Rasool M, Naseer MI, Pushparaj PN, Al-Qahtani M. Cytokines secreted by human Wharton's jelly stem cells inhibit the proliferation of ovarian cancer (OVCAR3) cells in vitro. *Oncol. Lett*. 2019; 17(5): 4521-4531.

43. Taher MY, Davies DM, Maher J. The role of the interleukin (IL)-6/IL-6 receptor axis in cancer. *Biochem Soc Trans.* 2018; 46(6): 1449-1462.
44. Bakouny Z, Choueiri TK. IL-8 and cancer prognosis on immunotherapy. *Nat Med.* 2020; 26(5): 650-651.
45. Grabarek B, Wcisło-Dziadecka D, Strzałka-Mrozik B, Adamska J, Mazurek U, Brzezińska-Wcisło L. The Capability to Forecast Response to Therapy with Regard to The Time and Intensity of The Inflammatory Process in vitro in Dermal Fibroblasts Induced by IL-12. *Curr Pharm Biotech.* 2018; 19(15): 1232-1240.
46. Salas A, Hernandez-Rocha C, Duijvestein M, Faubion W, McGovern D, Vermeire S, Vetrano S, Vande Casteele N. JAK-STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020; 17(6): 323-337.
47. Morris R, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Sci.* 2018; 27(12): 1984-2009.
48. Ferrao R, Lupardus PJ. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK-Receptor Interactions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017; 8: 71.
49. Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nature Reviews Immunology.* 2006 ; 6(8): 602-612.
50. Brooks AJ, Putoczki T. JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer. *Cancers* 2020; 12(7): 1291.
51. Lokau J, Schoeder V, Haybaeck J, Garbers C. Jak-Stat signaling induced by interleukin-6 family cytokines in hepatocellular carcinoma. *Cancers* 2019; 11(11): 1704.
52. Grabarek B, Wcislo-Dziadecka D, Gola J, Kruszniewska-Rajs C, Brzezinska-Wcislo , Zmarzly N, Mazurek U. Changes in the expression profile of Jak/Stat signaling pathway genes and miRNAs regulating their expression under the adalimumab therapy. *Curr Pharm Biotech.* 2018; 19(7): 556-565.
53. Zhao G, Zhu G, Huang Y, Zheng W, Hua J, Yang S, Zhuang J, Ye J. IL-6 mediates the signal pathway of JAK-STAT3-VEGF-C promoting growth, invasion and lymphangiogenesis in gastric cancer. *Oncol. Rep.* 2016; 35(3): 1787-1795.
54. Ma JH, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun. Signal.* 2020; 18(1): 33.

55. Wang Y, Shen Y, Wang S, Shen Q, Zhou X. The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system. *Cancer Lett.* 2018; 415: 117-128.
56. Laudisi F, Cherubini F, Monteleone G, Stolfi C. STAT3 Interactors as Potential Therapeutic Targets for Cancer Treatment. *IJMS.* 2018; 19(6): 1787.
57. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 2004; 10(1): 48-54.
58. Wang W, Edington HD, Rao UN, Jukic DM, Land SR, Ferrone S, Kirkwood JM. Modulation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 signaling in melanoma by high-dose IFNalpha2b. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13(5): 1523-31.
59. Unver N, McAllister F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018; 41: 10-17.
60. Houssiau FA, Coulie PG, Van Snick J. Distinct roles of IL-1 and IL-6 in human T cell activation. *Immunol. Res.* 1989; 143(8): 2520-2524.
61. Costa-Pereira AP. Regulation of IL-6-type cytokine responses by MAPKs. *Biochem. Soc. Trans.* 2014; 42(1): 59-62.
62. Su H, Lei CT, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol* 2017; 8: 405.
63. Servais F, Kirchmeyer M, Hamdorf M, Minoungou NW, Rose-John S, Kreis S, Behrmann I. Modulation of the IL-6-Signaling Pathway in Liver Cells by miRNAs Targeting gp130, JAK1, and/or STAT3. *ol. Ther. Nucleic. Acids.* 2019; 16: 419-433.
64. Johnson D.E, O'Keefe R.A, Grandis J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat. Rev. Clin.* 2018; 15(4): 234-248.
65. Didion SP. Cellular and oxidative mechanisms associated with interleukin-6 signaling in the vasculature. *IJMS* 2017; 18(12): 2563.
66. Browning L, Patel M, Horvath E.B, Tawara K, Jorcyk CL. IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag. Res.* 2018; 10: 6685.

67. Webster JD, Vucic, D. The balance of TNF mediated pathways regulates inflammatory cell death signaling in healthy and diseased tissues. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8: 365.
68. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol* 2020; 43(1): 1-18.
69. Oku T, Shimada K, Kenmotsu H, Ando Y, Kurisaka C, Sano R, Tsuji T. Stimulation of peritoneal mesothelial cells to secrete matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by TNF- $\alpha$ : a role in the invasion of gastric carcinoma cells. *IJMS* 2018; 19(12): 3961.
70. Tse B W C, Scott K E, Russell P J. Paradoxical roles of tumor necrosis factor – alpha in prostate cancer biology. *Prostate cancer* 2012; 2012: 1-8.
71. Wcisło-Dziadecka D, Gola J, Grabarek B, Mazurek U, Brzezińska-Wcisło L, Kucharz EJ. Effect of adalimumab on the expression of genes encoding TNF- $\alpha$  signal paths in skin fibroblasts in vitro. *Adv Derm Allergol* 2018; 35(4): 413.
72. Gohda T, Maruyama S, Kamei N, Yamaguchi S, Shibata T, Murakoshi M, Suzuki Y. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict mortality in patients with end-stage renal disease undergoing dialysis. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 1-10.
73. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets Ther.* 2016; 5: 47.
74. Fève B, Bastard C, Fellahi S, Bastard JP, Capeau J. New adipokines. In *Annales d'endocrinologie*. Elsevier Masson. 2016; 77(1): 49-56.
75. Friedman J. The long road to leptin. *J Clin Invest* 2016; 126(12): 4727-4734.
76. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later?. *Nutrients* 2019; 11(11): 2704.
77. Sudhakar M, Silambanan S, Chandran AS, Prabhakaran AA, Ramakrishnan R. C-reactive protein (CRP) and leptin receptor in obesity: binding of monomeric CRP to leptin receptor. *Front Immunol* 2018; 9: 1167.
78. Poetsch M.S, Strano A, Guan K. Role of Leptin in Cardiovascular Diseases. *Frontiers Endocrinology* 2020; 11: 354.
79. Han TJ, Xu HZ, Li JS, Geng LY, Li XY, Zhou XX, Wang X. Leptin and its receptor in glucose metabolism of T-cell lymphoma. *Oncol Lett.* 2018; 16(5): 5838-5846.

80. Martín-González J, Pérez-Pérez A, Cabanillas-Balsera D, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V, Segura-Egea JJ. Leptin stimulates DMP-1 and DSPP expression in human dental pulp via MAPK 1/3 and PI3K signaling pathways. *Arch Oral Biol.* 2019; 98: 126-131.
81. Zhang B, Yang L, Zeng Z, Feng Y, Wang X, Wu X, Luo H, Zhang J, Zhang M, Pakvasa M, Wagstaff W, He F, Mao Y, Qin K, Ding H, Zhang Y, Niu C, Wu M, Zhao X, Wang H, Huang L, Shi D, Liu Q, Ni N, Fu K, Athiviraham A, Moriatis Wolf J, Lee MJ, Hynes K, Strelzow J, El Dafrawy M, Xia Y, He TC. Leptin Potentiates BMP9-Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through the Activation of JAK/STAT Signaling. *Stem Cells Dev.* 2020; 29(8): 498-510.
82. Nowak A, Kobierzyński C, Dzięgiel P. Rola leptyny w patogenezie nowotworów związanych z otyłością. *Postępy Biol Komórki* 2015; 42(2): 309-328.
83. <https://bioinfo.imdik.pan.pl/wiki/Leptyna> [data dostępu 08.07.2021].
84. Nakao T, Hino M, Yamane T, Nishizawa Y, Morii H, Tatsumi N. Expression of the leptin receptor in human leukaemic blast cells. *Br J Haematol.* 1998; 102(3): 740-745.
85. Konopleva M, Mikhail A, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Sanchez-Williams G, Kornblau SM, Dong J, Kliche KO, Jiang S, Snodgrass HR, Estey EH, Andreeff M. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood* 1999; 93(5): 1668-76
86. Knuła H, Rubiś B, Rybczyńska M. The roles of leptin and LEP and LEPR gene polymorphisms in pathogenesis of breast cancer. *Contemp Oncol* 2009; 13: 287-291.
87. Mullen M, Gonzalez-Perez RR. Leptin-Induced JAK/STAT Signaling and Cancer Growth. *Vaccines (Basel)* 2016; 4(3): 26.
88. Olea-Flores M, Zuñiga-Eulogio M, Tacuba-Saavedra A, Bueno-Salgado M, Sánchez-Carvajal A, Vargas-Santiago Y, Mendoza-Catalán MA, Pérez Salazar E, García-Hernández A, Padilla-Benavides T, Navarro-Tito N. Leptin Promotes Expression of EMT-Related Transcription Factors and Invasion in a Src and FAK-Dependent Pathway in MCF10A Mammary Epithelial Cells. *Cells* 2019 4; 8(10): 1133

89. Pan H, Deng LL, Cui JQ, Shi L, Yang YC, Luo JH, Qin D, Wang L. Association between serum leptin levels and breast cancer risk: An updated systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(27): e11345
90. Wu MH, Chuang PC, Chen HM, Lin CC, Tsai SJ. Increased leptin expression in endometriosis cells is associated with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8(5): 456-464.
91. Koshihara H, Kitawaki J, Ishihara H, Kado N, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H. Progesterone inhibition of functional leptin receptor mRNA expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2001; 7(6): 567-72.
92. Bogusiewicz M, Semczuk A, Gogacz M, Skomra D, Jakowicki JA, Rechberger T. Lack of correlation between leptin receptor expression and PI3-K/Akt signaling pathway proteins immunostaining in endometrioid-type endometrial carcinomas. *Cancer Lett*. 2006; 238(1): 61-8.
93. Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol*. 2016; 8(2): 93-100.
94. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol*. 2016; 8(2): 101-109.
95. Dong Z, Su L, Esmaili S, Iseli TJ, Ramezani-Moghadam M, Hu L, Xu A, George J, Wang J. Adiponectin attenuates liver fibrosis by inducing nitric oxide production of hepatic stellate cells. *J Mol Med (Berl)*. 2015; 93(12): 1327-39.
96. Gamberi T, Magherini F, Modesti A, Fiaschi T. Adiponectin Signaling Pathways in Liver Diseases. *Biomedicines*. 2018; 6(2): 52.
97. Karnati HK, Panigrahi MK, Li Y, Tweedie D, Greig NH. Adiponectin as a Potential Therapeutic Target for Prostate Cancer. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(28): 4170-4179.
98. Gelsomino L, Naimo GD, Catalano S, Mauro L, Andò S. The Emerging Role of Adiponectin in Female Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(9): 2127.
99. Castejón M, Plaza A, Martínez-Romero J, Fernández-Marcos PJ, Cabo R, Díaz-Ruiz A. Energy Restriction and Colorectal Cancer: A Call for Additional Research. *Nutrients*. 2020; 12(1): 114.
100. Li ZJ, Yang XL, Yao Y, Han WQ, Li BO. Circulating adiponectin levels and risk of endometrial cancer: Systematic review and meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2016; 11(6): 2305-2313.

101. Busch EL, Crous-Bou M, Prescott J, Downing MJ, Rosner BA, Mutter GL, De Vivo I. Adiponectin, Leptin, and Insulin-Pathway Receptors as Endometrial Cancer Subtyping Markers. *Horm Cancer*. 2018; 9(1): 33-39.
102. Friberg E, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes and risk of endometrial cancer: a population-based prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16(2): 276-280.
103. Rzepka-Górska I, Bedner R, Cymbaluk-Płoska A, Chudecka-Głaz A. Serum adiponectin in relation to endometrial cancer and endometrial hyperplasia with atypia in obese women. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2008; 29(6): 594-597.
104. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol*. 2019; 53(2): 148-158.
105. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol*. 2019; 53(2): 148-158.
106. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12(6): 385-392.
107. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol*. 2001; 59(4): 657-663.
108. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccosanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007; 13(1): 54-61.
109. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003; 22(47): 7265-7279.
110. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol*. 2019; 53(2): 148-158.
111. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2000; 275(50): 39435-43.
112. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, Cheng AL. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem Pharmacol*. 2002; 63(8): 1423-1430.

113. Clark DW, Okada Y, Moore KHS, Mason D, Pirastu N, Gandin I, Mattsson H, Barnes CLK, Lin K, Zhao JH, Deelen P, Rohde R, Schurmann C, Guo X, Giulianini F, Zhang W, Medina-Gomez C, Karlsson R, Bao Y, Bartz TM, Baumbach C, Biino G, Bixley MJ, Brumat M, Chai JF, Corre T, Cousminer DL, Dekker AM, Eccles DA, van Eijk KR, Fuchsberger C, Gao H, Germain M, Gordon SD, de Haan HG, Harris SE, Hofer E, Huerta-Chagoya A, Igartua C, Jansen IE, Jia Y, Kacprowski T, Karlsson T, Kleber ME, Li SA, Li-Gao R, Mahajan A, Matsuda K, Meidtner K, Meng W, Montasser ME, van der Most PJ, Munz M, Nutile T, Palviainen T, Prasad G, Prasad RB, Priyanka TDS, Rizzi F, Salvi E, Sapkota BR, Shriner D, Skotte L, Smart MC, Smith AV, van der Spek A, Spracklen CN, Strawbridge RJ, Tajuddin SM, Trompet S, Turman C, Verweij N, Viberti C, Wang L, Warren HR, Wootton RE, Yanek LR, Yao J, Yousri NA, Zhao W, Adeyemo AA, Afaq S, Aguilar-Salinas CA, Akiyama M, Albert ML, Allison MA, Alver M, Aung T, Azizi F, Bentley AR, Boeing H, Boerwinkle E, Borja JB, de Borst GJ, Bottinger EP, Broer L, Campbell H, Chanoock S, Chee ML, Chen G, Chen YI, Chen Z, Chiu YF, Cocca M, Collins FS, Concas MP, Corley J, Cugliari G, van Dam RM, Damulina A, Daneshpour MS, Day FR, Delgado GE, Dhana K, Doney ASF, Dörr M, Doumatey AP, Dzimiri N, Ebenesersdóttir SS, Elliott J, Elliott P, Ewert R, Felix JF, Fischer K, Freedman BI, Girotto G, Goel A, Gögele M, Goodarzi MO, Graff M, Granot-HersHKovitz E, Grodstein F, Guarrera S, Gudbjartsson DF, Guity K, Gunnarsson B, Guo Y, Hagenaars SP, Haiman CA, Halevy A, Harris TB, Hedayati M, van Heel DA, Hirata M, Höfer I, Hsiung CA, Huang J, Hung YJ, Ikram MA, Jagadeesan A, Jousilahti P, Kamatani Y, Kanai M, Kerrison ND, Kessler T, Khaw KT, Khor CC, de Kleijn DPV, Koh WP, Kolcic I, Kraft P, Krämer BK, Kutalik Z, Kuusisto J, Langenberg C, Launer LJ, Lawlor DA, Lee IT, Lee WJ, Lerch MM, Li L, Liu J, Loh M, London SJ, Loomis S, Lu Y, Luan J, Mägi R, Manichaikul AW, Manunta P, Måsson G, Matoba N, Mei XW, Meisinger C, Meitinger T, Mezzavilla M, Milani L, Millwood IY, Momozawa Y, Moore A, Morange PE, Moreno-Macías H, Mori TA, Morrison AC, Muka T, Murakami Y, Murray AD, de Mutsert R, Mychaleckyj JC, Nalls MA, Nauck M, Neville MJ, Nolte IM, Ong KK, Orozco L, Padmanabhan S, Pálsson G, Pankow JS, Pattaro C, Pattie A, Polasek O, Poulter N, Pramstaller PP, Quintana-Murci L, Rääkkönen K, Ralhan S, Rao DC, van Rheenen W, Rich SS, Ridker PM, Rietveld CA, Robino A, van Rooij FJA, Ruggiero D, Saba Y, Sabanayagam C, Sabater-Lleal M, Sala CF, Salomaa V, Sandow K, Schmidt H,

Scott LJ, Scott WR, Sedaghati-Khayat B, Sennblad B, van Setten J, Sever PJ, Sheu WH, Shi Y, Shrestha S, Shukla SR, Sigurdsson JK, Sikka TT, Singh JR, Smith BH, Stančáková A, Stanton A, Starr JM, Stefansdottir L, Straker L, Sulem P, Sveinbjornsson G, Swertz MA, Taylor AM, Taylor KD, Terzikhan N, Tham YC, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Tillander A, Tracy RP, Tusié-Luna T, Tzoulaki I, Vaccargiu S, Vangipurapu J, Veldink JH, Vitart V, Völker U, Vuoksima E, Wakil SM, Waldenberger M, Wander GS, Wang YX, Wareham NJ, Wild S, Yajnik CS, Yuan JM, Zeng L, Zhang L, Zhou J, Amin N, Asselbergs FW, Bakker SJL, Becker DM, Lehne B, Bennett DA, van den Berg LH, Berndt SI, Bharadwaj D, Bielak LF, Bochud M, Boehnke M, Bouchard C, Bradfield JP, Brody JA, Campbell A, Carmi S, Caulfield MJ, Cesarini D, Chambers JC, Chandak GR, Cheng CY, Ciullo M, Cornelis M, Cusi D, Smith GD, Deary IJ, Dorajoo R, van Duijn CM, Ellinghaus D, Erdmann J, Eriksson JG, Evangelou E, Evans MK, Faul JD, Feenstra B, Feitosa M, Foisy S, Franke A, Friedlander Y, Gasparini P, Gieger C, Gonzalez C, Goyette P, Grant SFA, Griffiths LR, Groop L, Gudnason V, Gyllensten U, Hakonarson H, Hamsten A, van der Harst P, Heng CK, Hicks AA, Hochner H, Huikuri H, Hunt SC, Jaddoe VWV, De Jager PL, Johannesson M, Johansson Å, Jonas JB, Jukema JW, Juntila J, Kaprio J, Kardia SLR, Karpe F, Kumari M, Laakso M, van der Laan SW, Lahti J, Laudes M, Lea RA, Lieb W, Lumley T, Martin NG, März W, Matullo G, McCarthy MI, Medland SE, Merriman TR, Metspalu A, Meyer BF, Mohlke KL, Montgomery GW, Mook-Kanamori D, Munroe PB, North KE, Nyholt DR, O'connell JR, Ober C, Oldehinkel AJ, Palmas W, Palmer C, Pasterkamp GG, Patin E, Pennell CE, Perusse L, Peyser PA, Pirastu M, Polderman TJC, Porteous DJ, Posthuma D, Psaty BM, Rioux JD, Rivadeneira F, Rotimi C, Rotter JI, Rudan I, Den Ruijter HM, Sanghera DK, Sattar N, Schmidt R, Schulze MB, Schunkert H, Scott RA, Shuldiner AR, Sim X, Small N, Smith JA, Sotoodehnia N, Tai ES, Teumer A, Timpson NJ, Toniolo D, Tregouet DA, Tuomi T, Vollenweider P, Wang CA, Weir DR, Whitfield JB, Wijmenga C, Wong TY, Wright J, Yang J, Yu L, Zemel BS, Zonderman AB, Perola M, Magnusson PKE, Uitterlinden AG, Kooner JS, Chasman DI, Loos RJJ, Franceschini N, Franke L, Haley CS, Hayward C, Walters RG, Perry JRB, Esko T, Helgason A, Stefansson K, Joshi PK, Kubo M, Wilson JF. Associations of autozygosity with a broad range of human phenotypes. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 4957.

114. Sznurkowski JJ, Knapp P, Bodnar L, Bidziński M, Jach R, Misiek M, Basta A. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej dotyczące diagnostyki i leczenia raka endometrium. *Curr Gyn Oncol*. 2017; 15(1): 34-44.
115. Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirtos NM, Mannel RS, Fowler J, Thigpen JT, Benda JA; Gynecologic Oncology Group Study. Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2006; 24(1): 36-44.
116. Maggi R, Lissoni A, Spina F, Melpignano M, Zola P, Favalli G, Colombo A, Fossati R. Adjuvant chemotherapy vs radiotherapy in high-risk endometrial carcinoma: results of a randomised trial. *Br J Cancer*. 2006; 95(3): 266-271.
117. Susumu N, Sagae S, Udagawa Y, Niwa K, Kuramoto H, Satoh S, Kudo R; Japanese Gynecologic Oncology Group. Randomized phase III trial of pelvic radiotherapy versus cisplatin-based combined chemotherapy in patients with intermediate- and high-risk endometrial cancer: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2008; 108(1): 226-233.
118. Thigpen JT, Brady MF, Homesley HD, Malfetano J, DuBeshter B, Burger RA, Liao S. Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol*. 2004; 22(19): 3902-3908.
119. Fleming GF, Filiaci VL, Bentley RC, Herzog T, Sorosky J, Vaccarello L, Gallion H. Phase III randomized trial of doxorubicin + cisplatin versus doxorubicin + 24-h paclitaxel + filgrastim in endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Ann Oncol*. 2004; 15(8): 1173-1178.
120. Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, Look KY, Reid GC, Munkarah AR, Kline R, Burger RA, Goodman A, Burks RT. Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2004; 22(11): 2159-66.
121. Opławski M, Michalski M, Witek A, Michalski B, Zmarzły N, Jęda-Golonka A, Styblińska M, Gola J, Kasprzyk-Żyszczyńska M, Mazurek U, Plewka A. Identification of a gene expression profile associated with the regulation of angiogenesis in endometrial cancer. *Mol Med Rep*. 2017; 16(3): 2547-2555.

122. Zhao H, Jiang A, Yu M, Bao H. Identification of biomarkers correlated with diagnosis and prognosis of endometrial cancer using bioinformatics analysis. *J Cell Biochem.* 2020; 121(12): 4908-4921.
123. anuszyk 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 Biotechnol.* 2021; 22(4): 541-548.
124. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, Kingsmore SF. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med.* 2018; 3: 16.
125. Shukla AK, Singh P, Vardhan M. A two-stage gene selection method for biomarker discovery from microarray data for cancer classification. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2018; 183: 47-58.
126. Busch CJ, Becker B, Kriegs M, Gatzemeier F, Krüger K, Möckelmann N, Fritz G, Petersen C, Knecht R, Rothkamm K, Rieckmann T. Similar cisplatin sensitivity of HPV-positive and -negative HNSCC cell lines. *Oncotarget.* 2016; 7(24): 35832-35842.
127. Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Toro L, Durinikova E, Tyciakova S, Demkova L, Gursky J, Kucerova L. Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells. *Cell Commun Signal.* 2016; 14: 4.
128. Moon HS, Chamberland JP, Aronis K, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS. Direct role of adiponectin and adiponectin receptors in endometrial cancer: in vitro and ex vivo studies in humans. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10(12): 2234-43.
129. Cai ZF, Deng L, Wang MM, Zhang JQ, Li L. Effect of AMPK/mTOR/S6K1 pathways and the insulin-sensitizing effect for adiponectin in endometrial cancer cells. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2018; 53(8): 554-560.
130. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol.* 2016; 8(2): 101-109.
131. Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152(1): 113-8.

132. Miller DS, Filiaci VL, Mannel RS, Cohn DE, Matsumoto T, Tewari KS, DiSilvestro P, Pearl ML, Argenta PA, Powell MA, Zweizig SL, Warshal DP, Hanjani P, Carney ME, Huang H, Cella D, Zaino R, Fleming GF. Carboplatin and Paclitaxel for Advanced Endometrial Cancer: Final Overall Survival and Adverse Event Analysis of a Phase III Trial (NRG Oncology/GOG0209). *J Clin Oncol.* 2020; 38(33): 3841-3850.
133. Chitcholtan K, Sykes PH, Evans JJ. The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *J Transl Med.* 2012; 10: 38.
134. Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol.* 2018; 31(1): 15-25.
135. Wang Z, Gao S, Sun C, Li J, Gao W, Yu L. Clinical significance of serum adiponectin and visfatin levels in endometrial cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2019; 145(1): 34-39.
136. örner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, Kelesidis I, Williams CJ, Kaprara A, Bullen J, Neuwirth A, Tseleni S, Mitsiades N, Kiess W, Mantzoros CS. Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(3): 1041-1048.
137. Gong TT, Wu QJ, Wang YL, Ma XX. Circulating adiponectin, leptin and adiponectin-leptin ratio and endometrial cancer risk: Evidence from a meta-analysis of epidemiologic studies. *Int J Cancer.* 2015; 137(8): 1967-78.
138. Ciortea R, Şuşman S, Măluţan AM, Berceanu C, Mocan-Hognogi RF, Bucuri CE, Soriţău O, Neagoe I, Mişu D. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and Ishikawa cells co-culture highlight the role of adiponectin in endometrial cancer pathogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018; 59(4): 1165-1172.
139. Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(8): 2476-2481.
140. Maleki M, Ghanbarvand F, Reza Behvarz M, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells.* 2014; 7(2): 118-26.
141. Alhazzani K, Alaseem A, Algahtani M, Dhandayuthapani S, Venkatesan T, Rathinavelu, A. Angiogenesis in Cancer Treatment; 60 Years' Swing Between

- Promising Trials and Disappointing Tribulations. *Anti-Angiogenesis Drug Discovery and Development* 2019; 4(4): 34.
142. Daley-Brown D, Oprea-Ilie GM, Lee R, Pattillo R, Gonzalez-Perez RR. Molecular cues on obesity signals, tumor markers and endometrial cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015; 21(1): 89-106.
143. Gong C, Liu Y, Xiao W, Yin J, Wang DH, Sheng H. The role of ERK1/2 in leptin promoting the proliferation of human endometrial cancer cell line Ishikawa. *Ai Zheng.* 2007 Nov; 26(11): 1211-1214.
144. Liu Y, Lv L, Xiao W, Gong C, Yin J, Wang D, Sheng H. Leptin activates STAT3 and ERK1/2 pathways and induces endometrial cancer cell proliferation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2011; 31(3): 365.
145. Grabowski J. Ocena stężeń leptyny w surowicy krwi chorych na raka jajnika a skuteczność cytoredukcji i chemioterapii. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2009.
146. Słomian G, Świętochowska E, Nowak G. Chemotherapy and plasma adipokines level in patients with colorectal cancer. *Postepy Hig Med Dosw.* 2017; 71: 281–290.
147. Kumar J, Fang H, McCulloch DR, Crowley T, Ward AC. Leptin receptor signaling via Janus kinase 2/Signal transducer and activator of transcription 3 impacts on ovarian cancer cell phenotypes. *Oncotarget.* 2017; 8(55): 93530–93540.
148. Yuan SS, Tsai KB, Chung YF, Chan TF, Yeh YT, Tsai LY, Su JH. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2004; 92(3): 769-775.
149. Michlewski G, Cáceres, J.F. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *Rna* 2009; 25(1): 1-16.
150. Panda AC. Circular RNAs Act as miRNA Sponges. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1087: 67-79.
151. Xu L, Xu Q, Li X, Zhang X. MicroRNA-21 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells via tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Mol Med Rep.* 2017; 16(4): 4659-4663.
152. Qi R, Huang J, Wang Q, Liu H, Wang R, Wang J, Yang F. MicroRNA-224-5p regulates adipocyte apoptosis induced by TNF $\alpha$  via controlling NF- $\kappa$ B activation. *J Cell Physiol.* 2018; 233(2): 1236-1246.

153. Deng L, Hu G, Jin L, Wang C, Niu H. Involvement of microRNA-23b in TNF- $\alpha$ -reduced BMSC osteogenic differentiation via targeting runx2. *J Bone Miner Metab.* 2018; 36(6): 648-660.
154. Che Q, Xiao X, Liu M, Lu Y, Dong X, Liu S. IL-6 promotes endometrial cancer cells invasion and migration through signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway. *Pathol Res Pract.* 2019; 215(6): 152392.
155. Chu Y, Wang Y, Peng W, Xu L, Liu M, Li J, Hu X, Li Y, Zuo J, Ye Y. STAT3 activation by IL-6 from adipose-derived stem cells promotes endometrial carcinoma proliferation and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 J ; 500(3): 626-631.
156. Yan HQ, Huang XB, Ke SZ, Jiang YN, Zhang YH, Wang YN, Li J, Gao FG. Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation. *Cancer Sci.* 2014; 105(9): 1220-1227.
157. Gao J, Zhao S, Halstensen TS. Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2016; 35(6): 3265-3274.
158. Kumar P, Sulakhiya K, Barua CC, Mundhe N. TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 expressions, responsible for disparity in action of curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem.* 2017; 431(1-2): 113-122.
159. Morgan EL, Macdonald A. JAK2 Inhibition Impairs Proliferation and Sensitises Cervical Cancer Cells to Cisplatin-Induced Cell Death. *Cancers (Basel).* 2019; 11(12): 1934.
160. Kullmann MK, Pegka F, Ploner C, Hengst L. Stimulation of c-Jun/AP-1-Activity by the Cell Cycle Inhibitor p57Kip2. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 664609.

## 8. Streszczenie

**Wstęp:** Rak endometrium, inaczej rak trzonu macicy jest najczęstszym nowotworem ginekologicznym u kobiet w wieku około- i postmenopauzalnym. Do najlepiej poznanych i opisanych adipokin zalicza się: leptyna, adiponektyna, wisfatyna, rezystyna i omentyna.

Leptyna (LEP) jest wydzielana przede wszystkim przez zróżnicowane adipocyty, wpływa na angiogenezę nowotworową poprzez aktywację ścieżki JAK/STAT, co skutkuje wzmożoną proliferacją komórek śródbłona naczyń oraz zwiększeniem ekspresji czynnik wzrostu śródbłona naczyń (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF, ang. fibroblast growth factor) i białek antyapoptotycznych, m.in. Bcl-2. U kobiet, których BMI jest wyższe niż 25 ryzyko zachorowania na raka trzonu macicy wzrasta 2-krotnie, a u tych, gdzie BMI jest powyżej 30 ryzyko wzrasta 3-krotnie. Potwierdzono także wyższe stężenie LEP w surowicy kobiet z rakiem endometrium w porównaniu do zdrowych ochotniczek.

Z kolei, adiponektyna wykazuje działanie uwrażliwiające na insulinę, wzmacnia ekspresję syntazy tlenku azotu oraz posiada aktywność przeciwzapalną poprzez hamowanie ekspresji czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ , ang. tumor necrosis factor alpha) i interleukiny 6 (IL-6). Odnotowano 6-krotnie wyższe ryzyko rozwoju nowotworu u osób otyłych, u których stężenie ADP było niższe niż w grupie zdrowych ochotników. Podkreśla się, że to właśnie ta adipokina jest najsilniej związana z ryzykiem wystąpienia raka błony śluzowej trzonu macicy.

Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej (PTGO) z 2017 roku w przypadku raka endometrium stosowana w stężeniu 60 mg/m<sup>2</sup> w terapii adjuwantowej. Mechanizm działania cisplatyny związany jest z oddziaływaniem związków platyny z materiałem genetycznym komórki, czyli kwasem deoksyrybonukleinowym (DNA), z którym tworzą wiązania krzyżowe w obrębie cząsteczki DNA, jak i pomiędzy cząsteczkami. W konsekwencji dochodzi do zaburzenia struktury DNA, powstawania pęknięć, nieprawidłowej syntezy DNA i kwasu rybonukleinowego (RNA) oraz zahamowania podziałów komórkowych i apoptozy.

**Cel:** Nadrzędnym celem pracy była ocena zmian wzorca ekspresji genów kodujących wybrane adipokiny i czynniki prozapalne w hodowli komórkowej raka endometrium

linii Ishikawa eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej.

**Material i metody:** Komórki raka endometrium linii Ishikawa były eksponowane na działanie cisplatyny w stężeniu 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  przez okres 12, 24 i 48 godzin w porównaniu do hodowli kontrolnej (K), którą tworzą komórki nietraktowane cisplatiną. Dla każdego czasu ekspozycji i stężenia cisplatyny przeprowadzono trzy powtórzenia techniczne.

Do zbadania cytotoksycznego wpływu cisplatyny względem hodowli komórkowej raka endometrium linii Ishikawa wykorzystano test z sulforodaminą B, która jest anionowym barwnikiem, wykazującym zdolność do wiązania się z resztami aminokwasowymi białek komórkowych. Oznaczenie cytotoksyczności w tym teście opiera się na podstawie ilości białka komórkowego.

Ekstrakcja całkowitego kwasu rybonukleinowego (RNA) z hodowli raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na cisplatinę i hodowli kontrolnej została przeprowadzona z wykorzystaniem odczynnika użyto TRIzol. W celu przeprowadzenia oceny jakościowej wyizolowanych ekstraktów RNA wykorzystano technikę elektroforezy agarozowej z dodatkiem bromku etydyny. Ilościowej analizy otrzymanych ekstraktów kwasu nukleinowego RNA dokonano poprzez przeprowadzenie pomiarów spektrofotometrycznych.

Technika mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133\_A2 została wykorzystana do oceny profilu ekspresji genów wybranych czynników prozapalnych i adipokin w hodowli Ishikawa eksponowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do kontroli. Geny do analizy mikromacierzowej zostały wytypowane w oparciu o bazę danych AffymetrixNetAffx™ Analysis Center database (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>).

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją (RTqPCR, ang. Real-Time Quantitative Reverse Transcription Reaction) została wykorzystana w celu potwierdzenia obserwowanych zmian wytypowanych techniką mikromacierzy. Ten etap analizy jest istotny, gdyż eksperyment mikromacierzowy jest badaniem przesiewowym, półilościowym, stąd konieczne jest potwierdzenie wyników techniką ilościową.

Ostatnim etapem analizy molekularnej była ocena zmian stężenia wybranych białek w medium hodowlanym komórek raka endometrium linii Ishikawa

do których dodano cisplatynę w porównaniu do hodowli kontrolnej, czyli komórek nieekspozowanych na lek. W tym celu przeprowadzono kanapkową odmianę testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) w 96-dołkowych szalkach zgodnie z rekomendacją producenta.

Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania Transcriptome Analysis Console program (Thermo Fisher Scientific) i STATISTICA 13PL (Kraków, Polska).

**Wyniki:** Na podstawie uzyskanych wyników testu cytotoksyczności można zaobserwować, iż niezależnie od stężenia cisplatyny, którą dodano do hodowli komórkowej następuje spadek liczby żywych komórek w porównaniu do hodowli kontrolnej. Na podstawie wykresu dawka-efekt stężenie 5  $\mu\text{M}$  jest średnim stężeniem hamującym (IC<sub>50</sub>, ang. average inhibitory concentration) wzrost komórek raka endometrium linii Ishikawa.

Na podstawie uzyskanych wyników eksperymentu mikromacierzowego można zaobserwować, iż pod wpływem cisplatyny następuje obniżenie aktywności transkrypcyjnej leptyny i jej trzech receptorów. Odnotowano tym mniejszą ekspresję omawianych genów, im wyższe było stężenie leku dodanego do hodowli oraz dłuższy czas ekspozycji komórek na niego ( $p < 0,05$ ).

Z kolei dla adiponektyny i jej receptorów można zaobserwować odmienny do obserwowanego dla leptyny i jej receptorów profil ekspresji w zależności od stężenia cisplatyny i czasu traktowania nią komórek raka endometrium. Im wyższe stężenie leku i czas ekspozycji komórek, tym większa nadekspresja adiponektyny i jej receptorów ( $p < 0,05$ ).

W kolejnym etapie analizy molekularnej oceniono zmiany profilu ekspresji wybranych czynników prozapalnych w hodowli raka endometrium pod wpływem cisplatyny z zastosowaniem mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133\_A2 ( $p < 0,05$ ). Można zaobserwować, iż dodanie cisplatyny do hodowli komórkowej spowodowało nadekspresję *TNF- $\alpha$*  i *IL-6* z równoczesnym obniżeniem ekspresji *STAT3* i *JAK2* ( $p < 0,05$ ). Różnice aktywności transkrypcyjnej ocenianych genów były bardziej widoczne, im wyższe zastosowano stężenie cisplatyny i czas inkubacji ( $p < 0,05$ ).

Z kolei na poziomie białka przy stężeniu cisplatyny równym 2,5  $\mu\text{M}$  statystycznie istotną różnicę odnotowano po 24 i 48-godzinnej ekspozycji na lek w porównaniu do kontroli ( $p < 0,05$ ).

Jednakże przy wyższych stężeniach cisplatyny na które eksponowano komórki raka endometrium zaobserwowano znamienne statystycznie różnice w jej stężeniu niezależnie od czasu inkubacji ( $p > 0,05$ ). Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała także istotne różnice w ekspresji leptyny na poziomie białka również pomiędzy poszczególnymi czasami ekspozycji. Istotne zmiany w stężeniu adiponektyny na poziomie proteomu były widoczne dopiero, gdy do hodowli komórkowej dodano cisplatynę w stężeniu  $5 \mu\text{M}$ , niezależnie od czasu ekspozycji komórek na lek ( $p < 0,05$ ). Analiza statystyczna wykazała także, że przy stężeniu  $5 \mu\text{M}$  i  $10 \mu\text{M}$  stężenie leptyny zmieniło się istotnie pomiędzy ekspozycją trwającą 12 i 48 godzin ( $p < 0,05$ ).

Ostatnim etapem analizy molekularnej było wyznaczenie stężenie TNF- $\alpha$ , STAT3, JAK2 i IL-6 na poziomie białka w hodowli raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na cisplatynę w porównaniu do hodowli kontrolnej ( $p < 0,05$ ). Warto zauważyć, iż w przypadku TNF- $\alpha$ , jego profil ekspresji na poziomie transkryptomu i proteomu jest odmienny. Na poziomie białka można zaobserwować mniejsze stężenie tej cytokiny w hodowli komórkowej eksponowanej na lek w porównaniu do kontroli ( $p < 0,05$ ). W przypadku pozostałych czynników na poziomie mRNA i białka odnotowano ten sam kierunek zmiany ekspresji, przy czym zmiany na poziomie proteomu wydają się być mniej wyraźne niż w przypadku transkryptomu  $p < 0,05$ ).

W ostatnim etapie analizy otrzymanych wyników poszukiwano zależności pomiędzy ekspresją ocenianych adipokin i czynników prozapalnych na poziomie mRNA oraz białka ( $p < 0,05$ ).

Na poziomie mRNA odnotowano występowanie istotnych statystycznie dodatnich zależności ekspresji pomiędzy *LEP* a *LEPROT* ( $r = 0,72$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *LEPROTL1* ( $r = 0,97$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *LEPR* ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *LEPROTL1* ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *LEPR* ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *LEPR* ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,05$ ); *ADIPOR2* a *TNF- $\alpha$*  ( $r = 0,81$ ;  $p < 0,05$ ); *ADIPOR 2* a *IL-6* ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,05$ ).

Z kolei ujemne zależności odnotowano pomiędzy genami: *LEP* a *ADP* ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *ADIPOR2* ( $r = -0,86$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *TNF- $\alpha$*  ( $r = -0,81$ ;  $p < 0,05$ ); *LEP* a *IL-6* ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *ADP* ( $r = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *ADIPOR2* ( $r = -0,92$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROT* a *IL-6* ( $r = -0,85$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *ADP* ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *ADIPOR2* ( $r = -0,87$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *TNF- $\alpha$*  ( $r = -0,72$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPROTL1* a *IL-6* ( $r = -0,94$ ;  $p < 0,05$ ); *LEPR* a *ADP* ( $r = -0,96$ ;

$p < 0,05$ ); LEPR a ADIPOR2 ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,05$ ); LEPR a TNF- $\alpha$  ( $r = -0,74$ ;  $p < 0,05$ ); LEPR a IL-6 ( $r = -0,85$ ;  $p < 0,05$ ).

Na poziomie białka zaobserwowano występowanie istotnej statystycznie silnej, dodatniej zależności pomiędzy ekspresją TNF- $\alpha$  a LEP ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,05$ ); STAT3 a LEP ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,05$ ); TNF- $\alpha$  a STAT3 ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,05$ ) oraz jednej ujemnej korelacji pomiędzy ADP a JAK2 ( $r = -0,74$ ;  $p < 0,05$ ).

**Wnioski:** Cisplatyna w hodowli raka endometrium linii Ishikawa spowodowała zmianę profilu ekspresji genów i kodowanych przez nie białek: leptyny i jej receptorów, adiponektyny, IL-6, TNF- $\alpha$ , JAK2. Uzyskane wyniki sugerują, że cisplatyna wywiera efekt biologiczny poprzez szlak JAK/STAT. Niewykluczone, że w regulację ekspresji TNF- $\alpha$  zaangażowane są cząsteczki mikro RNA.

Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny, IL-6, TNF- $\alpha$ , JAK2 można rozpatrywać w kontekście wykorzystania jako uzupełniających markerów diagnostycznych raka endometrium, monitorowania skuteczności terapii cisplatyną i tworzenia nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na szlak sygnalizacyjny JAK/STAT.

**Słowa kluczowe:** rak endometrium, linia Ishikawa, cisplatyna, adipokiny, leptyna, adiponektyna, interleukina 6, czynnik martwicy nowotworu alfa, marker molekularny, mRNA, białko, JAK/STAT, proces zapalny, kancerogeneza, kinaza Janusa 2, czynnik indukcji transkrypcji 3

## 9. Abstract

**Introduction:** Endometrial cancer is the most common gynecological tumor in peri- and postmenopausal women. The best known and best-described adipokines are: leptin, adiponectin, visfatin, resistin, and omentin.

Leptin (LEP) is primarily secreted by differentiated adipocytes, influencing neoplastic angiogenesis through the activation of the JAK/STAT pathway, which results in the increased proliferation of vascular endothelial cells as well as an increased expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) and anti-apoptotic proteins, namely Bcl-2. In women whose BMI is higher than 25, the risk of endometrial cancer is doubled and in those whose BMI is above 30, this risk is tripled. A higher concentration of LEP in the serum of women with endometrial cancer compared to healthy volunteers was also confirmed.

In turn, adiponectin (ADP) demonstrates an insulin-sensitizing effect, increasing the expression of nitric oxide synthase, furthermore, it also has anti-inflammatory activity through inhibiting the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6). A 6-times higher risk of cancer development is noted in obese people, in whom the concentration of ADP was lower than in the group of healthy volunteers. It is highlighted that it is this adipokine that is most strongly associated with the risk of endometrial cancer.

In accordance with the recommendations of the Polish Association of Oncological Gynecology (PAOG) from 2017, a concentration of 60 mg/m<sup>2</sup> is used for the treatment of endometrial cancer in adjuvant therapy. The mechanism through which cisplatin acts is related to the interaction of platinum compounds with the genetic material of the cell, which is deoxyribonucleic acid (DNA), together with which they cross-link within the DNA molecule and between the molecules. Consequently, the structure of the DNA is disturbed, cracks appear, DNA and ribonucleic acid (RNA) synthesis incorrectly, as well as the inhibition of cell division and apoptosis.

**Aim:** The overriding aim of this study was the assessment of changes in the expression pattern of genes coding chosen adipokines and pro-inflammatory factors in an Ishikawa line endometrial cancer cell culture exposed to the effects of cisplatin, compared to a control culture.

**Materials and methods:** Ishikawa line endometrial cancer cells were exposed to the effects of cisplatin at concentrations of 2.5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, and 10  $\mu$ M for 12, 24, and 48 hours, and afterward compared to a control culture (C), which consisted of cells untreated using cisplatin. For each exposition period and cisplatin concentration, 3 technical repetitions were conducted.

To investigate the cytotoxic influence of cisplatin in regards to the Ishikawa endometrial cancer cell line, the Sulforhodamine B test was utilized, which is an anionic dye indicating the ability to bind itself to amino acid residues of cellular proteins. Determining the cytotoxicity in this test is based on the amount of cellular protein.

The extraction of whole ribonucleic acid (RNA) from the Ishikawa line endometrial cancer cell culture exposed to cisplatin and the control culture was carried out using the TRIzol reagent. In order to conduct the quality assessment of the isolated RNA extract, the electrophoresis technique with the addition of ethidium bromide was used.

Quantitative analysis of the obtained RNA extracts was conducted using spectrophotometric measurements.

The HG-U133\_A2 oligonucleotide microarray technique was used to assess the expression profile of genes, selected pro-inflammatory factors, and adipokines in an Ishikawa line culture exposed to the effects of cisplatin, compared to a control. The genes used in the microarray analysis were selected based on the AffymetrixNetAffx™ Analysis Center database (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>).

The Real-Time Quantitative Reverse Transcription Reaction (RTqPCR) was used to confirm the observed changes selected using the microarray technique. This stage of analysis is significant, as the microarray experiment is a semi-quantitative, screening examination, therefore, the confirmation of the results using a quantitative technique is necessary.

The last stage of molecular analysis was the assessment of the changes in the concentration of the selected proteins in the Ishikawa line endometrial cancer culture medium, to which cisplatin was added, compared with a control culture, which consists of cells unexposed to the drug. To achieve this, a sandwich version of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test in 96-well plates, in accordance with the recommendations of the manufacturer.

Statistical analysis was conducted using the Transcriptome Analysis Console program (Thermo Fisher Scientific) and STATISTICA 13.3 PL program (Cracow,

Polska).

**Results:** Based on the obtained results of the cytotoxicity test, it can be observed that, independently from the cisplatin concentration, which was added to the cell culture, a drop in the number of living cells, compared to the control culture, is noted.

Furthermore, on the basis of the dose-effect diagram, a 5  $\mu\text{M}$  cisplatin concentration is the average inhibitory concentration (IC50) for the growth of Ishikawa line endometrial cancer cells.

From the results of the microarray experiment, it can be observed that under the influence of cisplatin, there is a decrease in the transcriptional activity of leptin and its' three receptors. A lower expression of the discussed genes was noted, the higher the concentration of the drug added to the culture and the higher the exposition time of the cells to the drug was ( $p < 0.05$ ).

In turn, for adiponectin and its' receptors, an opposite expression profile to leptin and its' receptors is noted, depending on the cisplatin concentration and treatment time of the endometrial cancer cells using it. The higher the drug concentration and cell exposition time, the higher the overexpression of adiponectin and its' receptors.

In the next stage of molecular analysis, changes in the expression profile of selected pro-inflammatory factors in the endometrial cancer cell culture under the influence of cisplatin were assessed, using the HG-U133\_A2 oligonucleotide microarray technique ( $p < 0.05$ ). It can be observed that the addition of cisplatin to the cell culture resulted in overexpression of *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* with a simultaneous decrease in *STAT3* and *JAK2* expression ( $p < 0.05$ ). Differences in the transcriptional activity of the assessed genes were more visible, the higher the utilized cisplatin concentration and incubation time were ( $p < 0.05$ ).

In turn, on the protein level, at a cisplatin concentration of 2.5  $\mu\text{M}$ , statistically significant differences after 24 and 48 hour-long expositions to the drug were noted, compared to the control ( $p < 0.05$ ).

However, at higher cisplatin concentrations, to which endometrial cancer cells were exposed, statistically, significant differences were noted for higher concentrations regardless of incubation time ( $p < 0.05$ ). The conducted statistical analysis also indicated significant differences in the expression of leptin at the protein level between the individual exposition times. Significant changes in the adiponectin concentration and the proteome level were visible only when cisplatin at a 5  $\mu\text{M}$  concentration was added

to the cell culture, regardless of the exposition time of the cells to the drug ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis also indicated that at concentrations of 5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ , the leptin concentration significantly changed between the exposition periods lasting 12 and 38 hours ( $p < 0.05$ ).

The final stage of molecular analysis was the calculation of the concentration for TNF- $\alpha$ , STAT3, JAK2, and IL-6 on the protein level in an Ishikawa line endometrial cancer cell culture exposed to cisplatin, compared to a control culture ( $p < 0.05$ ). Worth noting is the fact that in the case of TNF- $\alpha$ , its' expression profile on the transcriptome and proteome levels are opposite to each other. On the protein level, a lower concentration of this cytokine can be observed in the cell culture exposed to the drug, compared to the control ( $p < 0.05$ ). In the case of the remaining factors, on the mRNA and protein levels, the same trend of changes in expression was noted, whereas changes on the proteome level seem to be less clear compared to the transcriptome level ( $p < 0.05$ ).

Furthermore, in the final stage of analysis of the obtained results, positive relations between the expression of the assessed adipokines and pro-inflammatory factors on the mRNA and protein levels were searched for ( $p < 0.05$ ).

On the mRNA level, statistically significant positive relations of expression between *LEP* and *LEPOT* were found ( $r = 0.72$ ;  $p < 0.05$ ); *LEP* and *LEPROTL1* ( $r = 0.97$ ;  $p < 0.05$ ); *LEP* and *LEPR* ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPOT* and *LEPROTL1* ( $r = 0.76$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPOT* and *LEPR* ( $r = 0.83$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPROTL1* and *LEPR* ( $r = 0.76$ ;  $p < 0.05$ ); *ADIPOR2* and *TNF- $\alpha$*  ( $r = 0.81$ ;  $p < 0.05$ ); *ADIPOR 2* and *IL-6* ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.05$ ).

In turn, negative relations were noted between the following genes: *LEP* and *ADP* ( $r = -0.91$ ;  $p < 0.05$ ); *LEP* and *ADIPOR2* ( $r = -0.86$ ;  $p < 0.05$ ); *LEP* and *TNF- $\alpha$*  ( $r = -0.81$ ;  $p < 0.05$ ); *LEP* and *IL-6* ( $r = -0.94$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPOT* and *ADP* ( $r = -0.83$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPOT* and *ADIPOR2* ( $r = -0.92$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPOT* and *IL-6* ( $r = -0.85$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPROTL1* and *ADP* ( $r = -0.94$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPROTL1* and *ADIPOR2* ( $r = -0.87$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPROTL1* and *TNF- $\alpha$*  ( $r = -0.72$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPROTL1* and *IL-6* ( $r = -0.94$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPR* and *ADP* ( $r = -0.96$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPR* and *ADIPOR2* ( $r = -0.91$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPR* and *TNF- $\alpha$*  ( $r = -0.74$ ;  $p < 0.05$ ); *LEPR* and *IL-6* ( $r = -0.85$ ;  $p < 0.05$ ).

On the protein level, a statistically significant strong positive relationship between expression was observed for: TNF- $\alpha$  and LEP ( $r = 0.83$ ;  $p < 0.05$ ); STAT3 and LEP ( $r = 0.98$ ;  $p < 0.05$ ); TNF- $\alpha$  and STAT3 ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.05$ ) as well as one negative correlation between ADP and JAK2 ( $r = -0.74$ ;  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Cisplatin in an endometrial cancer cell culture of the Ishikawa line caused a change in the expression profile of genes and the proteins they coded: leptin and its' receptors; adiponectin; IL-6; TNF- $\alpha$ ; and JAK-2. The results obtained by us suggest that cisplatin exerts a biological effect through the JAK/STAT pathway. Moreover, it is possible that in the regulation of TNF- $\alpha$  expression, microRNA particles are involved.

Changes in the expression profiles of leptin, adiponectin, IL-6, TNF- $\alpha$ , and JAK-2 can be explored in the context of utilizing them as supplementary diagnostic markers of endometrial cancer, monitoring the effectiveness of cisplatin therapy, and in the creation of new therapeutic strategies aimed toward the JAK/STAT signaling pathway.

**Key words:** endometrial cancer, Ishikawa lineage, cisplatin, adipokines, leptin, adiponectin, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha, molecular marker, mRNA, protein, JAK/STAT, inflammatory process, carcinogenesis, Janus kinase 2, transcription induction factor 3