

Streszczenie

Jajnik ssaków jest parzystym gruczołem rozrodczym umiejscowionym wewnątrz jamy otrzewnej. Ze względu na morfologię i funkcję składa się z dwóch głównych stref: kory i rdzenia. Kora zbudowana jest z tkanki łącznej, w której znajdują się pęcherzyki jajnikowe w różnych stadiach rozwojowych. Jest też źródłem różnych populacji dorosłych komórek macierzystych (ASCs).

Domniemane komórki macierzyste (PSCs) to heterogenna populacja drobnych i okrągłych ASCs z jądrem wypełniającym prawie całą komórkę. PSCs zostały wyizolowane immunomagnetycznie względem epitopów SSEA-4 i CD34 z kory jajnika trawionej enzymatycznie. Jednak w toku badań, ze względu na profil ekspresji markerów typowych dla komórek macierzystych wybrano PSCs izolowane wyłącznie względem epitopu SSEA-4. Charakterystyka fenotypowa uzyskanych komórek PSC SSEA-4⁺ wykazała, ekspresję markerów multipotencjalnych, mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs) przy braku specyficznej ekspresji kluczowych markerów pluripotencji. Ponadto w hodowli *in vitro* PSCs SSEA-4⁺ tworzyły typowe dla komórek macierzystych skupiska przypominające ciała embrioidalne. PSCs SSEA-4⁺ różnicowały się w komórki układu nerwowego pod wpływem związków takich jak forskolina, kwas retinowy i bFGF. Ekspresja nestyny i NeuN świadczy o zróżnicowaniu PSCs SSEA-4⁺ w komórki podobne do neuronów, a ekspresja GFAP dowodzi, że niektóre z nich zróżnicowały się również w głąz. Dodatkowo analiza aktywności kanałów jonowych patch clamp potwierdziła, że w wyniku różnicowania otrzymano komórki, które elektrofizjologicznie zachowują się jak neurony. PSCs SSEA-4⁺ różnicowano także w śródbłonek naczyń przy pomocy czynników wzrostu m. in. bFGF, VEGF, R3-IGF-1 oraz hEGF. Analizy charakterystycznych dla śródbłonka naczyń markerów takich jak VE-kadheryna i VEGFR dowodzą, że uzyskane komórki rzeczywiście są komórkami śródbłonka. Potwierdzają to również testy funkcjonowania komórek. Zarówno w teście migracji jak i teście tworzenia naczyń uzyskano pozytywne wyniki.

Steroidy anaboliczne są wciąż powszechnie stosowane w masowej hodowli zwierząt gospodarskich oraz nielegalnie stosowane tak przez sportowców, jak i amatorów, pomimo, że są uznawane za związki potencjalnie rakotwórcze. W niniejszej pracy badano wpływ wybranych steroidów anabolicznych (boldenon i nandrolon) na PSCs SSEA-4⁺. Boldenon i nandrolon mają silne działanie anaboliczne oraz słabe działanie androgenowe prawdopodobnie przez receptor androgenowy (AR). Dodatkowo

nandrolon jest silnym progestagenem, przez co jeszcze silniej może zaburzać funkcjonowanie żeńskiego układu rozrodczego. PSCs SSEA-4⁺ hodowano *in vitro* w obecności obu steroidów oddzielnie przez 7 i 14 dni. Zarówno po 7 jak i 14 dniach oba związki indukowały podwyższoną ekspresję białek CD44 i CD133, których nadekspresja jest charakterystyczna dla macierzystych komórek nowotworowych (CSC) oraz nowotworów jajnika.

Izolowane immunomagnetycznie PSCs SSEA-4⁺ mają charakter multipotencjalnych MSCs. Z powodzeniem mogą być różnicowane w różne komórki układu nerwowego oraz w komórki śródbłónka naczyń. Dodatkowo są podatne na działanie innych związków endokrynnie czynnych w tym steroidów anabolicznych, które mogą potencjalnie kierować PSCs SSEA-4⁺ na drogę kancerogenezy.



Summary

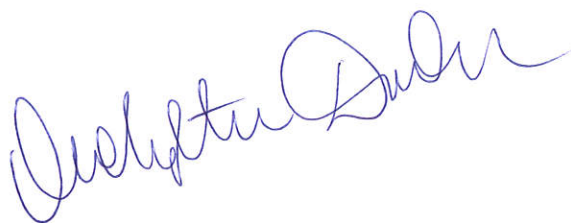
Mammalian ovaries are the twin reproductive glands located inside the peritoneal cavity. According to morphology and function, the ovaries consists of two main zones: the cortex and the core. The ovarian cortex is made up of connective tissue with follicles at various stages of development. It is also a source of different adult stem cell (ASCs) populations.

Putative stem cells (PSCs) are a heterogeneous population of tiny and round ASCs with a nucleus that fills almost the entire cell. PSCs were immunomagnetically isolated due to the presence of SSEA-4 and CD34 epitopes from the ovarian cortex which was enzymatically digested. Based on the expression of stem cells (SCs) markers, for further experiments we chose PSCs isolated only for the presence of the SSEA-4 epitope. Characterization of the PSCs SSEA-4⁺ phenotype revealed the expression of multipotent, mesenchymal stem cell (MSCs) markers. In contrast, PSCs SSEA-4⁺ do not show specific expression of key pluripotency markers. In addition, PSCs SSEA-4⁺ cultured *in vitro* formed aggregates which are similar to embryonic bodies typical of SCs. PSCs SSEA-4⁺ differentiated into cells of the nervous system with compounds such as forskolin, retinoic acid and bFGF. Expression of nestin and NeuN indicates the differentiation of PSCs SSEA-4⁺ into neuron-like cells, whereas expression of GFAP proves that part of the PSCs SSEA-4⁺ also differentiated into glial cells. Moreover analysis of the activity of ionic channels by the patch clamp method confirmed that as a result of differentiation, cells that electrophysiologically behave like neurons were obtained. PSCs SSEA-4⁺ were also differentiated into the vascular endothelium using growth factors such as bFGF, VEGF, R3-IGF-1 and hEGF. Analysis of characteristic endothelial markers such as VE-cadherin and VEGFR shows that the cells obtained are indeed endothelial cells. This is also confirmed by cell functioning tests. In both the migration test and the vascular test, positive results were obtained.

Anabolic steroids are still widely used in the industrial livestock breeding and illegally used, both by athletes and amateurs, although they are considered to be potentially carcinogenic. This work investigated the effect of selected anabolic steroids (boldenone and nandrolone) on PSCs SSEA-4⁺. Boldenone and nandrolone are probably to have a strong anabolic effect and weak androgenic effects via the androgen receptor (AR). In addition, nandrolone is a strong progestogen, which may even more actively affect the functioning of the female reproductive system. PSCs SSEA-4⁺ were cultured *in vitro* in the presence of both

steroids separately for 7 and 14 days. After that time both compounds contributed to the increased expression of CD44 and CD133 proteins, whose overexpression is characteristic of cancer stem cells (CSCs) and ovarian tumors.

Immunomagnetically isolated PSCs SSEA-4⁺ are multipotent MSCs. They can be successfully differentiated into various cells of the nervous system and endothelial cells. Moreover PSC SSEA-4⁺ are susceptible to other endocrine compounds, including anabolic steroids, which may potentially direct PSC SSEA-4⁺ into carcinogenesis.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Dushita Dahiya", is located in the lower right quadrant of the page.