

Ocena *in vitro* wpływu wybranych związków na komórki o cechach nowotworowych komórek macierzystych w raku jajnika.

Słowa kluczowe: nowotworowe komórki macierzyste, metformina, fenformina, tolerancja na lek, plastyczność komórek nowotworowych, rak jajnika

Pomimo znaczących postępów w dziedzinie onkologii choroby nowotworowe wciąż pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów wśród ludzi. Nowotwór złośliwy tworzy heterogenna populacja komórek o różnym stopniu zróżnicowania. Komórki nowotworowe, które posiadają zdolność do tworzenia przerzutów oraz większą oporność na leczenie, często wykazują cechy fenotypu charakterystyczne dla prawidłowych komórek macierzystych. Ta frakcja komórek, określana jako „komórki inicjujące nowotwór” lub „macierzyste komórki nowotworowe”, może stanowić źródło nawrotu choroby nowotworowej oraz niepowodzeń w leczeniu.

Rak jajnika charakteryzuje się największym odsetkiem zgonów wśród kobiet chorych na nowotwory ginekologiczne. Dotychczas stosowane terapie nie przynoszą zadowalających odległych wyników leczenia, ponieważ często dochodzi do wznowy i do wykształcenia chemiooporności. Powszechnie stosowane w leczeniu raka jajnika związki platyny, bądź taksanów nie eliminują wolno dzielących się komórek o fenotypie nowotworowych komórek macierzystych. Stąd też istnieje potrzeba poszukiwania nowych, skuteczniejszych terapii raka jajnika, które mogą być ukierunkowane na komórki o wspomnianych cechach macierzystości.

Celem pracy była ocena *in vitro* wpływu metforminy oraz fenforminy - związków z grupy biguanidów – na komórki o cechach nowotworowych komórek macierzystych w raku jajnika.

Do badań wykorzystano cztery referencyjne linie raka jajnika: 1) A2780 - komórki bez mutacji genu *TP53*, linia wyprowadzona z komórek guza pierwotnego endometrioidalnego gruczolakoraka jajnika, wyprowadzona od pacjentki przed rozpoczęciem chemioterapii, 2) TOV 112D - komórki z mutacją typu „missense” genu *TP53*, linia wyprowadzona z endometrioidalnego raka jajnika, 3) IGROV 1 - komórki z mutacją typu „missense” genu *TP53*, linia wyprowadzona z populacji komórek raka jajnika o zróżnicowanej postaci histologicznej – z przewagą komórek o morfologii charakterystycznej dla raka endometrioidalnego oraz z komórkami o fenotypie właściwym dla surowiczego, jasnokomórkowego i niezróżnicowanego raka jajnika, oraz 4) SK-OV-3 - komórki z mutacją typu „null” genu *TP53*, linia wyprowadzona z wysięku surowiczego raka jajnika.

Komórki tych linii poddawano 6-dniowej ekspozycji na metforminę lub fenforminę w stężeniu 0,5 mM, badając ich oddziaływanie na proliferację, migrację, potencjał do wzrostu niezależnego od podłoża (klonogenność), wrażliwość na cisplatynę oraz poziom ekspresji wybranych genów, które uznaje się za wyznaczniki macierzystości i/lub agresywności komórek nowotworowych. We wszystkich badanych liniach komórkowych po 6-dniowej ekspozycji wykazano znacznie silniejsze działanie przeciwnowotworowe fenforminy w porównaniu z metforminą w zakresie hamowania proliferacji oraz klonogenności komórek. Zaobserwowano również spowolnienie tempa migracji komórek w liniach TOV 112D,

IGROV 1 i SK-OV-3, a w linii IGROV 1 wykazano także zwiększoną wrażliwość na cisplatynę po ekspozycji na fenforminę.

Wykazano, że 6-dniowa ekspozycja komórek analizowanych linii raka jajnika na te biguanidy w zróżnicowany sposób wpłynęła na ekspresję na poziomie mRNA lub białka różnych regulatorów macierzystości i/lub agresywności komórek nowotworowych. Na przykład, zaobserwowano wzrost poziomu białka LIN28A w linii A2780 zarówno po ekspozycji na metforminę, jak i na fenforminę, natomiast poziom tego białka w linii IGROV 1 spadł po ekspozycji na fenforminę. W pozostałych liniach nie wykryto białka LIN28A. W linii IGROV 1 ekspresja izoformy A genu *POU5F1* (OCT4A) uległa obniżeniu na poziomie białka po 6 dniach ekspozycji na fenforminę. W komórkach pozostałych linii nie wykazano ekspresji OCT4A. W komórkach linii IGROV 1 po 6-dniowej ekspozycji na fenforminę stwierdzono także wzrost poziomu białka SOX2 oraz transkryptów: *KIT/CD117*, *SNAI1*, *CD24*, *CD44*, *MYC*, *NR5A2*, *CLMN*, *ABCB1*, oraz *CDK6*. Oznaczenia poziomu HMGA2, wykonane techniką Western Blot, wykazały w tych warunkach ekspozycji wzrost poziomu tego białka w trzech liniach komórkowych: A2780, TOV 112D oraz IGROV 1. W liniach A2780, TOV 112D oraz SK-OV-3 zaobserwowano istotny wzrost poziomu transkryptu *HMGA2* po takiej ekspozycji, natomiast w linii IGROV 1 nie wykazano istotnej różnicy poziomu ekspresji tego genu. W żadnej z badanych linii nie stwierdzono także istotnych różnic w poziomie ekspresji *HMGA2* po ekspozycji na metforminę zarówno na poziomie mRNA, jak i produktu białkowego. W komórkach linii SK-OV-3 wykazano spadek poziomu ekspresji *SNAI1* oraz *ALDH1A1*, przy jednoczesnym wzroście ekspresji *CD24*, *CD44* oraz *KIT/CD117*.

Analiza fenotypu powierzchniowego komórek badanych linii z użyciem cytometrii przepływowej wykazała m.in. w komórkach linii IGROV 1 wzrost odsetka komórek o fenotypie CD24+CD44+CD117+ po ekspozycji na fenforminę oraz w linii SK-OV-3 wzrost odsetka komórek o fenotypie CD24-CD44+.

Stwierdzono następnie, że po 6-dobowej ekspozycji na 0,5 mM fenforminy frakcja komórek linii IGROV 1 była zdolna do dalszego wzrostu w obecności tego czynnika. W celu dokładniejszej charakterystyki tych komórek, uzyskano wariant IGROV 1/FEN, którego komórki tolerowały obecność fenforminy podczas dalszej hodowli. Równolegle prowadzono także hodowlę kontrolną (IGROV 1/K) w pożywce bez fenforminy. Po 71 dniach ciągłego wzrostu w obecności fenforminy wprowadzono kolejny wariant, którego komórki namnażano bez dodawania fenforminy do pożywki (IGROV 1/DF), natomiast w 160. dobie hodowli z komórek wariantu IGROV 1/DF wyprowadzono czwarty wariant (IGROV 1/DF/FEN), którego komórki ponownie namnażano w obecności 0,5 mM fenforminy.

Wykazano, że komórki wariantów IGROV 1/FEN oraz IGROV 1/DF/FEN mają znacznie obniżone tempo proliferacji w porównaniu z komórkami wariantów IGROV 1/K oraz IGROV 1/DF. Komórki wariantu IGROV 1/DF/FEN wykazały obniżone tempo migracji w porównaniu z pozostałymi wariantami. Wykazano także, że długotrwały wzrost komórek IGROV 1 w obecności fenforminy prowadził do obniżenia potencjału klonogenności, jednak oddziaływanie to miało charakter odwracalny, ponieważ zaobserwowano wzrost tego potencjału w komórkach wariantu IGROV 1/DF. Wrażliwość na cisplatynę była zwiększona w komórkach wariantów długotrwale namnażanych w obecności fenforminy w porównaniu z komórkami hodowli kontrolnej, przy czym komórki wariantu IGROV 1/DF wykazały szybsze

tempo proliferacji po ekspozycji na cisplatynę w porównaniu z komórkami pozostałych wariantów (IGROV 1/FEN i IGROV 1/DF/FEN). Może to wskazywać, że zjawisko indukowanej przez fenforminę większej wrażliwości na cisplatynę było częściowo odwracalne.

Przeprowadzono także analizę globalnego profilu ekspresji genów z użyciem metody sekwencjonowania następnej generacji (RNAseq) w komórkach wszystkich czterech ww. wariantów hodowli linii IGROV 1. Analiza ta pozwoliła wykryć dwie grupy genów, których ekspresja zmienia się w skoordynowany i odwracalny sposób w zależności od obecności fenforminy w podłożu hodowlanym. W pierwszej grupie 629 genów, których poziom ekspresji uległ pierwotnie spadkowi po ekspozycji na fenforminę, a następnie wzrostowi po zaprzestaniu dodawania tego leku, są m.in.: *STYXL2*, *MGAT4C*, *AXL* i *ZWINT*. W drugiej grupie 674 genów, których poziom ekspresji pierwotnie uległ wzrostowi po ekspozycji na fenforminę a następnie spadkowi po zaprzestaniu dodawania tego leku, wykryto m.in.: *CLMN*, *CDK6*, *SEMA5A*, *ABCB1*, *TWIST1*, *SNAI1* oraz *MYC*. Analizy skalowania wielowymiarowego (MDS) wykazały największe podobieństwo fenotypu komórek wariantów IGROV 1/FEN oraz IGROV 1/DF/FEN, natomiast komórki wariantu IGROV 1/DF wykazały większe podobieństwo do dwóch ww. wariantów, niż do komórek hodowli kontrolnej.

Zaobserwowano ponadto, że komórki długotrwale namnażane w obecności fenforminy (IGROV 1/FEN) ujawniły obniżone tempo proliferacji oraz zmniejszony potencjał klonogenności, przy czym zmiany te były odwracalne. Jednocześnie w komórkach IGROV 1/FEN doszło w tych warunkach do wzrostu ekspresji istotnych regulatorów macierzystości/agresywności komórek nowotworowych, w tym: *HMGA2*, *KIT/CD117*, *TWIST1*, *ABCB1*, *LGR5*, *LIN28A*, *ALDH1A1*, *GLIS1*, *MYC*, *NR5A2*, *CLMN*, *CDK6* oraz *SEMA5A*. Wykazano przy tym, że zmiany poziomu ekspresji *TWIST1*, *ABCB1*, *MYC*, *NR5A2*, *CLMN*, *CDK6* oraz *SEMA5A* były odwracalne, zależnie od obecności fenforminy w pożywce.

Wykazano także, że długotrwale namnażanie komórek kontrolnych (IGROV 1/K) w standardowych warunkach spowodowało szereg istotnych zmian fenotypu tych komórek. Zaobserwowano m.in. znaczący wzrost poziomu ekspresji genów: *STYXL2*, *MGAT4C*, *AXL*, *STK11*, *SNAI1*, *CD24*, *CD44* i *MYC* oraz znaczący spadek poziomu ekspresji genów *ZWINT*, *HMGA2*, *LGR5*, *LIN28A*, *TWIST1*, *ALDH1A1*, *KIT/CD117* i *NR5A2* pomiędzy 6. a 229. dniem hodowli, a także znaczący wzrost odsetka komórek o fenotypie CD24+CD44+.

Analizy ontologiczne wykonane dla grupy genów, których poziom ekspresji obniża się w sposób odwracalny w komórkach linii IGROV 1, w zależności od obecności fenforminy, wykazały m.in., że geny te są związane z procesami podziałów komórkowych, starzenia komórkowego czy epigenetycznej regulacji poziomu ekspresji genów. Analogiczne analizy wykonane dla grupy genów, których poziom ekspresji w odwracalny sposób wzrasta w obecności fenforminy nie ujawniły żadnych terminów ontologicznych. Wykazano także, że komórki linii IGROV 1 mogą uzyskiwać oporność na fenforminę m.in. na drodze odwracalnego wzrostu poziomu ekspresji genu oporności wielolekowej *ABCB1* (*MDR1*).

Wyniki analiz sekwencjonowania następnej generacji wykazały także, iż długotrwały wzrost komórek linii IGROV 1 w obecności fenforminy jest również związany ze spadkiem poziomu ekspresji genów biorących udział w biosyntezie lipidów (*SLC25A1*, *ACLY*, *PPARG*,

ACACA, *FASN*, *SCD*), których zwiększona ekspresja jest ujawniana przez komórki o cechach nowotworowych komórek macierzystych. Długotrwały wzrost komórek linii IGROV 1 w obecności fenforminy powoduje także wzrost poziomu ekspresji genów związanych z pozyskiwaniem energii z kwasów tłuszczowych (*ACSL1*, *CPT1A*), których podwyższona ekspresja również jest wiązana z nabywaniem przez komórki nowotworowe cech złośliwości.