

Streszczenie w języku polskim

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) stanowiące liczną grupę związków zawierających od dwóch do kilku, a nawet kilkunastu pierścieni aromatycznych w cząsteczce, zaliczane są do trwałych zanieczyszczeń organicznych, które charakteryzują się tendencją do bioakumulacji i długim okresem półtrwania w środowisku. Badania epidemiologiczne ostatnich lat wskazują na silną korelację pomiędzy stopniem ekspozycji na WWA a licznymi chorobami cywilizacyjnymi. Szczególnie narażone są osoby starsze, dzieci i kobiety w ciąży. Ekspozycja w okresie ciąży wiąże się z ryzykiem zaburzeń wzrostu płodu jak i przedwczesnych porodów. Co więcej, WWA ze względu na zdolność do wiązania się ze strukturą DNA w komórkach łożyska i działaniem mutagennym prowadzą do zaburzeń funkcji łożyska, co w konsekwencji zwiększa ryzyko samoistnych poronień we wczesnym okresie ciąży.

Biorąc pod uwagę fakt, że istniejące badania dotyczą głównie działania benzo(a)pirenu (BaP) i brak danych na temat wpływu realnie występujących mieszanin WWA, celem prezentowanej pracy doktorskiej było określenie cytotoksycznego działania wybranych WWA lub ich mieszanin, w stężeniach obserwowanych we krwi matki i tkance łożyska oraz ich wpływ na cykl komórkowy, proliferację, apoptozę, funkcje endokrynne i metaboliczne komórek ludzkiego łożyska.

W badaniach wykorzystano 2 modele badawcze: 1) monokultury linii komórkowych wywodzących się z raka kosmówki: JEG-3 i BeWo oraz 2) kokultury tych komórek z komórkami linii nadnerczy H295R, odzwierciedlające działanie jednostki płodowo-łożyskowej.

Wykorzystując hodowle monokulturowe komórek linii łożyska, zbadano wpływ pojedynczych WWA (naftalen, fenantren, antracen i piren w dawkach z krwi matki i dawkach oznaczanych w łożysku) oraz ich mieszanin (Mix I: suma stężeń naftalenu, fenantrenu, antracenu oraz pirenu w dawkach obserwowanych w krwi matki; Mix II: suma stężeń naftalenu, fenantrenu, antracenu oraz pirenu w dawkach obserwowanych w tkance łożyska) na 1) poziom cytotoksyczności mierzonej za pomocą testów z wykorzystaniem dehydrogenazy mleczanowej LDH (z *ang. lactate dehydrogenase*), kwaśnej fosfatazy AP (z *ang. acid phosphatase*) oraz XTT; 2) zmiany w potencjale proliferacyjnym komórek mierzone za pomocą testu AlamarBlue; 3) zmiany w ekspresji białek zaangażowanych w cykl komórkowy i apoptozę (cyklina A1, cyklina D2, cdk2, cdk4, Bax, Bcl-x1, kaspaza-3) (Western blotting); 4) zmiany w poziomie wydzielanych hormonów steroidowych, progesteronu (P4) oraz estradiolu (E2) mierzonych za pomocą testów ELISA a także enzymów zaangażowanych w steroidogenezę 3 β HSD (dehydrogenaza 3 β hydroksysteroidowa) oraz CYP19 (P450 aromataza) metodą Western blottingu. Dodatkowo w celu określenia mechanizmu działania WWA oceniono wpływ dwóch mieszanin 16 znacznikowych WWA (Mix I: suma 16 znacznikowych WWA w stężeniach obserwowanych we krwi matki; Mix II: suma 16 znacznikowych WWA w stężeniach obserwowanych w tkance łożyska) na ekspresję receptora węglowodorów

aromatycznych (AhR), czynnika transkrypcyjnego (NF- κ B), receptora estrogenowego alfa (ER α) oraz enzymów zaangażowanych w metabolizm ksenobiotyków (CYP1A1, CYP1B1, COMT) metodą Western blottingu.

Hodowle kokultur natomiast wykorzystano w celu określenia wpływu mieszanin stanowiących sumę wszystkich 16 znacznikowych WWA na sekrecje P4, estronu (E1), E2 i estriolu (E3) metodą ELISA.

Otrzymane wyniki świadczą o tym, że badane pojedyncze WWA nie naruszają integralności błon komórkowych, natomiast wykazują działanie cytotoksyczne na poziomie aktywności enzymów mitochondrialnych i lizosomalnych. Zarówno pojedyncze związki WWA jak i ich mieszaniny obniżały proces apoptozy komórek JEG-3, natomiast w przypadku komórek BeWo działały proapoptotycznie. Ponadto wykazano, że naftalen, fenantren i piren obniżają sekrecję P4 i E2 w monokulturach, natomiast w przypadku hodowli kokultur obserwowano brak wpływu na sekrecję badanych hormonów. Określając mechanizm działania WWA w komórkach łożyska stwierdzono aktywację enzymów I i II fazy metabolizmu za pośrednictwem AhR w komórkach linii JEG-3 i interakcję AhR z NF κ B i ER α skutkującą zahamowaniem detoksykacji w komórkach linii BeWo.

Podsumowując: przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania dostarczają dowodów na specyficzne komórkowo działanie wybranych WWA na proliferację, cykl komórkowy, ekspresja białek apoptotycznych i wydzielanie hormonów. Ponadto potwierdzają „hormesis doses response” czyli większe działanie niskich dawek notowanych w łożysku w porównaniu z dawkami wysokimi notowanymi w krwi matki. Wykazano także specyficzny komórkowo mechanizm działania WWA. Kanoniczne w komórkach JEG-3, poprzez aktywację receptora AhR i enzymów CYP1A1 i CYP1B1, skutkujące uruchomieniem I fazy metabolizmu a co za tym idzie tworzeniem form pośrednich, a w rezultacie stymulującym wpływem na proliferację komórek. Niekanoniczny mechanizm działania w komórkach BeWo, w wyniku interakcji AhR z NF κ B i współdziałaniem pomiędzy receptorami AhR i ER α , co skutkuje zahamowaniem detoksykacji i w rezultacie hamującym wpływem na proliferację komórek.

Wniosek: WWA modulując procesy detoksykacji i wpływając na proliferację, różnicowanie i sekrecje hormonów przez komórki łożyska mogą być odpowiedzialne za obserwowane niewydolności łożyska, co w konsekwencji może prowadzić do poronień czy przedwczesnych porodów.

