

## 1. Streszczenie w języku polskim

---

Badania epidemiologiczne ostatnich lat wskazują na silną korelację pomiędzy stopniem zanieczyszczenia powietrza, a występowaniem licznych chorób cywilizacyjnych. Narażenie kobiet na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) (z ang. *polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs) jest przyczyną zaburzeń płodności z niewyjaśnionych powodów, ale także biorąc pod uwagę udowodnione działanie kancerogenne niektórych WWA, ekspozycja na te związki może również przyczynić się do rozwoju nowotworów hormonozależnych, w tym nowotworu jajnika. Nieliczne, dostępne badania dotyczące skutków działania WWA obejmują narażenie na pojedyncze związki, głównie benzo(a)piren. Niewiele dotyczy mechanizmu ich działania w jajniku. Mechanizm działania WWA obejmuje: 1) mechanizm kanoniczny - receptorowy oraz niekanoniczny - interakcja z innymi ścieżkami sygnalizacyjnymi. Mechanizm kanoniczny związany jest z aktywacją receptora węglowodorów aromatycznych (z ang. *aryl hydrocarbon receptor*, AhR) oraz łączeniem z jądrowym translokatorem receptora AhR (z ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, ARNT), skutkujący aktywacją enzymów metabolizujących WWA. Mechanizm kanoniczny obejmuje również aktywację jądrowego represora receptora AhR (z ang. *aryl hydrocarbon receptor repressor*, AhRR), w konsekwencji czego dochodzi do zahamowania detoksykacji. Mechanizm niekanoniczny obejmuje m. in. interakcję receptora AhR z jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym NF kappa B (z ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-κB) oraz interakcje z receptorami estrogenowymi (z ang. *estrogen receptors*, ER) lub androgenowymi (z ang. *androgen receptors*, AR).

Badania prezentowanej rozprawy doktorskiej skupiły się na określeniu mechanizmu działania realnych dawek mieszanin WWA w prawidłowych oraz nowotworowych komórkach ziarnistych jajnika oraz działaniu ich jako związków hormonalnie czynnych (z ang. *endocrine disrupting chemicals*, EDCs), co w konsekwencji byłoby przyczyną zaburzenia steroidogenezy w komórkach ziarnistych jajnika i jedną z przyczyn zaburzeń płodności z niewyjaśnionych powodów.

Do badań zastosowano dwie mieszaniny: mieszaninę 1 (M1) składającą się z wszystkich 16 znacznikowych, nisko- oraz wysokocząsteczkowych związków oraz mieszaninę 2 (M2) złożoną z 5 niskocząsteczkowych związków oznaczonych w najwyższym stężeniu we krwi kobiet oraz krwi pępowinowej (naftalenu, fenantrenu, antracenu, fluorantenu oraz pirenu). Badania przeprowadzono na linii prawidłowych komórek ziarnistych jajnika (HGrC1) oraz linii nowotworowych komórek ziarnistych jajnika (COV434). Określono wpływ mieszanin na proliferację, aktywność kwaśnej fosfatazy (z ang. *acid phosphatase*, AP) oraz aktywność kaspazy-3, jako enzymu wykonawczego w procesie apoptozy. Ponadto, w celu określenia mechanizmu działania WWA, określono wpływ mieszanin na ekspresję genów i białek zaangażowanych w metabolizm zależny od receptora AhR, interakcje receptora AhR z NF-κB oraz z receptorami ER/AR. Dodatkowo, w celu stwierdzenia działania WWA jako potencjalnych czynników zaburzających funkcje endokrynne w jajniku, określono wpływ mieszanin na sekrecję

estradiolu (z ang. *estradiol*, E2), ekspresję aromatazy cytochromu P450 (z ang. *aromatase cytochrome P450*, P450arom), a także określono udział receptora AhR oraz receptorów estrogenowych pod wpływem mieszanin na sekrecję E2 oraz ekspresję P450arom.

Wykazano: 1) kanoniczny mechanizm działania mieszanin WWA w prawidłowych komórkach ziarnistych jajnika, poprzez aktywację receptora AhR oraz I i II fazy metabolizmu, a w rezultacie stymulujący wpływ mieszanin na proliferację, 2) niekanoniczny mechanizm w nowotworowych komórkach ziarnistych jajnika, wynikający z aktywacji NF- $\kappa$ B oraz represora AhRR pod wpływem M1 (złożonej z nisko- oraz wysokocząsteczkowych WWA) i aktywacji jedynie NF- $\kappa$ B pod wpływem M2 (złożonej z niskocząsteczkowych WWA). Rezultatem tego było zahamowanie detoksykacji. Wykazano również interakcje receptora AhR z receptorem estrogenowym alfa (z ang. *estrogen receptor alfa*, ER $\alpha$ ) pod wpływem obu mieszanin oraz z receptorem AR pod wpływem M2 w nowotworowych komórkach ziarnistych jajnika. Dodatkowo wykazano, że hamujący wpływ mieszanin WWA na steroidogenezę, w prawidłowych komórkach ziarnistych jajnika, był związany nie tylko z dobrze znaną interakcją WWA z klasycznymi receptorami ER, ale także z nieklasycznym, błonowym receptorem sprzężonym z białkiem G dla estrogenów (z ang. *estrogen G protein-coupled receptor 30*, GPR30).

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że nie tylko wysokocząsteczkowe WWA, ale również związki niskocząsteczkowe powinny być brane pod uwagę jako potencjalne związki zaburzające funkcje żeńskiego układu rozrodczego oraz jako związki działające kancerogennie.

Wniosek: WWA zaburzając proces detoksykacji, proliferacji i steroidogenezy w komórkach ziarnistych jajnika mogą być odpowiedzialne za zaburzenia płodności, ale także inicjację i progresję nowotworu jajnika u kobiet żyjących w środowisku o wysokim stopniu narażenia na WWA.

Krzysztof Wójcik



## 2. Streszczenie w języku angielskim

---

Epidemiological studies, of recent years, showed a strong correlation between the degree of air pollution and the occurrence of numerous civilization diseases. It is suggested that exposure of women to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is the reason of unresolved fertility disorders and also, taking into account the proven carcinogenic effects of some PAHs, the reason of hormone-dependent cancers, including ovarian cancer. The few available studies, on the effects of PAHs, include exposure to individual compounds, mainly benzo(a)pyrene. Only few concern the mechanism of their action in ovary. The mechanism of PAHs action includes: 1) canonical - receptor and non-canonical - interaction with other signaling pathways. The canonical mechanism is associated with the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and its connection with the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), resulting in the activation of PAHs metabolizing enzymes. The canonical mechanism also involves activation of the aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR), which results in inhibition of detoxification. The non-canonical mechanism involves the interaction of the AhR receptor with the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) or interaction with estrogen receptors (ER) and androgen receptors (AR).

Studies presented in doctoral dissertation focused on determining the mechanism of action of real life mixtures of PAHs in non-tumor and tumor ovarian granulosa cells. Additionally, determining the action of PAHs mixtures as the endocrine disrupting chemicals (EDCs), which in consequence would be a cause of steroidogenesis disorder in ovarian granulosa cells and one of the causes of fertility disorders of unexplained reasons.

Two cell lines have been used in this study: human nonluteinized granulosa cell line (HGrC1) and human granulosa tumor cell line (COV434). Cells were exposed for two different PAHs mixtures: mixture 1 (M1) consisting of all 16 priority, both low and high molecular weight compounds and mixture 2 (M2) consisting of 5 low molecular weight compounds determined in the highest concentration in maternal blood and cord blood (naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene and pyrene). The effects of mixtures on proliferation, acid phosphatase activity (AP), and caspase-3 activity as an executive enzyme in the process of apoptosis were determined. In addition, effect of mixtures on the expression of genes and proteins involved in AhR-dependent metabolism, interactions of AhR receptor with NF- $\kappa$ B and ER/AR receptors were also determined. In order to determine the endocrine disrupting effect of mixtures, estradiol secretion (E2), expression of aromatase cytochrome P450 (P450arom), and the involvement of the AhR receptor and estrogen receptors in the effect of mixtures on E2 secretion and P450arom expression were determined.

The conducted studies showed: 1) in non-tumor ovarian granulosa cells, canonical mechanism of PAHs mixtures action, by activating the AhR receptor, I and II phase of metabolism, and in consequence stimulatory effect of mixtures on proliferation, 2) in tumor ovarian granulosa cells, non-canonical mechanism of PAHs mixtures action, resulting in the activation of NF- $\kappa$ B and AhRR repressor under the influence of M1 (composed of 16 low and high molecular weight compounds), and activation of only

NF- $\kappa$ B under the influence of M2 (composed of only low molecular weight compounds), resulting in the inhibition of detoxification. In tumor ovarian granulosa cells, interactions of the AhR receptor with estrogen receptor alfa (ER $\alpha$ ) under the influence of both mixtures and the AR receptor under the influence of M2 have also been demonstrated. In addition, it was shown that the inhibitory effect of PAHs mixtures on steroidogenesis in non-tumor ovarian granulosa cells was associated not only with the well-known interaction of PAHs with classic ER receptors, but also with the non-classical, estrogen G protein-coupled receptor 30 (GPR30).

Based on the conducted experiments, it has been shown that not only high molecular weight PAHs, but also low molecular weight compounds should be taken into account as potential compounds disrupting the functions of the female reproductive system and as compounds that have carcinogenic effects.

Conclusion: PAHs mixtures, in real life doses, by disrupting the process of detoxification, proliferation and steroidogenesis in ovarian granulosa cells may be responsible for fertility disorders and also the initiation and progression of ovarian cancer in women living in an environment with high levels of PAHs exposure.

Kendine Kayole  
