



Wybrane zmiany fenotypowe oraz funkcjonalne zachodzące w komórkach raka jajnika poddanych *in vitro* terapii kombinowanej z zastosowaniem cisplatyny oraz hipertermii

Selected phenotypic and functional changes in ovarian cancer cells treated *in vitro* with combined therapy using cisplatin and hyperthermia

Aleksandra Zoń , Ilona Bednarek 

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach / Department of Biotechnology and Genetic Engineering, Faculty of Pharmaceutical Sciences in Sosnowiec, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

STRESZCZENIE

WSTĘP: Typową strategią leczenia raka jajnika jest operacja chirurgiczna oraz podawana po niej chemioterapia wykorzystująca leki cytostatyczne, w tym cisplatynę. Niestety u większości pacjentek dochodzi do nawrotu choroby, którego głównym powodem jest wykształcanie przez komórki nowotworowe oporności na cisplatynę. Z tego względu intensywnie poszukuje się nowych rozwiązań terapeutycznych, m.in. terapii skojarzonej, której przykładem jest jednoczesne traktowanie komórek lekiem cytostatycznym oraz hipertermią. Celem pracy była ocena zmian fenotypowych oraz funkcjonalnych w komórkach raka jajnika poddanych działaniu cisplatyny i/lub umiarkowanej hipertermii.

MATERIAŁ I METODY: Linie komórek raka jajnika SKOV-3 [ATCC: HTB-77] oraz TOV-21G [ATCC: CRL-11730] stymulowano do apoptozy z wykorzystaniem dichlorku cis-diamino platyny (II). Następnie komórki poddawano działaniu umiarkowanej hipertermii poprzez umieszczenie w temperaturach 39°C i 40°C oraz w temperaturze standardowej 37°C. Zmiany fenotypowe w obrębie badanych komórek weryfikowano z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego z użyciem oranżu akrydyny, bromku etydyny oraz DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol). Zmiany funkcjonalne odnoszące się do migracji *in vitro* komórek analizowano testem zarastania rany (*wound healing assay*).

WYNIKI: Wykazano, że działanie na komórki cisplatyną indukowało śmierć komórek o charakterze apoptotycznym, przy czym zauważono efekt potencjalizacji działania cytostatyku na komórki poprzez zastosowanie umiarkowanej hipertermii (39°C oraz 40°C). Dodatkowo, w przypadku komórek linii SKOV-3 traktowanych wspomnianymi czynnikami, zaobserwowano istotny statystycznie spadek migracji komórek *in vitro* w odniesieniu do populacji komórek kontrolnych.

Received: 21.11.2022

Revised: 12.01.2023

Accepted: 13.01.2023

Published online: 28.07.2023

Adres do korespondencji: mgr Aleksandra Zoń, Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, tel. +48 32 364 12 57, e-mail: aleksandra.zon@sum.edu.pl



Artykuł opublikowany w modelu Open Access i udostępniony na licencji Creative Commons Uznanie autorstwa-Na tych samych warunkach 4.0 Międzynarodowe (CC BY-SA 4.0), określającej zasady jego wykorzystania. Dozwolone jest kopiowanie, zmienianie, rozprowadzanie i przedstawianie utworu w dowolnym celu, także komercyjnym, pod warunkiem oznaczenia autorstwa i wykonanych modyfikacji utworu, jeśli takie zostały wykonane, a przetwarzając lub tworząc na podstawie utworu, należy udostępnić swoje dzieło na tej samej licencji co oryginał. Pełny tekst licencji dostępny na stronie <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode.pl>.

Wydawca: Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach



WNIOSKI: Traktowanie komórek raka jajnika cisplatyną oraz umiarkowaną hipertermią prowadzi do zmian fenotypowych, charakterystycznych dla procesów apoptozy. Dodatkowo zastosowanie obu tych czynników indukuje takie zmiany w komórkach, które zmniejszają migrację komórek, a tym samym wpływają na zmniejszenie potencjału metastatycznego komórek raka jajnika.

SŁOWA KLUCZOWE

rak jajnika, hipertermia, apoptoza, cisplatyna, zmiany morfologiczne, test migracji komórek in vitro

ABSTRACT

INTRODUCTION: The typical treatment strategy used for ovarian cancer is surgery followed by chemotherapy using cytostatic drugs, including cisplatin. Unfortunately, the majority of patients experience a relapse of the disease, the main reason for which is the development of cisplatin resistance. Due to this, new treatment strategies are being sought, including combination therapy, an example of which is the simultaneous treatment of cells with a cytostatic drug and hyperthermia. The aim of the study was to assess the occurrence of phenotypic and functional changes in ovarian cancer cells treated with cisplatin and/or moderate hyperthermia.

MATERIAL AND METHODS: Ovarian cancer cell lines SKOV-3 and TOV-21G were stimulated to apoptosis using cis-diammineplatinum(II) dichloride. Subsequently, the cells were subjected to hyperthermia by placing them in temperatures of 39°C, 40°C and a standard temperature of 37°C. Phenotypic changes within the cells were verified by fluorescent staining with acridine orange, ethidium bromide and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Functional changes related to in vitro cell migration were analyzed with the wound healing assay.

RESULTS: It was shown that the effect of cisplatin on the cells led to death by apoptosis, whereby the effect of potentiating the action of the cytostatic agent by the use of moderate hyperthermia was noticed. In addition, in the case of cells of the SKOV-3 line treated with the aforementioned agents, a statistically significant decrease in cell migration was observed in relation to the population of control cells.

CONCLUSIONS: The obtained results indicate that the treatment of ovarian cancer cells with cisplatin and moderate hyperthermia leads to the appearance of phenotypic changes in these cells, characteristic of apoptotic processes. In addition, the application of both agents induces such changes in the cells that reduce cell migration, thereby reducing the metastatic potential of ovarian cancer cells.

KEY WORDS

ovarian cancer, hyperthermia, apoptosis, cisplatin, morphological changes, wound healing assay

WSTĘP

Rak jajnika staje się coraz poważniejszym problemem wśród Polek. W ciągu ostatnich 20 lat liczba nowych przypadków tej choroby w naszym kraju wzrosła o ponad 40% (z 2033 odnotowanych przypadków w 2000 r. do 4669 w 2020 r.) i jak pokazują dane szacunkowe, w kolejnych latach nadal będzie wzrastać [1,2]. Biorąc pod uwagę wszystkie rodzaje nowotworów, rak jajnika jest piątym najczęściej występującym i czwartym najbardziej śmiertelnym nowotworem u polskich kobiet [1]. Wysoka śmiertelność wynika przede wszystkim z bardzo późnego wykrywania choroby, co spowodowane jest głównie niejednoznaczными objawami oraz brakiem wysoko specyficznego badania przesiewowego, pozwalającego z całkowitą pewnością stwierdzić występowanie raka jajnika. Z tego też powodu większość pacjentek trafia do gabinetu lekarza, gdy choroba osiągnie stan zaawansowany [3,4]. Typową terapią stosowaną w przypadku takich pacjentek jest operacja chirurgiczna polegająca na wycięciu guza oraz tuż po niej

chemioterapia wykorzystująca leki cytostatyczne – przede wszystkim cisplatynę lub karboksyplatynę, podawaną jednocześnie z paklitakselem [5]. Duża część pacjentek dobrze odpowiada na terapię, osiągając pełną odpowiedź na leczenie; niestety po pewnym czasie u większości z nich dochodzi do nawrotu choroby, w głównej mierze spowodowanego wykształcaniem mechanizmów oporności na cisplatynę przez traktowane nią komórki [5]. Ze względu na rosnący problem cisplatinooporności intensywnie poszukuje się nowych strategii leczenia, które znacząco poprawiłyby efektywność i skuteczność działania cisplatyny, zmniejszając w ten sposób rozwój oporności na lek. Coraz częstszą strategią naukowców pozwalającą na osiągnięcie tego celu jest stosowanie terapii skojarzonej, polegającej na jednoczesnym zastosowaniu kilku czynników wykazujących działanie przeciwnowotworowe. Przykładem terapii skojarzonej jest m.in. jednoczesne traktowanie komórek nowotworowych lekiem cytostatycznym oraz hipertermią, na czym skupiono się w niniejszej pracy. Celem badań była ocena indukcji zmian fenotypowych w zakresie morfologii i zmian funkcjonalnych w od-



niesieniu do zdolności do migracji *in vitro* komórek raka jajnika poddanych działaniu cisplatyny i umiarkowanej hipertermii.

MATERIAŁ I METODY

Hodowla komórek

Linie komórek reprezentujących raka jajnika – cisplatinoooporna linia SKOV-3 [ATCC: HTB-77] oraz cisplatinowrażliwa linia TOV-21G [ATCC: CRL-11730] – hodowano w pożywce DMEM + GlutaMAX-I (Gibco) z 10-proc. zawartością bydlęcej surowicy płodowej (PAN-Biotech) oraz dodatkiem antybiotyku (gentamycyna; Sigma), w standardowych warunkach środowiska: temperatura 37°C, wilgotność powietrza 95%, zawartość dwutlenku węgla 5%.

Stymulację komórek do apoptozy przeprowadzono z wykorzystaniem roztworu cisplatyny (Sigma) w stężeniu końcowym 50 nM dla linii SKOV-3 oraz 5 nM dla linii TOV-21G. Wybrane stężenia cisplatyny wystandardyzowano we wcześniejszych badaniach [6,7]. Komórki poddawano działaniu hipertermii, stosując godziną inkubację w temperaturach 39°C i 40°C. Po godzinnej inkubacji komórki przeniesiono do standardowej temperatury 37°C, po czym hodowano je w standardowych warunkach w kolejnych interwałach czasowych (24 godz. oraz dodatkowo 48 i 72 godz.) przy analizie migracji komórek.

Analiza zmian fenotypowych

Zmiany fenotypowe w obrębie jądra i cytoplazmy badanych komórek weryfikowano na podstawie oceny obrazów mikroskopowych z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego (Eclipse Ti2-E Nikon). Komórki wybarwiano oranżem akrydyny (Invitrogen by ThermoFisher; 10 µg/ml), DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol; Invitrogen by ThermoFisher; 300 nM) i/lub mieszaniną bromek etydyny/oranż akrydyny (Invitrogen by ThermoFisher/Sigma; 100 µg/ml/10 µg/ml).

Dla każdej z prób wykonano zdjęcia z zastosowaniem powiększenia 10- oraz 20-krotnego.

Wyszukiwano zmiany morfologiczne w obrębie jądra komórkowego oraz cytoplazmy wskazujące na aktywny proces apoptozy w komórkach; dla każdej z prób wyznaczono średnią procentową liczbę komórek apoptotycznych.

Analiza zmian funkcjonalnych

Weryfikację zmian funkcjonalnych, zachodzących pod wpływem cisplatyny i hipertermii, polegających na zmianach w zdolności komórek do migracji, analizowano z wykorzystaniem testu migracji komórek *in vitro* (*wound healing assay*). W przypadku obu linii komórkowych – po przeprowadzeniu stymulacji apoptozy –

w każdym z dołków płytek 6-dołkowych wykonano rysę przebiegającą przez jego środek. Następnie komórki inkubowano w standardowych warunkach środowiska przez 72 godz. Od momentu wykonania rysy co 24 godz. prowadzono jej obserwację i wykonywano dokumentację zdjęciową z wykorzystaniem mikroskopu odwróconego (Axiovert 40 CFL Zeiss).

Ocenę zmian w zdolnościach migracyjnych komórek przeprowadzono na podstawie parametru określanego jako procent zamknięcia rany. Parametr ten weryfikowano z zastosowaniem programu ImageJ poprzez automatyczne wyznaczenie końcowej krawędzi wykonanego zarysowania, a następnie obliczenie jego powierzchni. Procent zamknięcia rany obliczono za pomocą algorytmu: procent zamknięcia rany (%) = $[O(0) - O(t)/O(0)] \times 100\%$, gdzie $O(0)$ to obszar zarysowania w czasie 0, a $O(t)$ to obszar zarysowania po danym czasie inkubacji, przy założeniu, że obszar zmierzony w czasie 0 wynosi 0%.

Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu Statistica (Wersja 13.3, Tipco Software, USA). W trakcie analizy zmian fenotypowych badanych komórek, aby porównać średnie wartości zmiennych pomiędzy próbami, wykonano analizę wariancji ANOVA. W przypadku analizy zmian funkcjonalnych wyniki dla prób badanych porównano z wynikami dla prób kontrolnych za pomocą testu t-Studenta dla prób niezależnych. W obu przypadkach dane ilościowe przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Jako wyniki istotne statystycznie uznano te o wartości prawdopodobieństwa testowego $p < 0,05$.

WYNIKI

Analiza zmian fenotypowych

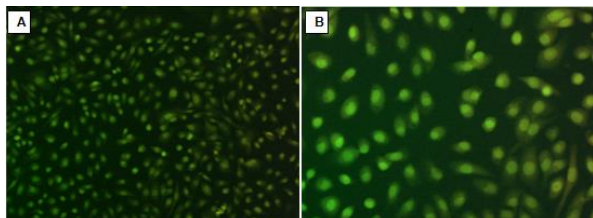
Komórki linii SKOV-3

Komórki stanowiące próbę kontrolną badania (nie-tractowane cisplatiną, hodowane w temperaturze 37°C) wykazywały morfologię typową dla komórek prawidłowych – miały okrągły, regularny kształt, jądra komórkowe znajdowały się w centralnej części komórki i wykazywały umiarkowaną zieloną fluorescencję w przypadku barwienia oranżem akrydyny (ryc. 1) lub umiarkowaną jasnoniebieską fluorescencję w przypadku barwienia DAPI (ryc. 2).

Komórki stanowiące próbę badaną (tractowane cisplatiną, poddane działaniu hipertermii) wykazywały znaczące zmiany w morfologii, wskazujące na procesy wczesnej i późnej apoptozy (ryc. 3 i 4). Komórki zaliczone do grupy wczesnoapoptotycznych charakteryzowały się znaczącym zmniejszeniem objętości, konden-

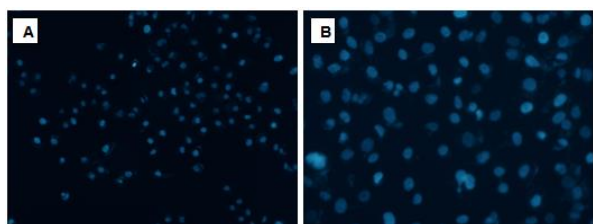


sacją jądra komórkowego i emisją silnej zielono-żółtej (oranż akrydyny) lub niebieskiej (DAPI) fluorescencji. Komórki późnoapoptotyczne cechowały się jeszcze większą kondensacją, a także fragmentacją jądra komórkowego oraz emisją silnie zielonej fluorescencji (oranż akrydyny) lub silnie niebieskiej fluorescencji (DAPI). W puli ocenianych komórek można było także zaobserwować obecność ciałek apoptotycznych.



Ryc. 1. Próba kontrolna – komórki linii SKOV-3 hodowane w temperaturze 37°C, nietraktowane cisplatyną, wybarwione oranżem akrydyny; A) komórki linii SKOV-3 stanowiące kontrolę (10 × 10), B) komórki linii SKOV-3 stanowiące kontrolę (10 × 20).

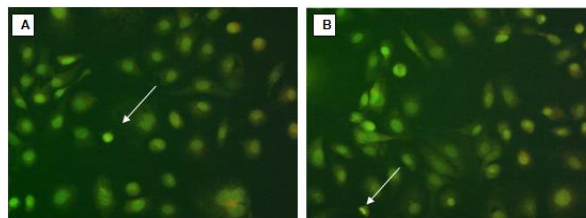
Fig. 1. Control sample – SKOV-3 cells cultured at 37°C, not treated with cisplatin, stained with acridine orange; A) SKOV-3 control cells (10 × 10), B) SKOV-3 control cells (10 × 20).



Ryc. 2. Próba kontrolna – komórki linii SKOV-3 hodowane w temperaturze 37°C, nietraktowane cisplatyną, wybarwione DAPI; A) komórki linii SKOV-3 stanowiące kontrolę (10 × 10), B) komórki linii SKOV-3 stanowiące kontrolę (10 × 20).

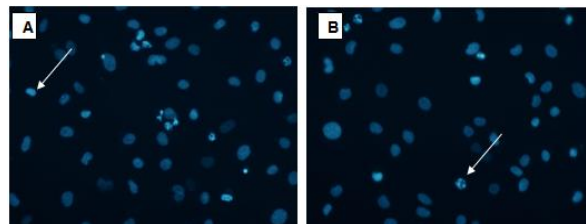
Fig. 2. Control sample – SKOV-3 cells cultured at 37°C, not treated with cisplatin, stained with DAPI; A) SKOV-3 control cells (10 × 10), B) SKOV-3 control cells (10 × 20).

Działanie na komórki cisplatyną w stężeniu 50 nM oraz traktowanie ich temperaturami 37°C, 39°C oraz 40°C doprowadziło do śmierci komórek na drodze apoptozy (ryc. 3 i 4). W stosunku do populacji komórek stanowiących kontrolę liczba komórek apoptotycznych w populacjach traktowanych cisplatyną oraz poddanych działaniu hipertermii była znacząco wyższa ($p < 0,01$; tab. I i II).



Ryc. 3. Komórki linii SKOV-3 traktowane cisplatyną w stężeniu 50 nM oraz poddane działaniu hipertermii, wybarwione oranżem akrydyny; A) komórki w fazie wczesnej apoptozy – przykład zaznaczony strzałką (10 × 20), B) komórki w fazie późnej apoptozy – przykład zaznaczony strzałką (10 × 20).

Fig. 3. SKOV-3 cells treated with cisplatin at concentration of 50 nM and subjected to hyperthermia, stained with acridine orange; A) cells in early apoptosis phase – example marked with arrow (10 × 20), B) cells in late apoptosis phase – example marked with arrow (10 × 20).



Ryc. 4. Komórki linii SKOV-3 traktowane cisplatyną w stężeniu 50 nM oraz poddane działaniu hipertermii, wybarwione DAPI; A) komórki w fazie wczesnej apoptozy – przykład zaznaczony strzałką (10 × 20), B) komórki w fazie późnej apoptozy – przykład zaznaczony strzałką (10 × 20).

Fig. 4. SKOV-3 cells treated with cisplatin at concentration of 50 nM and subjected to hyperthermia, stained with DAPI; A) cells in early apoptosis phase – example marked with arrow (10 × 20), B) late apoptotic cells – example marked with arrow (10 × 20).

Tabela I. Zestawienie średniego odsetka komórek apoptotycznych linii SKOV-3 poddanej działaniu cisplatyny w stężeniu 50 nM oraz czynnika termicznego
Table I. Summary of average percentage of apoptotic cells of SKOV-3 line treated with cisplatin at concentration of 50 nM and thermal agent

	Kontrola	37°C + cisplatyna (50 nM)	39°C + cisplatyna (50 nM)	40°C + cisplatyna (50 nM)	Wartość testu analizy wariancji ANOVA
Średnia procentowa liczba komórek apoptotycznych	5,96 ± 0,97	16,08 ± 0,23	20,25 ± 3,43	14,00 ± 1,51	$p < 0,05$

Tabela II. Wartości p testu analizy wariancji ANOVA dla porównywanych prób
Table II. ANOVA p-values for compared samples

Kontrola vs 37°C + cisplatyna (50 nM)	Kontrola vs 39°C + cisplatyna (50 nM)	Kontrola vs 40°C + cisplatyna (50 nM)
$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,01$



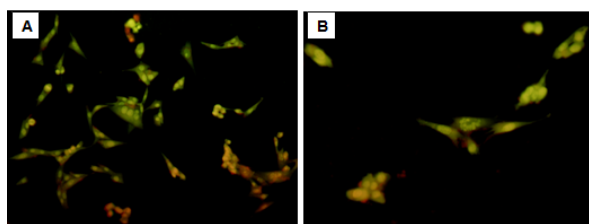
Komórki linii TOV-21G

Dla populacji komórek kontrolnych, analogicznie do linii SKOV-3, obserwowano przeważnie morfologię typową dla komórek prawidłowych – regularny, nieco wydłużony kształt o okrągłych i centralnie ułożonych jądrach komórkowych. Cytoplazma komórek wybarwiała się jednorodnie, komórki wykazywały umiarkowaną zieloną fluorescencję oranżu akrydyny (ryc. 5) lub umiarkowaną jasnoniebieską fluorescencję w przypadku barwienia DAPI (ryc. 6).

Po potraktowaniu komórek cisplatyną/hipertermią obserwowano w ich morfologii zmiany, które wskazywały na procesy wczesnej i późnej apoptozy (ryc. 7 i 8). Komórki zaliczone do grupy wczesnoapoptotycznych charakteryzowały się zmniejszeniem objętości, kondensacją jądra komórkowego i emisją bardzo silnej zielono-żółtej (oranż akrydyny/bromek etydyny) lub silnej niebieskiej (DAPI) fluorescencji. Komórki późnoapoptotyczne cechowały się jeszcze większą kondensacją, a także fragmentacją jądra komórkowego, położonego w komórce asymetrycznie. Dodatkowo zaobserwowano, że wykazywały one pomarańczowo-

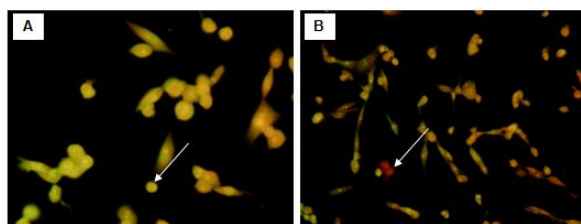
-czerwoną fluorescencję, związaną z przenikaniem do ich wnętrza bromku etydyny poprzez uszkodzenia błony komórkowej. W przypadku barwienia DAPI obserwowano silną niebieską fluorescencję jądra komórkowego, można było także zaobserwować obecność ciałek apoptotycznych.

Działanie na komórki linii TOV-21G cisplatyną w stężeniu 5 nM oraz traktowanie ich temperaturami 37°C, 39°C i 40°C doprowadziło do śmierci komórek na drodze apoptozy (ryc. 7 i 8). W stosunku do populacji komórek stanowiących kontrolę (komórki hodowane w temperaturze 37°C, nietraktowane cisplatyną) liczba komórek apoptotycznych w populacjach traktowanych cisplatyną oraz poddanych działaniu temperatur 39°C i 40°C była wyższa (tab. III i IV). Zaobserwowane różnice w liczbie komórek apoptotycznych były istotne statystycznie ($p < 0,01$ oraz $p < 0,05$). Mimo zaobserwowanych różnic w liczbie komórek apoptotycznych dla populacji komórek traktowanych cisplatyną oraz temperaturą 37°C w stosunku do populacji komórek stanowiącej kontrolę różnice te nie wykazały istotności statystycznej ($p = 0,36$).



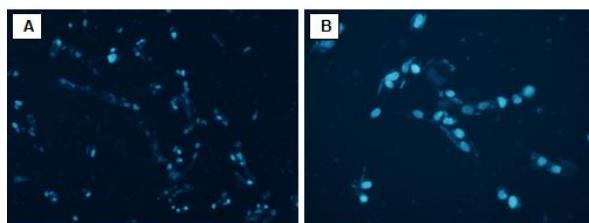
Ryc. 5. Próba kontrolna – komórki linii TOV-21G hodowane w temperaturze 37°C, nietraktowane cisplatyną, wybarwione oranżem akrydyny i bromkiem etydyny; A) komórki linii TOV-21G stanowiące kontrolę (10 × 10), B) komórki linii TOV-21G stanowiące kontrolę (10 × 20).

Fig. 5. Control sample – TOV-21G cells cultured at 37°C, not treated with cisplatin, stained with acridine orange and ethidium bromide; A) TOV-21G control cells (10 × 10), B) TOV-21G control cells (10 × 20).



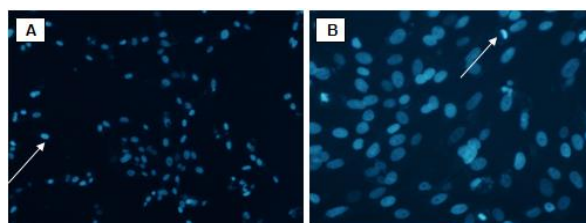
Ryc. 7. Komórki linii TOV-21G traktowane cisplatyną w stężeniu 5 nM oraz poddane działaniu hipertermii, wybarwione oranżem akrydyny i bromkiem etydyny; A) komórki w fazie wczesnej apoptozy – przykład zaznaczony strzałką (10 × 20), B) komórki w fazie późnej apoptozy – przykład zaznaczony strzałką (10 × 10).

Fig. 7. TOV-21G cells treated with 5 nM cisplatin and hyperthermia, stained with acridine orange and ethidium bromide; A) cells in early apoptosis phase – example marked with arrow (10 × 20), B) late apoptotic cells – example marked with arrow (10 × 10).



Ryc. 6. Próba kontrolna – komórki linii TOV-21G hodowane w temperaturze 37°C, nietraktowane cisplatyną, wybarwione DAPI; A) komórki linii TOV-21G stanowiące kontrolę (10 × 10), B) komórki linii TOV-21G stanowiące kontrolę (10 × 20).

Fig. 6. Control sample – TOV-21G cells cultured at 37°C, not treated with cisplatin, stained with DAPI; A) TOV-21G control cells (10 × 10), B) TOV-21G control cells (10 × 20).



Ryc. 8. Komórki linii TOV-21G traktowane cisplatyną w stężeniu 5 nM oraz poddane działaniu hipertermii, wybarwione DAPI; A) komórki w fazie wczesnej apoptozy – przykład zaznaczony strzałką (10 × 10), B) komórki w fazie późnej apoptozy – przykład zaznaczony strzałką (10 × 20).

Fig. 8. TOV-21G cells treated with cisplatin at concentration of 5 nM and subjected to hyperthermia, stained with DAPI; A) cells in early apoptosis phase – example marked with arrow (10 × 10), B) late apoptotic cells – example marked with arrow (10 × 20).



Tabela III. Zestawienie średniego odsetka komórek apoptotycznych linii TOV-21G poddanej działaniu cisplatyny w stężeniu 5 nM oraz czynnika termicznego
Table III. Summary of average percentage of apoptotic cells of TOV-21G line treated with cisplatin at concentration of 5 nM and thermal agent

	Kontrola	37°C + cisplatyna (5 nM)	39°C + cisplatyna (5 nM)	40°C + cisplatyna (5 nM)	Wartość testu analizy wariancji ANOVA
Średnia procentowa liczba komórek apoptotycznych	7,80 ± 0,88	19,12 ± 4,13	62,37 ± 10,77	40,18 ± 10,88	p < 0,001

Tabela IV. Wartości p testu analizy wariancji ANOVA dla porównywanych prób
Table IV. ANOVA p-values for compared samples

Kontrola vs 37°C + cisplatyna (5 nM)	Kontrola vs 39°C + cisplatyna (5 nM)	Kontrola vs 40°C + cisplatyna (5 nM)
p = 0,36	p < 0,001	p < 0,05

Analiza zmian funkcjonalnych

Komórki linii SKOV-3

W ramach analizy zmian funkcjonalnych komórek poddanych działaniu cisplatyny oraz hipertermii, polegających na zmianie szybkości migracji komórek raka jajnika, przeprowadzono test migracji komórek *in vitro*. Test prowadzono z zastosowaniem temperatur 37°C, 39°C i 40°C oraz cisplatyny w stężeniu równym 50 nM.

W każdym z analizowanych przypadków zaobserwowano znaczący, hamujący wpływ wymienionych czynników na zdolność komórek nowotworowych do migracji, w porównaniu z komórkami niepoddanymi działaniu wspomnianych czynników, jednak najistotniejsze zahamowanie tempa migracji wystąpiło w przypadku traktowania komórek cisplatyną oraz temperaturą 39°C (tab. V–VIII).

Tabela V. Wyniki testu t Studenta dla pomiaru po 24 h
Table V. Student's t-test results for measurement after 24 h

	Kontrola 24 h	Cisplatyna + 39°C 24 h	t	p
Procent zamknięcia rany	35,3 ± 1,51	4,15 ± 1,71	23,63	p < 0,001

Tabela VI. Wyniki testu t Studenta dla pomiaru po 48 h
Table VI. Student's t-test results for measurement after 48 h

	Kontrola 48 h	Cisplatyna + 39°C 48 h	t	p
Procent zamknięcia rany	42,17 ± 0,19	5,42 ± 1,81	34,91	p < 0,001

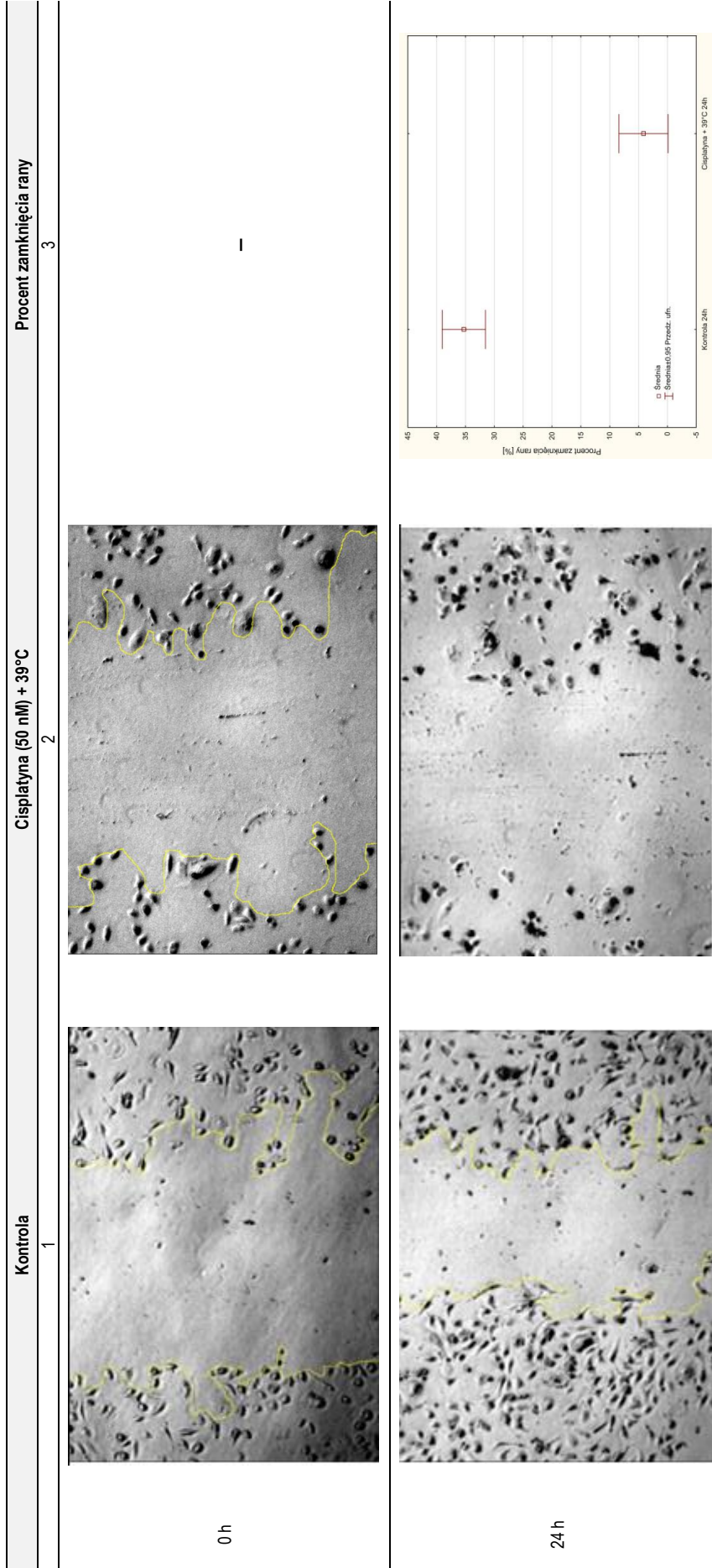
Tabela VII. Wyniki testu t Studenta dla pomiaru po 72 h
Table VII. Student's t-test results for measurement after 72 h

	Kontrola 72 h	Cisplatyna + 39°C 72 h	t	p
Procent zamknięcia rany	71,75 ± 0,33	1,81 ± 2,47	48,60	p < 0,001



Tabela VIII. Wyniki testu migracji komórek in vitro dla komórek linii SKOV-3 – komórki stanowiące kontrolę (nieotraktowane lekami, hodowane w temperaturze 37°C) oraz komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 50 nM, poddane działaniu temperatury 39°C

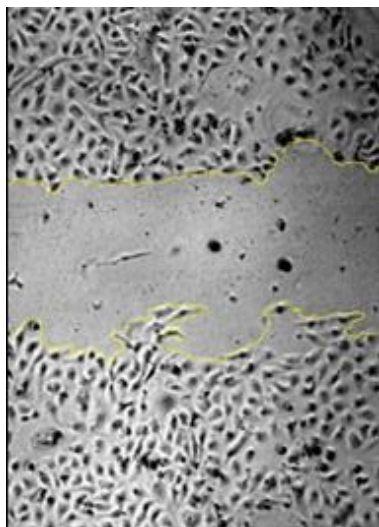
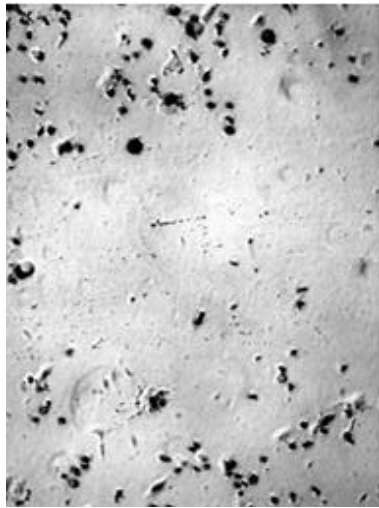
Table VIII. In vitro cell migration assay results for SKOV-3 cells – control cells (untreated, cultured at 37°C) and cells treated with 50 nM cisplatin, exposed to 39°C



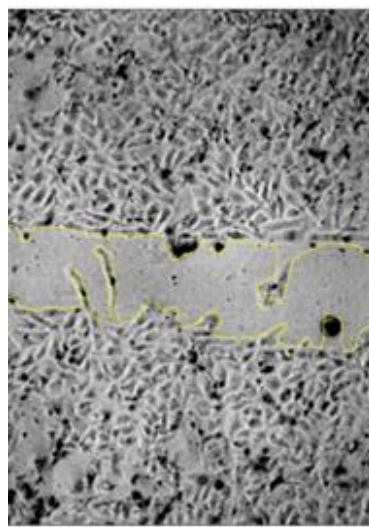
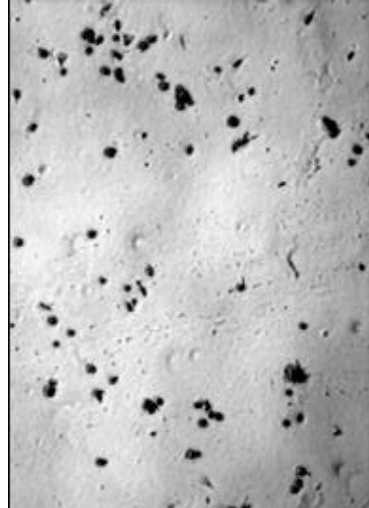
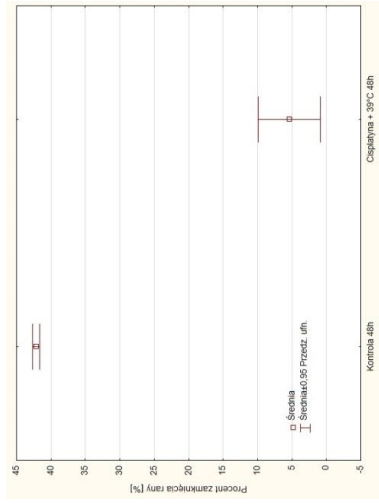


cd. tab. VIII

3



48 h



72 h





Komórki linii TOV-21G

W ramach analizy zmian funkcjonalnych komórek poddanych działaniu cisplatyny oraz hipertermii, polegających na zmianie szybkości migracji komórek raka jajnika, przeprowadzono test migracji komórek in vitro. Test prowadzono analogicznie do warunków termicznych stosowanych dla linii SKOV-3, ale z indukcją cisplatyną o stężeniu 5 nM.

Znaczący wpływ wymienionych czynników na zdolność komórek nowotworowych do migracji, w porównaniu z komórkami niepoddanymi działaniu tych czynników, zaobserwowano jedynie podczas traktowania komórek cisplatyną oraz temperaturą 40°C (tab. IX–XII). W przypadku traktowania komórek temperaturami 37°C oraz 39°C nie zaobserwowano znaczących różnic w zdolności komórek do migracji.

Tabela IX. Wyniki testu t Studenta dla pomiaru po 24 h
Table IX. Student's t-test results for measurement after 24 h

	Kontrola 24 h	Cisplatyna + 40°C 24 h	t	p
Procent zamknięcia rany	34,16 ± 1,88	21,01 ± 2,59	7,11	p < 0,05

Tabela X. Wyniki testu t Studenta dla pomiaru po 48 h
Table X. Student's t-test results for measurement after 48 h

	Kontrola 48 h	Cisplatyna + 40°C 48 h	t	p
Procent zamknięcia rany	76,21 ± 0,91	35,80 ± 1,06	49,94	p < 0,001

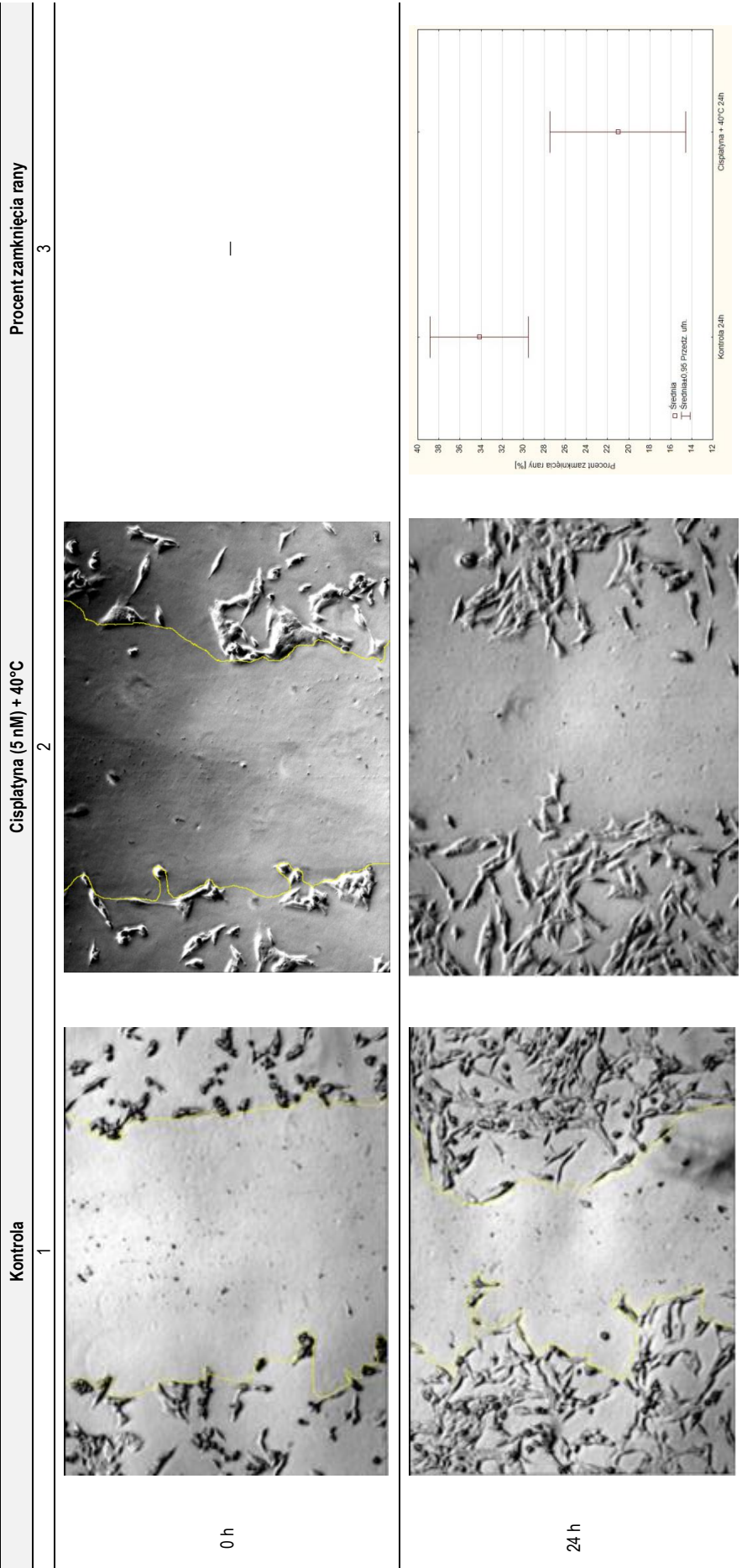
Tabela XI. Wyniki testu t Studenta dla pomiaru po 72 h
Table XI. Student's t-test results for measurement after 72 h

	Kontrola 72 h	Cisplatyna + 40°C 72 h	t	p
Procent zamknięcia rany	82,02 ± 0,20	65,09 ± 1,90	15,33	p < 0,05



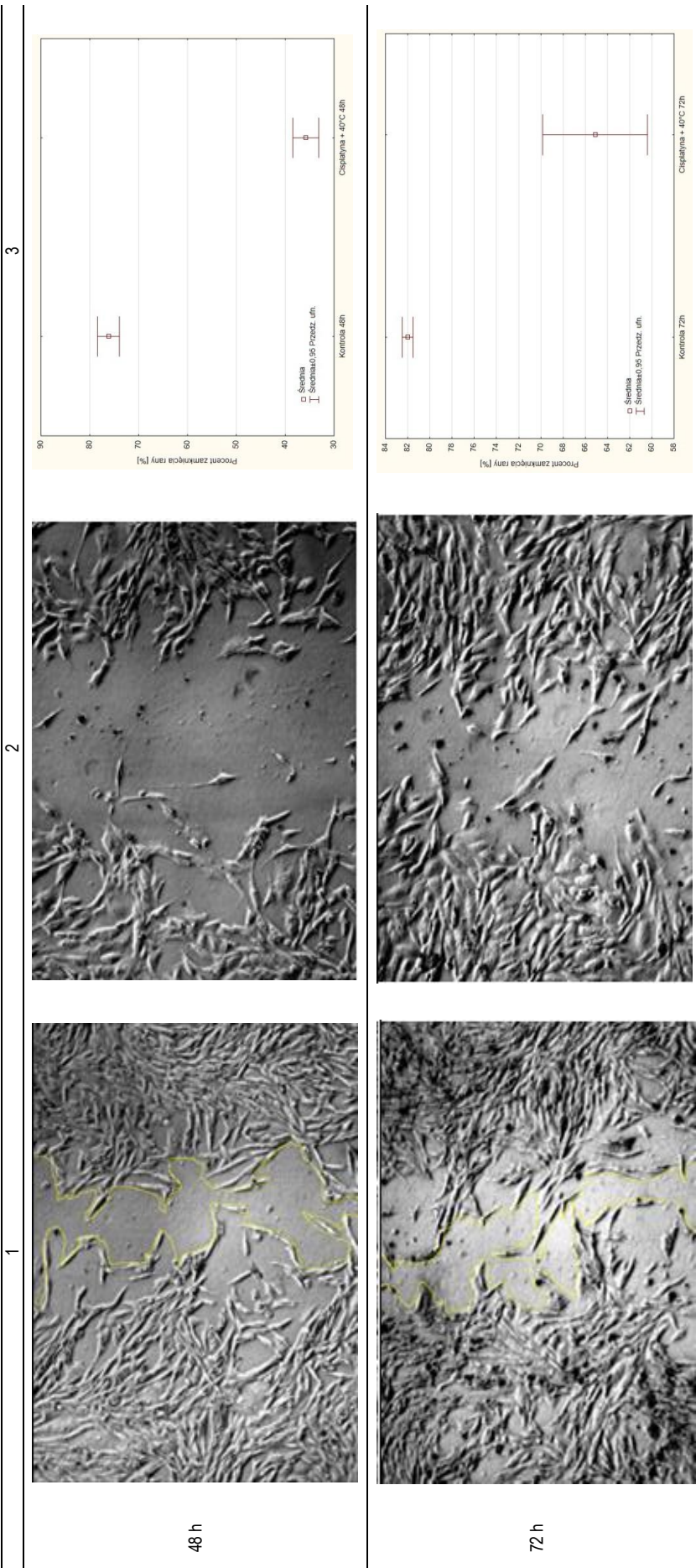
Tabela XII. Wyniki testu migracji komórek in vitro dla komórek linii TOV-21G – komórki stanowiące kontrolę (nieotraktowane lekami, hodowane w temperaturze 37°C) oraz komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 5 nM, poddane działaniu temperatury 40°C

Table XII. In vitro cell migration assay results for TOV-21G cells – control cells (untreated, cultured at 37°C) and cells treated with 5 nM cisplatin, exposed to 40°C





cd. tab. XII





DYSKUSJA

Wykształcanie oporności na cisplatynę przez komórki nowotworowe staje się coraz poważniejszym problemem, który znacząco utrudnia proces leczenia chorych z rakiem jajnika. Cisplatyna została wprowadzona do stosowania terapeutycznego w 1978 r. jako lek o wyjątkowo efektywnym działaniu cytostatycznym w przypadku wielu rodzajów nowotworów, m.in.: raka głowy i szyi, raka jądra, raka jajnika czy raka pęcherza moczowego [8]. Tak szeroki zakres nowotworów możliwych do leczenia z zastosowaniem opisywanego leku wynika z wielokierunkowego mechanizmu jego cytotoksycznego działania [8]. Najważniejszym celem działania cisplatyny jest genomowe DNA – po wniesieniu do komórki lek wiąże się z zasadami azotowymi w DNA, prowadząc do powstania wewnętrznych adduktów oraz międzyciniowych wiązań krzyżowych [9]. Powstawanie wspomnianych uszkodzeń prowadzi do uszkodzenia materiału genetycznego, co z kolei wywołuje aktywację mechanizmów naprawy DNA, przede wszystkim mechanizmu naprawy przez wycinanie nukleotydu (*nucleotide excision repair* – NER) oraz naprawy niesparowanych zasad (*mismatch repair* – MMR). Gdy mechanizmy te okażą się nieskuteczne, w komórce dochodzi do aktywacji procesu apoptozy i w konsekwencji śmierci komórki [9].

Dodatkowo cisplatyna wywołuje w komórkach stan stresu oksydacyjnego poprzez zwiększenie intensywności produkcji reaktywnych form tlenu, które powodując oksydacyjne uszkodzenia białek, lipidów i DNA, prowadzą do apoptozy komórek nowotworowych [8,10].

Cisplatyna wywołuje także uszkodzenia mitochondrialnego DNA, skutkujące uwolnieniem z tego organelum cytochromu C oraz prokaspazy 9. Uwolnione składniki łączą się z czynnikiem Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) oraz ATP (adenozyno-5'-trifosforan), tworząc apoptosom, który następnie aktywuje kaspazę 9. Aktywowana kaspaza 9, oddziałując z kolejnymi kaspazami, prowadzi do aktywacji kaspaz 3, 6 i 7, które indukują apoptozę komórki [8,10].

Pomimo tak szerokiego spektrum działania cisplatyny komórki nowotworowe zdołały wykształcić szereg mechanizmów pozwalających im na uniknięcie cytotoksycznego działania leku. Do przykładowych mechanizmów cisplatinooporności zalicza się zmiany w funkcjonowaniu transporterów błonowych, wewnątrzkomórkową inaktywację cisplatyny czy też wzrost efektywności działania mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA [11,12].

Ze względu na rosnący problem cisplatinooporności intensywnie poszukuje się nowych metod terapii raka jajnika, spośród których szczególnie zainteresowanie wzbudza terapia skojarzona, czyli terapia polegająca na

jednoczesnym zastosowaniu kilku czynników wykazujących działanie przeciwnowotworowe. Przykładem tego rodzaju leczenia jest opisywana w niniejszej pracy, a także przez innych autorów [13] terapia polegająca na jednoczesnym stosowaniu leku cytostatycznego oraz hipertermii.

Jak wykazała analiza zdjęć wykonanych w trakcie badań, jednoczesne traktowanie komórek linii nowotworowych raka jajnika cisplatyną oraz podwyższoną temperaturą prowadzi do znaczącego wzrostu liczby komórek apoptotycznych w porównaniu z komórkami kontrolnymi (niepoddanymi działaniu leku, hodowanymi w temperaturze 37°C). Zarówno dla linii SKOV-3, jak i TOV-21G największy wzrost skuteczności cytotoksycznego działania cisplatyny zaobserwowano w przypadku połączenia jej stosowania z traktowaniem komórek temperaturą 39°C. W warunkach tych średnia procentowa liczba komórek apoptotycznych w przypadku linii SKOV-3 wynosiła 20,25%, co stanowiło wzrost o 14,29% w stosunku do komórek stanowiących kontrolę. W przypadku linii TOV-21G średnia procentowa liczba komórek apoptotycznych wynosiła 62,37%, co stanowiło wzrost aż o 54,57% w stosunku do próby kontrolnej.

Ponadto w trakcie badań dokonano weryfikacji wpływu terapii kombinowanej, łączącej działanie cisplatyny z hipertermią, na zdolność komórek raka jajnika do migracji. Zdolność komórek do migracji regulowana jest przez liczne białka cytoszkieletu. Ustalono, że w komórkach nowotworowych dochodzi do szeregu zmian w aktywności tych białek, m.in. profiliny, kofiliny, filaminy A czy radyksyny, co w konsekwencji powoduje zmiany w zdolnościach migracyjnych komórek, przyczyniając się do procesu przerzutowania [14,15]. Ze względu na obecność licznych zmian ułatwiających komórkom nowotworowym procesy migracji obniżanie zdolności migracyjnych tych komórek jest ważnym zadaniem leków przeciwnowotworowych.

Analizę wpływu cisplatyny oraz hipertermii na komórki raka jajnika przeprowadzono z wykorzystaniem testu migracji komórek *in vitro*. Szczególnie obiecujące wyniki uzyskano w przypadku traktowania komórek linii SKOV-3 cisplatyną oraz temperaturą 39°C. W przypadku linii komórek TOV-21G największe zahamowanie migracji komórek osiągnięto w przypadku traktowania ich cisplatyną oraz temperaturą 40°C, jednak wyniki te nie były tak obiecujące jak w przypadku linii SKOV-3.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania potwierdzają wzrost efektywności cytotoksycznego działania cisplatyny wobec komórek raka jajnika podczas stosowania leku w połączeniu z łagodną hipertermią – w trakcie badań najlepsze wyniki zaobserwowano dla połączenia cisplatyny i temperatury 39°C. Terapia skojarzona może się okazać skutecznym środkiem umożliwiającym leczenie nowotworu jajnika, nadal jednak



istnieje konieczność dalszych badań w tym zakresie, tak aby możliwe było jej bezpieczne stosowanie u pacjentek.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują, że jednoczesne traktowanie komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz TOV-21G cisplatyną oraz łagodną hipertermią prowadzi do licznych zmian fenotypowych w komórkach, wskazujących na procesy apoptozy. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim struktury, rozmiarów i położenia jądra komórkowego, a także struktury cytoplazmy badanych komórek. Ustalono także, iż jednoczesne działanie na

komórki badanymi czynnikami prowadzi do zmian funkcjonalnych, polegających na hamowaniu ich zdolności do migracji. Hamujący efekt czynników był znacznie silniejszy w stosunku do linii SKOV-3 niż TOV-21G. Uzyskane wyniki sugerują pozytywny wpływ jednoczesnego stosowania hipertermii oraz cisplatyny na skuteczność działania przeciwnowotworowego terapii.

Finasowanie

Praca została sfinansowana ze środków PCN-1-087/N/1/I oraz PCN-1-87/K/2/I.

Author's contribution

Study design – I. Bednarek

Data collection – A. Zoń

Data interpretation – I. Bednarek, A. Zoń

Statistical analysis – A. Zoń

Manuscript preparation – A. Zoń, I. Bednarek

Literature research – A. Zoń

PIŚMIENNICTWO

1. Global Cancer Observatory: Cancer Today, 2020. J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam, M. Colombet, L. Mery, M. Piñeros, A. Znaor, I. Soerjomataram, F. Bray [red.] [online] <https://gco.iarc.fr/today> [dostęp: 15.11.2022].
2. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow, 2020. J. Ferlay, M. Laversanne, M. Ervik, F. Lam, M. Colombet, L. Mery, M. Piñeros, A. Znaor, I. Soerjomataram, F. Bray [red.] [online] <https://gco.iarc.fr/tomorrow> [dostęp: 15.11.2022].
3. Stewart C., Ralyea C., Lockwood S. Ovarian cancer: an integrated review. *Semin. Oncol. Nurs.* 2019; 35(2): 151–156, doi: 10.1016/j.soncn.2019.02.001.
4. Chandra A., Pius C., Nabeel M., Nair M., Vishwanatha J.K., Ahmad S., Basha R. Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer Med.* 2019; 8(16): 7018–7031, doi: 10.1002/cam4.2560.
5. Cortez A.J., Tudrej P., Kujawa K.A., Lisowska K.M. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2018; 81(1): 17–38, doi: 10.1007/s00280-017-3501-8.
6. Bieg D., Sypniewski D., Nowak E., Bednarek I. MiR-424-3p suppresses galectin-3 expression and sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2019; 299(4): 1077–1087, doi: 10.1007/s00404-018-4999-7.
7. Bieg D., Sypniewski D., Nowak E., Bednarek I. Morin decreases galectin-3 expression and sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2018; 298(6): 1181–1194, doi: 10.1007/s00404-018-4912-4.
8. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg. Chem.* 2019; 88: 102925, doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.
9. Rocha C.R.R., Silva M.M., Quinet A., Cabral-Neto J.B., Menck C.F.M. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)* 2018; 73(suppl 1): e478s, doi: 10.6061/clinics/2018/e478s.
10. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol. Oncol.* 2019; 53(2): 148–158, doi: 10.2478/raon-2019-0018.
11. Ortiz M., Wabel E., Mitchell K., Horibata S. Mechanisms of chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Cancer Drug Resist.* 2022; 5(2): 304–316, doi: 10.20517/cdr.2021.147.
12. Borkar P., Bhandari P., Yadav S., Prabhu A. Cisplatin resistance in ovarian cancer: classical outlook and newer perspective. *Biomed. Pharmacol. J.* 2021; 14(4): 1993–2005, doi: 10.13005/bpj/2297.
13. Shetake N.G., Pandey B.N. Hyperthermia therapy of cancer: need for deeper biological insights for improved therapeutic outcome. *J. Radiat. Cancer Res.* 2019; 10(4): 170–173, doi: 10.4103/jrcr.jrcr_2_20.
14. Aseervatham J. Cytoskeletal remodeling in cancer. *Biology* 2020; 9(11): 385, doi: 10.3390/biology9110385.
15. Shimizu T., Fujii T., Sakai H. The relationship between actin cytoskeleton and membrane transporters in cisplatin resistance of cancer cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8: 597835, doi: 10.3389/fcell.2020.597835.