Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt

mgr inż. Wiktoria Kozłowska

Konsekwencje oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na steroidogenezę i profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy

Rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech publikacji naukowych
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych,
w dyscyplinie nauki biologiczne

Olsztyn 2022

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Promotor

prof. dr hab. inż. Anita Franczak

Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 1A, pokój 233, 10-719 Olsztyn, Polska

e-mail: anitaf@uwm.edu.pl

Promotor pomocniczy

dr Agata Żmijewska

Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 1A, pokój 221, 10-719 Olsztyn, Polska

e-mail: agata.zmijewska@uwm.edu.pl

Źródła finansowania

Praca wykonana w ramach projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Numer projektu OPUS 2017/25/B/NZ9/00090, kierownik projektu prof. dr hab. inż. Anita Franczak

Wiktoria Kozłowska jest stypendystką w ramach programu interdyscyplinarnych studiów doktoranckich w zakresie biologii i biotechnologii [POWR.03.05.00-00-Z310/17] finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego „Program rozwojowy Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie” [POWR.03.05.00-00-Z310/17], współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego z Programu Operacyjnego – Wiedza Edukacja Rozwój.

”*Wiktoria Kozłowska is a recipient of a scholarship from the Program Interdisciplinary Doctoral Studies in Biology and Biotechnology* [POWR.03.05.00-00-Z310/17], *which is funded by the European Social Fund, “Development Program of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn”* [POWR.03.05.00-00-Z310/17], *co-financed by the European Union under the European Social Fund from the Operational Program Knowledge Education Development.”*

SPIS TREŚCI

Rozdział 1. WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozdział 2. OŚWIADCZENIA OKREŚLAJĄCE INDYWIDUALNY WKŁAD W POWSTANIE PUBLIKACJI

2.1. Publikacja nr 1 (załącznik 1)
2.2. Publikacja nr 2 (załącznik 2)
2.3. Publikacja nr 3 (załącznik 3)

Rozdział 3. WPROWADZENIE

Rozdział 4. HIPOTEZA, CELE I ZADANIA BADAWCZE

4.1. Hipoteza
4.2. Cele
4.3. Zadania badawcze

Rozdział 5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Izolacja skrawków błony śluzowej macicy
5.2. Inkubacja *in vitro* i opis systemu ekspozycji na pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości (PEM)
5.3. Określenie ekspresji mRNA *CYP17A1, HSD3B1, CYP19A3* i *HSD17B4*

5.4. Oznaczanie koncentracji białka hydroksylazy/liazy cytochromu P450 (cytochrom P450c17), dehydrogenazy 3*β* hydroksysteroidowej (3*β*HSD), aromatazy cytochromu P450 (aromataza) i dehydrogenazy 17*β* hydroksysteroidowej (17*β*HSD)

5.5. Oznaczanie stężenia androstendionu (A_4), testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17*β* i (E_2) w medium inkubacyjnym

5.6. Analiza statystyczna wyników

5.7. Izolacja RNA do analizy sekwencjonowania następnej generacji (NGS)

5.8. Budowa i sekwencjonowanie bibliotek cDNA – analiza NGS

5.9. Określenie profilu transkryptomicznego i bioinformatyczna analiza danych

5.10. Przewidywane miejsca edycji RNA

5.11. Procedura przeprowadzenia walidacji

Rozdział 6. WYNIKI

6.1. Wpływ PEM na ekspresję mRNA *CYP17A1, HSD3B1, CYP19A3* i *HSD17B4* w błonie śluzowej macicy

6.1.1. Wpływ PEM na ekspresję mRNA CYP17A1 i HSD3B1 w błonie śluzowej macicy

6.1.2. Wpływ PEM na ekspresję mRNA CYP19A3 i HSD17B4 w błonie śluzowej macicy

6.2. Wpływ PEM na koncentrację białka hydroksylazy/liazy cytochromu P450 (cytochrom P450c17), dehydrogenazy 3*β* hydroksysteroidowej (3*β*HSD), aromatazy cytochromu P450 (aromataza) i dehydrogenazy 17*β* hydroksysteroidowej (17*β*HSD) w błonie śluzowej macicy

6.2.1. Wpływ PEM na koncentrację cytochromu P450c17 i 3βHSD w błonie śluzowej macicy

6.2.2. Wpływ PEM na koncentrację aromatazy i 17βHSD w błonie śluzowej macicy

6.3. Wpływ PEM na syntezę i sekrecję androstendionu (A_4), testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17*β* (E_2) w błonie śluzowej macicy

6.3.1. Wpływ PEM na syntezę i sekrecję A_4 i T w błonie śluzowej macicy

6.3.2. Wpływ PEM na syntezę i sekrecję E_1 i E_2 w błonie śluzowej macicy

6.4. Wpływ PEM na profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy

6.4.1. Analiza zmian transkryptomu błony śluzowej macicy świń pod wpływem ekspozycji tkanki na PEM

6.4.2. Analiza ontologii genów

6.4.3. Identyfikacja szlaków przekazywania sygnałów

6.4.4. Analiza polimorfizmów

6.4.5. Weryfikacja danych uzyskanych z analizy następnej generacji (NGS)

Rozdział 7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

7.1. Podsumowanie

7.2. Wnioski

Rozdział 8. PIŚMIENNICTWO

Rozdział 9. STRESZCZENIA PRACY DOKTORSKIEJ

9.1. Streszczenie

9.2. Summary

Rozdział 10. REGULACJE PRAWNE DOTYCZĄCE DOŚWIADCZEŃ NA ZWIERZĘTACH

Rozdział 11. ZAŁĄCZNIKI

11.1. Załącznik 1 (*publikacja nr 1*)

11.2. Załącznik 2 (*publikacja nr 2*)

11.3. Załącznik 3 (*publikacja nr 3*)

Rozdział 1.

WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawa doktorska składa się z trzech oryginalnych prac naukowych, opublikowanych w latach 2021 – 2022 w czasopismach *Animal Reproduction Science, Reproductive Biology* oraz *Journal of Physiology and Pharmacology*. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest analiza zmian w procesie steroidogenezy i profilu transkryptomicznym błony śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.), wywołanych pod wpływem ekspozycji tkanki na pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości (PEM).

1. **KOZLOWSKA W.**, DRZEWIECKA E.M., ZMIJEWSKA A., KOZIOROWSKA A., FRANCZAK A. *Effects of electromagnetic field (EMF) radiation on androgen synthesis and release from the pig endometrium during the fetal peri-implantation period.* Animal Reproduction Science 2021, 226 (106694): 1-13.

   DOI:10.1016/j.anireprosci.2021.106694

   (IF[1] = 2,145; pkt.[3] = 140)

2. **KOZLOWSKA W.**, DRZEWIECKA E.M., ZMIJEWSKA A., FRANCZAK A. *Electromagnetic field exposure alters in vitro estrogen biosynthesis and its release by the porcine endometrium in the peri-implantation period*. Reproductive Biology 2022, 22 (100642): 1-9.

DOI: doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100642

(IF[2] = 2,376; pkt.[3] = 100)

3. **KOZLOWSKA W.**, DRZEWIECKA E.M., PAUKSZTO L., ZMIJEWSKA A., WYDORSKI P.J., JASTRZĘBSKI J.P., FRANCZAK A. *Exposure to the electromagnetic field alters the transcriptomic profile in the porcine endometrium during the peri-implantation period.* Journal of Physiology and Pharmacology 2021, 72 (6): 1-15.

   DOI: 10.26402/jpp.2021.6.04

   (IF[1] = 2,750; pkt.[3] = 100)

Razem:

Liczba punktów MEiN: **340 punktów**

Sumaryczny IF: **7.271**

[1] – wskaźnik Impact Factor czasopisma z 2021 roku.

[2] – wskaźnik Impact Factor czasopisma z 2022 roku.

[3] – liczba punktów wg Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 21 grudnia 2021 roku.

Rozdział 2.

OŚWIADCZENIA OKREŚLAJĄCE INDYWIDUALNY WKŁAD W POWSTANIE PUBLIKACJI

2.1. Publikacja nr 1 (załącznik 1):

KOZLOWSKA W., DRZEWIECKA E.M., ZMIJEWSKA A., KOZIOROWSKA A., FRANCZAK A. *Effects of electromagnetic field (EMF) radiation on androgen synthesis and release from the pig endometrium during the fetal peri-implantation period.* Animal Reproduction Science 2021, 226 (106694): 1-13.

Powstała w wyniku indywidualnego wkładu pracy współautorów:

mgr inż. Wiktoria Kozłowska – współudział w opracowywaniu metodyki badań, pobieranie materiału doświadczalnego, wykonywanie analiz laboratoryjnych i analiza uzyskanych wyników, przygotowanie grafik, wnioskowanie, opracowanie wyników, przygotowanie publikacji do druku



(podpis współautora)

dr Ewa Monika Drzewiecka – współudział w opracowaniu koncepcji badań, współudział w opracowywaniu metodyki badań, współudział w pobieraniu materiału doświadczalnego, współudział w wykonywaniu analiz laboratoryjnych



(podpis współautora)

dr Agata Żmijewska – współudział w nadzorze merytorycznym i akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu



(podpis współautora)

dr hab. inż. Anna Koziorowska, prof. UR – nadzór merytoryczny nad systemem ekspozycji na pole elektromagnetyczne



(podpis współautora)

prof. dr hab. inż. Anita Franczak – opracowanie koncepcji badań, pozyskanie środków na badania, opracowywanie metodyki badań, nadzór merytoryczny nad wykonywanymi analizami i opracowaniem wniosków, akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu, autor korespondencyjny



(podpis współautora)

Publikacja nr 1 jest załączona do niniejszego streszczenia rozprawy doktorskiej jako **załącznik 1**.

2.2. Publikacja nr 2 (załącznik 2):

KOZLOWSKA W., DRZEWIECKA E.M., ZMIJEWSKA A., FRANCZAK A. *Electromagnetic field exposure alters in vitro estrogen biosynthesis and its release by the porcine endometrium in the peri-implantation period*. Reproductive Biology 2022, 22 (100642): 1-9.

Powstała w wyniku indywidualnego wkładu pracy współautorów:

mgr inż. Wiktoria Kozłowska – współudział w opracowywaniu metodyki badań, pobieranie materiału doświadczalnego, wykonywanie analiz laboratoryjnych i analiza uzyskanych wyników, przygotowanie grafik, opracowanie wyników, wnioskowanie, przygotowanie publikacji do druku

(podpis współautora)

dr Ewa Monika Drzewiecka – współudział w opracowaniu koncepcji badań, współudział w opracowywaniu metodyki badań, współudział w pobieraniu materiału doświadczalnego, współudział w wykonywaniu analiz laboratoryjnych

(podpis współautora)

dr Agata Żmijewska – współudział w nadzorze merytorycznym i akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu

(podpis współautora)

prof. dr hab. inż. Anita Franczak – opracowanie koncepcji badań, pozyskanie środków na badania, opracowywanie metodyki badań, nadzór merytoryczny nad wykonywanymi analizami i opracowaniem wniosków, akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu, autor korespondencyjny

(podpis współautora)

Publikacja nr 2 jest załączona do niniejszego streszczenia rozprawy doktorskiej jako **załącznik 2**.

2.3. Publikacja nr 3 (załącznik 3):

KOZLOWSKA W., DRZEWIECKA E.M., PAUKSZTO L., ZMIJEWSKA A., WYDORSKI P.J., JASTRZĘBSKI J.P., FRANCZAK A. *Exposure to the electromagnetic field alters the transcriptomic profile in the porcine endometrium during the peri-implantation period.* Journal of Physiology and Pharmacology 2021, 72 (6): 1-15.

Powstała w wyniku indywidualnego wkładu pracy współautorów:

mgr inż. Wiktoria Kozłowska – współudział w opracowywaniu metodyki badań, pobieranie materiału doświadczalnego, wykonywanie analiz laboratoryjnych, udział w przeprowadzaniu analiz bioinformatycznych i przygotowaniu grafik, opracowanie wyników, wnioskowanie, przygotowanie ostatecznej wersji publikacji



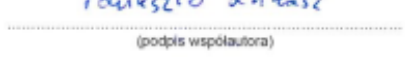
(podpis współautora)

dr Ewa Monika Drzewiecka – współudział w opracowaniu koncepcji badań, współudział w opracowywaniu metodyki badań, współudział w pobieraniu materiału doświadczalnego



(podpis współautora)

dr Łukasz Paukszto – wykonywanie bioinformatycznych analiz uzyskanych wyników, udział w przygotowaniu grafik



(podpis współautora)

dr Agata Żmijewska – współudział w nadzorze merytorycznym i akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu



(podpis współautora)

mgr inż. Paweł Józef Wydorski – współudział w wykonywaniu analiz



(podpis współautora)

dr Jan Paweł Jastrzębski – współudział w wykonywaniu bioinformatycznych analiz uzyskanych wyników, udział w przygotowaniu grafik



(podpis współautora)

prof. dr hab. inż. Anita Franczak – opracowanie koncepcji badań, pozyskanie środków na badania, opracowywanie metodyki badań, nadzór merytoryczny nad wykonywanymi analizami, opracowaniem wyników i wniosków, akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu, autor korespondencyjny



(podpis współautora)

Publikacja nr 3 jest załączona do niniejszego streszczenia rozprawy doktorskiej jako **załącznik 3**.

Rozdział 3

WPROWADZENIE

Rozwijająca się industrializacja wpływa na środowisko, przyczyniając się do narażenia organizmów żywych na różnorodne potencjalnie szkodliwe czynniki, w tym pole elektromagnetyczne (BERNABÒ i in. 2010; GAJŠEK i in. 2016; GYE i PARK 2012; MANSOURI i in. 2020). W środowisku powszechnie występuje pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskich częstotliwościach (PEM), przyjmujących wartości od 0 do 300 Hz (GAJŠEK i in. 2016; MANSOURI i in. 2020). PEM o częstotliwości od 50 do 120 Hz generowane jest m.in. przez urządzenia codziennego użytku, takie jak płyty indukcyjne, kuchenki mikrofalowe i przewody instalacji elektrycznych (GAJŠEK i in. 2016).

Udokumentowano, że konsekwencje oddziaływania PEM na organizmy żywe mogą być różnorodne. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań dostarczają dowodów, że ekspozycja organizmów żywych na PEM może m.in. wpływać na przebieg licznych procesów fizjologicznych i zmieniać aktywność komórek immunokompetentnych, strukturę DNA, tempo proliferacji komórek, wpływać na apoptozę i żywotności komórek oraz wywoływać stres oksydacyjny (LOURENCINI DA SILVA i in. 2000; LÓPEZ i in. 2019; MAHAKI i in. 2020; ROBISON i in. 2002; SCHMITZ i in. 2004; SONG i in. 2018 TOOSSI i in. 2018). Udokumentowano, że PEM może oddziaływać także na układ nerwowy i indukować reakcje stresowe (KLIMEK i ROGALSKA 2021). Uwzględniając zmiany generowane w organizmach żywych przez PEM, zostało ono zaklasyfikowane jako potencjalny czynnik rakotwórczy (grupa 2B, IARC Working

Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2013; MANSOURI i in. 2020). Konsekwencje ekspozycji tkanek układu rozrodczego samic ssaków na PEM nie są dobrze poznane, a nieliczne dotychczasowe badania przeprowadzano głównie na małych zwierzętach laboratoryjnych.

U samic szczurów poddanych ekspozycji na PEM stwierdzono wzrost poziomu estradiolu-17β (E_2) i obniżenie poziomu testosteronu (T) w surowicy (AYDIN i in. 2009; OZGUNER i in. 2005). Udokumentowano, że u myszy liczba blastocyst w grupie samic eksponowanych na PEM jest niższa (RAJAEI i in. 2010), a osobniki narażone na działanie PEM posiadają obniżoną liczbę potomstwa w miocie (CAO i in. 2006). W zależności od częstotliwości i czasu ekspozycji, PEM może mieć wpływ na tempo rozwoju zarodków i przebieg ciąży (GYE i PARK 2012; MANSOURI i in. 2020). Dowiedziono także, że PEM przyczynia się do powstawania reaktywnych form tlenu (SANTINI i in. 2018). Wyniki badań przeprowadzonych na różnych modelach badawczych wskazują na potencjał PEM do generowania zmian w procesach zaangażowanych w funkcje rozrodcze (DRZEWIECKA i in. 2021b; FRANCZAK i in. 2020; GYE i PARK 2012; KOZIOROWSKA i in. 2018; MANSOURI i in. 2020).

W ramach rozprawy doktorskiej zbadano wpływ PEM na aktywność steroidogeniczną błony śluzowej macicy świni domowej w okresie około-implantacyjnym oraz profil transkryptomiczny tej tkanki. Uwzględniając niepodważalną rolę błony śluzowej macicy w regulacji funkcji rozrodczych samic (FRANCZAK 2008; FRANCZAK i KOTWICA 2010, 2008; GEISERT

i in. 1990; ZIECIK i in. 2006), szczególnie interesującym aspektem jest wpływ PEM na odkryty w tej tkance przez FRANCZAK (2008) oraz FRANCZAK i KOTWICĘ (2010; 2008) proces steroidogenezy.

U samic androgeny pełnią funkcję substratów służących do syntezy estrogenów (PAYNE i HALES 2004), które inicjują rozrost błony śluzowej macicy wpływając na jej aktywność oraz determinując wrażliwość tej tkanki na inne hormony (ZIECIK 2002). Proces steroidogenezy w macicy zapewnia dodatkowe, istotne źródło hormonów steroidowych, wzbogacając środowisko wewnątrzmaciczne w te hormony (FRANCZAK 2008; FRANCZAK i KOTWICA 2010, 2008). W tkankach macicy udokumentowano m.in. obecność transkryptów: hydroksylazy/liazy cytochromu P450 (*CYP17*), aromatazy cytochromu P450 (*CYP19*), dehydrogenazy 3*β* hydroksysteroidowej (*HSD3B*) i dehydrogenazy 17*β* hydroksysteroidowej (*HSD17B*) oraz produktów ich ekspresji zaangażowanych w kolejne etapy steroidogenezy (FRANCZAK 2008; FRANCZAK i KOTWICA 2010, 2008; WOJCIECHOWICZ i in. 2016, 2013). W macicy świni enzymy: hydroksylaza/liaza cytochromu P450 i dehydrogenaza 3*β* hydroksysteroidowa, których synteza jest kodowana odpowiednio przez *CYP17A1* oraz *HSD3B1,* są niezbędne do zapewnienia prawidłowego przebiegu steroidogenezy, w tym produkcji androgenów (FRANCZAK i in. 2020; FRANCZAK i KOTWICA 2010, 2008; SPENCER i in. 2004; WOJCIECHOWICZ i in. 2016, 2013). Błona śluzowa macicy świni jest również ważnym źródłem estrogenów i wykazuje ekspresję aromatazy cytochromu P450 (FRANCZAK 2008; FRANCZAK i KOTWICA 2010, 2008) oraz dehydrogenazy 17*β* hydroksysteroidowej

(WOJCIECHOWICZ i in. 2016), których synteza jest kodowana odpowiednio przez *CYP19A3* oraz *HSD17B4*. Wymienione enzymy są zaangażowane w konwersję androgenów do estrogenów oraz estronu (E_1) do estradiolu-17*β* (E_2) i E_2 do E_1 (GRADDY i in. 2000; PAYNE i HALES 2004).

Dotychczas udokumentowano wpływ PEM na tkanki macicy świni domowej podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego (KOZIOROWSKA i in. 2018). Wykazano, że w tym okresie PEM może indukować zmiany w aktywności steroidogenicznej błony śluzowej i mięśniowej macicy, zaburzając syntezę i sekrecję E_2, co może wpłynąć na prawidłowy rozwój ciałek żółtych, a następne przebieg luteolizy (KOZIOROWSKA i in. 2018). Jednocześnie dowiedziono, że funkcję ochronną, tj. przeciwdziałającą negatywnym skutkom oddziaływania PEM na tkanki macicy, podczas fazy lutealnej cyklu rujowego może pełnić progesteron (P_4) (KOZIOROWSKA i in. 2018).

Odkrycie, że P_4, będący m.in. substratem do syntezy hormonów steroidowych w macicy (FRANCZAK 2008; FRANCZAK i KOTWICA 2010, 2008), może być czynnikiem chroniącym tkanki przed negatywnymi skutkami oddziaływania PEM w okresie cyklu rujowego jest bardzo interesujące (KOZIOROWSKA i in. 2018). Udokumentowano, że 2-godzinna inkubacja w obecności P_4 skrawków błony śluzowej i mięśniowej macicy świni domowej w dniach 12 – 13 cyklu rujowego z PEM o częstotliwości 120 Hz nie skutkuje zmianami w poziomie ekspresji *CYP19A3*. Zmian sekrecji E_2 nie stwierdzono również po 4-godzinnej ekspozycji błony mięśniowej macicy na PEM (50 Hz) w obecności P_4 oraz po 2- i 4-godzinnej ekspozycji błony śluzowej macicy na PEM

o częstotliwości 50 i 120 Hz (KOZIOROWSKA i in. 2018). Rola P_4 w błonie śluzowej macicy eksponowanej na PEM w okresie wczesnej ciąży nie była do tej pory badana.

Uwzględniając dotychczasową wiedzę dokumentującą negatywne skutki ekspozycji tkanek macicy na PEM obserwowane u samic podczas cyklu rujowego, szczególnie interesujące jest podjęcie badań dotyczących konsekwencji oddziaływania PEM u samic ciężarnych. Aspekt dotyczący narażenia na działanie PEM dotyczy także ludzi, jednakże ze względów etycznych takie badania nie mogły być przeprowadzone na tkankach kobiet. Z tego powodu wykorzystanie świni domowej jako modelu w badaniach dotyczących molekularnych mechanizmów zaangażowanych w funkcjonowanie komórek i tkanek organizmu, w tym układu rozrodczego, jest w pełni uzasadnione (MORDHORST i PRATHER 2017).

Można przypuszczać, że konsekwencje oddziaływania PEM zarówno na tkanki macicy, jak i na zarodki mogą mieć szczególnie negatywne skutki u samic w okresie około-implantacyjnym. Udokumentowano, że straty zarodków w tym okresie mogą wynosić ok. 30%, a okres ten warunkuje sukces ciąży (BAZER i in. 2015; JARVIS 2017). W tym czasie prawidłowa aktywność błony śluzowej macicy jest konieczna do niezaburzonej interakcji pomiędzy zarodkiem a matką (ZIECIK i in. 2006). Przyjmuje się, że interakcja ta decyduje o powodzeniu implantacji oraz determinuje przebieg i sukces ciąży (JARVIS 2017; ZIECIK i in. 2006). W okresie około-implantacyjnym niezbędne jest zapobieżenie luteolizie i utrzymanie funkcji ciałka żółtego (CHRISTENSON i in. 1994),

a procesy molekularne związane m.in. z syntezą i sekrecją hormonów steroidowych w zarodkach i tkankach macicy determinują zdarzenia występujące w czasie tego krytycznego okresu, obejmującego u świń dni ciąży 15 – 16 (FRANCZAK 2008; FRANCZAK i KOTWICA 2010, 2008; GEISERT i in. 1982; ZIECIK i in. 2006).

Poznanie konsekwencji oddziaływania PEM na mechanizmy warunkujące prawidłową aktywność błony śluzowej macicy w okresie około-implantacyjnym jest bardzo ważne, zwłaszcza, że udokumentowany wpływ PEM na aktywność błony mięśniowej macicy świni obejmuje zmiany w jej profilu transkryptomicznym i procesie steroidogenezy (DRZEWIECKA i in. 2021a, 2021b; FRANCZAK i in. 2020). Dowiedziono istotny wpływ PEM na syntezę i sekrecję androgenów oraz estrogenów w błonie mięśniowej macicy (DRZEWIECKA i in. 2021b; FRANCZAK i in. 2020). Wykazano, że w mięśniówce macicy sekrecja A_4 obniża się istotnie już po krótkotrwałej (2-godzinnej) inkubacji tej tkanki bez dodatku P_4 i w obecności PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz. Natomiast w konsekwencji dłuższej (4-godzinnej, bez dodatku P_4) ekspozycji błony mięśniowej macicy na PEM o częstotliwości 50 Hz i 120 Hz stwierdzono obniżoną sekrecję, odpowiednio E_1 i A_4 (DRZEWIECKA i in. 2021b; FRANCZAK i in. 2020). Udokumentowano także wpływ PEM na obniżenie sekrecji T, ale efekt ten był widoczny wyłącznie w przypadku skrawków błony mięśniowej macicy inkubowanych przez 2 godziny w obecności P_4 i eksponowanych na PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz (FRANCZAK i in. 2020). W mięśniówce macicy stwierdzono również obniżenie sekrecji E_1 w konsekwencji 4-godzinnej ekspozycji tkanki na PEM o częstotliwości

50 Hz, zarówno w obecności, jak i przy braku P_4 (DRZEWIECKA i in. 2021b). Skutki ekspozycji błony mięśniowej macicy na PEM różnią się zatem w zależności od częstotliwości PEM, czasu ekspozycji i obecności lub braku P_4 w medium inkubacyjnym (DRZEWIECKA i in. 2021b; FRANCZAK i in. 2020).

Konsekwencje oddziaływania PEM na błonę mięśniową zaobserwowano także w badaniach dotyczących analiz profilu transkryptomicznego tej tkanki. Dzięki sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS) udokumentowano istotny wpływ krótkotrwałej (2-godzinnej) ekspozycji mięśniówki macicy na PEM o częstotliwości 50 Hz. Analiza wykazała zmiany poziomu ekspresji genów (DEGs, ang. *differently expressed genes*) pod wpływem PEM. Geny te są zaangażowane m.in. w szlak sygnałowy czynnika martwicy nowotworów (*TNF*), regulację sygnalizacji interferonu-*α* (*IFNA*) i sygnalizację interferonu-*α*/*β* (DRZEWIECKA i in. 2021a). Stwierdzono, że PEM wpływając na profil transkryptomiczny błony mięśniowej macicy świń w okresie około-implantacyjnym zmienia poziom ekspresji genów zaangażowanych m.in. w regulację odpowiedzi immunologicznej, mechanizmy syntezy i sekrecji estrogenów, proces angiogenezy i potencjał proliferacyjny tej tkanki (DRZEWIECKA i in. 2021a).

Z uwagi na nasze codzienne czynności wymagające ciągłej obecności urządzeń elektrycznych nie jesteśmy w stanie całkowicie wyeliminować PEM z otaczającego środowiska. Istotne jest, aby mieć świadomość potencjalnego zagrożenia, jakie może nieść za sobą ekspozycja organizmów żywych na PEM, zwłaszcza jeśli dotyczy okresu ważnego dla sukcesu rozrodczego. Dodatkowo, jest

to kluczowe w poszukiwaniu metod i możliwości ograniczania konsekwencji oddziaływania PEM na organizmy żywe. Biorąc pod uwagę dotychczasowe rezultaty i wyniki badań, w prezentowanej pracy zbadano wpływ PEM na syntezę oraz sekrecję androgenów i estrogenów w błonie śluzowej macicy świni oraz profil transkryptomiczny tej tkanki w okresie około-implantacyjnym.

Rozdział 4.

HIPOTEZA, CELE I ZADANIA BADAWCZE

4.1. Hipoteza

Pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości wpływa na syntezę oraz sekrecję androgenów i estrogenów w błonie śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie około-implantacyjnym oraz zmienia profil transkryptomiczny tej tkanki.

4.2. Cele

1. Określenie wpływu pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości (PEM) na ekspresję mRNA *CYP17A1, HSD3B1*, *CYP19A3* i *HSD17B4* w błonie śluzowej macicy (Real-Time PCR).
2. Określenie wpływu PEM na koncentrację hydroksylazy/liazy cytochromu P450 (cytochrom P450c17), dehydrogenazy 3*β* hydroksysteroidowej (3*β*HSD), aromatazy cytochromu

P450 (aromataza) i dehydrogenazy 17*β* hydroksysteroidowej (17*β*HSD) w błonie śluzowej macicy (Western Blot).

3. Określenie wpływu PEM na sekrecję *in vitro* androstendionu (A_4) testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17*β* (E_2) w błonie śluzowej macicy (metoda radioimmunologiczna, RIA).
4. Poznanie wpływu PEM na zmiany profilu transkryptomicznego błony śluzowej macicy (analiza sekwencjonowania następnej generacji, NGS).

4.3. Zadania badawcze

1. Analiza wpływu PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz podczas 2- i 4-godzinnej inkubacji *in vitro* na ekspresję mRNA *CYP17A1*, *HSD3A1, CYP19A3* i *HSD17B4* w błonie śluzowej macicy w obecności lub przy braku P_4:
   a. izolacja RNA,
   b. one-step Real-Time PCR,
   c. analiza statystyczna wyników.
2. Analiza wpływu PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz podczas 2- i 4-godzinnej ekspozycji *in vitro* na koncentrację hydroksylazy/liazy cytochromu P450 (cytochrom P450c17), dehydrogenazy 3*β* hydroksysteroidowej (3*β*HSD), aromatazy cytochromu P450 (aromataza) i dehydrogenazy 17*β* hydroksysteroidowej (17*β*HSD) w błonie śluzowej macicy w obecności lub przy braku P_4:
   a. izolacja białka,
   b. analiza Western Blot,
   c. analiza statystyczna wyników.

3. Zbadanie wpływu PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz podczas 2- i 4-godzinnej inkubacji *in vitro* na sekrecję androstendionu (A_4), testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17β (E_2) przez błonę śluzową macicy świń w obecności lub przy braku P_4:
   a. określnie stężenia A_4, T, E_1 i E_2 w medium inkubacyjnym metodą radioimmunologiczną (RIA),
   b. analiza statystyczna wyników.
4. Zbadanie wpływu PEM o częstotliwości 50 Hz, podczas 2-godzinnej ekspozycji, na zmiany profilu transkryptomicznego błony śluzowej macicy:
   a. izolacja RNA,
   b. analiza transkryptomu z użyciem metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS),
   c. bioinformatyczna analiza danych.

Rozdział 5.

MATERIAŁY I METODY

5.1. Izolacja skrawków błony śluzowej macicy

Badania przeprowadzono na pięciu świniach (n = 5, *Sus scrofa domestica* L., Polska Biała Zwisłoucha × Wielka Biała Polska, o masie ciała od 95 do 110 kg), które kojarzono naturalnie w pierwszym i w drugim dniu następującym po pierwszych objawach rui. Ubój zwierząt odbywał się w 15 dniu po drugim kryciu (zwierzęta wykorzystane do badań były zatem w 15 – 16 dniu ciąży), pod nadzorem lekarza weterynarii w lokalnej ubojni (Rozdroże, Polska) oraz zgodnie z przyjętymi wytycznymi humanitarnego uboju zwierząt i zasadami etyki. Wszystkie eksperymenty dotyczyły tkanek

zwierzęcych zebranych w trakcie uboju gospodarskiego. Po uboju izolowano macice i umieszczano je w zimnym roztworze sterylnej soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS, pH = 7,4) z dodatkiem 3% roztworu antybiotyczno-antymykotycznego (Sigma Aldrich, USA) i przewieziono do laboratorium Katedry Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Następnie macice płukano w sterylnym roztworze PBS (20 mL). Rogi macicy przecinano wzdłuż powierzchni mezometrium, a skrawki błony śluzowej macicy (od 95 do 105 mg) izolowano ze środkowej części każdego z rogów macicy wg procedury opisanej przez FRANCZAK i in. (2010). Wyizolowane skrawki przemywano w roztworze PBS i przeznaczono do inkubacji *in vitro*.

5.2. Inkubacja *in vitro* i opis systemu ekspozycji na pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości (PEM)

Pojedyncze skrawki błony śluzowej macicy (grubość od dwóch do trzech mm, masa od 95 do 105 mg każdy) umieszczono pojedynczo w 24-dołkowej płytce hodowlanej z dodatkiem medium hodowlanego (1 mL M199, Sigma Aldrich, USA; 0,1% albuminy surowicy bydlęcej [BSA], Carl Roth GmBH + Co KG, Niemcy; 1% roztworu antybiotyczno-antymykotycznego). Skrawki wstępnie inkubowano w łaźni wodnej przez 2 godziny (37°C, 95% O_2 i 5% CO_2). Po inkubacji wstępnej, medium wymieniono na nowe o tym samym składzie. Następnie, skrawki inkubowano *in vitro* przez 2 i 4 godziny (37°C, 95% O_2 i 5% CO_2) w obecności PEM. PEM było generowane przez urządzenie Astar (Magneris, Astar, Polska). Protokół ekspozycji na PEM opracowano

w oparciu o specyfikacje techniczne producenta (https://www/astar.pl/produkty/magneris). W badaniu zastosowano PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz oraz indukcji magnetycznej 8 mT. Skrawki kontrolne nie były eksponowane na PEM. Wybrane skrawki inkubowano dodatkowo w obecności progesteronu (P_4, 10^{-5}M, Serva, Niemcy) wg FRANCZAK i KOTWICY (2010, 2008) oraz KOZIOROWSKIEJ i in. (2018). Częstotliwość wynoszącą 50 Hz wybrano ze względu na powszechną obecność PEM o tej wartości w otaczającym środowisku (GAJŠEK i in. 2016). Natomiast PEM o częstotliwości 120 Hz wykazuje udokumentowany efekt terapeutyczny, co przyczynia się do stosowania tej częstotliwości m.in. w celach medycznych (GAJŠEK i in. 2016; GRANDOLFO 1994). Zarówno skrawki kontrolne (nieeksponowane na PEM), jak i skrawki eksponowane na PEM, inkubowano w oddzielnych łaźniach wodnych, aby zapobiec ewentualnemu (wzajemnemu) odziaływaniu PEM. Podczas inkubacji stale monitorowano temperaturę, aby wykluczyć ewentualne wahania wywołane dodatkowym efektem termicznym generowanym przez urządzenie. Po zakończeniu inkubacji skrawki błony śluzowej macicy utrwalono mrożeniowo w ciekłym azocie (–196°C) i przechowywano (–80°C) do czasu analiz ekspresji mRNA (Real Time PCR, NGS) i koncentracji białka (Western Blot). Media inkubacyjne zbierano i przechowywano w temperaturze –20°C w celu późniejszego oznaczenia stężeń hormonów steroidowych (metoda radioimmunologiczna, RIA).

5.3. Określenie ekspresji mRNA *CYP17A1, HSD3B1, CYP19A3 i HSD17B4* (*publikacja nr 1 i nr 2*)

Ekspresję mRNA analizowano zgodnie ze standardami metody (BUSTIN i in. 2009). Z fragmentów skrawków śluzówki macicy nieeksponowanej i eksponowanej na PEM izolowano całkowite RNA przy użyciu 600 *µ*L TRI-Reagent (Sigma Aldrich, USA), postępując zgodnie ze standardowym protokołem producenta. Skrawki homogenizowano na lodzie z TRI-Reagent, a następnie próbki inkubowano przez 15 minut i dodawano 150 *µ*L chloroformu (POCH, Polska), następnie ponownie inkubowano (pięć minut, 4°C). Próbki odwirowano (12 000 × g, 10 minut, 4°C), a supernatant przenoszono do 350 *µ*L izopropanolu (Sigma Aldrich, Niemcy), uprzednio schłodzonego w –20°C. Próbki dokładnie mieszano i inkubowano (15 minut, 4°C), a następnie odwirowano (12 000 × g, 10 minut, 4°C) i oczyszczano przy użyciu 75% etanolu, uprzednio schłodzonego w 4°C. W 30 *µ*L wody pozbawionej RNaz zawieszano RNA i analizowano je spektrofotometrycznie (Tecan, Szwajcaria) w celu oznaczenia koncentracji oraz gęstości optycznej prób (OD, ang. *optical density*, A260/A280) aby upewnić się, że dalszym analizom poddano próbki RNA o dobrej jakości (OD 1,8 – 2,0). Próbki RNA przechowywano w temperaturze –80°C.

Próbki RNA (4 pg/*µ*L) amplifikowano za pomocą zestawu TaqMan®RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Applied Biosystems, USA) przy użyciu sond TaqMan (Applied Biosystems, USA) wymienionych w **Tabeli nr 1** i aparatu AriaMX (Agilent Technologies, USA). Parametry amplifikacji:

1. jeden cykl w temperaturze 48°C przez 15 minut,
2. jeden cykl w temperaturze 95°C przez 10 minut,

3. 40 cykli w temperaturze 95°C przez 15 sekund oraz w temperaturze 60°C przez jedną minutę.

Jako geny referencyjne wykorzystano gen *β*aktyny (*ACTB*) i dehydrogenazy 3-fosforanu aldehydu glicerynowego (*GAPDH*). Ekspresję mRNA obliczano metodą *ΔΔ*Ct (LIVAK i SCHMITTGEN 2001).

Tabela 1. Sondy Taq Man użyte w badaniach.

Sonda Taq Man	Numer katalogowy
CYP17A1	Ss03394942_g1
HSD3B1	Ss03391752_m1
CYP19A3	Ss03384905_uH
HSD17B4	Ss03394673_m1
EGR2	Ss03388929_m1
HSD17B2	Ss04245816_m1
ID2	Ss03379795_u1
IFNGR1	Ss04246620_m1
IL1RAP	Ss06918537_m1
MRAP2	Ss06896222_m1
NOS3	Ss03383840_u1
PTGER4	Hs00168761_m1
SERPINE1	Ss03392656_u1
VDR	Ss03385197_u1
GAPDH	Ss03374854_g1
ACTB	Ss03376081_u1

5.4. Oznaczanie koncentracji białka hydroksylazy/liazy cytochromu P450 (cytochrom P450c17), dehydrogenazy 3*β* hydroksysteroidowej (3*β*HSD), aromatazy cytochromu P450 (aromataza) i dehydrogenazy 17*β* hydroksysteroidowej (17*β*HSD) (*publikacja nr 1 i nr 2*)

Skrawki błony śluzowej macicy (ok. 30 mg) homogenizowano w buforze litycznym (bufor lityczny zawierał 500 *µ*L bazy [Tris-HCl 0,16 g; EDTA 0,15 g; NaCl 0,29 g; pirofosforan sodu 1,34 g; fluorek sodu 0,21 g; azydek sodu 0,02 g]; 5 *µ*L ortowanadanu sodu; 2,5 *µ*L fluorku fenylometylosulfonylu [200 mM roztwór w izopropanolu]; 5 *µ*L Tritonu X 100; 0,5 *µ*L inhibitorów proteaz). Homogenaty inkubowano na lodzie przez 30 minut, a następnie supernatant odwirowano (10 621 × g, trzy x 10 minut) w celu oczyszczenia białka. Wyizolowane białko (15 *µ*g) połączono z buforem obciążającym (8 *µ*L), zawierającym Laemmli (0,5 M Tris-HCl o pH = 6,8; SDS 20%; glicerol i błękit bromofenolowy) i 1 M ditiotreitol. Próbki denaturowano w temperaturze 99°C przez trzy minuty i następnie poddano rozdziałowi elektroforetycznemu SDS-PAGE (PowerEase 90W, Life Technologies, USA). Następnie przeprowadzono transfer półsuchy (stałe napięcie 25 V, 2,4 mA, 12 minut; Pierce Power Blot Cassette, Thermo Scientific, USA), który pozwolił na związanie rozdzielonych białek z membraną nitrocelulozową (0,45 *µ*m, Whatman, USA). Membrany inkubowano w buforze blokującym TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl i 0,1% Tween 20), zawierającym 1% albuminy surowicy bydlęcej V (BSA, Carl Roth GmbH + Co KG, Niemcy) przez 2 godziny w 4°C (białka badane) lub zawierającym 5% BSA przez 2 godziny w temperaturze pokojowej (*β*aktyna, jako białko referencyjne). Następnie, membrany płukano w roztworze TBS-T i inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi (**Tabela nr 2**). Po inkubacji membrany ponownie płukano w roztworze TBS-T, a następnie inkubowano

z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fosfatazą alkaliczną tj. przeciwciała kozie, anty-królicze (**Tabela nr 2**) rozcieńczone w buforze TBS-T. Inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi trwała odpowiednio 1,5 godziny w temperaturze pokojowej (białka badane) lub 2 godziny w 4°C (*β*aktyna). Następnie, membrany płukano trzykrotnie przez pięć minut buforem TBS-T. Badane białka wizualizowano (w ciemności) za pomocą roztworu barwiącego (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl i 0,05 M $MgCl_2$), zawierającego 2% roztwór substratów NBT/BCIP (chlorek błękitu nitrotetrazolowego /fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolilu) przez 30 sekund (*β*aktyna), 60 sekund (cytochrom P450c17 i 17*β*HSD) lub 90 sekund (3*β*HSD i aromataza). Reakcję zatrzymano w wodzie z dodatkiem 0,4% EDTA (0,5 M kwas etylenodiaminotetraoctowy). Gęstość optyczną zidentyfikowanych białek obliczano przy użyciu oprogramowania ImageJ.

Tabela 2. Przeciwciała pierwszo– i drugorzędowe użyte do analiz.

Przeciwciała pierwszorzędowe	**Numer katalogowy**	**Pochodzenie**	**Rozcieńczenie**
Cytochrom P450c17	orb213833 (Biorbyt, Wielka Brytania)	Królik	1:250
3*β*HSD	SAB4503201 (Sigma Aldrich, Niemcy)	Królik	1:250
Aromataza	A7981 (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone)	Królik	1:250
17*β*HSD	orb137855 (Biorbyt, Wielka Brytania)	Królik	1:250
*β*aktyna	A2066 (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone)	Królik	1:200
Przeciwciała drugorzędowe	**Numer katalogowy**	**Pochodzenie**	**Rozcieńczenie**

IgG	sc-2057 (Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone)	Koza	1:2000

5.5. Oznaczanie stężenia androstendionu (A_4), testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17β (E_2) w medium inkubacyjnym (*publikacja nr 1 i nr 2*)

Stężenie androgenów i estrogenów oznaczono metodą radioimmunologiczną (CIERESZKO 1999; SZAFRAŃSKA i in. 2002). Wydajność ekstrakcji wynosiła odpowiednio 84% dla A_4 i 92% dla T oraz 89% dla E_1 i 87% dla E_2. Czułość testu ustalono na 1 pg zarówno dla A_4 i T, oraz E_1 i E_2. Współczynniki zmienności wewnątrz- i międzyseryjnej wynosiły odpowiednio 3,1% i 3,4% dla A_4, 3,9% i 8,4% dla T, 3,8% i 5,1% dla E_1 oraz 3,8% i 16,3% dla E_2.

5.6. Analiza statystyczna wyników (*publikacja nr 1 i nr 2*)

Wyniki przedstawiono jako średnie ± błąd standardowy średniej. Do analizy ekspresji mRNA wykorzystywano wartości $2^{-\Delta\Delta}$Ct genów badanych, obliczone z użyciem metody $\Delta\Delta$CT. Normalizację danych wykonano w oparciu o średnią geometryczną wartości Ct genów referencyjnych. W analizie koncentracji białek określano średnią gęstość optyczną zidentyfikowanych białek znormalizowaną do gęstości optycznej βaktyny. W analizie stężeń hormonów, każdą wartość przed analizą statystyczną poddano transformacji logarytmicznej. Analizę statystyczną określającą wpływ PEM na ekspresję mRNA, koncentrację białek, a także sekrecję hormonów przeprowadzano indywidualnie. Efekty główne

określano za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji (*ANOVA*), w której parametrami były: obecność PEM, czas ekspozycji na PEM i obecność P_4 w medium inkubacyjnym. Przeprowadzono również analizę, podczas której wyniki uzyskane po 2 i 4 godzinach inkubacji analizowano oddzielnie za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (*ANOVA*) i testu najmniejszych istotnych różnic (*NIR*) Fishera. Wyniki uznawano za istotne statystycznie przy $p \leq 0{,}05$.

5.7. Izolacja RNA do analizy sekwencjonowania następnej generacji (NGS) (*publikacja nr 3*)

Całkowite RNA uzyskano ze skrawków błony śluzowej macicy nieeksponowanych i eksponowanych na PEM (50 Hz, 2 godziny) zgodnie z protokołem łączonym obejmującym TRI-Reagent (Sigma Aldrich, USA) i zestaw RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Skrawki błony śluzowej macicy (n = 3, ok. 20 mg/1 n) dokładnie zhomogenizowano na lodzie w probówkach typu Eppendorf, zawierających TRI-Reagent (500 *µ*L). Homogenizację przeprowadzono za pomocą homogenizatora TissueRuptor (Qiagen, USA) przez ok. dwie sekundy. Następnie, próbki inkubowano na lodzie (30 minut) i mieszano po każdych 10 minutach inkubacji. Kolejno, do każdej próbki dodawano zimny chloroform (150 *µ*L), mieszano przez pipetowanie, inkubowano przez trzy minuty i odwirowywano (8 000 × g, osiem minut, 4°C). Górną fazę przenoszono do innej probówki zawierającej 200 *µ*L 70% etanolu schłodzonego do –20°C, po czym próbę mieszano przez pipetowanie. Próbki przenoszono na kolumnę RNeasy Mini (Qiagen, USA) i po jednej minucie inkubacji odwirowywano (8 000 × g, 15 sekund, temperatura pokojowa). Następnie, postępowano

zgodnie z protokołem producenta (Qiagen, USA). Przy użyciu 80 *µ*L wody traktowanej odczynnikiem DEPC eluowano RNA i mierzono spektrofotometrycznie w celu wstępnego oznaczenia jego czystości (OD: A260/A280) i ilości otrzymanego RNA. W dalszych analizach zastosowano próbki RNA o OD 1,8 do 2,0 i stężeniu > 500 *µ*g/*µ*L. Próbki otrzymanego RNA zamrożono w temperaturze –80°C i przygotowano do pomiarów integralności RNA (stosunek RIN: 28 S/18 S) przy użyciu urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer z zestawem RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies, USA). Do dalszych analiz (NGS, Macrogen, Korea Południowa oraz przyszłej walidacji wyników) wybrano próbki o RIN ≥ 7,5. Ostatecznie do analiz NGS wybrano trzy próbki kontrolne i trzy próbki eksperymentalne o najwyższym RIN (trzy próbki grupy kontrolnej – które nie były traktowane PEM i trzy próbki grupy badawczej – które były eksponowane na PEM o częstotliwości 50 Hz). Próbki zostały również wykorzystane do procedury walidacji.

5.8. Budowa i sekwencjonowanie bibliotek cDNA – analiza NGS (*publikacja nr 3*)

Konstrukcja i sekwencjonowanie bibliotek cDNA została wykonana przez Macrogen (Korea Południowa) w systemie Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, USA). Do skonstruowania bibliotek TruSeq mRNA oraz w celu dalszego sekwencjonowania za pomocą platformy NovaSeq 6000, z konfiguracją długości odczytu 2 × 150 bp i przepustowością 40 M odczytów na próbkę, użyto próbek RNA o następującej jakości: RIN ≥ 7,5; współczynnik rRNA ≥ 1,0; stężenie > 20 ng/*µ*L; zawartość całkowita > 1 *µ*g; objętość całkowita > 50 *µ*L. „Surowe dane” otrzymane w wyniku analizy NGS zdeponowano

w Europejskim Archiwum Nukleotydów (ENA) pod nr PRJEB50034, a następnie wykorzystano do profilowania transkryptomu i analizy ekspresji genów.

5.9. Określenie profilu transkryptomicznego i bioinformatyczna analiza danych (*publikacja nr 3*)

W celu określenia zmian profilu transkryptomicznego błony śluzowej macicy pod wpływem PEM, otrzymane dane NGS wykorzystano do przeprowadzenia różnicowania i profilowania ekspresji genów. Sekwencje o sparowanych końcach zostały zapisane w formacie FASTQ i oceniane za pomocą programowania FASTQC (ANDREWS 2010). Analizę jakości surowych danych RNA-seq przeprowadzono w oprogramowaniu Trimmomatic (BOLGER i in. 2014), w wyniku której usunięto odczyty niskiej jakości. Po procesie filtracji, odczyty o sparowanych końcach zostały dopasowane do genomu referencyjnego świni wykorzystując bazę ENSEMBL (Sus_scrofa.Sscrofa11.1.98) oraz narzędzia STAR (DOBIN i in. 2013) i StringTie (PERTEA i in. 2015). Wartości uzyskane w procedurze mapowania zostały przypisane do regionów aktywnych transkrypcyjnie (TAR). Uzyskane regiony zostały podzielone ze względu na obecność transkryptów regulatorowych oraz genów kodujących białka. W dalszym etapie, z użyciem oprogramowania statystycznego: edgeR (ROBISON i in. 2002) i DESeq2 (LOVE i in. 2014), oceniano zróżnicowaną ekspresję genów. W wyniku analizy obiema powyższymi metodami, TARy o zróżnicowanej ekspresji (DE-TARs, ang. *differentially expressed transcribed active regions*) spełniały istotność statystyczną obu testów przy skorygowanej wartości $p < 0,05$ i wartości

bezwzględnej zlogarytmowanej zmiany krotności ekspresji pomiędzy porównywanymi grupami eksperymentalnymi –abs(log2FC) > 1. DE-TARs zostały podzielone na: geny o zróżnicowanej ekspresji (DEGs, ang. *differently expressed genes*) i transkrypty niekodujące o zróżnicowanej ekspresji (DE-ncRNAs, ang. *differentially expressed non-coding RNAs*). Następnie DEGs zostały zaklasyfikowane do ontologii genów (GO) oraz szlaków biologicznych z wykorzystaniem bazy KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gens and Genomes; KANEHISA 2019; KANEHISA i in. 2021; KANEHISA i GOTO 2000) w oprogramowaniu gProfiler (REIMAND i in. 2016). Ontologiczna klasyfikacja była wykonana przy skorygowanej wartości $p < 0,05$. Ostateczne sklasyfikowanie DEGs zostało zwizualizowane na wykresach MA, Volcano i Circos z wykorzystaniem pakietów gplots oraz circlize, zaimplementowanych w środowisku R – **Rycina 1**, *publikacja nr 3*.

Zidentyfikowane DE-ncRNA zostały podzielone na długie niekodujące RNA o zróżnicowanej ekspresji (DE-lncRNA, ang. *differentially expressed long noncoding RNAs*) i inne niesklasyfikowane niekodujące RNA o zróżnicowanej ekspresji (DE-ncRNA). Spośród DE-lncRNA w oparciu o dane z bazy ENSEMBL lncRNA, odkryto transkrypty (długość > 200 pz), o wieloegzonowej strukturze i o braku potencjału do kodowania białek. Potencjał kodowania został przetestowany przez trzy algorytmy: CPAT (WANG i in. 2013), PLEK (LI i in. 2014) oraz CPC2 (KANG i in. 2017) z domyślnymi parametrami. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją DE-lncRNA i DEGs była przeprowadzona w środowisku R przy użyciu własnych skryptów. Korelacja została

ustalona na podstawie obliczonych wartości wskaźnika Pearsona, współczynnika korelacji dla profili ekspresji (dodatnia korelacja r > 0,9 lub korelacja ujemna r < –0,9).

5.10. Przewidywane miejsca edycji RNA (*publikacja nr 3*)

Analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNV, ang. *single nucleotide variant*) była wykonywana za pomocą skryptów rMATS-DVR (WANG i in. 2017). Obliczenie częstości alleli referencyjnych i alternatywnych (AAF) dla zidentyfikowanych SNV zostało wykonane za pomocą narzędzia Picard (Broad Institute, Picard; http://broadinstitute.github.io/picard, dostęp 19 września 2018) oraz Genome Analysis Tool Kit (GATK; MCKENNA i in. 2010). Otrzymane wartości SNV zostały odfiltrowane zgodnie ze standardowymi parametrami GATK. Zastosowany algorytm rMATS-DVR wyznaczał różnicę w AAF, w obrębie przefiltrowanych miejsc nukleotydowych pomiędzy próbkami poddanymi działaniu PEM i próbkami kontrolnymi. Korzystając z bazy danych ENSEMBL polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNPs, ang. *single nucleotide polymorphisms*) zostały wskazane wśród przefiltrowanych miejsc allelicznych. Wysokiej jakości SNV, charakteryzujące się alternatywnym występowaniem alleli w co najmniej połowie odczytów, wykorzystano w dalszej analizie. SNV zlokalizowane w pobliżu miejsc występowania dwukierunkowych genów i pseudogenów zostały usunięte z analizy przewidywanych miejsc edycji RNA. Zmiany AAF (ΔAAF > 0,1; FDR < 0,001) pomiędzy próbkami eksponowanymi na działanie PEM, a próbkami kontrolnymi oceniano pod kątem substytucji RNA. Współczynnik nierównowagi allelicznej określono testem zgodności

chi-kwadrat w programie R, natomiast próbki do edycji zostały opatrzone adnotacjami na podstawie narzędzia Variant Effect Predictor (VEP) (MCLAREN i in. 2016) i wykreślone w Circos (KRZYWINSKI i in. 2009).

5.11. Procedura przeprowadzenia walidacji (*publikacja nr 3*)

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w oparciu o analizę NGS przeprowadzono procedurę walidacji. W tym celu zbadano poziom ekspresji mRNA (Real-Time PCR) 10 wybranych DEGs w błonie śluzowej macicy eksponowanej *in vitro* na PEM i porównano do prób kontrolnych (brak ekspozycji na PEM). Do walidacji rezultatów analizy NGS wybrano geny o zmienionej ekspresji – na podstawie ich wartości FC oraz ze względu na GO, do których należały. Wybrano następujące DEGs: *EGR2* (ang. *early growth response 2*), *HSD17B2* (ang. *hydroxysteroid 17β dehydrogenase 2*), *ID2* (ang. *inhibitor of DNA binding 2*), *IFNGR1* (ang. *interleukin 1 receptor accessory protein*), *IL1RAP* (ang. *interferon-gamma receptor 1*), *MRAP2* (ang. *melanocortin 2 receptor accessory protein 2*), *NOS3* (ang. *nitric oxide synthase 3*), *PTGER4* (ang. *prostaglandin E receptor 4*), *SERPINE1* (ang. *serpin family E member 1*) oraz *VDR* (ang. *vitamin D receptor*). Do amplifikacji wykorzystano zestaw TaqMan™ RNA-to-CT™ 1-Step Kit oraz specyficzne sondy TaqMan™ (Thermofisher Scientific, USA). Wykaz użytych w procedurze walidacji specyficznych sond TaqMan™ przedstawiono w **Tabeli nr 1**. Amplifikację przeprowadzono w aparacie AriaMX (Agilent Technologies, USA) zgodnie z protokołem producenta. Analiza

opierała się na ogólnych wytycznych dotyczących analizy zmian ekspresji genów (BUSTIN i in. 2009). Względną ekspresję mRNA obliczano metodą *ΔΔ*Ct (LIVAK i SCHMITTGEN 2001), a statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,05$) oceniono *testem T* w programie Statistica (StatSoft Inc., USA).

Rozdział 6.

WYNIKI

6.1. Wpływ PEM na ekspresję mRNA *CYP17A1, HSD3B1, CYP19A3 i HSD17B4* w błonie śluzowej macicy (*publikacja nr 1 i nr 2*)

6.1.1. Wpływ PEM na ekspresję mRNA CYP17A1 i HSD3B1 w błonie śluzowej macicy

W **Tabeli 3A** (*publikacja nr 1*) przedstawiono wartości efektów głównych oraz interakcje pomiędzy badanymi parametrami (obecność PEM, czas ekspozycji na PEM oraz obecność progesteronu [P_4]) określające wpływ PEM na poziom ekspresji mRNA *CYP17A1* i *HSD3B1*. Stwierdzono, że poziom ekspresji mRNA *CYP17A1* był zależny od: a) obecności PEM ($p = 0,000021$); b) czasu ekspozycji na PEM ($p = 0,034654$); c) interakcji pomiędzy PEM i czasem ekspozycji ($p = 0,042938$) d) interakcji pomiędzy PEM i P_4 ($p = 0,000326$) oraz e) interakcji pomiędzy czasem ekspozycji na PEM i P_4 ($p = 0,000028$). Poziom ekspresji mRNA *HSD3B1* był zależny od: a) obecności PEM ($p = 0,032721$); b) czasu ekspozycji na PEM ($p = 0,009263$); c) interakcji pomiędzy PEM i P_4 ($p = 0,000001$) oraz d) interakcji pomiędzy PEM, czasem ekspozycji i P_4 ($p = 0,010799$).

W skrawach inkubowanych bez P_4 poziom ekspresji mRNA *CYP17A1* był niższy ($p \leq 0,05$) w tkance eksponowanej przez 4 godziny na PEM o częstotliwości 50 Hz (**Rycina 1B**, *publikacja nr 1*), a ekspresja mRNA *HSD3B1* była niższa ($p \leq 0,05$) po 2-godzinnej inkubacji skrawków z PEM o częstotliwości 50 Hz w porównaniu do kontroli – skrawki nieeksponowane na PEM (**Rycina 1C**, *publikacja nr 1*). Ekspresja mRNA *HSD3B1* była wyższa ($p \leq 0,05$) w skrawkach eksponowanych na PEM o częstotliwości 120 Hz przez 4 godziny w porównaniu do kontroli (**Rycina 1D**, *publikacja nr 1*).

Ekspresja mRNA *CYP17A1* była niższa ($p \leq 0,05$) po 2-godzinnej inkubacji z P_4 skrawków eksponowanych na PEM o częstotliwości 50 Hz (**Rycina 1A**, *publikacja nr 1*) oraz w skrawkach eksponowanych na PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz po 4-godzinnej inkubacji z P_4 ($p \leq 0,05$) w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 1B**, *publikacja nr 1*). Ekspresja mRNA *HSD3B1* była wyższa ($p \leq 0,05$) w skrawkach eksponowanych na PEM o częstotliwości 50 Hz przez 2 i 4 godziny inkubacji z P_4, w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 1C i D**, *publikacja nr 1*).

6.1.2. Wpływ PEM na ekspresję mRNA CYP19A3 i HSD17B4 w błonie śluzowej macicy

Wartości efektów głównych oraz interakcje pomiędzy badanymi parametrami (obecność PEM, czas trwania ekspozycji na PEM oraz obecność P_4) określające wpływ PEM na ekspresję mRNA *CYP19A3 i HSD17B4* zaprezentowano w **Tabeli 3A** (*publikacja nr 2*). Poziom ekspresji mRNA *CYP19A3* był zależny

od: a) obecności PEM (p = 0,017068); b) czasu ekspozycji na PEM (p = 0,008784); c) interakcji pomiędzy PEM i czasem ekspozycji (p = 0,028819) oraz d) interakcji pomiędzy czasem ekspozycji na PEM i P_4 (0,006002). Poziom ekspresji mRNA *HSD17B4* był zależny od obecności PEM (p = 0,000403).

W skrawach inkubowanych bez P_4 ekspresja mRNA *HSD17B4* była wyższa ($p \leq 0,05$) po 2-godzinnej ekspozycji na PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz w porównaniu do kontroli (**Rycina 1C**, *publikacja nr 2*).

Ekspresja mRNA *CYP19A3* była wyższa ($p \leq 0,05$) w skrawkach eksponowanych na PEM o częstotliwości 50 Hz po 4-godzinnej inkubacji z P_4 (**Rycina 1B**, *publikacja nr 2*), a ekspresja mRNA *HSD17B4* była wyższa ($p \leq 0,05$) po 2-godzinnej inkubacji skrawków z P_4, eksponowanych na PEM o częstotliwości 50 Hz w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 1C**, *publikacja nr 2*). Ekspresja mRNA *HSD17B4* była wyższa ($p \leq 0,05$) po 4-godzinnej inkubacji z P_4 w skrawkach eksponowanych na PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz, w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 1D**, *publikacja nr 2*).

6.2. Wpływ PEM na koncentrację białka hydroksylazy/liazy cytochromu P450 (cytochrom P450c17), dehydrogenazy 3*β* hydroksysteroidowej (3*β*HSD), aromatazy cytochromu P450 (aromataza) i dehydrogenazy 17*β* hydroksysteroidowej (17*β*HSD) w błonie śluzowej macicy (*publikacja nr 1 i nr 2*)

6.2.1. Wpływ PEM na koncentrację cytochromu P450c17 i 3βHSD w błonie śluzowej macicy

Wartości efektów głównych oraz interakcje pomiędzy badanymi parametrami (obecność PEM, czas trwania ekspozycji na PEM oraz obecność P_4) określające wpływ PEM na koncentrację białka cytochromu P450c17 i 3*β*HSD przedstawiono w **Tabeli 3B** (*publikacja nr 1*). Koncentracja cytochromu P450c17 była zależna od interakcji pomiędzy PEM, czasem ekspozycji na PEM i P_4 (p = 0,034507). Koncentracja 3*β*HSD była zależna od: a) czasu ekspozycji na PEM (p = 0,047677); b) interakcji pomiędzy PEM i czasem ekspozycji (p = 0,015928); c) interakcji pomiędzy PEM i P_4 (p = 0,004608) oraz d) interakcji pomiędzy PEM, czasem ekspozycji i P_4 (p = 0,003122).

W skrawach inkubowanych bez P_4 koncentracja cytochromu P450c17 była wyższa ($p \leq 0,05$) po 2-godzinnej ekspozycji tkanki na PEM o częstotliwości 120 Hz (**Rycina 4A**, *publikacja nr 1*) oraz po 4-godzinnej inkubacji skrawków z PEM o częstotliwości 50 Hz ($p \leq 0,05$) w porównaniu do kontroli (**Rycina 4B**, *publikacja nr 1*). Koncentracja 3*β*HSD była niższa ($p \leq 0,05$) w skrawkach po 2-godzinnej ekspozycji na PEM o częstotliwości 120 Hz (**Rycina 4C**, *publikacja nr 1*) i wyższa ($p \leq 0,05$) po 4-godzinnej inkubacji skrawków z PEM o częstotliwości 120 Hz w porównaniu do kontroli (**Rycina 4D**, *publikacja nr 1*).

Po 4-godzinnej inkubacji z P_4 koncentracja cytochromu P450c17 była niższa ($p \leq 0,05$) w skrawkach eksponowanych na PEM o częstotliwości 50 Hz, w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 4B**, *publikacja nr 1*).

6.2.2. Wpływ PEM na koncentrację aromatazy i 17βHSD w błonie śluzowej macicy

Wartości efektów głównych oraz interakcje pomiędzy badanymi parametrami (obecność PEM, czas trwania ekspozycji na PEM oraz obecność P_4) określające wpływ PEM na koncentrację aromatazy i 17*β*HSD przedstawiono w **Tabeli 3B** (*publikacja nr 2*). Koncentracja aromatazy była zależna od: a) obecności PEM (p = 0,002354); b) obecności P_4 (p = 0,000364); c) interakcji pomiędzy PEM i czasem ekspozycji (p = 0,000016) oraz d) interakcji pomiędzy PEM, czasem ekspozycji i P_4 (p = 0,000121). Koncentracja 17*β*HSD była zależna od: a) obecności PEM (p = 0,030093); b) obecności P_4 (p = 0,005379); c) interakcji pomiędzy PEM i czasem ekspozycji (p = 0,024205) oraz d) interakcji pomiędzy PEM i P_4 (p = 0,045388).

W skrawach inkubowanych bez P_4 koncentracja aromatazy była niższa ($p \leq 0,05$) w tkance po 2-godzinnej ekspozycji na PEM o częstotliwości 120 Hz (**Rycina 2A**, *publikacja nr 2*) oraz po 4-godzinnej inkubacji skrawków z PEM o częstotliwości 50 Hz ($p \leq 0,05$), w porównaniu do kontroli (**Rycina 2B**, *publikacja nr 2*). Koncentracja 17*β*HSD była wyższa ($p \leq 0,05$) w skrawkach po 4-godzinnej inkubacji z PEM o częstotliwości 120 Hz w porównaniu do kontroli (**Rycina 2D**, *publikacja nr 2*).

Koncentracja aromatazy była niższa ($p \leq 0,05$) po 4-godzinnej inkubacji skrawków z P_4 i ich ekspozycji na PEM o częstotliwości 50 Hz (**Rycina 2B**, *publikacja nr 2*), a koncentracja 17*β*HSD była niższa ($p \leq 0,05$) po 2-godzinnej inkubacji z P_4 w skrawkach eksponowanych na PEM o częstotliwości 120 Hz, w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 2C**, *publikacja nr 2*).

6.3. Wpływ PEM na syntezę i sekrecję androstendionu (A_4), testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17β (E_2) w błonie śluzowej macicy (*publikacja nr 1 i nr 2*)

6.3.1. Wpływ PEM na syntezę i sekrecję A_4 i T w błonie śluzowej macicy

Wartości efektów głównych oraz interakcje pomiędzy badanymi parametrami (obecność PEM, czas trwania ekspozycji na PEM oraz obecność P_4), określające wpływ PEM na A_4 i T zostały przedstawione w **Tabeli 3C** (*publikacja nr 1*). Sekrecja A_4 była zależna od: a) obecności PEM (p = 0,004517); b) obecności P_4 (p < 0,000001); c) interakcji pomiędzy PEM i czasem ekspozycji (p = 0,000265) oraz d) interakcji pomiędzy PEM i P_4 (p = 0,000051). Sekrecja T była zależna od: a) obecności PEM (p = 0,000132); b) obecności P_4 (p < 0,000001); c) interakcji pomiędzy PEM i P_4 (p = 0,000014) oraz d) interakcji pomiędzy czasem ekspozycji na PEM i P_4 (0,005761).

W skrawach inkubowanych bez P_4 sekrecja A_4 była niższa ($p \leq 0,05$) po 2-godzinnej ekspozycji tkanki na PEM o częstotliwości 120 Hz (**Rycina 5A**, *publikacja nr 1*) oraz po 4-godzinnej inkubacji skrawków z PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz ($p \leq 0,05$) w porównaniu do kontroli (**Rycina 5B**, *publikacja nr 1*).

Sekrecja A_4 była wyższa ($p \leq 0,05$) po 4-godzinnej inkubacji z P_4, skrawków eksponowanych na PEM o częstotliwości 120 Hz w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 5B**, *publikacja nr 1*). Sekrecja T była niższa ($p \leq 0,05$) po 2- i 4-godzinnej inkubacji z P_4, skrawków eksponowanych na PEM o częstotliwości

50 i 120 Hz w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 5C, D**, *publikacja nr 1*).

6.3.2. Wpływ PEM na syntezę i sekrecję E_1 i E_2 w błonie śluzowej macicy

Wartości efektów głównych oraz interakcje pomiędzy badanymi parametrami (obecność PEM, czas trwania ekspozycji na PEM oraz obecność P_4) określające wpływ PEM na E_1 i E_2 zostały przedstawione w **Tabeli 3C** (*publikacja nr 2*). Sekrecja E_1 była zależna od a) obecności P_4 w medium inkubacyjnym ($p < 0{,}000001$) oraz b) interakcji pomiędzy PEM i P_4 ($p = 0{,}001418$). Sekrecja E_2 była zależna od obecności P_4 w medium inkubacyjnym ($p < 0{,}000001$).

W skrawach inkubowanych bez P_4 sekrecja E_1 była wyższa ($p \leq 0{,}05$) po 2-godzinnej ekspozycji tkanki na PEM o częstotliwości 120 Hz w porównaniu do kontroli (**Rycina 3A**, *publikacja nr 2*).

Sekrecja E_2 była niższa ($p \leq 0{,}05$) po 2-godzinnej inkubacji skrawków z P_4 i ich ekspozycji na PEM o częstotliwości 50 Hz w porównaniu do kontroli z dodatkiem P_4 (**Rycina 3C**, *publikacja nr 2*).

6.4. Wpływ PEM na profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy (*publikacja nr 3*)

6.4.1. Analiza zmian transkryptomu błony śluzowej macicy świń pod wpływem ekspozycji tkanki na PEM

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) pozwoliło na wskazanie genów o znanych funkcjach biologicznych, których ekspresja zmieniała się pod wpływem PEM, niekodujących RNA

o zróżnicowanej ekspresji (DE-ncRNA, ang. *differentially expressed non-coding RNA*), sieci interakcji pomiędzy wybranymi grupami genów, ontologii genów (GO), ścieżek biologicznych (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Gens and Genomes) i pojedynczych wariantów nukleotydowych (SNV, ang. *single nucleotide variant*). Ogólny zestaw danych RNA-seq zbudowano dla sześciu bibliotek cDNA – trzech przypisanych do błony śluzowej macicy eksponowanej na PEM i trzech przypisanych do tkanek kontrolnych, tj. nieeksponowanych na PEM. Łącznie po zsekwencjonowaniu uzyskano 329 577 212 nieprzetworzonych sparowanych odczytów (średnia 54 929 535 na próbę), a 263 807 006 z 311 761 610 przefiltrowanych odczytów było przypisanych do genomu świni (Ss11.1.98). Zmapowane odczyty zostały przypisane do: sekwencji kodujących (42,13%), regionów niepodlegających translacji (26,41%), regionów międzygenowych (18,33%) i intronów (13,13%).

Na podstawie analizy bioinformatycznej transkryptomu, wykazano że w błonie śluzowej macicy eksponowanej na PEM zidentyfikowanych zostało 1561 transkryptów, w tym 1100 stanowiły transkrypty niekodujące. W bazie danych ENSEMBL 461 zidentyfikowanych, zmienionych pod wpływem PEM transkryptów opisanych jest jako geny kodujące białka. Wykazano, że 305 genów, które uległy obniżonej ekspresji i 156 genów, które uległy podwyższonej ekspresji pod wpływem PEM, oznaczono jako geny kodujące białka.

6.4.2. Analiza ontologii genów

Do ontologii genów przypisano 341 genów (pełna lista znajduje się w **Tabeli dodatkowej nr 1**, *publikacja nr 3*)

o zróżnicowanej ekspresji (DEGs, ang. *differentially expressed genes*). Wszystkie geny, których poziom ekspresji w błonie śluzowej macicy eksponowanej na PEM uległ zmianie należą do trzech ontologii: proces biologiczny (27 BP, ang. *biological process*), funkcja molekularna (15 MF, ang. *molecular function*) i składnik komórkowy (2 CC, ang. *cellular component*). Lista ontologii genów z podziałem na kategorie jest dostępna w **Tabeli dodatkowej nr 2** oraz na **Rycinie 3** (*publikacja nr 3*). Osiem zidentyfikowanych GO:BP było powiązanych z odpowiedzią komórkową (ang. *cellular response*) i metabolizmem (ang. *metabolic process*), a pięć z rozwojem (ang. *development*).

6.4.3. Identyfikacja szlaków przekazywania sygnałów

Analiza szlaków sygnałowych wykazała dwa szlaki KEGG: szlak sygnałowy apeliny (ang. *apelin signaling pathway*) oraz szlak synteza, wydzielanie i działanie parathormonu (ang. *parathyroid hormone synthesis, secretion i action*). Analiza KEGG wykazała, że poziom ekspresji ośmiu genów, przypisanych do szlaku sygnałowego apeliny, obniżył się: *ADCY8* (ang. *adenylate cyclase 8*), *ADCY10* (ang. *adenylate cyclase 10*), *GNAI1* (ang. *G protein subunit alfa I1*), *GNAQ* (ang. *G protein subunit alfa Q*), *GNB5* (ang. *G protein subunit beta 5*), *MEF2D* (ang. *myocyte enhancer factor 2D*), *PRKCE* (ang. *protein kinase C epsilon*) i *RPS6KB1* (ang. *ribosomal protein S6 kinase B1*), a poziom ekspresji trzech genów podwyższył się: *NOS3* (ang. *nitric oxide synthase 3*), *PLAT* (ang. *plasminogen activator, tissue type*) i *SERPINE1* (ang. *serpin family E member 1*) – **Rycina 4**, *publikacja nr 3*. W szlaku sygnałowym apeliny wykazano również, że ekspozycja błony

śluzowej macicy na PEM wpłynęła na geny kodujące enzymy biorące udział w procesach takich jak zwężenie naczyń, proliferacja komórek, przerost serca, regulacja lipolizy w adipocytach, rozwój układu sercowo-naczyniowego i zahamowanie czynności nerek (**Rycina 4**, *publikacja nr 3*).

6.4.4. Analiza polimorfizmów

Analiza wykazała 247 983 SNV w błonie śluzowej macicy świni eksponowanej na działanie PEM. Analiza częstotliwości wariantu ujawniła 46 226 miejsc polimorficznych z alternatywnym allelem w co najmniej połowie bibliotek RNA-seq, a 2 563 podstawienia, oznaczone jako pojedynczy polimorfizm (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*), zostały usunięte z eksperymentu.

6.4.5. Weryfikacja danych uzyskanych z analizy następnej generacji (NGS)

Geny o zmienionym poziomie ekspresji (podwyższonym lub obniżonym) w błonie śluzowej macicy eksponowanej na działanie PEM o częstotliwości 50 Hz zostały poddane analizie Real Time PCR w celu potwierdzenia kierunku zmian poziomu ekspresji mRNA. Procedura walidacji wykazała, że uzyskane rezultaty są spójne z wynikami analiz NGS i są wysokiej jakości. Do potwierdzenia wyników pochodzących z analizy NGS wybrano następujące geny o podwyższonej pod wpływem PEM ekspresji: *IFNGR1* (ang. *interleukin 1 receptor accessory protein*), *MRAP2* (ang. *melanocortin 2 receptor accessory protein 2*), *NOS3* (ang. *nitric oxide synthase 3*), *SERPINE1* (ang. *serpin family E member 1*), *VDR* (ang. *vitamin D receptor*) oraz geny o obniżonej po wpływem PEM ekspresji: *EGR2* (ang. *early growth response 2*),

HSD17B2 (ang. *hydroxysteroid 17β dehydrogenase 2*), *ID2* (ang. *inhibitor of DNA binding 2*), *IL1RAP* (ang. *interferon-gamma receptor 1*), *PTGER4* (ang. *prostaglandin E receptor 4*). Poziomy ekspresji transkryptów mRNA przedstawiono na **Rycinie 6** (*publikacja nr 3*).

Rozdział 7.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

7.1. Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonych badań dokumentują, że w konsekwencji oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości (PEM) na błonę śluzową macicy świń w okresie około-implantacyjnym następują zmiany w procesie syntezy oraz sekrecji androgenów i estrogenów w tej tkance. W zależności od częstotliwości PEM, czasu ekspozycji tkanki na PEM oraz obecności lub braku P_4 w medium inkubacyjnym – PEM wpływa na poziom ekspresji mRNA *CYP17A1, HSD3B1*, *CYP19A3* i *HSD17B4* oraz koncentrację kodowanych przez te geny białek, a także zmienia poziom sekrecji androstendionu (A_4), testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17*β* (E_2).

Udokumentowano, że w przypadku obu zastosowanych częstotliwości PEM obniżyło poziom sekrecji T w obecności progesteronu (P_4), natomiast efekt ten nie był obserwowany w skrawkach błony śluzowej macicy inkubowanych bez dodatku P_4 do medium. Można zatem przypuszczać, że w przypadku syntezy i sekrecji T, P_4 pełni funkcję uwrażliwiającą tkankę na działanie PEM.

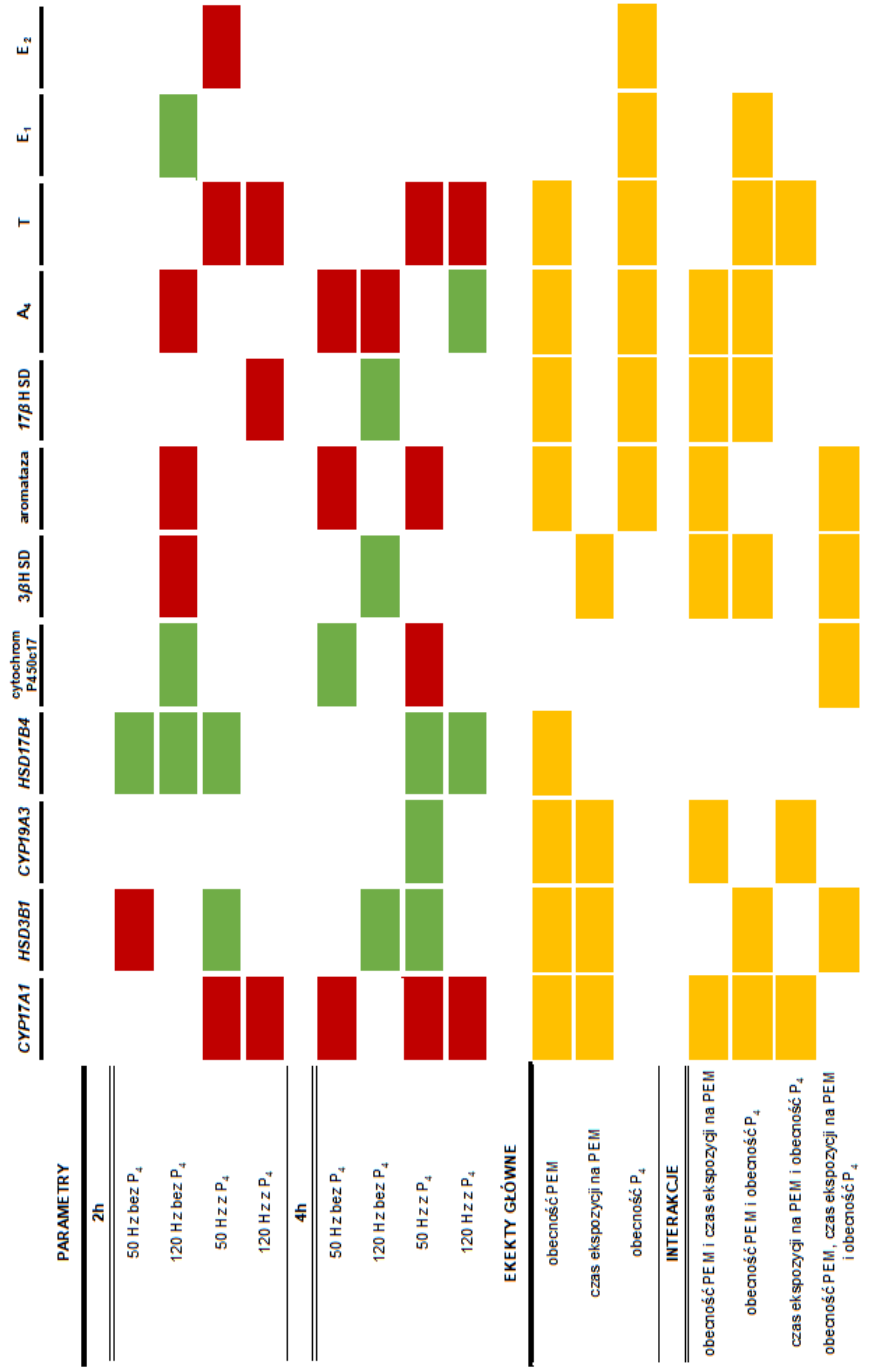
Z uwagi na rolę A_4, służącego u świń jako substrat do syntezy estrogenów, obserwowana niższa sekrecja A_4 przez skrawki błony śluzowej macicy eksponowane na PEM (120 Hz, 2 godziny), może potencjalnie skutkować niższym stężeniem estrogenów w macicy. Natomiast w skrawkach inkubowanych w obecności P_4 obserwowana wyższa sekrecja A_4 po wydłużonej (4-godzinnej) ekspozycji na PEM (120 Hz), może przyczynić się do wyższej niż optymalna produkcji estrogenów przez błonę śluzową macicy. W odniesieniu do sekrecji A_4 i E_1 zaobserwowano, że zmiany sekrecji A_4 i E_1 po krótkotrwałej (2-godzinnej) ekspozycji tkanki na PEM (120 Hz) nie były widoczne w obecności P_4, co świadczy o potencjalnie protekcyjnym działaniu tego hormonu przed niekorzystnymi skutkami oddziaływania PEM na badaną tkankę. Należy jednak zaznaczyć, że P_4 nie pełni (jak przypuszczano) wyłącznie funkcji ochronnych, ale również może uwrażliwiać tkankę na działanie PEM, ponieważ w przypadku dodatku P_4 do medium inkubacyjnego zaobserwowano obniżenie sekrecji E_2 (efekt PEM o częstotliwości 50 Hz, 2 godziny) oraz T (efekt PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz, 2 i 4 godziny), w konsekwencji ekspozycji tkanki na PEM. Wpływ PEM na badane androgeny i estrogeny, obserwowano zatem zarówno w obecności, jak i przy braku P_4 w medium inkubacyjnym. Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie stwierdzić, że w okresie około-implantacyjnym P_4 spełnia wyłącznie funkcję chroniącą błonę śluzową macicy przed niekorzystnymi skutkami oddziaływania PEM, jak ma to miejsce podczas cyklu rujowego (KOZIOROWSKA i in. 2018). Należy zatem stwierdzić, że podczas okresu około-implantacyjnego

P_4 może zarówno chronić, jak i uwrażliwiać błonę śluzową macicy na działanie PEM, a obserwowany efekt zależy od częstotliwości PEM i czasu jego oddziaływania oraz etapu procesu steroidogenezy.

Ogólne podsumowanie (**Rycina 1**), uwzględniające wszystkie efekty wywoływane przez PEM na badane geny, białka i hormony wykazało 19 istotnych zmian po 4 godzinach i 16 istotnych zmian po 2 godzinach inkubacji skrawków w obecności PEM. Zbiorcze analizy wykazują również, że liczba zmian występująca w tkance inkubowanej z PEM o częstotliwości 120 Hz była większa, niż liczba zmian po inkubacji z PEM o częstotliwości 50 Hz (bez dodatku P_4). Dodatkowo, biorąc pod uwagę częstotliwość PEM i obecność P_4 można stwierdzić, że PEM o częstotliwości 50 Hz wywołało więcej zmian w badanej tkance, niż PEM o częstotliwości 120 Hz. Z powyższych analiz wynika, że zmiany indukowane przez PEM występują częściej w tkance inkubowanej dłużej (4 godziny) oraz w obecności PEM o niższej częstotliwości (50 Hz) – gdy P_4 jest obecny i w obecności PEM o wyższej częstotliwości (120 Hz) – gdy P_4 nie jest obecny. Dodatkowo wykazano, że błona śluzowa macicy inkubowana *in vitro* w obecności P_4 jest uwrażliwiana częściej na działanie PEM o częstotliwości 50 Hz niż 120 Hz. Można zatem przypuszczać, że P_4 może uwrażliwiać tkankę na działanie PEM o częstotliwości 50 Hz i jednocześnie pełnić funkcje ochronne w tkance eksponowanej na PEM o częstotliwości 120 Hz. Podsumowując, wpływ PEM na błonę śluzową macicy inkubowaną *in vitro* był widoczny częściej jako statystycznie istotny w przypadku

syntezy oraz sekrecji androgenów, niż w przypadku syntezy oraz sekrecji estrogenów (**Rycina 1**).

Rycina 1. Podsumowanie statystycznie istotnych różnic, wywoływanych przez ekspozycję na działanie PEM w poziomie badanych genów, białek i hormonów w błonie śluzowej macicy. W tabeli statystycznie istotne różnice ($p \leq 0,05$) reprezentowane są przez kolory: **żółty** – wystąpienie statystycznie istotnej różnicy; **czerwony** – statystycznie istotny spadek; **zielony** – statystycznie istotny wzrost.


PARAMETRY
2h
50 Hz bez P4
120 Hz bez P4
50 Hz z P4
120 Hz z P4
4h
50 Hz bez P4
120 Hz bez P4
50 Hz z P4
120 Hz z P4
EKEKTY GŁÓWNE
obecność PEM
czas ekspozycji na PEM
obecność P4
INTERAKCJE
obecność PEM i czas ekspozycji na PEM
obecność PEM i obecność P4
czas ekspozycji na PEM i obecność P4
obecność PEM, czas ekspozycji na PEM i obecność P4
CYP17A1
HSD3B1
CYP19A3
HSD17B4
cytochrom P450c17
3βH SD
aromataza
17βH SD
A4
T
E1
E2

Zmieniając syntezę i uwalnianie androgenów oraz estrogenów w błonie śluzowej macicy w okresie około-implantacyjnym, PEM może indukować zmiany optymalnych stężeń tych hormonów w środowisku wewnątrzmacicznym i przez to zaburzać funkcje macicy podczas implantacji u świń. Oddziaływanie PEM na błonę śluzową może zatem wywoływać zmiany w procesach fizjologicznych zależnych od hormonów steroidowych obecnych w środowisku macicy. Zaburzenie syntezy i sekrecji androgenów i estrogenów produkowanych w błonie śluzowej macicy może wpłynąć na budowę i aktywność tej tkanki oraz w konsekwencji na utrzymanie wczesnej ciąży u badanego gatunku.

Wyniki przeprowadzonych badań dokumentują również, że PEM istotnie wpływa na zmiany w profilu transkryptomicznym błony śluzowej macicy. Za pomocą analizy NGS wykazano, że w tkance eksponowanej na PEM zmienia się ekspresja 461 genów (DEGs, ang. *differently expressed genes*). Dodatkowo stwierdzono, że geny o zmienionej ekspresji są zaangażowane w wiele istotnych procesów biologicznych takich jak: regulacja homeostazy energetycznej, proliferacja, przepływ krwi w macicy, modulacja migracji komórek i metabolizm.

W niniejszej pracy udokumentowano, że w wyniku ekspozycji błony śluzowej macicy na PEM, ekspresja genu *VDR* (ang. *vitamin D receptor*) w skrawkach śluzówki macicy została podwyższona, natomiast ekspresja genu *HSD17B2* (ang. *hydroxysteroid 17β dehydrogenase 2*) została obniżona. Mając na uwadze rolę *VDR* w oddziaływaniu witaminy D, która przyczynia się do zwiększonej syntezy estrogenów w macicy (GRZESIAK i in. 2019) oraz działanie

HSD17B2 jako regulatora metabolizmu hormonów steroidowych, który przekształca E_1 do E_2 oraz A_4 w T (PAYNE i HALES 2004) należy przypuszczać, że PEM wpływając na *VDR* i *HSD17B2* przyczynia się do zmienionej syntezy estrogenów i androgenów. Z tego powodu nie można wykluczyć, że zmiany związane z oddziaływaniem PEM na *VDR* i *HSD17B2* mogą zakłócać syntezę estrogenów i ich metabolizm w śluzówce macicy, przyczyniając się do hiperkoncentracji E_2 w środowisku wewnątrzmacicznym, co może wywierać negatywny (toksyczny) wpływ na zarodki w okresie około-implantacyjnym. Takie konsekwencje oddziaływania E_2 na zarodki zostały dobrze udokumentowane (GEISERT i in. 2006). Zastosowane w prezentowanej pracy sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) pozwoliło również na stwierdzenie, że ekspozycja błony śluzowej na PEM skutkuje zmianami profilu transkryptomicznego tkanki, związanymi m.in. z procesem steroidogenezy.

Niniejsze badania wykazały także, że pod wpływem PEM ekspresja genów *IFNGR1* (ang. *interleukin 1 receptor accessory protein*), *MRAP2* (ang. *melanocortin 2 receptor accessory protein 2*), *NOS3* (ang. *nitric oxide synthase 3*), *SERPINE1* (ang. *serpin family E member 1*) została podwyższona, a ekspresja genów *EGR2* (ang. *early growth response 2*), *ID2* (ang. *inhibitor of DNA binding 2*), *IL1RAP* (ang. *interferon-gamma receptor 1*), *PTGER4* (ang. *prostaglandin E receptor 4*) została obniżona. Geny *ID2, NOS3 i SERPINE1* są zaangażowane w mechanizmy warunkujące hamowanie procesów biologicznych (ang. *negative regulation of biological process*) i regulację procesów metabolicznych

(ang. *regulation of metabolic process*). W konsekwencji obserwowane zmiany wywołane oddziaływaniem PEM mogą zatem prowadzić do zaburzeń homeostazy, zmian w strukturze, proliferacji i migracji komórek badanej tkanki, a także mogą wpływać na przepływ krwi w macicy i zaburzać konwersję androgenów oraz estrogenów. Zmieniona wskutek działania PEM ekspresja wspomnianych genów, mogąca zaburzać procesy biologiczne, może wpływać na prawidłowe środowisko wewnątrzmaciczne, niezbędne do prawidłowego rozwoju zarodka.

W nawiązaniu do istniejącej wiedzy dotyczącej konsekwencji oddziaływania PEM na organizmy żywe, skupino się na możliwych mechanizmach, które mogą być zmienione przez PEM w okresie około-implantacyjnym. Przedstawione wyniki dostarczają cennych danych dokumentujących wpływ PEM na błonę śluzową macicy świni domowej w okresie około-implantacyjnym. Co więcej, uzyskane wyniki mogą posłużyć do dalszych badań np. nad wpływem stosowanego PEM na układ rozrodczy samic w przypadkach wymagających interwencji medycznych.

Aby możliwym było zachowanie prawidłowo funkcjonującego układu rozrodczego samic należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć nadmiernej i potencjalnie szkodliwej ekspozycji na PEM, zwłaszcza w okresie wczesnej ciąży, Dodatkowo, aby móc chronić się przed skutkami lub łagodzić skutki narażenia tkanek układu rozrodczego na PEM, warto skupić się na wykorzystaniu dostępnych możliwości ograniczających naszą ekspozycję na ten czynnik środowiskowy w życiu codziennym. Podsumowując, przedstawione wyniki badań wskazują, że PEM wpływa na procesy

zachodzące w macicy w krytycznym okresie, jakim jest okres około-implantacyjny.

7.2. Wnioski

1. Pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości (PEM) powoduje zmiany w syntezie oraz sekrecji androgenów i estrogenów w błonie śluzowej macicy świń w okresie około-implantacyjnym, zależnie od częstotliwości i czasu ekspozycji tkanki na PEM oraz obecności lub braku P_4.

2. W okresie około-implantacyjnym progesteron nie pełni wyłącznie funkcji ochronnej przed niekorzystnymi skutkami oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na błonę śluzową macicy, ale może również uwrażliwiać tkankę na jego działanie.

3. Pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości powoduje zmiany w profilu transkryptomicznym błony śluzowej macicy świń w okresie około-implantacyjnym.

Rozdział 8.

PIŚMIENNICTWO

ANDREWS S. *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.* **Babraham Bioinforma. 2010** (Available online, accessed 1 January 2020).

AYDIN M., CEVIK A., KANDEMIR F., YUKSEL M., APAYDIN A. *Evaluation of hormonal change, biochemical parameters, and histopathological status of uterus in rats exposed to 50-Hz electromagnetic field.* **Toxicol. Ind. Health 2009**, 25:153-158. DOI:10.1177/0748233709102717

BAZER F.W., JOHNSON G.A., WU G. *Amino acids and conceptus development during the peri-implantation period of pregnancy.* **Adv. Exp. Med. Biol. 2015**, 843: 23-52. DOI:10.1007/978-1-4939-2480-6_2

BERNABÒ N., TETTAMANTI E., RUSSO V., MARTELLI A., TURRIANI M., MATTOLI M., BARBONI B. *Extremely low-frequency electromagnetic field exposure affects fertilization outcome in swine animal model.* **Theriogenology 2010**, 73:1293-1305. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.12.010

BOLGER A.M., LOHSE M., USADEL B. *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.* **Bioinformatics 2014**, 30:2114-2120. DOI:10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170

BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J., WITTWER C.T. *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.* **Clin. Chem. 2009**, 55: 611-622. DOI:10.1373/clinchem.2008.112797

CAO Y.N., ZHANG Y., LIU Y. *Effects of exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields on reproduction of female mice and development of offsprings.* **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2006**, 24: 468-470.

CHRISTENSON L.K., ANDERSON L.H., FORD S.P., FARLEY D.B. *Luteal maintenance during early pregnancy in the pig: role for prostaglandin E_2.* **Prostaglandins 1994**, 47:61-75. DOI:10.1016/0090-6980(94)90075-2

CIERESZKO R. *Radioimmunoassay of steroid hormones in biological fluids,* in **Animal Physiology Demonstration and Methods** (Przała J., Editor), University of Warmia and Mazury Press – Olsztyn, Poland **1999**:157-163.

DOBIN A., DAVIS C.A., SCHLESINGER F., DRENKOW J., ZALESKI C., JHA S., BATUT P., CHAISSON M., GINGERAS T.R. *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner.* **Bioinformatics 2013,** 29:15-21. DOI:10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635

DRZEWIECKA E.M., KOZLOWSKA W., PAUKSZTO L., ZMIJEWSKA A., WYDORSKI P.J., JASTRZEBSKI J.P., FRANCZAK A. *Effect of the electromagnetic field (EMF) radiation on transcriptomic profile of pig myometrium during the peri-implantation period – an in vitro study.* **Int. J. Mol. Sci. 2021a**, 22:1-19. DOI:10.3390/ijms22147322

DRZEWIECKA E.M., KOZLOWSKA W., ZMIJEWSKA A., WYDORSKI P.J., FRANCZAK A. *Electromagnetic field (EMF) radiation alters estrogen release from the pig myometrium during the peri-implantation period.* **Int. J. Mol. Sci. 2021b**, 22:1-19. DOI:10.3390/ijms22062920

FRANCZAK A. *Endometrial and myometrial secretion of androgens and estrone during early pregnancy and luteolysis in pigs.* **Reprod. Biol. 2008**, 8:213-228. DOI:10.1016/S1642-431X(12)60013-8

FRANCZAK A., KOTWICA G. *Androgens and estradiol-17β production by porcine uterine cells: in vitro study.* **Theriogenology 2010**, 73:232-241. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.09.004

FRANCZAK A., KOTWICA G. *Secretion of estradiol-17β by porcine endometrium and myometrium during early pregnancy and luteolysis.* **Theriogenology 2008**, 69:283-289. DOI:10.1016/j.theriogenology.2007.09.023

FRANCZAK A., WASZKIEWICZ E., KOZLOWSKA W., ZMIJEWSKA A., KOZIOROWSKA A. *Consequences of electromagnetic field (EMF) radiation during early pregnancy - androgen synthesis and release from the myometrium of pigs in vitro.* **Anim. Reprod. Sci 2020**, 106465. DOI:10.1016/j.anireprosci.2020.106465

FRANCZAK A., ZMIJEWSKA A., KUROWICKA B., WOJCIECHOWICZ B., KOTWICA G. *Interleukin 1β-induced synthesis and secretion of prostaglandin E_2 in the porcine uterus during various periods of pregnancy and the estrous cycle.* **J Physiol Pharmacol. 2010**, 61:733-742.

GAJŠEK P., RAVAZZANI P., GRELLIER J., SAMARAS T., BAKOS J., THURÓCZY G. *Review of studies concerning electromagnetic field (EMF) exposure assessment in Europe: low-frequency fields*
(50 Hz-100 kHz). **Int. J. Environ. Res. Public Health 2016**, 13:875. DOI:10.3390/ijerph13090875

GEISERT R.D., RENEGAR R.H., THATCHER W.W., ROBERTS R.M., BAZER F.W. *Establishment of pregnancy in the pig: interrelationships between preimplantation development of the*

pig blastocyst and uterine endometrial secretions. **Biol. Reprod. 1982**, 27:925-939. DOI:10.1095/biolreprod27.4.925

GEISERT R.D., ROSS J.W., ASHWORTH M.D., WHITE F.J., JOHNSON G.A., DESILVA U. *Maternal recognition of pregnancy signal or endocrine disruptor: the two faces of oestrogen during establishment of pregnancy in the pig.* **Soc Reprod Fertil Suppl. 2006**, 62:131-145.

GEISERT R.D., ZAVY M.T., MOFFATT R.J., BLAIR R.M., YELLIN T. *Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs.* **J Reprod Fertil Suppl. 1990**, 40:293-305.

GRADDY L.G., KOWALSKI A.A., SIMMEN F.A., DAVIS S.L.F., BAUMGARTNER W.W., SIMMEN R.C.M. *Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes.* **J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2000**, 73:49-57. DOI:10.1016/S0960-0760(00)00054-6

GRANDOLFO M. *Protection of workers from power frequency electric and magnetic fields: A practical guide,* in **Occupational Safety and Health Series**, International Labour Office – Geneva, Switzerland **1994**:69.

GYE M.C., PARK C.J. *Effect of electromagnetic field exposure on the reproductive system.* **Clin. Exp. Reprod. Med. 2012**, 39:1-9. DOI:10.5653/cerm.2012.39.1.1

GRZESIAK M., WASZKIEWICZ E.M., WOJTAS M., KOWALIK K., FRANCZAK A. *Expression of vitamin D receptor in the porcine uterus and effect of 1,25(OH)2D3 on progesterone and estradiol-17β secretion by uterine tissues in vitro.* **Theriogenology 2019,** 125:102-108. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.10.026

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Non-ionizing radiation, part 2: radiofrequency electromagnetic fields.* **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 2013**,102:1-460.

JARVIS G.E. *Early embryo mortality in natural human reproduction: what the data say.* **F1000Research 2017**, 5:1-42. DOI:10.12688/f1000research.8937.2

KANEHISA M. *Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms.* **Protein Sci. 2019**, 28:1947-1951. DOI:10.1002/PRO.3715

KANEHISA M., FURUMICHI M., SATO Y. ISHIGURO-WATANABE M., TANABE M. *KEGG: integrating viruses and cellular organisms.* **Nucleic Acids Res. 2021**, 49:545-551. DOI:10.1093/NAR/GKAA970

KANEHISA M., GOTO S. *KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes.* **Nucleic Acids Res. 2000**, 28:27-30. DOI:10.1093/NAR/28.1.27

KANG Y.J., YANG D.C., KONG L., HOU M., MENG Y.Q., WEI L., GAO G. *CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features.* **Nucleic Acids Res. 2017**, 45:12-16. DOI:10.1093/nar/gkx428

KLIMEK A., ROGALSKA J. *Extremely low-frequency magnetic field as a stress factor – really detrimental? – Insight into literature from the last decade.* **Brain Sci. 2021**, 11:1-20. DOI:10.3390/BRAINSCI11020174

KOZIOROWSKA A., WASZKIEWICZ E.M., ROMEROWICZ-MISIELAK M., ZGLEJC-WASZAK K., FRANCZAK A. *Extremely low-frequency*

electromagnetic field (EMF) generates alterations in the synthesis and secretion of oestradiol-17β (E_2) in uterine tissues: an in vitro study. **Theriogenology 2018**, 1:86-95. DOI:10.1016 / j.theriogenology.2017.12.041

KRZYWINSKI M., SCHEIN J., BIROL I., CONNORS J., GASCOYNE R., HORSMAN D., JONES S.J., MARRA M.A. *Circos: an information aesthetic for comparative genomics.* **Genome Res. 2009**, 19:1639-1645. DOI:10.1101/GR.092759.109

LI A., ZHANG J., ZHOU Z. *PLEK: a tool for predicting long non-coding RNAs and messenger RNAs based on an improved k-mer scheme.* BMC **Bioinformatics 2014**, 15:311. DOI:10.1186/1471-2105-15-311

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* **Methods 2001**, 25:402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262

LÓPEZ O.G.M., VALBUENA A.J., UNTURBE C.M. *Significant cellular viability dependence on time exposition at ELF-EMF and RF-EMF in vitro studies.* **Int. J. Environ. Res. Public Health 2019**, 16:2085. DOI:10.3390/IJERPH16122085

LOURENCINI DA SILVA R., ALBANO F., LOPES DOS SANTOS L.R., TAVARES A.D., FELZENSZWALB I. *The effect of electromagnetic field exposure on the formation of DNA lesions.* **Redox Rep. 2000**, 5:299-301. DOI:10.1179/135100000101535843

LOVE M.I., HUBER W., ANDERS S. *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.*

Genome Biol. 2014, 1512:1-21. DOI:10.1186/S13059-014-0550-8

MAHAKI H., JABARIVASAL N., SARDANIAN K., ZAMANI A. *Effects of various densities of 50 Hz electromagnetic field on serum IL-9, IL-10, and TNF-α levels.* **Int J Occup Env. Med 2020**, 11:24-32. DOI:10.15171/IJOEM.2020.1572

MANSOURI E., ALIHEMMATI A., MESBAHI A. *An overview on the effects of power-frequency electromagnetic field exposure on the female reproduction system, pregnancy outcome and fetal development.* **J. Med. Chem. Sci. 2020**, 3:60-70. DOI:10.26655/JMCHEMSCI.2020.1.8

MCKENNA A., HANNA M., BANKS E., SIVACHENKO A., CIBULSKIS K., KERNYTSKY A., GARIMELLA K., ALTSHULER D., GABRIEL S., DALY M., DEPRISTO M.A. *The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data.* **Genome Res. 2010**, 20:1297-1303. DOI:10.1101/GR.107524.110

MCLAREN W., GIL L., HUNT S.E., RIAT H.S., RITCHIE G.R.S., THORMANN A., FLICEK P., CUNNINGHAM F. *The Ensembl variant effect predictor.* **Genome Biol. 2016**, 171:1-14. DOI:10.1186/S13059-016-0974-4

MORDHORST B.R., PRATHER R.S. *Pig models of reproduction.* **Anim. Model. Hum. Reprod. 2017**:213-234. DOI:10.1002/9781118881286.CH9

OZGUNER M., KOYU A., CESUR G., URAL M., OZGUNER F., GOKCIMEN A., DELIBAS N. *Biological and morphological effects*

on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. **Saudi Med J. 2005**, 26:405-410.

PAYNE A.H., HALES D.B. *Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones.* **Endocr. Rev. 2004**, 25:947-970. DOI:10.1210/er.2003-0030

PERTEA M., PERTEA G.M., ANTONESCU C.M., CHANG T.C., MENDELL J.T., SALZBERG S.L. *StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads.* **Nat. Biotechnol. 2015**, 33:290-295. DOI:10.1038/NBT.3122

RAJAEI F., BORHANI N., SABBAGH-ZIARANI F., MASHAYEKHI F. *Effects of extremely low-frequency electromagnetic field on fertility and heights of epithelial cells in pre-implantation stage endometrium and fallopian tube in mice.* **J. of Chinese Integrative Med. 2010**, 8:56-60. DOI:10.3736/JCIM20100111

REIMAND J., ARAK T., ADLER P., KOLBERG L., REISBERG S., PETERSON H., VILO J. *g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists*. **Nucleic Acids Res. 2016**, 44:83-89. DOI:10.1093/NAR/GKW199

ROBISON J.G., PENDLETON A.R., MONSON K.O., MURRAY B.K., O’NEILL K.L. *Decreased DNA repair rates and protection from heat-induced apoptosis mediated by electromagnetic field exposure.* **Bioelectromagnetics 2002**, 23:106-112. DOI:10.1002/bem.103

SANTINI S.J., CORDONE V., FALONE S., MIJIT M., TATONE C., AMICARELLI F., DI EMIDIO G. *Role of mitochondria in the oxidative stress induced by electromagnetic fields: focus*

on reproductive systems. **Oxid. Med. Cell. Longev. 2018**, DOI:10.1155/2018/5076271

SCHMITZ C., KELLER E., FREUDING T., SILNY J., KORR H. *50-Hz magnetic field exposure influences DNA repair and mitochondrial DNA synthesis of distinct cell types in brain and kidney of adult mice.* **Acta Neuropathol. 2004**. 107: 257-264. DOI:10.1007/s00401-003-0799-6

SONG K., IM S.H., YOON Y.J., KIM H.M., LEE H.J., PARK G.S. *A 60 Hz uniform electromagnetic field promotes human cell proliferation by decreasing intracellular reactive oxygen species levels.* **PLoS One 2018**, 13:0199753. DOI:10.1371/journal.pone.0199753

SPENCER T.E., JOHNSON G.A., BURGHARDT R.C., BAZER F.W. *Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals.* **Biol. Reprod. 2004**, 71:2-10. DOI:10.1095/biolreprod.103.024133

SZAFRAŃSKA B., ZIECIK A., OKRASA S. *Primary antisera against selected steroids or proteins and secondary antisera against gamma-globulins – an available tool for studies of reproductive processes.* **Reprod Biol. 2002**, 2:187-204.

TOOSSI M.H.B., SADEGHNIA H.R., FEYZABADI M.M.M., HOSSEINI M., HEDAYATI M., MOSALLANEJAD R., BEHESHTI F., RAHVAR Z.A. *Exposure to mobile phone (900–1800 MHz) during pregnancy: tissue oxidative stress after childbirth.* **J. of Maternal-Fetal and Neonatal Med. 2018**, 31: 1298-1303.

WANG J., PAN Y., SHEN S., LIN L., XING Y. *rMATS-DVR: rMATS discovery of differential variants in RNA.* **Bioinformatics 2017**, 33:2216-2217. DOI:10.1093/BIOINFORMATICS/BTX128

WANG L., PARK H.J., DASARI S., WANG S., KOCHER J.P., LI W. *CPAT: coding-potential assessment tool using an alignment-free logistic regression model.* **Nucleic Acids Res. 2013**, 41:74. DOI:10.1093/nar/gkt006

WOJCIECHOWICZ B., KOTWICA G., KOLAKOWSKA J., FRANCZAK A. *The activity and localization of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ(5)-Δ(4) isomerase and release of androstenedione and progesterone by uterine tissues during early pregnancy and the estrous cycle in pigs.* **J. Reprod. Dev. 2013**, 59:49-58. DOI:10.1262/JRD.2012-099

WOJCIECHOWICZ B., KOTWICA G., ZGLEJC K., WASZKIEWICZ E., FRANCZAK A. *Expression of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase and the effects of LH, FSH and prolactin on oestrone and 17β-oestradiol secretion in the endometrium of pigs during early pregnancy and the oestrous cycle.* **Reprod. Fertil. Dev. 2016**, 29:975. DOI:10.1071/RD15430

ZIECIK A.J. *Old, new and the newest concepts of inhibition of luteolysis during early pregnancy in pig.* **Domest. Anim. Endocrinol. 2002**, 23:265-275. DOI:10.1016/S0739-7240(02)00162-5

ZIECIK A.J., BLITEK A., KACZMAREK M.M., WACLAWIK A., BOGACKI M. *Inhibition of luteolysis and embryo-uterine interactions during the peri-implantation period in pigs.* **Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 2006**, 62:147-161.

Rozdział 9.

STRESZCZENIA PRACY DOKTORSKIEJ

9.1. Streszczenie

Rosnąca industrializacja wpływa na środowisko, przyczyniając się do narażenia organizmów żywych na czynniki potencjalnie szkodliwe, w tym pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości (PEM), emitowane przez urządzenia codziennego użytku. PEM może wpływać na przebieg licznych procesów fizjologicznych w organizmach żywych, a konsekwencje ekspozycji tkanek układu rozrodczego samic ssaków na PEM nie są dobrze poznane. Uwzględniając rolę błony śluzowej macicy zbadano wpływ PEM na proces steroidogenezy i profil transkryptomiczny tej tkanki, wyizolowanej od świń (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie około-implantacyjnym.

Stwierdzono, że w zależności od częstotliwości PEM (50 Hz lub 120 Hz), czasu ekspozycji tkanki na PEM (2 lub 4 godziny) i obecności lub braku progesteronu (P_4) w medium inkubacyjnym, w konsekwencji oddziaływania PEM na błonę śluzową macicy dochodzi w tej tkance do zmian poziomu ekspresji mRNA *CYP17A1, HSD3B1*, *CYP19A3*, *HSD17B4* i koncentracji kodowanych przez te geny białek oraz zmian sekrecji androstendionu (A_4), testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17β (E_2). Udokumentowano również, że 2-godzinne oddziaływanie PEM o częstotliwości 50 Hz zmienia profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy.

Zaobserwowano obniżoną sekrecję A_4 i podwyższoną sekrecję E_1 po krótkotrwałej (2-godzinnej) inkubacji błony śluzowej macicy w obecności PEM o częstotliwości 120 Hz w porównaniu

do kontroli (brak PEM), a powyższe zmiany nie były widoczne w skrawkach inkubowanych z dodatkiem P_4 w medium. Progesteron wykazywał zatem działanie ochronne przed niekorzystnym oddziaływaniem PEM. Jednakże, w obecności P_4 wykazano również obniżoną pod wpływem PEM (w porównaniu do kontroli – brak PEM) sekrecję T (PEM 50 i 120 Hz, 2 i 4 godziny ekspozycji) i E_2 (PEM 50 Hz, 2 godziny ekspozycji), ale zmian tych nie zaobserwowano w przypadku braku dodatku P_4 do medium inkubacyjnego. Powyższe obserwacje pozwalają na stwierdzenie, że w tym przypadku P_4 uwrażliwiał tkankę na działanie PEM. Wykazano zatem, że w okresie około-implantacyjnym P_4 nie tylko może chronić błonę śluzową macicy przed niekorzystnymi skutkami oddziaływania PEM, ale również może uwrażliwiać tę tkankę na jego działanie.

Zastosowane sekwencjonowania następnej generacji (NGS) pozwoliło na udokumentowanie, że ekspozycja błony śluzowej na PEM przyczynia się do zmian profilu transkryptomicznego badanej tkanki. W skrawkach błony śluzowej eksponowanych na PEM (50 Hz, 2 godziny) stwierdzono zmiany poziomu ekspresji 461 genów, m.in. takich jak: *IFNGR1, MRAP2, NOS3, SERPINE1, VDR* (wzrost ekspresji) i *EGR2, HSD17B2, ID2, IL1RAP*, *PTGER4* (obniżenie ekspresji). Nie można wykluczyć, że obserwowane pod wpływem PEM zmiany w poziomie ekspresji *VDR* i *HSD17B2,* mogą być przyczyną zakłóconej syntezy estrogenów i ich metabolizmu w śluzówce macicy, przyczyniając się do zwiększonej koncentracji E_2 w środowisku wewnątrzmacicznym. Stwierdzono, że w wyniku ekspozycji błony śluzowej macicy na PEM dochodzi do zmian ekspresji genów

zaangażowanych również w wiele innych istotnych procesów biologicznych, takich jak: regulacja homeostazy energetycznej, proliferacja, przepływ krwi w macicy, modulacja migracji komórek oraz metabolizm.

Obserwowane w konsekwencji oddziaływania PEM zmiany profilu transkryptomicznego i procesu steroidogenezy w błonie śluzowej macicy mogą prowadzić nie tylko do zaburzeń aktywności tej tkanki, ale również mogą być przyczyną zmian w stężeniu hormonów steroidowych w środowisku wewnątrzmacicznym, co może wpływać na sukces implantacji.

Z uwagi na codzienne czynności wymagające korzystania z urządzeń elektronicznych nie jesteśmy w stanie całkowicie wyeliminować PEM ze środowiska. Wiedza i świadomość dotycząca potencjalnego zagrożenia, jakie może nieść za sobą ekspozycja samic w okresie około-implantacyjnym na PEM może pomóc w opracowaniu strategii mających na celu ograniczenie potencjalnie szkodliwego narażenia na ten czynnik, w celu zachowania prawidłowego funkcjonowania układu rozrodczego samic i jego ochrony.

Słowa kluczowe: błona śluzowa macicy; okres około-implantacyjny; pole elektromagnetyczne; profil transkryptomiczny; steroidogeneza; świnia domowa (*Sus scrofa domestica* L.)

9.2. Summary

Increasing industrialization influences the environment, contributing to the exposure of living organisms to potentially harmful factors – including extremely low-frequency electromagnetic field (EMF) emitted by household devices. In living organisms, EMF can influence the course of many physiological processes, but the consequences of the exposure of the female reproductive system to EMF are not well understood. Taking into account the importance of the endometrial tissue during embryo implantation examined the influence of the EMF on the synthesis of and secretion of androgens and estrogens in the endometrium of pigs (*Sus scrofa domestica* L.) during the peri-implantation period and the transcriptomic profile of the tissue.

It was found that, depending on the EMF frequency (50 and 120 Hz), treatment duration (2 h and 4 h), and the presence or absence of progesterone (P_4), EMF changes the mRNA transcript abundance, *i.e. CYP17A1, HSD3B1, CYP19A3,* and *HSD17B4,* and the concentration of encoded proteins and the secretion of androstenedione (A_4), testosterone (T), (estrone) E_1, and (estradiol-17β) E_2. It has also been documented that EMF (50 Hz, 2 h) changes the transcriptomic profile of the endometrium.

Decreased A_4 secretion and increased E_1 secretion were observed after a short treatment duration (2 h) of the endometrium with EMF at 120 Hz compared to the control (no EMF). The above changes were not observed after incubation in the presence of P_4. Thus, P_4 had a protective effect against the adverse effects of EMF. However,

it was also observed, that in the presence of P_4, T secretion (50 and 120 Hz, 2 and 4 h) and E_2 (50 Hz, 2 h) were decreased after exposure to EMF (vs. control – no EMF) but these changes were not observed in the absence of P_4 in the incubation medium. Therefore, it can be assumed that P_4 may also sensitize the tissue to the EMF treatment. It has been shown that in the peri-implantation period P_4 can not only protect the endometrium against the adverse/hazardous effects of EMF but also sensitize the tissue to EMF.

The next-generation sequencing (NGS) used in the present work allowed to determine changes in the transcriptomic profile of the endometrium as a consequence of exposure to EMF. The changes in the expression of 461 genes, including: *IFNGR1, MRAP2, NOS3, SERPINE1, VDR* (increased expression) and *EGR2, HSD17B2, ID2, IL1RAP, PTGER4* (decreased expression). It cannot be excluded that the EMF-related differences in *VDR* and *HSD17B2* expression may interfere with the synthesis and secretion of estrogens in the endometrium, contributing to the potential hyper-concentration of E_2 in the intrauterine environment, which may have a toxic effect on the embryos during the peri-implantation period. It was determined, that genes with altered expression under the influence of EMF are involved in many important biological processes, such as regulation of energy homeostasis, proliferation, uterine blood flow, modulation of cell migration, and metabolism.

The observed changes in the process of steroidogenesis and transcriptomic profile of the endometrium may not only lead to disrupt the activity of the tissue but also may cause changes in the concentration of steroid hormones in the intrauterine environment, which may affect the success of implantation.

Due to the daily activities that require the use of electronic devices, we are not able to completely eliminate EMF from the surrounding environment. Knowledge and awareness of the potential risks of EMF exposure can help in developing strategies to reduce potentially harmful exposure to this factor in order to maintain the proper functioning of the female reproductive system and to protect it.

Keywords: domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.); electromagnetic field; endometrium; peri-implantation period; steroidogenesis; transcriptomic profile

Rozdział 10.

REGULACJE PRAWNE DOTYCZĄCE DOŚWIADCZEŃ NA ZWIERZĘTACH

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na tkankach pobranych podczas regularnych procedur uboju zwierząt, przeprowadzonego w profesjonalnej ubojni, w miejscowości Rozdroże, k. Nidzicy, Polska). Żywe zwierzęta nie były utrzymywane przez autorów. Zgodnie z ustawodawstwem Unii Europejskiej (DYREKTYWA PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. Unii Europejskiej; art. 3 [Definicje], ust. 1) i prawem polskim (ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. art. 2 ust. 1, pkt 6) w przypadku badań prowadzonych na tkankach zwierzęcych zgoda komisji etycznej nie jest wymagana.

Rozdział 11.

ZAŁĄCZNIKI

11.1. Załącznik 1 (***publikacja nr 1***)

11.2. Załącznik 2 (***publikacja nr 2***)

11.3. Załącznik 3 (***publikacja nr 3***)