

P R A C E O R Y G I N A L N E  
*ginekologia*

## Wpływ metforminy na przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów kodujących enzymy związane z O-GlcNAcyacją

Effects of metformin on the survival of the SKOV-3 ovarian cancer cell line and the expression of genes encoding enzymes involved in O-GlcNAcylation

Aneta Rogalska<sup>1</sup>, Katarzyna Wójcik-Krowiranda<sup>2</sup>, Ewa Forma<sup>3</sup>, Piotr Ciesielski<sup>3</sup>, Andrzej Bieńkiewicz<sup>2</sup>, Magdalena Bryś<sup>3</sup>, Anna Krześlak<sup>3</sup>, Agnieszka Marczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Thermobiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Poland

<sup>2</sup> Department of Gynecological Oncology, Medical University of Łódź, Poland

<sup>3</sup> Department of Cytobiochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Poland

### Streszczenie

**Cel pracy:** Celem pracy była analiza wpływu metforminy na proliferację komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów, kodujących białka zaangażowane w proces O-GlcNAcyacji – O-GlcNAc transferazy (OGT) i  $\beta$ -N-acetylo-D-glukozaminidazy (OGA).

**Materiał i metody:** Przeżywalność komórek po działaniu metforminy oznaczano metodą spektrofotometryczną z użyciem bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego (MTT). Żywotność komórek oceniano stosując metodę barwienia błękitem trypanu. Analizę ekspresji genów OGT i OGA na poziomie mRNA przeprowadzono przy użyciu techniki real-time PCR.

**Wyniki:** Zaobserwowano obniżenie przeżywalności komórek poddanych działaniu metforminy wraz ze wzrostem stosowanych stężeń. Cytotoksyczność metforminy została oszacowana na podstawie parametru IC<sub>50</sub> wynoszącego 14mM, w odniesieniu do komórek linii SKOV-3. Czas potrzebny do podwojenia komórek linii SKOV-3 wynosił 45 godzin, natomiast w przypadku prób traktowanych 10 mM metforminą nie uzyskano efektu podwojenia liczby komórek nawet po 72 godzinach.

### Adres do korespondencji:

Agnieszka Marczak  
Department of Thermobiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź  
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, Poland  
tel. +48 (42) 635-44-77  
e-mail: aszwar@biol.uni.lodz.pl

Otrzymano: 18.11.2013  
Zaakceptowano do druku: 03.03.2014

Aneta Rogalska et al. Wpływ metforminy na przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów kodujących enzymy związane z O-GlcNAcyacją.

W przypadku ekspresji mRNA dla genu OGA nie stwierdzono znamienych zmian w zależności od czasu inkubacji. W odniesieniu do ekspresji OGT na poziomie mRNA, stwierdzono, w porównaniu z materiałem kontrolnym, znamieny wzrost ekspresji już po 24 godzinach, który utrzymywał się także po 48 godzinach inkubacji. Stwierdzono również istotny statystycznie wzrost ekspresji OGT mRNA w komórkach inkubowanych z metforminą 48 godzin, w porównaniu do komórek inkubowanych 24 godziny.

**Wniosek:** Metformina z uwagi na jej antyproliferacyjne działanie może być rozpatrywana jako potencjalny chemioterapeutyk, niemniej z uwagi na fakt, iż zmienia ona ekspresję jednego z dwóch enzymów odpowiedzialnych za proces O-glikozylacji białek - O-GlcNAc transferazy, należy dogłębnie zbadać ten molekularny mechanizm.

Słowa kluczowe: **metformina / SKOV-3 / rak jajnika / proliferacja / O-GlcNAcyacja /**

## Abstract

**Objectives:** The aim of the study was to evaluate the cytotoxic effect of metformin on the ovarian cancer cells SKOV-3 and analyze the impact of this compound on the expression of genes coding for O-GlcNAc cycling enzymes, i.e. O-GlcNAc transferase (OGT) and -N-acetylglucosaminidase (OGA).

**Materials and methods:** Viability and proliferation of control cells and cells treated with metformin were evaluated by MTT test and trypan blue staining. OGT and OGA mRNA expressions analysis was performed using real-time PCR method.

**Results:** A metformin concentration-dependent decrease of SKOV-3 cell viability was observed. The IC50 parameter for metformin cytotoxicity was 14 mM. The SKOV-3 cell doubling time was 45 hours. The cell population treated with 10 mM metformin did not double even after 72 hours. There was no significant difference in mRNA level of OGA between control cells and cells treated with metformin. The OGT mRNA level was significantly higher in cells treated with metformin for 24 hours as compared to the control cells. The increase of OGT mRNA was dependent on time of incubation. Cells treated with metformin for 48 hour showed higher expression of OGT than cells treated for 24 hours.

**Conclusion:** Antiproliferative activity of metformin suggests that this compound may be considered as a candidate for potential chemotherapeutic agent. However, taking into account its impact on the expression of O-GlcNAc transferase, further studies on the molecular mechanism of metformin action are necessary.

Key words: **metformin / ovarian cancer / SKOV-3 / proliferation / O-GlcNAcylation /**

## Wstęp

Metformina zaliczana jest do doustnych leków przeciwcukrzycowych z grupy biguanidów i jest stosowana w leczeniu cukrzycy typu 2, na każdym etapie rozwoju choroby. Hipoglikemiczne działanie metforminy związane jest ze zmniejszeniem wchłaniania glukozy w jelicie cienkim, zwiększonym transportem glukozy do komórek, hamowaniem glukoneogenezy oraz obniżeniem stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu. Metformina wykazuje także działanie przeciwniażdżycowe, hipotensyjne oraz przeciwnowotworowe [1, 2].

U osób chorujących na cukrzycę obserwuje się wzrost ryzyka zachorowania na wiele nowotworów, w tym na raka wątroby, trzustki, nerek, żołądka, jelita grubego, endometrium, raka szyjki macicy, piersi oraz jajnika [3]. W 2005 roku Ewans i współpracownicy [4] opublikowali wyniki badań kohortowych, przeprowadzonych z udziałem pacjentów z rozpoznaną cukrzycą typu 2 i jednocześnie leczonych metforminą. W grupie tej wykazano zmniejszenie ryzyka zachorowania na choroby nowotworowe (iloraz szans 0,79) w porównaniu z grupą pacjentów cierpiących na cukrzycę typu 2, u których nigdy nie stosowano metforminy. Badania publikowane przez kolejne zespoły badawcze potwierdziły, że długotrwałe leczenie metforminą zmniejsza ryzyko rozwoju nowotworów piersi, prostaty i trzustki oraz obniża śmier-

telność związaną z tymi chorobami [5-10]. Wykazano także, że ponad 50% pacjentek z rakiem jajnika, u których stosowano metforminę w leczeniu cukrzycy typu 2 charakteryzowało się ponad 5-letnim okresem przeżycia bez progresji nowotworu, podczas gdy w grupie pacjentek, które nie chorowały na cukrzycę oraz tych, które w czasie terapii cukrzycy typu 2 nie przyjmowały metforminy tak długi okres przeżycia bez progresji choroby nowotworowej dotyczył odpowiednio 23% i 8% kobiet [11]. Kumar i współpracownicy w 2012 roku również wykazali, że stosowanie metforminy wpływa korzystnie na czas przeżycia pacjentek z rakiem jajnika [12].

Molekularne mechanizmy antynowotworowego działania metforminy nie są jeszcze całkowicie poznane, niemniej na podstawie badań *in vitro* oraz *in vivo*, sugeruje się udział metforminy w aktywacji szlaku przekazywania sygnału komórkowego LKB1/AMPK z udziałem kinazy tyrozynowej (LKB1, ang. *liver kinase B1*) i kinazy białkowej aktywowanej adenosinomonofosforanem (AMPK, ang. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) oraz hamowanie szlaku kinazy białkowej treoninowo-serynowej TOR (tzw. cel rapamycyny u ssaków) i w konsekwencji zahamowanie tempa wzrostu i proliferacji komórek zmienionych nowotworowo [13, 14]. Kolejnym sugerowanym mechanizmem jest hamowanie przez metforminę transformacji komórkowej

Aneta Rogalska et al. Wpływ metforminy na przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów kodujących enzymy związane z O-GlcNAcyacją.

w odniesieniu do nowotworowych komórek macierzystych, które odporne są na działanie niektórych chemioterapeutyków [15].

O-GlcNAcyacja jest modyfikacją potranslacyjną białek, która polega na przyłączeniu do seryny lub treoniny, wiązaniem O-glikozydowym (O-GlcNAc), pojedynczych reszt N-acetyloglukozoaminy [16]. b-N-acetyloglukozaminylotransferaza UDP-N-acetyloglukozamina: białko (O-GlcNAc transferaza, OGT) jest jedynym enzymem odpowiedzialnym za katalityczne przyłączenie b-N-acetylo-D-glukozaminy do grupy hydroksylowej seryny lub treoniny białka. Natomiast enzymem usuwającym reszty O-GlcNAc z białek jest b-N-acetylo-D-glukozaminidaza (OGA) [17].

Istnieje szereg doniesień sugerujących związek pomiędzy wzrostem stopnia O-glikozylacji białek komórkowych a cukrzycą typu 2, która cechuje się hiperglikemią połączoną z opornością na insulinę. Sugeruje się, że w oporności na insulinę dużą rolę może odgrywać szlak biosyntezy heksozamin, którego końcowym produktem jest przede wszystkim UDP-N-acetyloglukozamina (UDP-GlcNAc) będąca substratem dla O-GlcNAc transferazy [18, 19]. O-GlcNAcyacja odgrywa także ważną rolę w procesach związanych z nowotworzeniem, takich jak metabolizm, transkrypcja, regulacja cyklu komórkowego i reorganizacja cytoszkieletu [20]. Wzrost ekspresji OGT oraz O-GlcNAcyacji białek jest również charakterystyczny dla wielu typów nowotworów, w tym raka piersi, prostaty i jelita grubego [21]. W związku z powyższym, proces O-GlcNAcyacji wydaje się być molekularnym ogniwem łączącym proces nowotworzenia oraz cukrzycę typu 2. Stąd tak interesującym wydaje się określenie wpływu działającej hipoglikemicznie metforminy na proces O-GlcNAcyacji i proliferację komórek raka jajnika.

## Cel pracy

Celem pracy była analiza wpływu metforminy na proliferację komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów, kodujących białka zaangażowane w proces O-GlcNAcyacji – O-GlcNAc transferazy (OGT) i  $\beta$  N-acetylo-D-glukozaminidazy (OGA)

## Materiał i metody

### Hodowla komórkowa

Linia komórkowa raka jajnika SKOV-3 zakupiona została w American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Hodowlę prowadzono standardową techniką jednowarstwowych kultur, aż do osiągnięcia późnej fazy wzrostu logarytmicznego. Wykorzystywano sterylne polistyrenowe naczynia firmy Nunc (Dania) oraz podłoże wzrostowe – RPMI 1640 (Immunix, Polska) wzbogacone o 10% bydlęcą surowicę płodową (Cambrex, Bazylea, Szwajcaria). Do podłoża dodawano również mieszaninę antybiotyków - streptomycyna (10 U/ml)/penicylina (50  $\mu$ g/ml). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C, atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 100% wilgotności względnej i rutynowo sprawdzano na obecność zakażenia mykoplazmą (*Mycoplasma* sp.). Komórki paszowano po zapełnieniu około 80 - 90% powierzchni naczynia.

### Spektrofotometryczne oznaczanie przeżywalności komórek po działaniu metforminy

Przeżywalność komórek linii SKOV-3 po działaniu metforminy (Sigma-Aldrich, USA), oznaczano metodą spektrofotometryczną [22] na płytkach 96-dołkowych.

Zasadą metody jest pomiar redukcji bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego (MTT) (Sigma-Aldrich, USA) do barwnego (niebieskiego) formazanu. Reakcję tę przeprowadzają oksydoreduktazy wyłącznie w aktywnych mitochondriach żywych komórek. Za pomocą programu komputerowego ED50plus v1.0 (<http://www.free-downloads-center.com/download/ed50plus-v1-0-2434.html>) wyznaczono parametr IC<sub>50</sub>, czyli stężenie leku, które powoduje spadek przeżywalności komórek o 50% w stosunku do kontroli (komórki nie traktowane lekiem). Badane komórki nanoszono na 96-dołkową płytkę w liczbie 1x10<sup>4</sup> komórek/dołek w 100 ml podłoża wzrostowego i hodowano 24 godziny we wcześniej opisanych warunkach hodowli. Po tym czasie do komórek dodawano metforminę w wybranym zakresie stężeń (1–35 mM) na okres 72 godzin. Po upływie 72 godzin z płytek usuwano podłoże wzrostowe, a do komórek dodawano roztwór MTT o stężeniu 0,5 mg/ml w ilości 50 ml na dołek i inkubowano przez 4 godziny w warunkach hodowli. Następnie usuwano MTT, a niebieskie kryształki formazanu rozpuszczano w roztworze DMSO (ang. *dimethyl sulfoxide*) (Sigma-Aldrich USA). Absorbancję prób określano za pomocą czytnika spektrofotometrycznego (Awareness, USA), przy długości fali pomiaru  $\lambda = 580$  nm i długości fali referencyjnej  $\lambda = 720$  nm. Wpływ metforminy na przeżywalność analizowano w czterech niezależnych eksperymentach, z których każdy obejmował sześć powtórzeń dla danego stężenia badanego związku.

### Określanie tempa proliferacji komórek

Żywołność komórek oceniano stosując metodę barwienia błękitem trypanu [23]. Błona komórek nieuszkodzonych jest nieprzenikalna dla błękitu trypanu, co umożliwia rozróżnienie komórek żywych, niezabarwionych, od martwych, zabarwionych na ciemnoniebiesko. Komórki wysiewano na szalki Petriego w ilości 20x10<sup>4</sup> komórek/szalkę. Po 24 godzinach od wysiania (czas potrzebny komórkom do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu) do części szalek dodawano metforminę o stężeniu 10 mM. Zmiany w szybkości proliferacji komórek kontrolnych i poddanych działaniu metforminy badano po czasie 24–72 godzin. 4% roztwór błękitu trypanu dodawano do zawiesiny komórek w stosunku 1:1. Tak przygotowaną mieszaninę nanoszono na komorę Thoma i liczone wszystkie żywe komórki. Wpływ metforminy na przeżywalność i proliferację komórek raka jajnika linii SKOV-3 analizowano w trzech niezależnych eksperymentach.

### Izolowanie RNA i synteza cDNA

Komórki raka jajnika linii SKOV-3 uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów mających na celu ocenę wpływu metforminy na ich przeżywalność i proliferację przemywano zimnym roztworem PBS (ang. *phosphate buffered saline*), a następnie przechowywano w temp. -20°C do czasu izolowania RNA. Całkowity RNA izolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Czystość otrzymanych preparatów RNA określano metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm. Przyjętym kryterium czystości RNA była wartość A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> mieszcząca się w granicach 1,8–2,0. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. cDNA przechowywano w temp. -20°C.

Aneta Rogalska et al. Wpływ metforminy na przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów kodujących enzymy związane z O-GlcNAcyłacją.

### Analiza ilościowa produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym – reakcja real-time PCR

Otrzymany cDNA stanowił matrycę w reakcji real-time PCR dla oznaczenia liczby kopii mRNA dla genów *OGT* i *OGA*. Użyta mieszanina reakcyjna zawierała: 1 µl cDNA, 5 µl TaqMan® Universal PCR MasterMix (Life Technologies, USA), 0,5 µl 20x TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies, USA) i 3,5 ml H<sub>2</sub>O. Reakcję real-time PCR prowadzono w urządzeniu Mastercycler®ep realplex (Eppendorf, Niemcy). Początkowa ilość matrycy wyznaczana była na podstawie parametru Ct (teoretyczny numer cyklu, przy którym wartość fluorescencji jest wyższa niż przyjęta arbitralnie wartość graniczna). Pomiar wartości Ct wykonano w dwóch powtórzeniach, jako gen referencyjny wykorzystano *HPRT1* (ang. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*). Do badań zastosowano następujące sondy TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA): *OGT* - Hs00269228, *OGA* - Hs00201970\_m1, *HPRT1* - Hs02800695\_m1.

### Analiza statystyczna

Dane zostały wyrażone jako średnia ± SD. Ocenę normalności rozkładów badanych zmiennych wykonano testem Shapiro-Wilka a homogenność wariancji oszacowano testem Levene'a. W celu wskazania różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi zmiennymi wykonano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz zastosowano test Tukeya jako analizę post-hoc. Za statystycznie istotną przyjęto wartość  $p < 0,05$ . Obliczenia statystyczne wykonywano przy zastosowaniu programu STATISTICA ver.11 (StatSoft, Polska).

## Wyniki

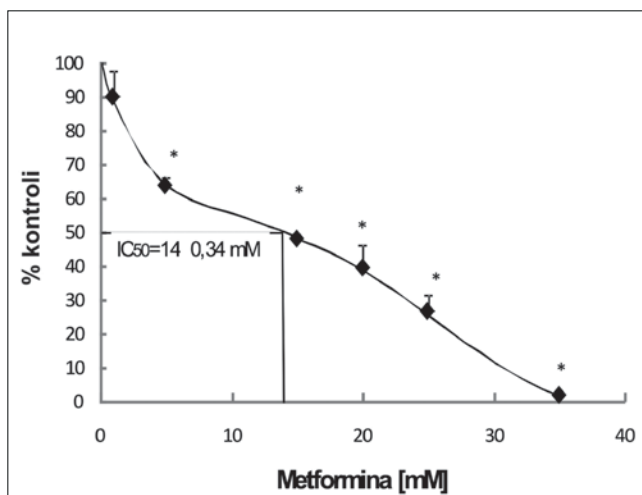
### Ocena cytotoksyczności metforminy oraz jej wpływu na poziom proliferacji komórek raka jajnika

W celu określenia wpływu metforminy na przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 zastosowano test MTT. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia metforminy w zakresie 5–35 mM spada przeżywalność badanych komórek ( $p < 0,05$ ; Rycina 1). Cytotoksyczność metforminy została określona na podstawie parametru IC<sub>50</sub>, który dla badanych komórek linii SKOV-3 wyniósł 14 mM. W dalszych badaniach stosowano roztwór metforminy o stężeniu 10 mM, w którym przeżywalność badanych komórek raka jajnika wynosiła 60% względem komórek nietraktowanych metforminą. Zgodnie z danymi literaturowymi stężenie to odpowiada dawce metforminy stosowanej w leczeniu cukrzycy typu 2 [24]. W toku dalszych analiz określono również wpływ metforminy na proliferację badanych komórek. (Rycina 2).

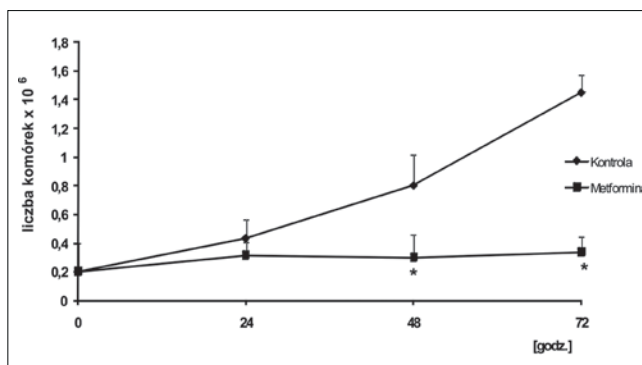
Czas podwojenia komórek kontrolnych linii SKOV-3 wynosił 45 godzin [25], natomiast w przypadku prób traktowanych 10 mM roztworem metforminy nie uzyskano efektu podwojenia liczby komórek nawet po 72 godzinach. Różnice w szybkości proliferacji komórek raka jajnika traktowanych badanym związkiem oraz komórek kontrolnych, niepoddanych działaniu metforminy, były istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

### Wpływ metforminy na ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w proces O-GlcNAcyłacji (*OGT* i *OGA*) w komórkach raka jajnika

Ekspresję genów *OGT* i *OGA* na poziomie mRNA analizowano w komórkach raka jajnika linii SKOV-3 poddanych działaniu roztworu metforminy o stężeniu 10 mM przez 24 i 48 godzin.



**Rycina 1.** Przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 po 72 godz. inkubacji z metforminą. N=4 niezależnych doświadczeń (każde w 6 powtórzeniach). \* $p < 0,05$  różnice istotne statystycznie pomiędzy próbkami traktowanymi lekiem i nie traktowanymi lekiem, 100% - komórki kontrolne nie traktowane metforminą.



**Rycina 2.** Przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 po 72 godz. inkubacji z metforminą. N=4 niezależnych doświadczeń (każde w 6 powtórzeniach). \* $p < 0,05$  różnice istotne statystycznie pomiędzy próbkami traktowanymi lekiem i nie traktowanymi lekiem, 100% - komórki kontrolne nie traktowane metforminą.

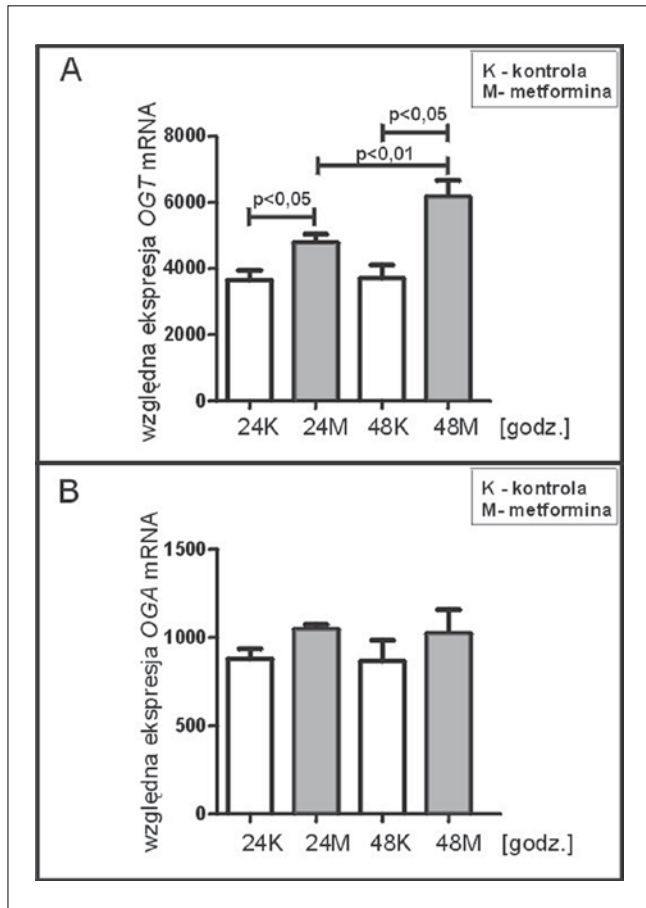
Jako kontrolę użyto komórki nietraktowane roztworem metforminy.

W przypadku ekspresji genu *OGA* nie stwierdzono znamiennych statystycznie zmian w zależności od czasu inkubacji. Natomiast w przypadku genu *OGT*, stwierdzono, w porównaniu z materiałem kontrolnym, znamienny statystycznie wzrost ekspresji już po 24 godzinach ( $p < 0,05$ ), który utrzymywał się także po 48 godzinach inkubacji ( $p < 0,05$ ). Stwierdzono również istotny statystycznie wzrost ekspresji *OGT* na poziomie mRNA w komórkach inkubowanych z metforminą 48 godzin w porównaniu do komórek inkubowanych 24 godziny ( $p < 0,01$ ), (Rycina 3).

## Dyskusja

Rak jajnika jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wywołanych nowotworami złośliwymi układu rozrodczego kobiet [26]. Ze względu na niespecyficzność objawów oraz brak dostatecznie czułych i swoistych metod diagnostycznych i przesiewowych, wykrywane przypadki raka jajnika charakteryzują się wysokim stopniem zaawansowania, co znacznie ogranicza skuteczność terapii i prowadzi do wzrostu śmiertelności [26, 27].

Aneta Rogalska et al. Wpływ metforminy na przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów kodujących enzymy związane z O-GlcNAcyacją.



**Rycina 3.** Względna ekspresja OGT i OGA mRNA w komórkach raka jajnika po traktowaniu metforminą (10mM) w czasie 24 i 48 godzin. K - komórki kontrolne nie traktowane metforminą, M - komórki traktowane metforminą.  $p < 0,05$  różnice istotne statystycznie.

Ze względu na rosnącą liczbę doniesień świadczących o przeciwnowotworowej aktywności metforminy, celem prowadzonych badań była analiza wpływu tego związku na przeżywalność i proliferację komórek raka jajnika linii SKOV-3. Zarówno w przypadku cukrzycy typu 2, jak i w procesie nowotworzenia obserwuje się zaburzenia O-GlcNAcyacji białek komórkowych [28,29]. W związku z powyższym kolejnym celem badań była analiza wpływu metforminy na ekspresję na poziomie mRNA genów OGT i OGA, kodujących enzymy regulujące poziom O-GlcNAcyacji.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że metformina w sposób zależny od dawki obniża przeżywalność oraz hamuje proliferację komórek raka jajnika linii SKOV-3. Otrzymane wyniki zgodne są z danymi literaturowymi. Badania prowadzone na różnych liniach komórkowych raka jajnika dowiodły, że metformina hamuje proliferację i migrację komórek raka jajnika w warunkach *in vitro* [30-33]. Ponadto wykazano, że w warunkach *in vivo* badany związek hamuje przerzutowanie raka jajnika do płuc, jelita cienkiego i wątroby, a także ogranicza naciekanie makrofagów oraz tworzenie nowych naczyń krwionośnych w obrębie guza nowotworowego [31]. W komórkach raka jajnika linii OVOCAR-3 i OVOCAR-4 traktowanych metforminą obserwowano wzrost ekspresji białek proapoptotycznych Bax i Bad oraz spadek poziomu białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xL, co prowadziło do indukcji apoptozy oraz zatrzymania cyklu komór-

kowego w fazie S i G2/M [34]. Wykazano również, że metformina może indukować wzrost komórkowego i mitochondrialnego poziomu reaktywnych form tlenu, co wynika najprawdopodobniej z inhibicji kompleksu I łańcucha oddechowego i prowadzić do apoptozy. Jednakże dokładny mechanizm tego zjawiska nie został wyjaśniony [35].

W niniejszej pracy analiza wpływu metforminy na ekspresję genów, kodujących białka regulujące proces O-GlcNAcyacji wykazała, że badany związek powoduje wzrost ekspresji OGT, nie wpływa zaś na poziom ekspresji OGA. Przeprowadzone przez nas badania są według naszej wiedzy pierwszymi, w których analizowano wpływ metforminy na ekspresję OGT i OGA w komórkach raka jajnika. Ponadto brak jest jakichkolwiek danych literaturowych na temat ekspresji OGA zarówno w liniach komórkowych, jak i preparatach tkankowych raka jajnika. Ekspresję OGT na poziomie mRNA i białka oraz całkowity poziom O-GlcNAcyacji analizowano w komórkach raka jajnika linii SKOV-3, OVOCAR3, HO-8910 i HO-8910PM. W badaniach tych wykazano, że ekspresja OGT na poziomie mRNA w komórkach SKOV-3 wydaje się być wyższa niż w komórkach OVOCAR3 i HO-8910, ale w porównaniu do komórek linii HO-8910PM jest znacznie niższa. Poziom O-GlcNAcyacji białek komórkowych był skorelowany z ekspresją OGT [36]. Wzrost poziomu O-GlcNAcyacji białek w wyniku zastosowania inhibitorów OGA skorelowany był ze wzrostem zdolności wyżej wymienionych komórek raka jajnika do migracji i spadkiem ekspresji E-kadheryny [29]. Jak wykazano w badaniach na komórkach neuroblastomy linii Neuro-2a, wzrost poziomu OGT może być wynikiem aktywacji przez metforminę szlaku AMPK [35]. Kinaza AMPK reguluje procesy związane z metabolizmem glukozy i lipidów oraz pełni istotną rolę w odpowiedzi na stres metaboliczny [36]. W wyniku aktywacji szlaku AMPK przez metforminę w komórkach raka jajnika obserwowano 1) zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 na skutek obniżenia ekspresji cykliny D1 i wzrostu poziomu białka p21 oraz 2) zahamowanie wzrostu komórki, ograniczenie procesu translacji białek i biosyntezy lipidów na skutek zahamowania aktywności mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) [33].

W związku z powyższym konieczne są dalsze badania mające na celu wyjaśnienie zależności pomiędzy wzrostem poziomu OGT i O-GlcNAcyacji białek a aktywnością kinazy AMPK na skutek działania metforminy.

## Wnioski

Biorąc pod uwagę wyniki przeprowadzonych badań, stwierdzić należy, że metformina z uwagi na jej antyproliferacyjne działanie może być rozpatrywana jako potencjalny chemioterapeutyk, niemniej z uwagi na fakt, iż zmienia ona ekspresję jednego z dwóch enzymów odpowiedzialnych za proces O-glikozylacji białek – O-GlcNAc transferazy, należy dogłębnie zbadać ten molekularny mechanizm.

## Oświadczenie autorów

1. Aneta Rogalska – współautor koncepcji i założeń pracy, wykonanie części doświadczeń, współautor analizy i interpretacji wyników, współautor tekstu pracy.
2. Katarzyna Wójcik-Krowiranda – współautor założeń pracy, analizy i interpretacji wyników, akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.

Aneta Rogalska et al. Wpływ metforminy na przeżywalność komórek raka jajnika linii SKOV-3 oraz ekspresję genów kodujących enzymy związane z O-GlcNAcyacją.

3. Ewa Forma – wykonanie części eksperymentów, analiza i interpretacja wyników.
4. Piotr Ciesielski – wykonanie części eksperymentów.
5. Andrzej Bieńkiewicz – współautor założeń pracy oraz analizy i interpretacji wyników, współautor tekstu pracy, akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
6. Magdalena Marczak – uzyskanie części funduszy na realizację badań, współautor założeń pracy, analiza i interpretacja wyników, współautor tekstu pracy.
7. Anna Krześlak – uzyskanie części funduszy na realizację badań, współautor założeń pracy, analizy i interpretacji wyników, akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
8. Agnieszka Marczak – uzyskanie części funduszy na realizację badań, współautor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.

#### Źródło finansowania:

- Część projektu finansowana była w ramach dotacji Dziekana WBIOS UŁ dla pracowników Katedry Termobiologii UŁ, w ramach projektu na dofinansowanie zadań badawczych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich – Nr projektu: 545/751.
- Część projektu finansowana była w ramach działalności statutowej Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego nr: 506/1137.

#### Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

#### Piśmiennictwo

1. Jakimiuk AJ. Rola metforminy w leczeniu zespołu policystycznych jajników (PCOS). *Ginekol Pol.* 2008, 79, 8-11.
2. Grzybowska M, Bober J, Olszewska M. Metformina – mechanizmy działania i zastosowanie w terapii cukrzycy typu 2. *Postępy Hig Med Dośw.* (online). 2011, 65, 277-285.
3. Dilokthornsakul P, Chaiyakunapruk N, Terrunguenglert W, [et al.]. The effects of metformin on ovarian cancer: a systematic review. *Int J Gynecol Cancer.* 2013, 23, 1544-1551.
4. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, [et al.]. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Br Med J.* 2005, 330, 1304-1305.
5. Bowker SL, Yasui Y, Veugelers P, Johnson JA. Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: assessing effects of time-varying exposure. *Diabetologia.* 2010, 53, 1631-1637.
6. Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, [et al.]. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care.* 2010, 33, 322-326.
7. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, [et al.]. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009, 32, 1620-1625.
8. Bodmer M, Meier C, Krahenbuhl S, [et al.]. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes Care.* 2010, 33, 1304-1308.
9. Li D, Yeung SC, Hassan MM, [et al.]. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2009, 137, 482-488.
10. Wright JL, Stanford JL. Metformin use and prostate cancer in Caucasian men: results from a population-based case-control study. *Cancer Causes Control.* 2009, 20, 1617-1622.
11. Romero IL, McCormick A, McEwen KA, [et al.]. Relationship of type II diabetes and metformin use to ovarian cancer progression, survival, and chemosensitivity. *Obstet Gynecol.* 2012, 119, 61-67.
12. Kumar S, Meuter A, Thapa P, [et al.]. Metformin intake is associated with better survival in ovarian cancer: a case-control study. *Cancer.* 2013, 119, 555-562.
13. Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, [et al.]. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2007, 67, 10804-10812.
14. Gottlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, [et al.]. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008, 110, 246-250.
15. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, [et al.]. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* 2009, 69, 7507-7511.
16. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Ann Rev Biochem.* 2011, 80, 825-858.
17. Iyer SP, Hart GW. Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of O-GlcNAc cycling. *Biochemistry* 2003, 42, 2493-2499.
18. Krześlak A. Wpływ modyfikacji białek komorkowych przez O-GlcNAc na proces przekazywania sygnału. *Postępy Biochem.* 2007, 53, 389-399.
19. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006, 290, 1-8.
20. Slawson C, Hart GW. O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer.* 2011, 11, 678-684.
21. Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013, 4, 99.
22. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, [et al.]. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 1987, 47, 943-946.
23. Kaltenbach JP, Kaltenbach MH, Lyons WB. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp Cell Res.* 1958, 15, 112-117.
24. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000, 348, 607-614.
25. Rogalska A, Marczak A, Gajek A, [et al.]. Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds, epothilone A and B. *Toxicol In Vitro.* 2013, 27, 239-249.
26. Góra E, Korczyński J, Wójcik-Krowiranda K, [et al.]. Telomeraza – marker molekularny w surowicy chorych na raka jajnika. *Przegląd Menopauzalny.* 2009, 1, 33-39.
27. Rooth C. Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. *Br J Nurs.* 2013, 22, 23-30.
28. Issad T, Masson E, Pagesy P. O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications. *Diabetes Metab.* 2010, 36, 423-435.
29. Jin FZ, Yu C, Zhao DZ, [et al.]. A correlation between altered O-GlcNAcylation, migration and changes in E-cadherin levels in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res.* 2013, 319, 1482-1490.
30. Chan DK, Miskimins WK. Metformin and phenethyl isothiocyanate combined treatment in vitro is cytotoxic to ovarian cancer cultures. *J Ovarian Res.* 2012, 5, 19.
31. Wu B, Li S, Sheng L, [et al.]. Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2012, 28, 903-908.
32. Shank JJ, Yang K, Ghannam J, [et al.]. Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol.* 2012, 127, 390-397.
33. Rattan R, Giri S, Hartmann LC, Shridhar V. Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner. *J Cell Mol Med.* 2011, 15, 166-178.
34. Yasmeen A, Beauchamp MC, Piura E, [et al.]. Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins. *Gynecol Oncol.* 2011, 121, 492-498.
35. Cheung WD, Hart GW. AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J Biol Chem.* 2008, 283, 13009-13020.
36. Sanli T, Steinberg GR, Singh G, Tsakiridis T. AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism: A novel genomic stress sensor participating in the DNA damage response pathway. *Cancer Biol Ther.* 2014, 15, 156-169.