

Do oceny aktywności metabolicznej komórek oraz potencjału proliferacyjnego zostały zastosowane testy: AlamarBlue oraz wbudowania bromodeoksyurydyny (BrdU). Zmiany w ekspresji genów zmierzono za pomocą metody łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR), natomiast zmiany w ilości białka oznaczono za pomocą metody Western blot. Pomiar aktywności kaspazy-3 został przeprowadzony zgodnie z metodą Nicholsona i współpracowników (1995). Pomiar stężenia estradiolu wykonano za pomocą metody ELISA z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów. Aktywność deacetylaz histonów określono fluorymetrycznie za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu.

Przeprowadzone badania wykazały zależne od typu nowotworu różnice w poziomie ekspresji genu receptora leptyny (*ObR*) w komórkach epitelialnych jajnika. Najniższą ekspresją charakteryzowała się linia komórek prawidłowych HOSEpiC oraz linia nowotworowa SK-OV-3. Wyższą ekspresję genu *ObR* zanotowano w linii komórkowej nowotworu jajnika jasnokomórkowego: TOV-21G. Najwyższą ekspresją charakteryzowały się linie CaOV-3 oraz OVCAR-3. Zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych zaobserwowano obecność długiej i krótkiej izoformy receptora leptyny. Leptyna w dawce notowanej w osoczu osób otyłych stymulowała proliferację komórek linii nowotworowych CaOV-3 oraz OVCAR-3, efekt ten nie był obserwowany w linii HOSEpiC. Wykazano hamujący wpływ antagonistów receptora leptyny, SHLA i Lan2, na leptyną stymulowaną proliferację komórek nowotworowych linii CaOV-3 oraz OVCAR-3. Jako mechanizm hamowania proliferacji przez antagonistów receptora leptyny, wskazano wpływ na obniżenie poziomu ekspresji genów i białek zaangażowanych w cykl komórkowy, takich jak kinazy cyklino-zależne: Cdk2 i Cdk4, jak również obniżenie poziomu fosforylacji białka STAT-3 oraz kinazy Akt uczestniczących w transdukcji sygnału leptynowego.

Dodatkowo wykazano stymulacyjny wpływ leptyny na poziom ekspresji genów deacetylaz histonów *HDAC1*, *HDAC7* i *HDAC9* w linii OVCAR-3, jak również ekspresji białka *HDAC1* w komórkach CaOV-3 oraz *HDAC4-5* w linii OVCAR-3. Antagonista SHLA obniżał poziom ekspresji genów *HDAC1*, *HDAC4-6* i *HDAC9* w komórkach OVCAR-3 oraz *HDAC4* w linii CaOV-4. Najwyższą aktywność deacetylaz histonów zanotowano w linii komórek opornych na chemioterapię: OVCAR-3. Nie wykazano natomiast wpływu zarówno leptyny jak i antagonistów *ObR* na aktywność deacetylaz histonów.

Również w przypadku linii komórek wywodzących się z warstwy ziarnistej obecność krótkiej i długiej formy *ObR* wykazano zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych z wyższym poziomem ekspresji receptora leptyny w komórkach nowotworowych (linie COV434 oraz KGN) niż w komórkach prawidłowych (HGrC1).

Stymulacyjny wpływ leptyny na proliferację komórek zanotowano w przypadku linii nowotworowych i nienowotworowych. Zarówno SHLA, jak i Lan2 hamował proliferację komórek obu linii nowotworowych, podczas gdy Lan1 wykazał podobne działanie jedynie w komórkach linii KGN. Bloker SHLA najefektywniej hamował leptyną stymulowaną proliferację w linii HGrC1. Podobnie jak w komórkach wywodzących się z warstwy nabłonkowej wykazano zahamowanie ekspresji cykliny D, Cdk2 i Cdk4. Zanotowano wyższą ekspresję ER α w komórkach nowotworowych a ER β w linii prawidłowej. Lan1 w linii COV434 i wszyscy trzej stosowani antagoniści w linii KGN obniżali ekspresję ER α . Ponadto wykazano hamujący wpływ Lan2 na leptyną stymulowaną sekrecję estradiolu w linii HGrC1 oraz KGN.

Określając możliwość działania antagonistów receptora leptyny, jako inhibitorów deacetylaz histonów, wykazano wyższą aktywność deacetylaz histonów w komórkach linii KGN niż w linii COV434 oraz stymulujący wpływ leptyny na ekspresję *HDAC5* - 7 w linii COV434 i *HDAC9* w linii KGN. Zarówno SHLA, jak i Lan2 obniżali ekspresję genów *HDAC1* w COV434 oraz *HDAC7* i *HDAC9* w komórkach KGN. Ponadto Lan2 obniżał poziom białka *HDAC5* i *HDAC9* w komórkach COV434.

Na podstawie otrzymanych wyników badań sugeruje się, że zastosowani antagoniści receptora leptyny hamują proliferację komórek nowotworowych wywodzących się zarówno z nabłonka jajnika, jak i warstwy ziarnistej poprzez obniżenie poziomu ekspresji genów i białek cyklu komórkowego, jak również poprzez zahamowanie ścieżek sygnalizacyjnych uruchamianych przez leptynę. Wykazano, że w komórkach ziarnistych wybrani antagoniści ObR powodują zmiany w stosunku ekspresji receptora estrogenowego na korzyść formy β , która dominuje w komórkach nienowotworowych. Dodatkowo sugeruje się, że antagoniści receptora leptyny obniżają ekspresję wybranych deacetylaz histonów, wykazując potencjalne korzyści działania na poziomie epigenetycznym. W związku z powyższym, antagoniści receptora leptyny mogą być brani pod uwagę jako związki potencjalnie terapeutyczne we wspomaganiu leczenia nowotworów jajnika wywodzących się z warstwy komórek nabłonkowych i ziarnistych.


Prof. dr hab. E. L. Gregoraszczyk

Rodpis promotora pracy