

Streszczenie

Rak jajnika charakteryzuje się najwyższą umieralnością ze wszystkich nowotworów złośliwych kobiet. Wciąż poszukiwane są nowe markery nowotworowe mogące poprawić zarówno diagnostykę, jak i umożliwić bardziej efektywną terapię raka jajnika. Ponadto, ze względu na dużą toksyczność stosowanych cytostatyków prowadzone są badania nad związkami mogącymi wspomagać leczenie przeciwnowotworowe.

Melatonina (MLT) jest hormonem syntetyzowanym głównie przez szyszynkę, który poprzez swoje błonowe receptory MT1, może wpływać na wzrost i progresję wielu typów nowotworów złośliwych człowieka.

Celem pracy było określenie ekspresji receptorów melatoninowych MT1 w liniach raka jajnika oraz linii prawidłowego nabłonka płciowego tego narządu. Ponadto, celem było również zbadanie potencjalnego synergistycznego działania MLT w skojarzonym stosowaniu z cisplatyną na ww. komórki i roli receptorów MT1 w tym mechanizmie.

Do badań wykorzystano linię komórkową prawidłowego nabłonka powierzchniowego jajnika IOSE 364 oraz linie komórkowe raka jajnika: SK-OV-3 (komórki nowotworowe o średniej agresywności) i OVCAR-3 (komórki nowotworowe o wysokiej agresywności).

Ekspresję receptorów MT1 ww. liniach komórkowych badano z użyciem metod: real-time PCR, immunofluorescencyjnej oraz Western Blot. Dodatkowo, przeprowadzono testy przeżywalności (SRB) mające na celu zbadanie wpływu MLT na proliferację komórek oraz na jej potencjalne synergistyczne działanie z cisplatyną. W celu sprawdzenia roli receptorów MT1 w mechanizmie działania MLT z cisplatyną na ww. komórki, testy te prowadzone były także z użyciem antagonisty receptorów MT1 – luzindolu.

Wykazano ekspresję receptorów MT1 na poziomie mRNA i białka z wykorzystaniem wszystkich stosowanych metod. Najniższy poziom mRNA receptorów MT1 obserwowano w linii prawidłowej IOSE 364, a najwyższy w linii OVCAR-3. Odwrotne wyniki uzyskano

badając ekspresję receptora MT1 na poziomie białka - najwyższą ekspresję receptorów MT1 stwierdzono w linii IOSE 364, a najniższą w linii OVCAR-3. Testy SRB wykazały, że MLT obniżała przeżywalność komórek w sposób zależny od dawki, zarówno prawidłowego nabłonka powierzchniowego jajnika IOSE 364, jak i komórek raka jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3. Ponadto MLT w kombinacji z cisplatyną istotnie obniżała przeżywalność badanych komórek w porównaniu do samej cisplatyny. Działanie synergistyczne obserwowano w linii prawidłowej IOSE 364 i nowotworowej SK-OV-3 przy zastosowaniu kombinacji najwyższego stężenia melatoniny (2 mM) i cisplatyny (5 µg/ml), natomiast w linii nowotworowej OVCAR-3 przy dwóch najwyższych zastosowanych stężeniach melatoniny (1 mM i 2 mM) oraz cisplatyny w stężeniu 2,5 µg/ml. We wszystkich pozostałych kombinacjach melatoniny i cisplatyny stwierdzono działanie addytywne pomiędzy badanymi związkami. Dodanie luzindolu – antagonisty receptorów MT1 – nie wpłynęło na działanie MLT w połączeniu z cisplatyną.

Podsumowując, w niniejszych badaniach wykazano, że komórki zarówno prawidłowego nabłonka powierzchniowego IOSE 364 oraz raka jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3 ekspresjonują receptor MT1. Najwyższy poziom białka receptora MT1 stwierdzono w komórkach prawidłowych IOSE 364, a najniższy w komórkach nowotworowych słabo zróżnicowanych OVCAR-3. Melatonina w farmakologicznych stężeniach obniżała przeżywalność komórek badanych linii w sposób zależny od dawki. Najsilniej obniżała przeżywalność komórek prawidłowych IOSE 364, a najslabiej komórek nowotworowych SK-OV-3. Ponadto melatonina w wybranych stężeniach wykazywała synergistyczne działanie w kombinacji z cisplatyną, a działanie to wydaje się być niezależne od receptorów błonowych MT1 (testy z luzindolem). Przeprowadzone badania zaprezentowane w tej pracy potwierdzają zasadność badania melatoniny jako leku wspomagającego chemioterapię cisplatyną w raku jajnika.

Abstract

Ovarian cancer is characterized by the highest mortality among all malignant cancer in women. Research on the new tumor markers, which may improve the diagnostics and make the therapy of ovarian cancer more effective, are still continued. Furthermore, due to the high toxicity of the chemotherapeutic drugs, research on the new agents which may support cancer treatment are required.

Melatonin (MLT) is a neurohormone synthesized mainly by the pineal gland, which, via its membrane receptors MT1, may affect the growth and progression of many types of human malignant cancer.

The aim of the study was evaluation of MT1 melatonin receptors expression in ovarian carcinoma cell lines and normal epithelial ovarian cell line. Furthermore, potential synergistic effect of MLT in combination with cisplatin on the studied cell lines and role of MT1 receptor in this mechanism have been determined.

In this study normal epithelial ovarian cell line IOSE 364 and ovarian carcinoma cell lines: SK-OV-3 (medium grade of cell invasiveness), OVCAR-3 (high grade of cell invasiveness) have been used.

Expression of melatonin receptors MT1 in studied cell lines was evaluated using real-time PCR, immunofluorescence and Western Blot. Additionally, SRB viability assays have been performed in order to determine effect of MLT on cell proliferation and its potential synergistic effect in combination with cisplatin. In order to assess role of MT1 receptors in this mechanism SRB viability assays have also been performed with MT1 receptors antagonist - luzindole.

Expression of MT1 receptor on mRNA as well as protein level have been confirmed by all used methods. The lowest level of MT1 receptor mRNA was observed in normal epithelial ovarian cells IOSE 364 and the highest level of that expression has been shown in

OVCAR-3. Opposite to that results the highest expression of MT1 receptor on protein level was observed in IOSE 364 and the lowest expression has been presented in OVCAR-3 cells. SRB assays results showed that decrease of cell viability after MLT treatment is dependent on the dose both in normal epithelial ovarian cells IOSE 364 and ovarian carcinoma cells SK-OV-3 and OVCAR-3. In addition, the MLT used in combination with cisplatin decreased significantly viability of examined cells when compared to cisplatin used alone. The synergistic effect was observed in the normal cells IOSE 364 and cancer cells SK-OV-3 as a result of using the combination of the highest concentrations of melatonin (2 mM) and cisplatin (5 mg/ ml) and in OVCAR-3 cells as a result of melatonin treatment using MLT concentration 1 mM and 2 mM and cisplatin at concentration of 2,5 ug/ml. All other combinations of melatonin and cisplatin resulted in additive effect of the analyzed compounds. Luzindole (MT1 receptor antagonists) treatment did not affect the activity of MLT in combination with cisplatin.

In conclusion, the present study demonstrated that both normal epithelial ovarian cells IOSE 364 and ovarian carcinoma cells SK-OV-3, OVCAR-3 express the MT1 receptor. The highest level of MT1 receptor protein was found in normal cell line IOSE 364, and the lowest level in poorly differentiated cancer cell OVCAR-3. Melatonin at pharmacological concentrations decreased viability of examined cells depending on the dose. The most reduced cell viability was observed in normal cells IOSE 364 and the least reduced cell viability was presented in cancer cells SK-OV-3 after MLT treatment. Additionally, melatonin used at certain concentrations together with cisplatin resulted in a synergistic effect and this effect seems to be independent on MT1 membrane receptors (SRB assays with luzindole). Results presented in this paper confirm the reasonability of the research on melatonin as an agent supporting chemotherapy with cisplatin in ovarian cancer.