



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

ЕФЕКАТ РАЛОКСИФЕНА НА ЦИТОТОКСИЧНОСТ МЕТОТРЕКСАТА И МИОТРЕКСАТА
IN VITRO

Кључне речи :

Raloxifene, Methotrexate, uterine fibroids, apoptosis

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Леомиоми су најчешћи бенигни тумори глатко мишићних ћелија зидова крвних судова утеруса. Клиничке манифестације у виду обилног и дуготрајног крварења јављају се у око 25% жена у репродуктивном периоду, од 35 до 50 године старости (4). Битно је напоменути да одсуство обилног и продуженог крварења не искључје постојање миома код жене. Тумор најчешће настаје и развија се у периоду највеће активности оваријума. После менопаузе, са смањењем ендокрине активности оваријума, раст миома престаје и долази до регресије величине тумора (2). Фактори који доводе до продужене изложености естрогенима (E2) попут гојазности и ране менархе, повећавају инциденцу миома (2). На основу овога можемо закључити да су настанак и раст миома хормонски регулисани, преваходно од естрогена (4).

Естроген припада групи стероидних хормона. Свој физиолошки ефекат естроген остварује дејством на транскрипционе факторе унутар једра предходно везујући се за своје рецепторе, ER α и ER β (6). Естрогенски рецептори ER α и ER β присутни су у нормалном ткиву али се налазе и у фиброидима (4). Везивањем за рецепторе естроген врши пролиферацију и стимулацију раста нормалних и туморских ћелија (4). Обзиром да су леомиоми хормонски зависни тумори, у нашем истраживању испитиваћемо ефекат селективног модулятора естрогенских рецептора (Ралоксифена) на пролиферацију и раст тумора.

Лекови који инхибирају естрогенске рецепторе називају се селективним модулаторима естрогенских рецептора (SERM) (1, 4, 5). У нашем истраживању користићемо Ралоксифен који припада трећој групи SERM-а (1, 7). Ралоксифен делује на обе врсте естрогенских рецептора. Након везивања, комплекс, лиганд-рецептор се транслоцира у једро, где спречава пролиферацију и раст ћелија преко транскрипционих фактора (1, 4). Спречавањем пролиферације и раста туморска ћелија добија сигнал који је постепено уводи у ћелијску смрт-апоптозу. У овом процесу укључени су многи про апоптотични и антиапоптотични протеини.



Превладавањем про-апоптотичних протеина (BAX, cyt-c) у односу на анти-апоптотичне (Bcl-2), ћелија улази у програмирану ћелијску смрт (4, 7).

Циљ истраживања

Циљ нашег истраживања је

1. Испитивање ефекта Ралоксифена и
2. Естрогена на цитотоксични и апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата Хумани фибробласти пореклом из ендометријума утеруса, иморталисани хуманом теломераза реверзибилном транскриптазом (hTERT) тј. Т HESC ћелијска линија (ATCC®: CRL-4003™).
3. Механизам дејства Ралоксифена на цитотоксични и апоптотични ефекат Метотрексата и Миотрексата
4. Утврђивање механизма апоптозе

Актуелност истраживања:

Миоми–леиомиоми материце су јасно ограничени бенигни тумори глатко-мишићног ткива миометријума утеруса или глатко-мишићних ћелија зидова крвних судова утеруса. У зависности од степена заступљености везивне компоненте деле се на: миоме, фибромиоме и фиброме. Терапија миома утеруса је медикаментозна и хируршка. Експерименталним истраживањима показано је да примена Метотрексата смањује волумен миома (3). Метотрексат је лек из групе антимериталита који делује на ензим дихидро-фолат-редуктазу (DHFR), инхибира редукцију дихидро-фолне киселине и спречава њено учешће у синтези пуринске базе dTMP. На тај начин ћелијама недостаје редукована фолна киселина – тетрахидрофолна киселина (FH 4), па није могућа синтеза DNK а у цитоплазми се акумулира токсични дихидрофолат-полиглутамат (8). У клиничкој студији спроведеној у Клиничком центру Крагујевац, Гинеколошко акушерско одељење, показано је да Метотрексат, локалном интрацервикалном апликацијом, смањује запремину миома за 20-30 % (3). За Миотрексат А 61 К 31/195 (WIPO Patent Application WO/2003/022260), показано је ефикасније цитотоксично дејство на туморске ћелије миома *in vitro* у односу на Метотрексат (рад у припреми, Јуниор пројекат Медицинског факултета). Адукт Миотрексат пријављен је заводу за патенте и у гласнику интелектуалне својине 2004/4 заведен под бројем P-657/01.

Ралоксифен се користи за лечење и превенцију остеопорозе код постменопаузалних жена. Селективни модулатори естрогенских рецептора (SERM) ефикасни су у лечењу и превенцији карцинома дојке, док у новијим клиничким истраживањима показано је да ови хормонски модулатори могу бити корисни и у лечењу лејомиома материце (4). Као естрогенски лиганди



SERM испољавају ткивно селективне карактеристике, понашају се као агонисти за кости, јетру и кардио васкулаторни систем, као антагонисти када је у питању ткиво дојке и као мешовити агонисти/антагонисти када је у питању утерус (4). У истраживању које је спровео Паломба (7) показано је да Ралоксифен испољава анти-пролиферативни и про-апоптоични ефекат на ћелије лејомиома пост-менопаузалних жена (4), такође смањује ризик од инвазивног карцинома дојке у периоду постменопаузе (1). Ралоксифен на коштаном ткиву имитира естрогенски ефекат, док на дојку и утерус тај ефекат је антиестрогенски (1). Студије под називом Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR и RUTH) показале су да је Ралоксифен најсличнији дејству Тамоксифена, са предношћу да Ралоксифен смањује учесталост појаве инвазивног карцинома дојке, смањује учесталост тромбоемболијских обољења, катаракти и карцинома утеруса (5). Студија RUTH / Raloxifene Use for The Heart испитивала је ефекат Ралоксифена на кардио-васкулаторне поремећаје у постменопаузалном периоду, резултати су показали да Ралоксифен у поређењу са плацебом не утиче значајно на смањење кардио-васкулаторних поремећаја жена али смањује ризик од настанка карцинома дојке (5). С обзиром да Ралоксифен модификује естрогенске рецепторе, испитаћемо ефекат Ралоксифена на цитотоксичност Метотрексата и Миотрексата у ћелијским линијама миома материце хуманог порекла.

Предмет и опис истраживања:

задачи, методологија, очекивани резултати

Хумани фибробласти пореклом из ендометријума утеруса, иморталисани хуманом теломераза реверзибилном транскриптазом (hTERT) тј. Т HESC ћелијска линија (ATCC®: CRL-4003™). Ћелије ће бити узгајане у DMEM-у обогаченим са: л-глутамином, 1% неесенцијалним аминокиселинама, 1% ITS-ом, penicillin-streptomycin-ом и 10% FBS -ом. Ћелијске линије биће инкубиране на 37 C° у атмосфери 5 % CO₂. Од методолошких приступа у нашем истраживању биће коришћени: Facs анализа – анексин (за испитивање апоптозе), МТТ тест (за испитивање цитотоксичности), Western blot (детекција апоптоичних и антиапоптоичних протеина), имунофлуоресенција (детекција и визуализација апоптоичних и антиапоптоичних протеина, естрогенских рецептора и једра).

МТТ тест цитотоксичности

Ефекат испитиваних супстанција на ћелијску вијабилност биће утврђиван МТТ колориметријском техником. Ћелије ће бити ресуспендоване у медијуму и распоређиване у бунарчиће 96-микротитар плоче, тако да број ћелија у сваком од њих буде подједнак. Ћелије ће потом бити третиране испитиваним супстанцијама (Ралоксифен, Метотрексат, Миотрексат, Естроген) па инкубиране МТТ солуцијом 4 h на температури 37 C° у атмосфери 5% CO₂. Након центрифугирања и отклањања супернатанта, ћелијама ће се додавати 200 µl DMSO-а, по бунарчићу, и биће вршена инкубација реакционе смеше 30 минута на собној температури (25 C°) уз константно мешање на шејкеру. Оптичка густина (OD) биће одређивана на таласној дужини 595 nm.



ANNEXIN V- FITC тест апоптотичности

Ћелије ће бити третиране испитиваним супстанцијама, потом ће бити опране 2 пута хладним PBS-ом и ресуспендоване у binding buffer-у. У 100 μ l ове солуције биће додато 5 μ l Annexin V-FITC и 5 μ l ПИ, инкубација 15 минута на собној температури (25 $^{\circ}$ C), у мраку. Након додавања 400 μ l binding buffer-а ћелије ће бити анализирани на FACS-у у року од 1 h.

Флуоресцентна микроскопија

Механизам апоптотичког ефекта одређиван је флуоресцентном микроскопијом. Ћелије су засејане на стерилисаним стакленим љуспицама (cover slips) које су предходно постављене у 24 well plate плочу и инкубирани 24h у инкубатору (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) до достизања конфлуентности од 80%. Ћелије су третиране испитиваним супстанцијама и након 24 h опране у PBS-у, а затим фиксиране. Пермеабилizација ћелија је вршена 10 минута у 0.2% Triton-X/PBS, а затим су ћелије инкубирани 30 минута у blocking buffer-у (10% FCS, 0.1% Triton X-100/ PBS). Ћелије су инкубирани 1 h са различитим анти-зечијим примарним антителима: BAX, BCL-2, caspase-3 и анти-мишијим антителима: cytochrome-c, β -actin, три пута опране у PBS-у и потом инкубирани 1 h на собној температури (25 $^{\circ}$ C), у мраку, са секундарним флуоресцентним антителима: Alexa 488 и Cy3. Флуоресценција ћелија је посматрана на увећању 40X и 100X под конвенционалним микроскопом.

Резултати који су добијени прелиминарним експериментом показали су да ефекат Ралоксифена на THES C ћелијске линије постоји. На основу првих резултата примећено је да Ралоксифен у одређеним дозама у различитим временским интервалима испољава супротни ефекат, цитотоксични и пролиферативни. Добијени резултати су у корелацији са литературним подацима који описују ефекат Ралоксифена на другим ћелијским линијама.

WESTERN BLOT метода

Ова метода се користи за детекцију протеина који су предмет истраживања. Метода се заснива на кретању протеина кроз SDS page гел под утицајем струјног кола. Након проласка протеина кроз гел, врши се њихов трансфер на нитроцелулозну мембрану. Потапањем мембране у блокинг буфер врши се блокирање протеина. Примарно антитело за испитивани протеин се прави у одређеном разблажењу у раствору blocking buffer. Мембрана треба да буде потопљена у примарном антителима преко ноћи на +4 степена. Након тога врши се испирање мембране 1X PBST 3 пута у трајању од по 10 минута на шејкеру. Након испирања, ставља се секундарно антитело које стоји 4 сата. Мембрана се опет испира и коришћењем раствора врши се детекција и визуализација протеина од интереса. Добијени резултати се анализирају коришћењем Image J софтвера који одређује интензитет појединачног бенда. Добијени резултати се тумаче у односу на контролни узорак.



Значај истраживања

Испитивање и упоређивање ефекта Ралоксифена и осталих испитиваних супстанци на ефикаснији цитотоксични ефекат ћелијских линија миома материце.

Још један од значаја овог истраживања јесте испитивање начина антипролиферативног дејства Ралоксифена на ћелијске линије.

Временски оквир

Планирани временски оквир за ово истраживање је годину дана. Сви експерименти биће спроведени на Институтима Медицинског факултета у Крагујевцу.

Литература

1. Adolfo Diez-Perez, Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMS), *Arq Bras Endocrinol Metab* Vol 50 No 4, 2006
2. Gordon P. Flake, Janet Andersen and Darlene Dixon, Etiology and Pathogenesis of Uterine Leiomyomas: A Review *Environmental Health Perspectives* • Volume 111, Number 8, 2003
3. Živanović A, Arsenijević S, Janković S, Jevremović M. Methotrexat in the therapy of uterus leiomyomas. *Archive of Oncology* 1998; 6(3): 95-7.
4. Jin Liu, Hiroya Matsuo, Qin Xu, Wei Chen, Jiayin Wang and Takeshi Maruo Concentration-dependent effects of a selective estrogen receptor modulator raloxifene on proliferation and apoptosis in human uterine leiomyoma cells cultured in vitro *Human Reproduction* Vol. 22, No. 5 pp. 1253–1259, 2007
5. Karen A. Johnson, The SERM of My Dreams, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006 91: 3754-3756
6. Mika Gushima, Hisaya Kawatea, Keizo Ohnaka, Masatoshi Nomura, Ryoichi Takayanagi, Raloxifene induces nucleolar translocation of the estrogen receptor, *Molecular and Cellular Endocrinology* 319 (2010) 14–22
7. Palomba S, Orio F, Russo T, Falbo A, Tolino A, Lombardi D, Cimini Vand Zullo F, Antiproliferative and proapoptotic effects of raloxifene on uterine leiomyomas in postmenopausal women. *Fertil Steril* (2005) 84, 154–161.
8. Rajagopalan, P. T. Ravi; Zhang, Zhiquan; McCourt, Lynn; Dwyer, Mary; Benkovic, Stephen J.; Hammes, Gordon G. (2002). "Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: Ensemble and single-molecule kinetics". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (21): 13481–6