

## Streszczenie

Rak jajnika jest jedną z wiodących przyczyn śmierci spośród wszystkich schorzeń ginekologicznych u kobiet na całym świecie. Mimo znacznego postępu konwencjonalnych terapii przeciwnowotworowych w dalszym ciągu istotny problem kliniczny i leczniczy stanowią trudność z wczesną diagnostyką tej choroby, jak również wzrastająca oporność komórek nowotworowych na obecnie stosowane chemioterapeutyki. Dlatego też, trwają poszukiwania nowych strategii leczenia raka jajnika, obejmujące zastosowanie nowych związków przeciwnowotworowych lub też preparatów mogących wspomóc standardową terapię. Wśród wielu kandydatów, na szczególną uwagę zasługują donory tlenku azotu (NO) - farmakologicznie aktywne związki syntetyczne, które podczas rozpadu uwalniają NO *in vivo* i/lub *in vitro*. W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad możliwością ich wykorzystania w leczeniu niektórych raków, w tym raka jajnika.

Głównym celem niniejszej pracy była ocena bezpośredniego działania donorów NO na poszczególne cechy komórek raka jajnika. Spośród charakterystycznych dla komórek nowotworowych aktywności wybrano: niewyczerpany potencjał proliferacyjny, wzmożoną aktywność poszczególnych szlaków sygnałowych, zwiększoną oporność na chemioterapeutyki oraz nasiloną produkcję czynników ułatwiających tworzenie przerzutów. Powyższe cechy są kluczowe dla intensywnego wzrostu i rozwoju guzów nowotworowych.

Do badań użyto dwóch linii komórek raka jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3, które wywodzą się odpowiednio z komórek obecnych w płynie otrzewnowym chorych oraz z komórek guza chorych z zaawansowanym stopniem choroby, różniąc się stopniem agresywności. Ponadto, jako kontroli referencyjnej użyto niezmienionych nowotworowo embrionalnych komórek nerki linii HEK 293. Wykorzystano dwa donory NO cechujące się różnym czasem półrozpadu: sperminę/NO (SPER/NO,  $t_{1/2}$  ok. 30 minut) i dietylenotriaminę/NO (DETA/NO,  $t_{1/2}$  ok. 20 godzin). Do komórek nowotworowych dodawano donory NO w trzech stężeniach, a następnie komórki hodowano w ustalonych przedziałach czasowych: 24-48 godzin (SPER/NO) i 48-96 godzin (DETA/NO). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w podłożu bez donorów NO.

Pierwszy etap badań obejmował ocenę wpływu donorów NO na przeżywalność komórek raka jajnika. Wykazano, że zarówno SPER/NO jak i DETA/NO, w stężeniach 100 $\mu$ M i 1000 $\mu$ M hamują wzrost komórek linii raka jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3 w sposób istotny statystycznie, przy czym siła ich oddziaływania jest zależna od stężenia,

czasu ekspozycji oraz rodzaju linii komórkowej. Warto zaznaczyć, że cytotoksyczne działanie DETA/NO wobec obu linii komórek raka jajnika jest silniejsze niż SPER/NO, natomiast, komórki linii SK-OV-3 charakteryzują się większą opornością na cytotoksyczność donorów NO niż komórki linii OVCAR-3. Co istotne, niezmienione nowotworowo komórki linii HEK 293 okazują się mniej wrażliwe na działanie donorów NO niż komórki linii raka jajnika. W kolejnym etapie badań, oceniano zdolność SPER/NO i DETA/NO do uwrażliwiania komórek raka jajnika linii SK-OV-3 i OVCAR-3 na cytotoksyczne działanie cisplatyny. Wykazano, że pre-inkubacja z donorami NO, istotnie zwiększa podatność komórek linii OVCAR-3, lecz nie SK-OV-3, na cytotoksyczne działanie chemioterapeutyku. Co więcej, jednoczesne zastosowanie donorów NO i cisplatyny, wzmacnia jej aktywność zarówno wobec komórek linii SK-OV-3 jak i OVCAR-3.

W dalszych badaniach określono, czy mechanizm cytotoksycznego działania donorów NO opiera się na pobudzeniu procesu apoptozy czy też może indukcji nekrozy. W tym celu wykorzystano testy pozwalające zaobserwować występowanie zjawisk towarzyszących procesowi apoptozy, takich jak spadek potencjału błony mitochondrialnej, aktywność kaspazy-3 oraz obecność fosfatydyloseryny na powierzchni komórek. Otrzymane wyniki pokazały, że donory NO indukują wyżej wymienione zjawiska w komórkach obu linii raka jajnika, co wskazuje na ich pro-apoptotyczne działanie. Ważny jest jednak również fakt, że liczba komórek linii SK-OV-3 i OVCAR-3, będących w stanie późnej apoptozy/nekrozy, rośnie w statystycznie istotny sposób wraz ze wzrostem stężenia obu donorów NO, a największe wartości odnotowano przy stężeniu 1000 $\mu$ M SPER/NO i DETA/NO. Pozwala to przypuszczać, iż mechanizm działania donorów NO opiera się w głównej mierze na indukcji apoptozy w komórkach raka jajnika, jednakże, w większym stężeniu i po dłuższym czasie ekspozycji związki te mogą również prowadzić do ich nekrozy.

W ramach realizacji kolejnej fazy badań dokonano oceny wpływu SPER/NO i DETA/NO na kluczowe, dla przeżycia komórek nowotworowych, białka sygnałowe, takie jak czynnik transkrypcyjny STAT3 oraz serynowo-treoninowa kinaza białkowa AKT. Wyniki wykazały, że obydwa donory NO (w stężeniu 1000 $\mu$ M) w znamiennej sposób obniżają poziom obu białek oraz stopień ich fosforylacji w komórkach linii SK-OV-3 i OVCAR-3. Należy jednak zaznaczyć, że DETA/NO okazuje się silniejszym inhibitorem aktywności STAT3 i AKT niż SPER/NO, natomiast komórki linii SK-OV-3 są bardziej odporne na działanie donorów NO, niż komórki linii OVCAR-3. Ponadto, zastosowanie

specyficznych inhibitorów STAT3 i AKT pokazało, że zahamowanie fosforylacji tych białek, obniża jednocześnie żywotność komórek badanych linii raka jajnika. Można zatem przypuszczać, iż mechanizm cytotoksycznego działania związków uwalniających NO związany jest także z zahamowaniem aktywności konstytutywnie pobudzonych białek sygnałowych odpowiedzialnych za niekontrolowany wzrost i proliferację komórek nowotworowych.

Równie istotny etap badań stanowiła ocena wpływu donorów NO na uwalnianie czynników inwazyjności, takich jak VEGF-A, metaloproteinazy (MMP-2 i -9) i TGF- $\beta$ 1 przez komórki badanych linii raka jajnika. Określono również poziom ekspresji mRNA wyżej wymienionych czynników w komórkach poddanych działaniu donorów NO. Otrzymane wyniki pokazały, że komórki linii SK-OV-3 uwalniają znacznie więcej VEGF-A, MMP-2 i TGF- $\beta$ 1 niż komórki linii OVCAR-3, co wskazuje na ich bardziej inwazyjny charakter. Zaobserwowano, że SPER/NO i DETA/NO (w stężeniach 100 $\mu$ M i 1000 $\mu$ M) istotnie hamują uwalnianie VEGF-A jedynie w przypadku komórek linii OVCAR-3, podczas gdy, zahamowanie wydzielania MMP-2 obserwowano w przypadku komórek obydwu badanych linii. Wykazano także, iż SPER/NO oraz DETA/NO w stężeniu 1000 $\mu$ M obniżają aktywność MMP-2 w nadsączach komórek linii SK-OV-3. Warto zaznaczyć, że jedynie DETA/NO (w stężeniu 1000 $\mu$ M) istotnie osłabiała ilość uwalnianego TGF- $\beta$ 1 przez komórki linii SK-OV-3. Analiza ekspresji mRNA VEGF-A i MMP-2 wykazała, że ani SPER/NO ani DETA/NO nie wpływają na poziom mRNA wymienionych czynników w komórkach linii OVCAR-3, natomiast, w komórkach linii SK-OV-3 zaobserwowano istotny spadek ekspresji mRNA MMP-2 po hodowli tych komórek z DETA/NO oraz wzrost ekspresji mRNA VEGF po hodowli ze SPER/NO. Poziom ekspresji mRNA MMP-9 i TGF- $\beta$ 1 nie ulega istotnej zmianie pod wpływem donorów NO w żadnej z badanych linii komórek raka jajnika. Przedstawione wyniki wskazują, że donory NO, w wysokich stężeniach, mają zdolność do hamowania uwalniania, do środowiska pozakomórkowego, czynników warunkujących migrację i tworzenie przerzutów. Jednakże, zaznaczyć należy, iż tylko w niewielkim stopniu oddziałują one na ekspresję ich mRNA. Może to sugerować, że nasilone zahamowanie uwalniania czynników inwazyjności wynika z nasilonej apoptozy/nekrozy komórek raka jajnika, spowodowanej obecnością donorów NO.

Ostatnim etapem badań była ocena oddziaływania donorów NO na uwalnianie cytokin o charakterze immunoregulacyjnym, takich jak IL-6, IL-10 oraz TNF- $\alpha$  przez komórki badanych linii raka jajnika. Wyniki wskazały, że poziom uwalnianej IL-6 wzrasta

wraz ze wzrostem stężenia obu donorów NO. Ponieważ IL-6 pobudza szlak sygnałowy STAT3, w głównej mierze odpowiedzialny za przeżywanie komórek nowotworowych, otrzymane wyniki mogą sugerować, iż zwiększona ilość tej cytokiny może stanowić mechanizm obronny komórek raka jajnika przed działaniem donorów NO. Poziom wydzielanej IL-10 i TNF- $\alpha$  przez komórki linii SK-OV-3 oraz OVCAR-3 znajduje się poniżej progu detekcji zastosowanych testów ELISA.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań pokazały, że donory NO charakteryzują się szerokim spektrum działania na komórki raka jajnika. Związki te hamują wzrost i proliferację komórek, czyniąc je również bardziej podatnymi na działanie cisplatyny. Ponadto, donory NO obniżają konstytutywną aktywację białek sygnałowych odpowiedzialnych za przeżywalność komórek nowotworowych, jak również osłabiają uwalnianie i aktywność czynników odpowiedzialnych za ich inwazyjność. Co szczególnie istotne, ogólnoustrojowe działanie NO sprawia, że nie tylko działa on przeciwnowotworowo, ale także łagodzi wiele skutków ubocznych wywołanych przez chemioterapeutyki (wzrost ciśnienia tętniczego krwi, zakrzepica). Dzięki wymienionym właściwościom, donory NO zdają się być dobrymi kandydatami do zastosowania w terapiach wspomagających leczenie nowotworów.