

Streszczenie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wyniki: Oceniając mikromacierzowy profil ekspresji genów związanych z lekoopornością zaobserwowano, że liczba różnicujących mRNA hodowlę inkubowaną z lekiem od kontroli w zależności od czasu ekspozycji komórek na salinomycynę jest następujący: H_12 vs K - 9 mRNA, H_24 vs K - 7 mRNA, H_48 vs K - 1 mRNA. Największe zmiany ekspresji stwierdzono dla genów: *TUFT1*, *ABCB1*, *MTMR11*, *SLC30A5*.

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

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

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

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

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

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

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