

Streszczenie

Skażenie środowiska związkami zaburzającymi funkcje endokrynne (EDCs; ang - endocrine disrupting chemicals) stanowi jeden z globalnych problemów XXI wieku. Szczególny niepokój budzi zdolność akumulacji tych związków w organizmach żywych nawet przez kilkanaście lat, co klasyfikuje je jako trwale zanieczyszczenia środowiska (POPs; ang – persistent organic pollutants). Badania epidemiologiczne dowodzą obecności poszczególnych EDCs w płynie pęcherzykowym jajnika kobiet poddanych zapłodnieniu IVF (ang – in vitro fertilization), wskazując na możliwość oddziaływania parakrynnego przyczyniającego się do zaburzeń funkcji jajnika. Do EDCs oznaczonych w najwyższym stężeniu w płynie pęcherzykowym jajnika zaliczane są 1) związki perfluorowane: kwas perfluoroktanowy (PFOA) i sulfonian perfluorooktanu (PFOS), 2) pestycydy: 2,2-dichlorodifenylodichloroetylen (p,p'-DDE) i heksachlorobenzen (HCB) oraz 3) polichlorowane bifenyle (PCB153). W aspekcie progresji nowotworowej alarmująca wydaje się być pozytywna korelacja pomiędzy skażeniem środowiska a zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwory hormonozależne do których zaliczane są ziarniszczeniaki jajnika.

Nowotwór jajnika określany jest jako cichy zabójca ze względu na brak występowania specyficznych objawów oraz wysoką śmiertelność. Do czynników ryzyka zaliczane są m.in. hormony m.in. 17 β -estradiol (E2), a także zanieczyszczenia środowiska; głównie EDCs. Ziarniszczeniaki jajnika wywodzące się z komórek ziarnistych jajnika stanowią około 5% wszystkich nowotworów tego narządu. Ze względu na cechy morfologiczne oraz molekularne a także wiek występowania choroby wyróżnia się typ młodzieńczy (JGCT), charakteryzujący się zdolnością do wydzielania dużych ilości E2 oraz typ dojrzały (AGCT) z występującymi formami agresywnymi oraz pojawiającymi się nawrotami choroby. Jako model badawczy na potrzeby niniejszej rozprawy doktorskiej wybrano ludzką linię komórkową COV434 reprezentującą JGCT oraz linię KGN odpowiadającą AGCT hodowane w postaci sferoidów w warunkach trójwymiarowych (3D).

Obecność receptorów estrogenowych (ER α , ER β , GPR30), gonadotropin (FSHR i LHR) oraz receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF1R) w ziarniszczeniakach jajnika, a także wykazana w prowadzonych dotychczas badaniach zdolność wiązania poszczególnych EDCs jako agoniści lub antagoniści tych receptorów, czyni ziarniszczeniaki jajnika miejscem docelowym działania tych związków. Warto zaznaczyć, że człowiek narażony jest na mieszaninę wielu EDCs. Dlatego, na podstawie przytoczonych argumentów zasadne było określenie wpływu mieszaniny EDCs występującej w płynie pęcherzykowym jajnika na progresję ziarniszczeniaków jajnika analizując proliferację, inwazję i sekrecję E2 oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF1).

Zrealizowane badania dostarczyły informacji o proliferacyjnym działaniu mieszanin EDCs oraz pojedynczych związków wchodzących w skład mieszaniny w obu typach ziarniszczeniaka jajnika, jednak obserwowany efekt był niższy niż szacowany na podstawie wyników dotyczących pojedynczych

związków. Ponadto scharakteryzowano poziom ekspresji receptorów w komórkach linii COV434 i KGN wykazując, iż dojrzały typ ziarniszcza jajnika posiada wyższą ekspresję genów klasycznych receptorów estrogenowych ESR1, ESR2 i receptora IGF1R niż typ młodzieńczy. Zaobserwowany wzrost ekspresji GPR30 oraz IGF1R po ekspozycji na badaną mieszaninę, a także analizy z zastosowaniem inhibitora oraz wyciszeniem genów dla tych receptorów dowiodły o roli ścieżek sygnałowych GPR30 i IGF1R w proliferacyjnym działaniu mieszaniny EDCs. Dodatkowo narażenie na mieszaninę zwiększało poziom cAMP oraz fosforylację ERK1/2 i Akt potwierdzając otrzymane wcześniej wyniki. Ponadto dowiedziono, że p,p'-DDE wiąże się do receptora GPR30, natomiast PFOA, PFOS i HCB są ligandami receptora IGF1R, co wyjaśnia działanie mieszaniny poprzez aktywację tych receptorów.

Następnie określono różnice w zdolnościach migracyjnych oraz inwazyjnych dwóch typów ziarniszcza jajnika, wykazując mezenchymalny fenotyp dojrzałego typu ziarniszcza jajnika posiadającego potencjał migracyjny oraz inwazyjny, w porównaniu do typu młodzieńczego, który nie jest zdolny do migracji oraz inwazji. Ponadto, mieszaniny EDCs poprzez wzrost ekspresji oraz aktywności metaloproteiny 2 (MMP2), zwiększały obszar migracji oraz inwazji komórek linii KGN. Interesujące okazały się wyniki badań z wykorzystaniem endotelialnych komórek limfatycznych, dowodzące zwiększenie zdolności do przechodzenia komórek dojrzałego typu ziarniszcza jajnika przez naczynia limfatyczne. W celu zobrazowania molekularnego mechanizmu inwazyjnego działania mieszaniny zastosowano inhibitor oraz wyciszenie genu dla receptora IGF1R, które znosiły stymulujące działanie mieszaniny w procesach migracji oraz inwazji. Ponadto zwiększenie fosforylacji IGF1R obserwowane po ekspozycji na mieszaninę potwierdziło aktywację ścieżki receptora IGF1R i jego rolę w tym procesie. Otrzymane wyniki udowodniły, że mieszanina EDCs poprzez wpływ na proliferację oraz inwazję bezpośrednio przyczynia się do progresji tego nowotworu.

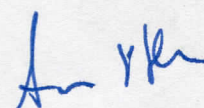
W kolejnych analizach skupiono się na działaniu pośrednim badanej mieszaniny na progresję ziarniszcza jajnika. Celem tych badań było określenie wpływu badanej mieszaniny na wydzielanie E2 i IGF1. Wykazano, że dojrzały typ posiada zarówno wyższą sekrecję E2 jak i ekspresję enzymu aromatazy (CYP19A1) w porównaniu do typu młodzieńczego. Ponadto, zastosowanie mieszaniny stymulowało wydzielanie E2 w komórkach dojrzałego typu ziarniszcza jajnika angażując w swoje działanie zarówno klasyczne jak i nieklasyczne receptory estrogenowe. Odmiennie, w komórkach typu młodzieńczego, który scharakteryzowano jako typ z wyższym potencjałem metabolicznym E2, zaobserwowano zmniejszenie wydzielanego poziomu E2 na korzyść jego metabolitów.

Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej, dostarczyły także informacji na temat zdolności do sekrecji IGF1 przez oba typy ziarniszcza jajnika. Co ciekawe poziom wydzielanego IGF1 był wyższy w dojrzałym typie ziarniszcza jajnika, cechującym się gorszymi rokowaniami. Otrzymane wyniki pokazują stymulację sekrecji oraz ekspresji IGF1 z równoczesnym

obniżeniem ekspresji białka wiążącego IGF1 (IGFBP3) po ekspozycji na mieszaninę EDCs w komórkach linii KGN, natomiast nie zaobserwowano wpływu badanej mieszaniny na poziom wydzielanego IGF1 w komórkach linii COV434. Analizując mechanizm molekularny wykazano zaangażowanie ścieżki sygnałowej receptora ER α . Szczególnie ciekawe wydają się być badania obrazujące, iż zwiększony poziom wydzielanego IGF1 przez komórki AGCT przyczynia się do proliferacji prawidłowych komórek ziarnistych jajnika. Przeprowadzone badania dostarczają zatem dowodów, że mieszanina EDCs poprzez zaburzenia sekrecji E2 i/lub IGF1 w ziarniszczykach jajnika przyczynia się pośrednio do ich progresji.

Reasumując wyniki otrzymane w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że mieszanina EDCs oznaczona w płynie pęcherzykowym jajnika przyczynia się do progresji tego nowotworu, jednak wykazuje odmienne działanie w dojrzałym typie ziarniszczyka jajnika w porównaniu do typu młodzieńczego. W typie dojrzałym, mieszanina stymulując proliferację oraz inwazję, bezpośrednio prowadzi do progresji tego nowotworu, cechującego się gorszymi rokowaniami oraz występowaniem form agresywnych. Ponadto działa w sposób pośredni, zwiększając wydzielanie E2 oraz czynnika mitogennego IGF1, przez co może być również zaangażowana w powstawanie zaburzeń towarzyszących temu nowotworowi, takich jak hiperplazje, endometrioza oraz rak endometrium. Inaczej, mieszanina wpływa na młodzieńczą formę ziarniszczyka jajnika. Jej zdolność do stymulacji proliferacji jest znacznie niższa, prawdopodobnie przez niższą ekspresję receptorów estrogenowych: ER α , ER β oraz receptora IGF1R. Jednak nie należy pomniejszać jej oddziaływania w tym typie nowotworu, gdyż, zmniejszenie sekrecji E2, może przyczynić się do maskowania lub braku występowania wczesnych objawów prowadząc tym samym do późniejszej diagnozy tego nowotworu, co wiąże się z gorszym rokowaniem.

Co warto podkreślić, określenie molekularnych mechanizmów działania mieszaniny poprzez różne ścieżki sygnałowe a także poznanie różnic w biologii dwóch typów ziarniszczyków jajnika, jest ważnym punktem w aspekcie zrozumienia patologii oraz opracowywania nowych metod leczenia tych nowotworów.



Streszczenie w języku angielskim

Environmental contamination with endocrine disrupting chemicals (EDCs) is one of the global problems of the 21st century. One cause for particular concern is the ability of these compounds to accumulate in living organisms even for several years, which classifies them as persistent organic pollutants (POPs). Epidemiological studies demonstrate the presence of individual EDCs in the ovarian follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF), suggesting a possible paracrine effect contributing to ovarian dysfunction. The EDCs determined in the highest concentration in ovarian follicular fluid include 1) perfluorinated compounds: perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS), 2) pesticides: 2,2 – dichlorodiphenyl dichloroethylene (p,p'-DDE) and hexachlorobenzene (HCB) and 3) polychlorinated biphenyls (PCB153). In the aspect of cancer progression, positive correlation between environmental contamination and increased risk of hormone-dependent cancers, such as ovarian granulosa cell tumors, seems alarming.

Ovarian cancer is referred to as a silent killer due to its lack of specific symptoms and high mortality rate. Risk factors include hormones such as 17 β -estradiol (E2), as well as environmental pollutants; mostly EDCs. Ovarian granulosa cell tumors originating from granulosa cells of the ovary account for approximately 5% of all ovarian cancers. Due to the morphological and molecular features as well as the age of onset of a disease, a distinction is made between the juvenile type (JGCT), characterized by the ability to secrete large amounts of E2, and the adult type (AGCT) with aggressive and relapsing forms of the disease. The human COV434 cell line representing JGCT and the KGN cell line corresponding to AGCT cultured as spheroids under three-dimensional (3D) conditions were chosen as the research model for this doctoral thesis.

The presence of estrogen receptors (ER α , ER β , GPR30), gonadotropins (FSHR and LHR) and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) in ovarian granulosa cell tumor and the binding ability of particular EDCs as agonists or antagonists of these receptors demonstrated in the present study make ovarian granulosa cell tumors the target site of action of these compounds. It is worth noting that humans are exposed to a mixture of many EDCs. Therefore, based on these arguments, it was reasonable to determine the effect of the mixture of EDCs present in the ovarian follicular fluid on the progression of ovarian granulosa cell tumors by analyzing proliferation, invasion and secretion of E2 and insulin-like growth factor 1 (IGF1).

Completed studies provided information on the proliferative effect of mixtures of EDCs and single compounds included in the mixture in both types of ovarian granulosa cell tumors, but the observed effect was lower than estimated on the basis of the results for single compounds. Moreover, the expression level of receptors in COV434 and KGN cells was characterized, showing that adult type of ovarian granulosa cell tumors has higher expression of classical estrogen receptors ESR1, ESR2 and IGF1 receptor genes than juvenile type. The observed increase in GPR30 and IGF1R expression after

exposure to the tested mixture as well as analyses with the use of inhibitor and silencing of genes for these receptors proved the role of GPR30 and IGF1R signaling pathways in the proliferative effect of the mixture of EDCs. Additionally, exposure to the mixture increased cAMP levels and ERK1/2 and Akt phosphorylation, confirming the results obtained previously. Moreover, it was proved that p,p'-DDE binds to the GPR30 receptor, whereas PFOA, PFOS and HCB are ligands of the IGF1R receptor, which explains the action of the mixture through activation of these receptors.

Subsequently, differences in migration and invasion abilities of two types of ovarian granulosa cell tumors were determined, demonstrating the mesenchymal phenotype of adult ovarian granulosa cell tumor possessing migration and invasion potential in comparison to the juvenile type, which is not capable of migration and invasion. In addition, mixtures of EDCs by increasing the expression and activity of metalloproteinase 2 (MMP2) increased the migration and invasion area of KGN cell lines. Research results with the use of endothelial lymphoid cells turned out to be interesting and they demonstrated the increased ability of adult type ovarian granulosa cell tumor to pass through lymphatic vessels. In order to visualize the molecular mechanism of invasive action of the mixture, an inhibitor and silencing of the IGF1R receptor gene were used, which abolished the stimulatory effect of the mixture in the processes of migration and invasion. Furthermore, the increase in IGF1R phosphorylation observed after exposure to the mixture confirmed the activation of the IGF1R receptor pathway and its role in this process. The obtained results proved that the mixture of EDCs by affecting proliferation and invasion directly contributes to the progression of this cancer.

Subsequent analyses focused on the indirect effect of the mixture on the progression of ovarian granulosa cell tumors. The purpose of this study was to determine the effect of the test mixture on E2 and IGF1 secretion. It has been shown that the adult type has both higher E2 secretion and aromatase enzyme (CYP19A1) expression compared to the juvenile type. Moreover, application of the mixture stimulated E2 secretion in adult ovarian granulosa cell tumor, involving both classical and non-classical estrogen receptors. In contrast, in cells of the juvenile type, which was characterized as the type with higher metabolic potential of E2, a decrease in the secreted level of E2 in favor of its metabolites was observed.

The studies presented in this dissertation also provided information on the ability to secrete IGF1 by both types of ovarian granulosa cell tumors. Interestingly, the level of secreted IGF1 was higher in adult type of ovarian granulosa cell tumor characterized by worse prognosis. The obtained results show stimulation of secretion and expression of IGF1 with concomitant decrease in IGF1 binding protein (IGFBP3) expression after exposure to EDCs mixture in KGN cells, whereas no effect of the tested mixture on the level of secreted IGF1 was observed in COV434 cells. Analysis of the molecular mechanism demonstrated the involvement of the ER α receptor signaling pathway. Studies showing that increased level of secreted IGF1 by AGCT cells contribute to the proliferation of normal ovarian

granulosa cells seem to be particularly interesting. Thus, this study provides evidence that a mixture of EDCs, by disturbing E2 and/or IGF1 secretion in ovarian granulosa cell tumors, indirectly contributes to their progression.

In summary, the results obtained in this study demonstrate that the mixture of EDCs determined in ovarian follicular fluid contributes to ovarian cancer progression, but has a different effect in the adult type of ovarian granulosa cell tumor compared with the juvenile type. In the adult type the mixture stimulating proliferation and invasion directly leads to the progression of this cancer, characterized by worse prognosis and occurrence of aggressive forms. In addition, it acts indirectly by increasing the secretion of E2 and the mitogenic factor IGF1, and thus may also be involved in the formation of associated disorders such as hyperplasia, endometriosis, and endometrial cancer. Otherwise, the mixture affects the juvenile form of ovarian granulosa cell tumor. Its ability to stimulate proliferation is much lower, probably due to lower expression of estrogen receptors: ER α , ER β and IGF1R receptor. However, its effect should not be underestimated in this type of cancer, as decreased E2 secretion may contribute to masking or absence of early symptoms leading to later diagnosis of this cancer, which is associated with poorer prognosis.

It is worth emphasizing that identification of molecular mechanisms of action through different signaling pathways and understanding the differences in biology of two types of ovarian granulosa cell tumors is an important point in terms of understanding the pathology and developing new methods of treatment of these tumors.

