

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 śródbłonna naczyń oraz zwiększeniem ekspresji czynnik wzrostu śródbłonna 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 tlenu azotu oraz posiada aktywność przeciwzapalną poprzez hamowanie ekspresji czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α , 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/m² 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 μM , 5 μM i 10 μM przez okres 12, 24 i 48 godzin w porównaniu do hodowli kontrolnej (K), którą tworzą komórki nietraktowane cisplatyną. 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 cisplatynę 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 μM jest średnim stężeniem hamującym (IC₅₀, 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- α* 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 μM 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 cisplatinę 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- α , STAT3, JAK2 i IL-6 na poziomie białka w hodowli raka endometrium linii Ishikawa eksponowanej na cisplatinę w porównaniu do hodowli kontrolnej ($p < 0,05$). Warto zauważyć, iż w przypadku TNF- α , 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- α* ($r = 0,81$; $p < 0,05$); *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- α* ($r = -0,81$; $p < 0,05$); *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- α* ($r = -0,72$; $p < 0,05$); *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- α ($r = -0,74$; $p < 0,05$); LEPR a IL-6 ($r = -0,85$; $p < 0,05$).

Na poziomie białka zaobserwowano występowanie istotnej statystycznie silnej, dodatniej zależności pomiędzy ekspresją TNF- α a LEP ($r = 0,83$; $p < 0,05$); STAT3 a LEP ($r = 0,98$; $p < 0,05$); TNF- α 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- α , JAK2. Uzyskane wyniki sugerują, że cisplatyna wywiera efekt biologiczny poprzez szlak JAK/STAT. Niewykluczone, że w regulację ekspresji TNF- α zaangażowane są cząsteczki mikro RNA.

Zmiany profilu ekspresji leptyny, adiponektyny, IL-6, TNF- α , 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