

Streszczenie

Rak płuc jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie, zarówno u kobiet jak i mężczyzn. Mimo nieustających postępów w diagnostyce molekularnej i wdrażaniu coraz nowocześniejszych strategii leczenia, co roku stanowi najczęstszą przyczynę śmierci spowodowanej chorobami nowotworowymi u obu płci. Złe rokowania i wysoka umieralność zmuszają do poznania procesów prowadzących do rozwoju tego nowotworu, co pozwoli na znalezienie lepszych metod diagnostycznych, prewencyjnych lub terapeutycznych. Rak płuc jest chorobą kompleksową. Jego powstawanie i rozwój zależą od wielu różnych czynników, zarówno molekularnych jak środowiskowych. Bezdyskusyjną kwestią jest, że główne czynniki zaangażowane we wzrost wspomnianego nowotworu, związane są z długotrwałą ekspozycją na dym tytoniowy lub ksenobiotyki obecne w powietrzu. Pomimo oczywistego, kancerogennego wpływu papierosów na płuca, najnowsze badania podkreślają również istotną rolę hormonów płciowych, w szczególności estrogenów, w postępowaniu tego procesu. W tkance nowotworowej płuc wykazano nieprawidłową ekspresję genów i białek zaangażowanych w syntezę estradiolu *in situ*, między innymi aromatazy i HSD17B1, co prowadziło do zwiększonego poziomu E₂ w komórkach. Hormon ten w wielu liniach komórkowych, wykazujących ekspresję ER, powodował indukcję proliferacji i inwazyjności. E₂ do swojego działania potrzebuje odpowiedniego receptora. Połączenie się E₂ z białkiem skutkuje wywołaniem odpowiedzi komórkowej, związanej z transkrypcją odpowiednich genów i syntezą właściwych białek. Sam proces wspomagany jest przez szereg koaktywatorów, których rolą jest stabilizacja kompleksu transkrypcyjnego stworzonego z receptora i cząsteczki sygnałowej. Jednym z takich białek jest PELP1, który jest ostatnio intensywnie badany i często ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów estrogenozależnych. Sam E₂ może być również metabolizowany przez enzymy z rodziny cytochromów, głównie przez CYP1A1 oraz CYP1B1, do katecholowych pochodnych, które mogą mieć działanie genotoksyczne, związane z tworzeniem się adduktów DNA lub generacją wolnych rodników. Same cytochromy, oprócz E₂ odpowiadają za transformację WWA, związków powszechnie występujących w dymie tytoniowym. Odbywa się to w ramach I i II fazy reakcji detoksykacji. Warto nadmienić, że ilość wspomnianych cytochromów w komórce, zależy ściśle od jej kontaktu z WWA i odbywa się za pośrednictwem receptora AhR, który wiążąc się z XRE, kontroluje ekspresję wspomnianych enzymów. Celem pracy było

głównie zbadanie synergicznego efektu jaki może być wywoływany przez wspólne działanie E_2 oraz powszechnie występującego w dymie tytoniowym B(a)P oraz analiza ekspresji genów i/lub białek CYP1A1, CYP1B1, PELP1, AhR, które niewątpliwie pełnią ważną rolę w tym procesie.

Cel pracy osiągnięto poprzez oznaczenie ilości transkrypty i/lub białka oraz poziomu E_1 i E_2 w materiale klinicznym, który obejmował tkanki nowotworowe oraz histopatologicznie niezmiennione pobrane od pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuc. Zbadano również genotoksyczność B(a)P, E_2 , jego pochodnych 2-OH E_2 i 4-OH E_2 oraz ich wpływ na proliferację komórek. Sprawdzone także czy B(a)P i/lub E_2 mają wpływ na ekspresję wybranych genów i/lub białek. Aby zrealizować te zadania, wykorzystano następujące metody: w celu określenia ekspresji genów i białek, przeprowadzono ilościowy PCR (qPCR, Real Time PCR), (który był poprzedzony reakcją odwrotnej transkrypcji) oraz western blot. Wpływ badanych substancji na proliferację komórek został oceniony dzięki spektrofotometrycznemu testowi aktywności metabolicznej MTT. Do analizy genotoksyczności wykorzystano test kometkowy, po którym następowało barwienie związkami fluorescencyjnymi Hoechst. Poziom estrogenów w materiale klinicznym został wykonany dzięki wysokosprawnej chromatografii cieczowej/spektrometrii mas, w ramach współpracy z Pracownią Spektrometrii Mas, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

W badaniach stwierdzono statystycznie istotny poziom stosunku E_2/E_1 w tkance nowotworowej w porównaniu do histopatologicznie niezmiennionej. Wykazano również stymulujący wpływ B(a)P (A549) oraz E_2 (A549, Calu-1) na proliferację ustalonych linii komórkowych. Dodatkowo zaobserwowano hamujące oddziaływanie B(a)P (Calu-1, Beas-2b) oraz 4-OH- E_2 (A549, Beas-2b) na wzrost komórek. Jednym z najważniejszych osiągnięć niniejszej pracy było wykazanie, że genotoksyczność 4-OH E_2 może być zależna od obecności $Er\beta$. Potwierdzono, że B(a)P może indukować ekspresję CYP1A1 oraz CYP1B1 na poziomie transkrypty jak i białka w komórkach linii A549, Calu-1 i Beas-2b, oraz że mechanizm ten może być później hamowany. Wykazano potencjalny inkucyjny wpływ E_2 na ekspresję *AHR* w liniach A549 oraz Calu -1. W materiale klinicznym, pochodzącym od pacjentów, udało się oznaczyć obniżenie ekspresji *CYP1A1*, *AhR* i *CYP1B1* w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki histopatologicznie niezmiennionej, co sugeruje obecność potencjalnego mechanizmu

STRESZCZENIE

inhibicji tych cząsteczek. Wykazano również zwiększenie ilości PELPI we fragmentach zmienionych nowotworowo. Wszystkie uzyskane wyniki wydają się dowodzić synergii między paleniem papierosów, a przynajmniej oddziaływaniem B(a)P wraz z estrogenami, co niewątpliwie może sprzyjać rozwojowi nowotworu płuc.