

Załącznik nr 2
do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Autoreferat

dr Paulina Sicińska
Katedra Biofizyki Skazań Środowiska,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki.

Łódź, 2023

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	3
4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zawarte w niniejszej rozprawie habilitacyjnej	4
4.3. Opis osiągnięcia naukowego.....	6
5. Opis pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	21
5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora	21
5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora	23
6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury w szczególności zagranicznej	35
7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	38
7.1. Działalność dydaktyczna	38
7.1.1. Prowadzone zajęcia	38
7.1.2. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego.....	38
7.1.3. Opieka naukowa nad magistrantami i licencjuszami.....	39
7.1.4. Opieka naukowa nad stażystami	39
7.2. Działalność w zakresie organizacyjnym	39
7.3. Działalność w zakresie popularyzacji nauki	39
8. Inne osiągnięcia	40
8.1. Recenzje artykułów	40
8.2. Szkolenia	41
8.3. Nagrody	41
9. Bibliometryczne podsumowanie dorobku publikacyjnego	42
10. Literatura.....	42

1. Imię i nazwisko

Paulina Sicińska

ORCID: 0000-0002-6139-2613

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2000 Magister biologii w zakresie biochemii.

Praca wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego pod tytułem „Wpływ cyjanotoksyn na oksydazę cytochromu c”

Promotor: Prof. dr hab. Zofia Walter

2005 Doktor nauk biologicznych w zakresie biofizyki.

Praca wykonana w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod tytułem „Wpływ toksyn sinicowych na erytrocyty człowieka”

Promotor: Prof. dr hab. Wirgiliusz Duda.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

2006–2010 Specjalista biofizyk w zakresie cytometrii w grupie pracowników naukowo-technicznych. Pracownia Cytometrii, Katedra Biofizyki Molekularnej (obecnie Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki), Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki.

Od 01.11.2010 Adiunkt naukowo-dydaktyczny, Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 5 powiązanych tematycznie publikacji naukowych pod wspólnym tytułem:

„Mechanizmy działania wybranych ftalanów i ich metabolitów w bezjądrzastych i jądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka”

4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zawarte w niniejszej rozprawie habilitacyjnej

Listę publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zgłoszonego we wniosku habilitacyjnym wraz z opisem mojego wkładu oraz wskaźnikami bibliometrycznymi przedstawiłam poniżej (kopie publikacji znajdują się w Załączniku nr. 5, a oświadczenia współautorów w Załączniku nr. 6). Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR).

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, IF) wynosi: zgodnie z rokiem opublikowania: **23,906** (IF_{2022/2023} = 26,896).

Łączna liczba punktów MEiN wynosi **620***.

Liczba cytowań (bez autocytowań) wg bazy Web of Science wynosi **70**, wg bazy Scopus równa jest **78**.

Publikacja A1.

Sicińska P.

Di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate and their metabolites induce haemolysis and eryptosis in human erythrocytes.

Chemosphere. 2018 Jul; 203:44-53.doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.161.

IF₂₀₁₈ = 5,108; IF_{2022/2023} = 8,80; MEiN* = 140 pkt

Liczba cytowań (bez autocytowań) = 33 (Web of Science), 35 (Scopus).

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji badań, wyborze metodyki badań, przygotowaniu prób do analizy, wykonaniu oznaczeń, opracowaniu i analizie wyników. Napisaniu publikacji, prezentacji danych, wysłaniu publikacji do czasopisma, prowadzeniu korespondencji z Edytorem, zmodyfikowaniu manuskryptu zgodnie z sugestiami Recenzentów, udzielaniu odpowiedzi na uwagi i pytania w trakcie recenzji pracy.

Mój udział procentowy wynosi 100%.

Publikacja A2.

Sicińska P., Kik K., Bukowska B.

Human Erythrocytes exposed to phthalates and their metabolites alter antioxidant enzyme activity and hemoglobin oxidation.

Int J Mol Sci. 2020 Jun 24;21(12):4480. doi: 10.3390/ijms21124480.

IF₂₀₂₀ = 5,923, IF_{2022/2023} = 5,60; MEiN* = 140 pkt

Liczba cytowań (bez autocytowań) = 11 (Web of Science), 12 (Scopus).

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji badań, wyborze metodyki badań, wykonaniu oznaczeń, opracowaniu i analizie wyników, napisaniu wstępnej wersji publikacji i prezentacji danych, współtworzeniu ostatecznej wersji pracy, wysłaniu publikacji do czasopisma i prowadzeniu korespondencji z Edytorem, zmodyfikowaniu

manuskryptu zgodnie z sugestiami Recenzentów, współuczestniczeniu w udzielaniu odpowiedzi na uwagi i pytania w trakcie recenzji pracy.

Mój udział procentowy oceniam na 80%.

Publikacja A3.

Sicińska P.

Di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate, and their metabolites exhibit different apoptotic potential in human peripheral blood mononuclear cells.

Food Chem Toxicol. 2019 Nov;133:110750. doi: 10.1016/j.fct.2019.110750.

IF₂₀₁₉ = 4,679; IF_{2022/2023} = 4,3; MEiN* = 100 pkt

Liczba cytowań (bez autocytowań) = 11 (Web of Science), 12 (Scopus).

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji badań, wyborze metodyki badań, przygotowaniu prób do analizy, wykonaniu oznaczeń, opracowaniu i analizie wyników. Napisaniu publikacji, prezentacji danych, wysłaniu publikacji do czasopisma, prowadzeniu korespondencji z Edytorem, zmodyfikowaniu manuskryptu zgodnie z sugestiami Recenzentów, udzielaniu odpowiedzi na uwagi i pytania w trakcie recenzji pracy.

Mój udział procentowy wynosi 100%.

Publikacja A4.

Sicińska P., Mokra K., Wozniak K., Michałowicz J., Bukowska B.

Genotoxic risk assessment and mechanism of DNA damage induced by phthalates and their metabolites in human peripheral blood mononuclear cells.

Sci Rep. 2021 Jan 18;11(1):1658. doi: 10.1038/s41598-020-79932-5.

IF₂₀₂₁ = 4,996; IF_{2022/2023} = 4,996; MEiN* = 140 pkt

Liczba cytowań (bez autocytowań) = 14 (Web of Science), 18 (Scopus).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, wyborze metodyki badań, współprzygotowaniu materiału biologicznego do badań, wykonaniu oznaczeń, analizie wyników (oprócz analizy densytometrycznej żelu), prezentacji graficznej danych (oprócz wykresów dotyczących analizy densytometrycznej żelu), sformułowaniu wniosków i przygotowaniu pracy do druku, pełniłam rolę autora korespondencyjnego (wysłałam pracę do czasopisma, prowadziłam korespondencję z Edytorem), współuczestniczyłam w korekcie manuskryptu po recenzjach i udzielaniu odpowiedzi na uwagi i pytania w trakcie recenzji pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 75%.

Publikacja A5.

Sicińska P., Jabłońska E., Bukowska B., Balcerczyk A., Reszka E.

The selected epigenetic effects of phthalates: DBP, BBP and their metabolites: MBP, MBzP on human peripheral blood mononuclear cells (In Vitro).

Toxicol In Vitro. 2022 Aug;82:105369. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105369.

IF₂₀₂₂ = 3,20; IF_{2022/2023} = 3,20 MEiN* = 100 pkt

Liczba cytowań (bez autocytowań) = 1 (Web of Science), 1 (Scopus).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji badawczej pracy, współwyborze metodyki badań, przygotowaniu prób do analizy, wykonaniu wszystkich oznaczeń, opracowaniu wyników badań, współinterpretacji otrzymanych wyników, napisaniu wstępnej wersji publikacji i prezentacji danych, współtworzeniu ostatecznej wersji pracy, pełniłam rolę autora korespondencyjnego (wysłałam pracę do czasopisma, prowadziłam korespondencję z Edytorem), współuczestniczyłam w korekcie manuskryptu po recenzjach i udzielaniu odpowiedzi na uwagi i pytania w trakcie recenzji pracy.

Mój udział procentowy oceniam na 70%.

* Załącznik do Komunikatu Ministra Nauki z dnia 17 lipca 2023 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych. Na podstawie art. 267 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742, 1088 i 1234).

4.3. Opis osiągnięcia naukowego

Podstawą mojego osiągnięcia naukowego jest pięć oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2018-2022. W badaniach tych podjęłam próbę wyjaśnienia mechanizmu działania wybranych ftalanów i ich metabolitów w dwóch rodzajach komórek krwi człowieka w układzie *in vitro*.

Ftalany, są największą grupą plastyfikatorów stosowanych na świecie. Z jednej strony związki te zapewniają nam „wygodę” konsumencką z drugiej strony badania analityczne i epidemiologiczne coraz częściej wykazują obecność ftalanów w organizmie człowieka oraz ich szkodliwe działanie. Ftalany z chemicznego punktu widzenia są pochodnymi kwasu ftalowego w postaci soli lub estrów. Ze względu na swoje właściwości zmiękczone stosowane są w przemyśle spożywczym (opakowania do żywności), kosmetycznym (perfumy, dezodoranty, kremy, balsamy, lakiery do paznokci) czy farmaceutycznym (pojemniki do pobierania oraz konserwacji krwi, zestawy do transfuzji i infuzji, rurki tracheotomijne, wenflony, cewniki, składnik otoczki tabletek powlekanych) [Bahadar i in., 2014; Lin i in., 2015; Yan i in., 2016]. Zużycie tych związków w Europie wynosi około 1 miliona ton rocznie, natomiast na całym świecie około 30 milionów ton rocznie [Net i in., 2015; Serrano i in., 2014]. Ftalany stanowią duże zagrożenie, ponieważ nie wiążą się kowalencyjnie z tworzywami do których są dodawane, przez co mogą z nich z łatwością migrować do pożywienia, wody, powietrza, kosmetyków czy produktów codziennego użytku. Do organizmu człowieka dostają

się drogą pokarmową, oddechową lub przez bezpośredni kontakt ze skórą [Pie i in., 2013; Xiaowei i in., 2015; Kolarik i in., 2008].

W 2008 roku cztery ftalany: ftalan bis(2-etyloheksylu) (DEHP), ftalan dibutyłu (DBP), ftalan benzylu butyłu (BBP) i ftalan diizobutyłu (DIBP) zostały zaliczone do grupy substancji wzbudzających szczególne obawy (ang. Substances of Very High Concern, SVHC) przez Europejską Agencję Chemikaliów (ang. European Chemicals Agency, ECHA). Tego rodzaju substancje mogą mieć poważny wpływ na zdrowie ludzi i środowisko. Są to przede wszystkim substancje rakotwórcze, mutagenne, działające szkodliwie na rozrodczość, zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego, jak i substancje określane jako trwałe lub wykazujące zdolność do bioakumulacji [<https://echa.europa.eu/-/chemicals-in-our-life-chemicals-of-concern-svhc>]. Ponadto Komisja Unii Europejskiej w Dyrektywie 2015/863 z dnia 31.03.2015 zastosowała ograniczenia zgodnie z którymi zabawki zawierające DEHP, BBP oraz DBP w stężeniu (obliczonym dla sumy trzech ftalanów łącznie) większym niż 0,1 % masy materiału z dodatkami plastyfikatorów, nie mogą być wprowadzane do obrotu w UE. W 2018 roku ta sama komisja zaproponowała podobne ograniczenia dla przedmiotów ogólnego użytku zawierających ftalany z wyłączeniem wyrobów przeznaczonych do stosowania wyłącznie na otwartej przestrzeni bez długotrwałego kontaktu ze skórą lub błonami śluzowymi.

Do swoich badań wybrałam **ftalan dibutyłu (DBP), ftalan benzylu butyłu (BBP) oraz ich metabolity ftalan monobutyłu (MBP) i ftalan monobenzylu (MBzP)** (Tabela 1).

Tabela 1. Wzory, masa cząsteczkowa i Log P dla badanych ftalanów.

	DBP	BBP	MBP	MBzP
Wzór strukturalny				
Wzór chemiczny	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
Masa cząsteczkowa	278,34	312,36	222,24	256,25
Log P	4,83	5,00	2,72	2,90

Najistotniejszym źródłem narażenia ogólnopopulacyjnego na te ftalany jest żywność, z której przeciętny konsument pobiera DBP i BBP w ilości około 7 do 10 µg/kg/dzień [Kavlock

i in., 2002]. DBP i BBP wykryto w olejach i tłuszczach, gdzie średnie stężenie DBP wynosiło 3287 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a BBP 11083 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [Page i Lacroix, 1992; Serrano i in., 2014]. W nabiale BBP był obecny w ilości 8,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a w przyprawach DBP i BBP oznaczono w stężeniu 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [Dickson-Spillmann i in., 2009; Trasande i in., 2013]. Zanieczyszczenia ftalanami stwierdzono również w makaronach, ryżu, owocach, warzywach, rybach, mięsie, wodzie butelkowanej, piwie i sokach [Serrano i in., 2014; Lee i in., 2014, Ceretti i in., 2010; Lin i in., 2015]. Grupami szczególnie narażonymi są pacjenci przyjmujący leki, których osłony zawierają DBP (szacunkowe spożycie wynosi 1-233 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$) oraz pracownicy narażeni zawodowo na te związki (0,1-76 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$) [Hernández-Díaz i in. 2009; Hines i in., 2011]. Ftalany występują w znacznych stężeniach także w powietrzu i pyłach w nim zawartych [Kolarik i in., 2008]. Stężenie BBP w powietrzu może wahać się w granicach 0,058 ng/m^3 - 3,97 mg/m^3 natomiast DBP 1,5 - 270 ng/m^3 [Jaakkola and Knight, 2008; Pie i in., 2013; Kolena i in., 2014]. Ponadto związki te mogą również przenikać do organizmu człowieka poprzez kontakt skórny z kosmetykami zawierającymi ftalany. DBP wykryto w perfumach gdzie ich maksymalne stężenie wynosiło 0,642 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a maksymalne stężenie BBP wynosiło 201,724 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [Heudorf i in., 2007; Al-Salech and Elkhatib, 2016]. Po wniknięciu do organizmu w reakcji katalizowanej przez lipazy i esterazy, BBP jest rozkładany do monoestrów, takich jak MBP i MBzP, natomiast DBP do MBP [Frederiksen i in., 2007; Tranfo i in., 2014].

Narażenie zawodowe i środowiskowe populacji na ftalany prowadzi do przenikania i obecności tych substancji w organizmach ludzi (Tabela 2). Wiele badań epidemiologicznych wykazało, że ftalany po dostaniu się do organizmu powodują zaburzenia w funkcjonowaniu układu hormonalnego, mogą również przyczyniać się do powstania anemii, alergii, astmy, otyłości, zespołu metabolicznego, cukrzycy typu 2, chorób sercowo-naczyniowych, czy nowotworów złośliwych [Kim i in., 2022; Bornehag et al., 2014; Kolarik et al., 2008; Kim i in., 2022; Codru i in., Bornehag et al., 2014; Kolarik et al., 2008; Just et al., 2012].

Tabela 2. Stężenia ftalanów i ich metabolitów oznaczonych w organizmie człowieka.

	DBP	BBP	MBP	MBzP	Literatura
Krew żylna	0,051-7,67 $\mu\text{g}/\text{ml}$				Chen i in.,2008; Lin i in., 2008
Krew pępowinowa	0,0197-5,71 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,0225 $\mu\text{g}/\text{ml}$			Chen i in.,2008; Lin i in., 2008; Huang i in., 2014
Surowica krwi	0,0008-0,0125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 35,1 $\mu\text{g}/\text{g}$	0,0008 – 0,002 $\mu\text{g}/\text{ml}$			Wan i in., 2013; Genius i in., 2012

Płyn owodniowy			0,0035 µg/ml	0,0002 µg/ml	Huang i in., 2014;
Mocz	0,0003-0,269 µg/ml		4,6 µg/g kreatyniny	0,0010-1,02 µg/ml	Chen i in.,2008; Hauser i in.,2004; Blount i in., 2000; Fromme i in., 2007; Polanska i in., 2016; Hartman i in., 2015; Perng i in., 2017; Fromme i in., 2011
Mleko matki	0,022-0,093 µg/ml				Chen i in.,2008; Fromme i in., 2011
Włosy	2-4 µg/ml	0-6 µg/ml			Zhao i in., 2017
Ślina			0,0658 µg/ml	0,3536 µg/ml	Silva i in., 2005

Ze względu na fakt, że ftalany wykryto w krwi żyłnej, pępowinowej oraz surowicy krwi do swoich badań wybrałam **dwa rodzaje komórek krwi obwodowej człowieka: dojrzałe erytrocyty (jako model komórek bezjądrzastych) i jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (jako model komórek jądrzastych)**. Komórki te są narażone na substancje toksyczne dostające się do krwi w organizmie człowieka, a obecne prace badawcze nie pozwalają na udzielenie odpowiedzi jaki jest mechanizm działania DBP, BBP i ich metabolitów w tych komórkach. Badania przeprowadziłam w układzie *in vitro*, gdyż do wstępnej oceny mechanizmów leżących u podstaw toksyczności komórkowej danego związku zaleca się najpierw wykonanie alternatywnych testów *in vitro*, rekomendowanych przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. wykorzystywania alternatywnych testów na zwierzętach (ang. European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, EURL-ECVAM). Testy te z dużym naciskiem są popularyzowane i stosowane obecnie w Unii Europejskiej, a wykorzystanie komórek ludzkich dodatkowo zwiększa znaczenie uzyskanych wyników badań w odniesieniu do organizmu człowieka [https://joint-research-centre.ec.europa.eu/scientific-activities-z/alternatives-animal-testing-and-safety-assessment-chemicals_en].

Celem moich badań było poznanie mechanizmów działania wybranych ftalanów w bezjądrzastych i jądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka oraz odniesienie uzyskanych wyników do danych dotyczących stężenia ftalanów oznaczonych we krwi ludzi.

Na początku analizowałam mechanizmy, które zachodzą w komórkach bezjądrzastych krwi obwodowej człowieka czyli w **dojrzałych erytrocytach**. Erytrocyty są komórkami najbardziej licznymi w ludzkim układzie krwionośnym. Oprócz swojej podstawowej funkcji,

jaką jest transport tlenu i dwutlenku węgla, biorą udział w transporcie ksenobiotyków. Z tego względu są one potencjalnie narażone na różne substancje toksyczne dostające się do organizmu człowieka i stanowią odpowiedni model do badań [Jarosiewicz i in., 2017]. Ponadto pojawiły się doniesienia epidemiologiczne sugerujące zależność między obecnością ftalanów i ich metabolitów w organizmie człowieka a wystąpieniem anemii [Jiang i in., 2018; Kim i in., 2022].

W pierwszym etapie badań sprawdziłam czy wybrane ftalany mogą indukować procesy przyspieszające usuwanie erytrocytów z krwioobiegu. W związku z tym określiłam właściwości hemolityczne, eryptotyczne i prooksydacyjne badanych związków.

Publikacje:

A1. Sicińska P. *Di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate and their metabolites induce haemolysis and eryptosis in human erythrocytes. Chemosphere. 2018 Jul; 203:44-53.*

A2. Sicińska P, Kik K, Bukowska B. *Human Erythrocytes exposed to phthalates and their metabolites alter antioxidant enzyme activity and hemoglobin oxidation. Int J Mol Sci. 2020 Jun 24;21(12):4480.*

W pracy pt. „*Di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate and their metabolites induce haemolysis and eryptosis in human erythrocytes*” (A1) przedstawiłam badania, w których oceniłam stopień hemolizy erytrocytów człowieka pod wpływem DBP i BBP oraz ich metabolitów (MBP i MBzP), po 24-godzinnej ekspozycji na te związki w szerokim zakresie stężeń 0,5 -500 µg/ml. Uzyskane wyniki wykazały, że DBP i BBP powodowały istotny statystycznie **wzrost stopnia hemolizy** od stężenia 25 µg/ml. Metabolity wykazywały znacznie słabsze właściwości hemolityczne, a zmiany istotne statystycznie obserwowałam od stężenia 250 µg/ml. Dodatkowo stopień hemolizy wywołany przez DBP i BBP był około dziesięć razy większy niż w przypadku metabolitów. Do dalszych badań wybrałam tylko stężenia przedhemolityczne, dla ftalanów macierzystych był to zakres 0,5 - 20 µg/ml, a dla metabolitów 2,5 - 100 µg/ml.

Następnie sprawdziłam czy badane związki mogą wywoływać w krwinkach czerwonych eryptozę. Proces ten przebiega w warunkach fizjologicznych podczas eliminacji starych lub uszkodzonych erytrocytów bez utraty integralności błony komórkowej, zapobiegając w ten sposób hemolizie nieprawidłowych komórek [Lang i in., 2012]. Eryptoza charakteryzuje się m.in. zaburzeniem stanu uporządkowania dwuwarstwy lipidowej powiązanej z translokacją fosfatydyloseryny. Stwierdziłam, że ftalany i ich metabolity **zwiększyły stopień eksternalizacji fosfatydyloseryny** w krwinkach czerwonych człowieka. Wzrost istotny statystycznie tego

parametru dla BBP obserwowałam od stężenia 5 µg/ml, a dla DBP od 10 µg/ml. Pod wpływem metabolitów MBzP i MBP zmiany istotne statystycznie zachodziły od stężenia 50 µg/ml, czyli kilkakrotnie wyższego niż w przypadku związków macierzystych. W związku z tym, że w badaniach zaobserwowałam eksternalizację fosfatydyloseryny, która towarzyszy eryptozie, postanowiłam oznaczyć inne markery charakterystyczne dla tego procesu. Do dalszej analizy wybrałam ocenę poziomu jonów wapnia w cytozolu. Podczas naruszenia homeostazy wapniowej w erytrocytach następuje napływ Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórki. Podwyższony jego poziom wpływa na aktywację skramblazy, która jest odpowiedzialna za translokację fosfolipidów pomiędzy dwiema monowarstwami błony komórkowej, co skutkuje właśnie translokacją fosfatydyloseryny [Lang i in., 2005]. Wyniki wykazały, że wszystkie badane ftalany po 24-godzinnym narażeniu erytrocytów, **podwyższyły stężenie jonów wapnia** w krwinkach czerwonych człowieka. DBP powodował wzrost tego parametru od stężenia 1 µg/ml, BBP od stężenia 2,5 µg/ml, natomiast metabolity powodowały istotny statystycznie wzrost poziomu jonów wapnia w cytozolu od stężenia 5 µg/ml (MBP) i 10 µg/ml (MBzP). Wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w cytozolu erytrocytów wiąże się również z aktywacją kalpajny I (μ -kalpaina), która może powodować proteolizę białek cytoszkieletu. Zaburza ona w ten sposób strukturę błony plazmatycznej komórki, co utrudnia mikrocyrkulację i prowadzi do usuwania krwinek czerwonych z krwioobiegu [Bratosin i in., 2001, Marczak, 2005]. Analiza tego parametru wykazała, że ftalany jak i ich metabolity powodowały **wzrost aktywności kalpajny I**. DBP powodował istotny statystycznie wzrost aktywności tego enzymu już przy stężeniu 1 µg/ml, a BBP od stężenia 2,5 µg/ml. Metabolity wywoływały zmiany, przy stężeniu 10 µg/ml, czyli dziesięć i czterokrotnie wyższym niż związki wyjściowe. Wzrost aktywności tego enzymu pociągnął za sobą **aktywację kaspazy-3**, która odgrywa kluczową rolę w efektorowej fazie programowanej śmierci komórki. Podobnie jak dla poprzednich analizowanych parametrów, wzrost aktywności tego enzymu obserwowałam po działaniu związków macierzystych DBP i BBP przy stężeniu kilkakrotnie niższym niż w przypadku metabolitów.

Proces eryptozy, który zaobserwowałam we wcześniejszych badaniach może być związany z powstaniem stresu oksydacyjnego i/lub utlenianiem hemoglobiny. W następnym etapie swoich badań, sprawdziłam czy wybrane ftalany mogą generować reaktywne formy tlenu (RFT), powodować utlenianie hemoglobiny (Hb) człowieka i wpływać na aktywność

enzymów antyoksydacyjnych co przedstawiłam w pracy pt. „*Human Erythrocytes exposed to phthalates and their metabolites alter antioxidant enzyme activity and hemoglobin oxidation*” (A2). W organizmie człowieka RFT odgrywają kluczową rolę w podstawowych procesach biologicznych, jednak nadmierny ich poziom prowadzi do stresu oksydacyjnego w komórkach. Wykazałam, że DBP i BBP powodują istotny statystycznie **wzrost RFT** już od stężenia 1 µg/ml, natomiast metabolity ftalanów powodowały wzrost tego parametru od stężenia 5 µg/ml. Podobne efekty zaobserwowałam w przypadku tworzenia wysoce reaktywnych form tlenu głównie rodnika hydroksylowego, gdzie ftalany macierzyste powodowały istotny statystycznie wzrost tego parametru przy stężeniu czterokrotnie niższym (2,5 µg/ml) niż ich metabolity (10 µg/ml).

Ftalanę ze względu na stosunkowo wysokie wartości logarytmu współczynnika podziału oktanol-woda (logP), wykazują dobrą rozpuszczalność w lipidach, łatwo przenikają przez błonę komórkową erytrocytów do ich wnętrza i mogą łączyć się z Hb, wpływając na jej strukturę i funkcję. Dane literaturowe opierające się na metodach modelowania molekularnego sugerują, że ftalanę tworzą kompleksy z Hb głównie z udziałem sił hydrofobowych. Interakcje te mogą zmienić drugorzędową strukturę tego białka, prowadząc do uwolnienia żelaza, zainicjowania reakcji Fentona i powstania RFT [Chi i in., 2016; Tan i in., 2017]. W swoich badaniach obserwowałam **wzrost poziomu utleniania Hb do methemoglobiny (metHb)** korelujący ze wzrostem poziomu RFT i wzrastającymi stężeniami stosowanych ftalanów. Należy jednak podkreślić, że DBP i BBP wykazywały istotne statystycznie działanie methemoglobino-twórcze już przy stężeniu 2,5 i 5 µg/ml, natomiast ich metabolity podwyższały poziom metHb dopiero od stężenia 50 µg/ml. Powstawanie metHb może sugerować, że toksyczność badanych ftalanów jest ukierunkowana na Hb i jej ugrupowania hemowe.

Zaobserwowany wcześniej wzrost poziomu RFT, może również skutkować uruchomieniem szlaków sygnałowych prowadzących do zmian w aktywności enzymów antyoksydacyjnych [Ghosh i in., 2010; Arimon i in., 2015; Cheng i in., 2019]. Aby to sprawdzić, określiłam aktywność trzech enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w erytrocytach inkubowanych z ww. ftalanami i ich metabolitami. Badane związki po 24-godzinnym narażeniu erytrocytów powodowały istotny statystycznie **spadek aktywności SOD** od stężenia 2,5 µg/ml dla DBP i BBP, natomiast dla metabolitów podobny spadek zaobserwowano od stężenia 10 µg/ml.

Hamowanie aktywności tego enzymu wzrastało wraz ze zwiększeniem stężenia danego ftalanu. Badania dokowania molekularnego przeprowadzone przez Prasanth i in., (2009) sugerują, że DBP i MBP mogą wiązać się w miejscu aktywnym SOD i tworzyć wiązania wodorowe z resztą miejsca aktywnego argininy w pozycji 143 (R143). Miejsce to ma kluczowe znaczenie w wiązaniu RFT podczas ich przekształcenia do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego, a każdy związek, który wiąże się z R143, może częściowo lub całkowicie hamować aktywność enzymatyczną dysmutazy nadtlenu wodoru. Zaobserwowaną zależność wykazującą, że metabolity hamują aktywność SOD przy stężeniu kilkakrotnie wyższym niż związki macierzyste można przypisać faktowi, że ich cząsteczki są mniejsze. W związku z tym mogą one wiązać się w różnych miejscach z porównanymi energiami wiązania, jednak nie musi to być oddziaływanie z pozycją R143.

W wyniku reakcji dysmutacji powstaje H_2O_2 , który następnie jest rozkładany do wody i tlenu z udziałem CAT i/lub GSH-Px [Nagababu i in., 2003; Bukowska i in., 2006]. W związku z tym w następnym etapie oznaczyłam aktywność tych enzymów. Moje badania wykazały, że aktywność CAT wzrastała od stężenia 5 $\mu\text{g/ml}$ po działaniu ftalanów macierzystych, natomiast metabolity powodowały istotny statystycznie wzrost aktywności tego enzymu od stężenia 50 $\mu\text{g/ml}$. W erytrocytach człowieka, które są komórkami pozbawionymi jądra, wzrost aktywności CAT pod wpływem badanych ftalanów może być spowodowany utlenianiem hemoglobiny do formy metHb, która wykazuje aktywność pseudokatalazową [Paco i in., 2009]. Taki właśnie efekt zaobserwowałam w swoich badaniach, gdzie **wzrost aktywności katalazowej** korelował ze wzrostem poziomu metHb. W przypadku **GSH-Px obserwowałam istotny statystycznie spadek aktywności** tego enzymu po działaniu DBP i BBP od stężenia 5 $\mu\text{g/ml}$, natomiast dla MBP i MBzP od stężenia 50 $\mu\text{g/ml}$. Związki macierzyste powodowały istotny statystycznie spadek aktywności tego enzymu przy stężeniu 10-krotnie niższym niż ich metabolity, a efekt działania wzrastał wraz ze wzrostem stężenia danego ftalanu.

Silniejsze działanie ftalanów macierzystych DBP i BBP niż metabolitów MBP i MBzP może zależeć od ich lipofilności. Związki, których wartość logP jest wyższa od 3 charakteryzują się wysoką lipofilnością i wysokim potencjałem bioakumulacji, natomiast związki, dla których log P zawiera się pomiędzy wartością 1 a 3 charakteryzują się średnią lipofilnością i mogą ulegać tylko częściowej bioakumulacji. Wartości logP dla DBP, BBP, MBP i MBzP wynoszą odpowiednio 4,83; 5,00; 2,72 i 2,90. Jak widać wartość logP dla DBP i BBP jest wysoka, co może tłumaczyć większe właściwości prooksydacyjne, eryptotyczne i hemolityczne tych związków.

Wynika to z tego, że bogate w lipidy błony komórkowe są łatwo penetrowane przez substancje lipofilowe, które wnikają do wnętrza komórki i w większym stopniu mogą oddziaływać na zwarte w niej składniki.

W badaniach na bezjadrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka (erytrocytach) wykazałam, że badane ftalany DBP, BBP oraz ich metabolity (MBP i MBzP):

- 1. Powodują istotny statystycznie wzrost stopnia eksternalizacji fosfatydyloseryny, napływ jonów wapnia do cytozolu, aktywację kalpajny I i kaspazy-3. Wyniki te sugerują, że ftalany wywołują w krwinkach czerwonych proces eryptozy. Proces ten prowadzi do eliminacji uszkodzonych komórek a tym samym zapobiega hemolizie, którą obserwowałam dopiero przy wyższych stężeniach.*
- 2. Powodują utlenianie hemoglobiny, prowadzą do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu oraz spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa i peroksydaza glutationowa.*
- 3. Związki macierzyste tj.: DBP i BBP powodują zmiany istotne statystycznie w badanych parametrach przy stężeniach 4 - 10 krotnie niższych niż ich metabolity MBP i MBzP.*

W drugiej części swoich badań skupiłam się na poznaniu molekularnych mechanizmów działania ftalanów macierzystych (DBP, BBP) i ich metabolitów (MBP i MBzP) w **jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka**. Komórki te odgrywają kluczową rolę w układzie immunologicznym organizmu człowieka, gdyż odpowiedzialne są za produkcję przeciwciał, eliminację komórek nowotworowych lub zakażonych wirusami, a także za regulację odpowiedzi układu odpornościowego [LaRosa i Orange, 2008]. Udowodniono, że pośrednie działanie ksenobiotyków może powodować uszkodzenie tych komórek wywołując zmiany w identyfikacji markerów powierzchniowych, produkcji cytokin oraz rozwoju chorób autoimmunologicznych i nowotworów [Ratomski i in., 2007; Hartung i Corsini, 2013; Halit i in., 2017]. Przeprowadzone przeze mnie **badania miały na celu określenie właściwości cytotoksycznych, proapoptycznych, genotoksycznych oraz efektów epigenetycznych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka wywołanych przez analizowane ftalany.**

Publikacje:

A3. Sicińska P. *Di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate, and their metabolites exhibit different apoptotic potential in human peripheral blood mononuclear cells. Food Chem Toxicol. 2019 Nov;133:110750.*

A4. Sicińska P, Mokra K, Wozniak K, Michałowicz J, Bukowska B. *Genotoxic risk assessment and mechanism of DNA damage induced by phthalates and their metabolites in human peripheral blood mononuclear cells. Sci Rep. 2021 Jan 18;11(1):1658.*

A5. Sicińska P, Jabłońska E, Bukowska B, Balcerczyk A, Reszka E. *The selected epigenetic effects of phthalates: DBP, BBP and their metabolites: MBP, MBzP on human peripheral blood mononuclear cells (In Vitro). Toxicol In Vitro. 2022 Aug;82:105369.*

W kolejnym etapie badań opisanym w pracy pt. „*Di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate, and their metabolites exhibit different apoptotic potential in human peripheral blood mononuclear cells*” (A3), oceniłam zmiany w żywotności jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka pod wpływem badanych związków. Parametr ten analizowany był po 12-godzinnej i 24-godzinnej inkubacji komórek z ftalanami i pozwolił dobrać odpowiednie stężenia badanych substancji do dalszych analiz. Po 12-godzinnym narażeniu komórek istotny statystycznie spadek żywotności powodowały tylko związki macierzyste: DBP i BBP odpowiednio od stężenia 100 µg/ml i 50 µg/ml. Natomiast po 24 godzinach narażenia **spadek żywotności** obserwowałam w przypadku wszystkich badanych ftalanów. DBP i BBP powodowały istotny statystycznie spadek tego parametru od stężenia 5 µg/ml i 10 µg/ml, natomiast metabolity od stężenia 20 µg/ml.

Następnie w celu określenia mechanizmu śmierci komórek oznaczyłam odsetek komórek apoptotycznych i nekrotycznych po 24-godzinnym działaniu ftalanów. **Wzrost odsetka komórek apoptotycznych** zaobserwowałam po działaniu związków macierzystych (DBP i BBP) przy stężeniach cztery (5 µg/ml) i dwa (10 µg/ml) razy niższych niż w przypadku ich metabolitów (20 µg/ml). Natomiast istotny statystycznie **wzrost odsetka komórek nekrotycznych** obserwowałam przy stężeniu 20 µg/ml dla DBP i 50 µg/ml dla pozostałych związków. Powyższe wyniki sugerują, iż badane ftalany, mogą indukować proces apoptozy w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka.

W celu potwierdzenia tej tezy, oznaczyłam dodatkowe parametry odgrywające kluczową rolę w regulacji procesu apoptozy. Istotnym czynnikiem inicjującym ten proces jest wzrost poziomu jonów wapnia w komórce. Jony te są obecne głównie w retikulum endoplazmatycznym (ER), mitochondriach i przestrzeni zewnątrzkomórkowej. W wyniku

naruszenia homeostazy wapniowej następuje wypływ Ca^{2+} z organelli komórkowych do cytozolu oraz wzrost jego napływu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Moje badania wykazały, że po 12-godzinnym narażeniu komórek na badane ftalany, istotny statystycznie **wzrost poziomu jonów wapnia w cytozolu** nastąpił już od stężenia 1 $\mu\text{g/ml}$ w przypadku DBP, natomiast w przypadku pozostałych ftalanów od stężenia 5 $\mu\text{g/ml}$.

Wzrost poziomu jonów wapnia w cytozolu komórki może przyczynić się do zmian funkcjonalnych w mitochondriach, powodując spadek wartości transbłonowego potencjału ($\Delta\Psi\text{m}$) tego organellum. Możemy to zaobserwować od kilkudziesięciu minut do kilku godzin przed fazą efektorową apoptozy [Kaufman i wsp., 2002]. Z tego względu, oznaczyłam wartość $\Delta\Psi\text{m}$ w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka po 12-godzinnej inkubacji z badanymi ftalanami i ich metabolitami. Wykazałam, że wszystkie analizowane związki powodowały **obniżenie wartości transbłonowego potencjału mitochondrialnego**. Również w tym przypadku DBP powodował istotne zmiany od stężenia 1 $\mu\text{g/ml}$, a pozostałe ftalany od stężenia 5 $\mu\text{g/ml}$.

Zaburzenia równowagi wapniowej i obniżenie transbłonowego potencjału mitochondrialnego przyczyniają się do aktywacji kaspaz, które odgrywają istotną rolę w procesie apoptozy. Aby to sprawdzić na początku zbadalam aktywność **kaspazy-3** wykazując, że wszystkie analizowane związki powodowały **aktywację tego enzymu** od stężenia 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Następnie, aby wyjaśnić czy w proces apoptozy indukowanej przez ftalany zaangażowany jest szlak wewnętrzny zwany inaczej szlakiem mitochondrialnym, czy szlak zewnętrzny zwany szlakiem receptorowym, oceniłam odpowiednio aktywność kaspazy-9 i -8. Po działaniu wszystkich ftalanów obserwowałam istotny statystycznie **wzrost aktywności** (w stosunku do kontroli) **kaspazy-9** już od stężenia 2,5 $\mu\text{g/ml}$, natomiast **wzrost aktywności kaspazy-8** widoczny był dopiero od stężenia 20 $\mu\text{g/ml}$. Ponadto wykazałam wyższą istotną statystycznie aktywność kaspazy-9 w porównaniu do kaspazy-8 (przy wszystkich analizowanych stężeniach), co sugeruje, że **głównie szlak mitochondrialny zaangażowany jest w proces apoptozy** jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka narażonych na badane substancje.

Szczególnie niebezpieczną właściwością ksenobiotyków jest ich zdolność do uszkodzenia DNA, co może prowadzić do mutacji a ostatecznie do procesu kancerogenezy. W związku z tym, postanowiłam określić mechanizm genotoksycznego działania badanych

ftalanów i ich metabolitów co przedstawiłam w pracy pt. „*Genotoxic risk assessment and mechanism of DNA damage induced by phthalates and their metabolites in human peripheral blood mononuclear cells*” (A4). Na początku, sprawdziłam czy związki te **wywołują pęknięcia jedno- i dwuniciowe DNA**. Zaobserwowałam, że DBP i BBP powodowały istotny statystycznie wzrost tych uszkodzeń już przy stężeniu 0,5 µg/ml, natomiast metabolity (MBP i MBzP) powodowały zmiany istotne statystycznie od wyższego stężenia (1 µg/ml). Aby wyjaśnić czy obserwowane uszkodzenia DNA wynikały z bezpośredniej interakcji badanych ftalanów z DNA, zastosowałam metodę rozdziału elektroforetycznego plazmidowego DNA (pUC19) oraz analizę densytometryczną. Odnotowałam, że po działaniu ftalanów i ich metabolitów nie nastąpiło powstanie liniowej struktury plazmidowego DNA, a analiza densytometryczna nie wykazała zmian w ilości różnych form plazmidu w stosunku do kontroli negatywnej. Tym samym przeprowadzony **test wykluczył możliwość bezpośredniego wiązania się badanych związków do DNA i tworzenia adduktów**.

Innym możliwym wyjaśnieniem obserwowanych uszkodzeń DNA może być pośrednie działanie reaktywnych form tlenu (RFT). Z tego względu, w następnym etapie badań oceniłam powstawanie RFT i wysoce reaktywnych form tlenu (głównie rodnika hydroksylowego) pod wpływem działania wybranych ftalanów. Wszystkie badane związki powodowały **powstawanie RFT**. Silniejszy potencjał prooksydacyjny wykazywały DBP i BBP (odpowiednio od stężenia 0,1 µg/ml i 0,5 µg/ml), natomiast metabolity powodowały wzrost tego parametru od stężenia 1 µg/ml. Wykazałam również, że ftalany powodowały istotny statystycznie **wzrost poziomu rodnika hydroksylowego**, związki macierzyste od stężenia 1 µg/ml, natomiast metabolity od stężenia 10 µg/ml. Nadmierna produkcja RFT, a szczególnie rodnika hydroksylowego jest odpowiedzialna za powstawanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Zmiany te z kolei, są podstawą procesu starzenia, rozwoju chorób zwyrodnieniowych, nowotworów czy miażdżycy [Cadet i in., 2003, Jena i in., 2012; Wang al. i in., 2012; Dizdaroglu, 2015; Borghini i in., 2013]. W związku z powyższym oceniłam zdolność badanych związków do indukowania oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych i pirymidynowych DNA w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Analiza danych wykazała, że wszystkie badane ftalany powodowały istotny statystycznie **wzrost utleniania zasad purynowych** (od stężenia 1 µg/ml) i **zasad pirymidynowych** (od stężenia 5 µg/ml), a efekt ten korelował ze wzrostem RFT i poziomu rodnika hydroksylowego. Powyższe wyniki wskazują na pośredni oksydacyjny mechanizm uszkodzenia DNA przez ftalany i ich metabolity. Należy podkreślić, że badane

związki powodują uszkodzenia DNA w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka w stężeniach, które wykryto w organizmie ludzi narażonych środowiskowo lub zawodowo na te substancje. Z drugiej strony należy wziąć pod uwagę fakt, że komórki posiadające liczne mechanizmy naprawy DNA, mogą eliminować genotoksyczne skutki działania ksenobiotyków. Z tego względu w dalszej części pracy sprawdziłam czy komórki są w stanie naprawić powstałe uszkodzenia DNA. W tym celu przeprowadziłam analizę kinetyki naprawy uszkodzeń DNA, która wykazała, że po 90 minutach od usunięcia ksenobiotyku, **uszkodzenia DNA wywołane przez metabolity (MBP i MBzP) zostały całkowicie naprawione, natomiast w przypadku związków macierzystych (DBP i BBP) komórki nawet po 120 minutach nie były w stanie naprawić całkowicie powstałych uszkodzeń DNA.**

Innymi parametrami mogącymi służyć jako biomarkery ryzyka zdrowotnego związanego z ekspozycją na różne ksenobiotyki są zmiany epigenetyczne. Regulacja epigenetyczna jest jednym z podstawowych mechanizmów rozwoju i utrzymania specyficznej tkankowo ekspresji genów. Zmiany w tym procesie prowadzą do aktywacji lub wyciszenia genów, co może skutkować rozwojem stanów patologicznych. W ostatnim etapie badań opisanym w publikacji pt. „*The selected epigenetic effects of phthalates: DBP, BBP and their metabolites: MBP, MBzP on human peripheral blood mononuclear cells (In Vitro)*” (A5). sprawdziłam, czy badane ftalany mogą wpływać na poziom ogólnej metylacji DNA oraz czy są w stanie zmieniać profil metylacji regionów promotorowych wybranych genów związanych z procesem apoptozy i cyklem komórkowym oraz ich ekspresję.

Jednym z epigenetycznych markerów wykorzystywanym w diagnostyce jest metylacja DNA. Parametr ten można analizować na poziomie ogólnym, oceniając całkowitą zawartość 5-metylocytozyny (5-mc), a także można go określić dla specyficznych genów, gdzie oznacza się poziom ulegających metylacji cytozyn zlokalizowanych w danym genie lub jego promotorze.

Zmiany w poziomie ogólnej metylacji DNA mogą odgrywać istotną rolę w mechanizmie rakotwórczego działania proliferatorów peroksysomów do których zaliczamy badane ftalany [Pogribny i in., 2007]. W związku z tym na początku oceniłam właśnie ten parametr. Zaobserwowałam **obniżony poziom 5-mC** w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka traktowanych niskimi stężeniami (0,001 µg/mL i 0,01 µg/mL) BBP, MBP i MBzP. Hipometylacja genomu może być spowodowana nagromadzeniem pęknięć nici DNA,

wzrostem proliferacji komórek czy zmienioną ekspresją metylotransferazy DNA [Pogribny i in., 2008]. Możliwe, że do spadku poziomu ogólnej metylacji DNA obserwowanej w moich badaniach przyczynił się wzrost pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka, co wykazałam w uprzednio zaprezentowanych wynikach (Publikacja A4).

Zaburzenia w procesie metylacji DNA, mogą być wczesnym zdarzeniem prowadzącym do zmian w ekspresji genów i inicjacji procesu kancerogenezy [Sharapova i in., 2021]. Z tego powodu duże znaczenie mają wyniki badań oceniające poziom metylacji regionów promotorowych genów biorących udział w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy oraz ich ekspresji. Tym samym, w następnym etapie pracy oceniłam profil metylacji regionów promotorowych wybranych genów supresorowych (P16, TP53) i protoonkogenów (BCL2, CCND1) oraz ich ekspresję.

Gen TP53 jest genem supresorowym transformacji nowotworowej, oprócz udziału w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy pełni również funkcję represora transkrypcji genów zaangażowanych w proliferację komórek. Zmieniona metylacja promotora genu TP53 jest wzorcem epigenetycznym często obserwowanym w nowotworach u ludzi [Scoumanne i Chen, 2008; Liu i in., 2019, Kwiatkowska i in., 2017]. W moich badaniach wykazałam, że wszystkie analizowane związki powodowały **wzrost metylacji promotora genu TP53** w obrębie wysp CpG. Istotny statystycznie wzrost tego parametru obserwowałam przy najniższym stężeniu 0,001 µg/ml dla DBP, MBP i MBzP, natomiast największy wzrost tego parametru powodował BBP przy stężeniach 0,01 i 0,1 µg/ml. Jednocześnie obserwowałam **spadek ekspresji genu TP53** po działaniu analizowanych ksenobiotyków. Dalsza analiza molekularnych czynników regulujących cykl komórkowy wykazała **obniżenie ekspresji kolejnego supresorowego genu P16** w badanym modelu komórkowym po inkubacji z analizowanymi związkami. Zmiany istotne statystycznie można było już obserwować przy najniższym stężeniu 0,001 µg/ml dla BBP i metabolitów ftalanów. Natomiast w przypadku DBP zmiana istotna statystycznie była widoczna przy stężeniu 0,1 µg/ml. Obniżeniu ekspresji towarzyszył **wzrost poziomu metylacji w regionie promotorowym genu P16**. Gen P16 koduje białko p16 będące inhibitorem cyklu komórkowego. Niska ekspresja tego genu może skutkować nadekspresją cykliny D1 (CCND1), aktywacją jej kompleksów z kompleksami CDK4 i CDK6 oraz pokonaniem punktu kontrolnego G0/G1 cyklu komórkowego [Ortiz i in., 2017]. W moim układzie eksperymentalnym obserwowałam istotny statystycznie **wzrost ekspresji protoonkogeny CCND1** przy najniższych

zastosowanych stężeniach (0,001 µg/ml i 0,001 µg/ml) dla związków macierzystych (DBP i BBP). Metabolit MBzP powodował wzrost ekspresji tego genu od stężenia 0,01 µg/ml, natomiast w przypadku MBP nie obserwowałam zmian. Równocześnie wykazałam istotny statystycznie **spadek metylacji w regionie promotorowym genu CCND1** pod wpływem DBP, BBP i MBzP. Stwierdziłam również **wzrost ekspresji genu BCL2** przy stężeniu 0,01µg/ml po działaniu DBP i jego metabolitu MBP, natomiast w przypadku BBP i MBzP wzrost ekspresji widoczny był tylko przy najwyższym stężeniu (0,1µg/ml). Równocześnie w przypadku działania wszystkich badanych ftalanów zaobserwowałam istotny statystycznie **spadek metylacji regionów promotorowych protoonkogeny BCL2** przy stężeniu 0,01 µg/ml.

Niepokojący wydaje się fakt, że wybrane ftalany powodują zmiany w ekspresji i metylacji genów związanych z cyklem komórkowym i apoptozą, już przy bardzo niskich stężeniach (0,001 µg/ml).

W badaniach na jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka wykazałam, że badane ftalany DBP i BBP oraz ich metabolity MBP i MBzP:

- 1. Indukują proces apoptozy poprzez: podwyższenie poziomu jonów wapnia w cytozolu, obniżenie wartości transbłonowego potencjału mitochondrialnego oraz wzrost aktywności kaspazy -3, -8, a szczególnie kaspazy-9.*
- 2. Wywołują uszkodzenia jedno- i dwuniciowe DNA oraz oksydacyjne uszkodzenia zasad purynowych i pirymidynowych. Analiza wyników wskazuje na pośredni oksydacyjny mechanizm uszkodzenia DNA. Powstałe uszkodzenia DNA wywołane przez metabolity ulegają naprawie, natomiast uszkodzenia wywołane przez związki macierzyste nie ulegają całkowitej naprawie nawet po 120 min.*
- 3. BBP, MBP oraz MBzP powodują obniżenie poziomu ogólnej metylacji DNA w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Badane ftalany zmieniają profil metylacji regionów promotorowych wybranych genów supresorowych (P16, TP53) i protoonkogenów (BCL2, CCND1) oraz zmieniają ich ekspresję.*

Podsumowanie końcowe i wnioski

Badane ftalany DBP, BBP oraz ich metabolity MBP i MBzP w komórkach krwi obwodowej człowieka, wykazują właściwości cytotoksyczne, proapoptotyczne, genotoksyczne oraz powodują zmiany epigenetyczne. Zdecydowana większość obserwowanych zmian

zachodzi w zakresie stężeń ftalanów (0, 0008 – 7,67 µg/ml) oznaczanych we krwi ludzi narażonych środowiskowo i/lub zawodowo na te substancje.

Badane ftalany:

1. W krwinkach czerwonych wywołują eryptozę poprzez indukcję stresu oksydacyjnego. W przypadku tych komórek znacznie większą toksyczność wykazują ftalany macierzyste niż ich metabolity.
2. W jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka:
 - prowadzą do śmierci tych komórek na drodze apoptozy głównie poprzez szlak mitochondrialny,
 - powodują uszkodzenia DNA poprzez pośrednie oddziaływanie związane z generowaniem reaktywnych form tlenu, a uszkodzenia DNA wywołane przez związki macierzyste (DBP i BBP) nie ulegają całkowitej naprawie,
 - obniżają poziom ogólnej metylacji DNA oraz zmieniają profil metylacji i ekspresję genów zaangażowanych w cykl komórkowy i proces apoptozy.

Poznanie mechanizmów działania ftalanów macierzystych (DBP, BBP) i ich metabolitów (MBP, MBzP) na poziomie molekularnym przyczynia się do oceny ryzyka i konsekwencji wpływu tych związków na organizm człowieka. Wykazane niekorzystne efekty szczególnie genotoksyczne i epigenetyczne mogą prowadzić do zaburzeń zdrowotnych również w następnych pokoleniach. Wiedza ta może pomóc w podjęciu decyzji o stopniowym wycofaniu analizowanych ftalanów z produkcji przemysłowej i zastąpieniu ich innymi mniej szkodliwymi odpowiednikami.

5. Opis pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora

Pierwsze zainteresowania naukowe miałam szansę rozwinąć w roku 1999/2000 w czasie V roku studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UŁ, podczas realizacji pracy magisterskiej w Katedrze Genetyki Molekularnej UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Walter. Temat pracy dotyczył wpływu cyjanotoksyn sinicowych na oksydazę cytochromu c. Cyjanotoksyny są to substancje produkowane przez sinice, które ze względu na swoją dużą toksyczność stanowią zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Jedną z nich jest

mikrocystyna-LR (MC-LR) zaliczana do grupy hepatotoksyn. Celem pracy magisterskiej była ocena wpływu ekstraktu sinicowego zawierającego mikrocystyny i związku wzorcowego mikrocystyny-LR na funkcjonowanie kompleksu oddechowego mitochondriów ssaczy *Bos taurus*. Dzięki współpracy z prof. dr hab. Maciejem Zalewskim i dr Małgorzatą Tarczyńską z Katedry Ekologii Stosowanej UŁ wykorzystałam w pracy ekstrakty otrzymane z zakwitów sinic *Microcystis aeruginosa* zebranych ze Zbiornika Sulejowskiego. Stężenie mikrocystyny-LR w ekstrakcie określono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Dostępną w handlu mikrocystynę-LR firmy Sigma zastosowano jako standard. Zarówno związek standardowy, jak i ekstrakt sinicowy inkubowano z mitochondriami w różnych stężeniach i czasie ekspozycji, a następnie zmierzono aktywność kompleksu oksydazy cytochromu c. Badania wykazały, że ekstrakt sinicowy w stężeniu 1 nM spowodował aktywację badanego kompleksu w mitochondriach. Wynik ten można uznać za sygnał obronny mitochondriów przed niskim stężeniem związku toksycznego. Ekstrakt sinicowy w stężeniu 1 μ M znacznie silniej hamował aktywność kompleksu oksydazy mitochondrialnej niż standardowy preparat zastosowany w tym samym stężeniu. Podsumowując wykazano, że ekstrakt sinicowy jest silnie toksyczny, a mitochondria mogą służyć jako wskaźnik tej toksyczności *in vivo*, zwłaszcza podczas długotrwałego spożywania wody ze zbiorników, w których produkowana jest ta mikrocystyna [**Publikacja B1**].

Po zakończeniu studiów magisterskich podjęłam studia doktoranckie (2000–2005) w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii UŁ w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Wirgiliusza Dudy. Podczas realizacji studiów doktoranckich dalej rozwijałam swoje zainteresowania dotyczące toksyczności związków produkowanych przez sinice ale w odniesieniu do erytrocytów człowieka. Zbadałam wpływ mikrocystyny-LR na peroksydację lipidów, płynność błony, morfologię komórek, utlenianie hemoglobiny oraz zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych w ludzkich erytrocytach w układzie *in vitro*. Zaobserwowałam, że toksyna ta indukuje utlenianie lipidów i hemoglobiny, powstawanie echinocytów, hemolizę, spadek płynności błony. Badany związek zmieniał również aktywność enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i reduktazy glutationowej oraz spowodował powstawanie reaktywnych form tlenu. Wszystkie zaobserwowane zmiany wskazują na to, że stężenie mikrocystyny-LR równe 100 nM jest graniczną (progową) dawką toksyczną dla ludzkich erytrocytów. Dawka ta spowodowała większość opisanych powyżej zmian. Obserwowane uszkodzenia błony erytrocytów i zmiana aktywności enzymów antyoksydacyjnych mogą być wynikiem bezpośredniego kowalencyjnego wiązania mikrocystyny-LR z resztami -SH białek, a także mogą być pośrednio związane z powstawaniem reaktywnych form tlenu [**Publikacja B3**] (ukazała się po uzyskaniu stopnia doktora).

5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora w styczniu 2006 podjęłam pracę w Pracowni Cytometrii w Katedrze Biofizyki Molekularnej UŁ jako specjalista biofizyk w zakresie cytometrii w grupie pracowników naukowo-technicznych. W owym czasie odbyłam szkolenia związane z obsługą cytometru przepływowego i analizą pomiarów z wykorzystaniem oprogramowania FACSDiva oraz uczestniczyłam w szkoleniu diagnostyki białaczek i chłoniaków.

Uzyskane umiejętności z zakresu cytometrii przepływowej pozwoliły mi w 2008 roku podjąć współpracę z dr hab. Hanną Ławnicką i dr hab. Ewelina Motylewską z Zakładu Immunoendokrynologii Uniwersytetu Medycznego. Celem współpracy była ocena wpływu naturalnych inhibitorów MEK (laktonów L-783, 277 kwasu resorcylowego) [**Publikacja B5**] oraz DMAT (inhibitor CK2, 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu) [**Publikacja B7**] na proliferację i cykl komórkowy linii nowotworowej H295R. W badaniach tych opracowałam i zastosowałam warunki pomiaru cyklu komórkowego i apoptozy metodą cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki wykazały, iż zastosowane inhibitory hamowały proliferację komórek linii nowotworowej czemu towarzyszyły istotne zmiany w cyklu komórkowym oraz indukcja apoptozy. Kontynuacja współpracy z Zakładem Immunoendokrynologii UM umożliwiła powstanie kolejnych prac, których celem była ocena bezpośredniego wpływu preparatów o działaniu antyangiogennym (rapamycyna, interferon alpha) na wzrost szczurzej linii pheochromocytoza PC12 (guzy chromochłonne) [**Publikacja B14**] oraz wpływu tych preparatów na wzrost dwóch neuroendokrynych linii: rakowiaka oskrzela H727 oraz raka rdzeniastego tarczycy (medullary thyroid cancer) [**Publikacja B16**]. Zaobserwowano silny efekt hamujący działania preparatów na obie linie komórkowe, co daje szansę na wykorzystanie tych inhibitorów w leczeniu nowotworów neuroendokrynych.

Dalsze badania związane z analizą cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej kontynuowałam podejmując współpracę z dr hab. Magdą Kowalewicz-Kulbat z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ. Badania dotyczyły efektu oddziaływania rozpuszczalnych składników *H. pylori*, (takich jak: antygeny zawarte w ekstrakcie glicynowym (GE), podjednostka A ureazy (UreA), białko CagA i LPS) na żywotność i cykl komórkowy w linii komórkowej ludzkich komórek nowotworowych raka żołądka oraz fibroblastów. Wykazano, iż zastosowany w wysokim stężeniu LPS *H. pylori* hamował istotnie żywotność komórek obu linii czemu towarzyszyły istotne zmiany w cyklu komórkowym związane z zatrzymaniem komórek linii AGS w fazie S, a fibroblastów w fazie G2 cyklu komórkowego. Uzyskane wyniki potwierdziły istotny udział LPS *H. pylori* w procesie zatrzymania cyklu komórkowego i zostały opublikowane w jednej pracy oryginalnej [**Publikacja B21**].

Współpracując z dr hab. Magdaleną Boncler z Zakładu Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, brałam udział w badaniach nad oceną interakcji między

białkiem C-reaktywnym (CRP) a jego różnymi ligandami (białkami macierzy pozakomórkowej lub białkami osocza). W pracy porównano skuteczność działania zmodyfikowanego CRP (mCRP) na modulację funkcji płytek krwi w różnych warunkach doświadczalnych. Wykazano, że działanie mCRP było skuteczniejsze w stymulacji aktywacji płytek krwi mierzonych w zawiesinach izolowanych płytek krwi niż w pełnej krwi. Adhezja płytek krwi do fibrynogenu była prawie siedmiokrotnie wyższa w zawiesinach izolowanych płytek krwi w porównaniu z osoczem bogatopłytkowym (PRP). Ponadto mCRP zwiększało agregację płytek krwi w pełnej krwi, ale nie miało wpływu na PRP. Skuteczność mCRP w stymulacji odpowiedzi płytkowej w osoczu była związana z proporcjami gamma globuliny i albuminy w surowicy ludzkiej [**Publikacja B10**].

Miałam również możliwość prowadzenia badań w ramach działania COST B35 w międzynarodowym zespole pracującym nad walidacją metody w pomiarach peroksydacji lipidów. Produkty peroksydacji lipidów, takie jak dialdehyd malonowy, 4-hydroksynonenal i F2-izoprostany, są szeroko stosowane jako markery stresu oksydacyjnego w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Celem współpracy było wyłonienie najczulszej i najbardziej powtarzalnej metody oraz ocena różnic między laboratoryjnymi i wewnątrzlaboratoryjnymi pomiarami peroksydacji lipidów różnymi metodami. Próbkę ludzkiego osocza zostały poddane działaniu promieniowania UVA w różnych dawkach (0, 15 J, 20 J), zakodowane i wysłane do 15 laboratoriów, gdzie przeprowadzono pomiar poziomu dialdehydu malonowego, 4-hydroksynonenalu i izoprostanów. Po porównaniu wyników pochodzących z różnych laboratoriów stwierdzono, że dialdehyd malonowy oznaczony metodą HPLC jest najbardziej czułym i powtarzalnym produktem peroksydacji lipidów w osoczu po działaniu UVA [**Praca B8**].

Dzięki nawiązanej współpracy z prof. dr hab. Bożeną Bukowską i prof. dr. hab. Jaromirem Michałowiczem z Katedry Biofizyki Skażeń Środowiska UŁ, mogłam uczestniczyć w badaniach oceniających wpływ różnych ksenobiotyków na komórki krwi obwodowej człowieka. Celem pierwszych wspólnych badań była ocena stresu oksydacyjnego w erytrocytach człowieka po działaniu związków fenolowych: fenolu, 2,4-dichlorofenolu (2,4-DCP), 2,4-dimetylofenolu (2,4-DMP) i katecholu. Przeprowadziliśmy pomiary: poziomu utleniania dioctanu 6-karboksy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF-DA), zawartości grup karbonylowych i poziomu zdenaturowanej hemoglobiny. Badania wykazały, że 2,4-DCP, 2,4-DMP i katechol indukowały wzrost utleniania H₂DCF-DA zależnie od stężenia i czasu inkubacji. Zaobserwowaliśmy również wzrost zawartości grup karbonylowych oraz zmiany parametru T świadczącym o denaturacji hemoglobiny w erytrocytach inkubowanych z 2,4-DCP, katecholem i 2,4-DMP. Najwyższy stopień utlenienia H₂DCF-DA wywołał 2,4-DCP. Największe zmiany w karbonylacji białek w erytrocytach były indukowane przez 2,4-DMP, natomiast najsilniejsze zmiany mierzone parametrem T były indukowane przez katechol. Z kolei fenol do stężenia 2,5 mM nie utleniał H₂DCF-DA, nie wpływał na zawartość grup karbonylowych, natomiast indukował denaturację hemoglobiny. Po analizie wyników stwierdziliśmy, że rodzaj

podstawnika w pierścieniu fenolowym określa molekularny mechanizm działania danego związku jego zdolność do generowania reaktywnych form tlenu, a tym samym uszkodzenia określonych struktur w ludzkich erytrocytach [Publikacja B4]. Współpracując z prof. dr. hab. Jaromirem Michałowiczem uczestniczyłam w badaniach oceniających wpływ chlorofenoli, chlorokatecholi i chlorogwajakoli na proces apoptozy w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. W badaniach wykorzystaliśmy takie związki jak: 2,4,5-trichlorofenol (2,4,5-TCP), pentachlorofenol (PCP), 4,6-dichlorogwajakol (4,6-DCG), tetrachlorogwajakol (TeCG), 4,5-dichlorokatechol (4,5-DCC) i tetrachlorokatechol (TeCC) i oceniliśmy zmiany w transbłonowym potencjale mitochondrialnym za pomocą sondy fluorescencyjnej JC-9 oraz aktywność kaspazy-3 jako wstępne markery procesu apoptozy. Po raz pierwszy udowodniliśmy, że badane związki indukowały apoptozę w limfocytach człowieka (zwiększały odsetek komórek apoptotycznych) poprzez zmniejszenie potencjału transbłonowego mitochondriów oraz indukcję aktywności kaspazy-3 [Publikacja B6].

Pod koniec roku 2010 zostałam zatrudniona na etacie adiunkta w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska UŁ. Od tego czasu moje zainteresowania skupiły się wokół oceny mechanizmów działania różnych ksenobiotyków na komórki krwi obwodowej człowieka (erytrocyty i jednojądrzaste komórki krwi). Wykorzystanie powyższych modeli komórkowych różniących się zasadniczo budową i pełnionymi funkcjami w układzie *in vitro* umożliwiło mi ocenę właściwości cytotoksycznych, proapoptotycznych, prooksydacyjnych, genotoksycznych oraz epigenetycznych różnych ksenobiotyków. Dzięki uzyskanym wynikom mogłam częściowo odpowiedzieć na pytanie czy stosowanie danego ksenobiotyku stwarza potencjalne zagrożenie dla człowieka. Równolegle prowadziłam badania oceniające wpływ różnych jednostek chorobowych na budowę i funkcje erytrocytów człowieka.

5.2.1. Ocena toksyczności wybranych ksenobiotyków

5.2.1.1. Fenole i ich pochodne

Na początku uczestniczyłam w badaniach dotyczących wpływu fenoli i ich pochodnych na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Na tym etapie badań skupiłam się na ocenie wpływu 2,4-dichlorofenolu (2,4-DCP), który powstaje w wodzie pitnej w wyniku jej chlorowania, a w środowisku podczas przemian innych ksenobiotyków, takich jak chlorofenole, triklosan czy herbicyd – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D). Oceniony został wpływ 2,4-DCP na strukturę i żywotność jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka. Określiliśmy zmiany nekrotyczne, apoptotyczne i morfologiczne (zmiany wielkości i granulacji), oszacowaliśmy zmiany w tworzeniu reaktywnych form tlenu, peroksydacji lipidów i karbonylacji białek. Badania wykazały, iż 2,4-DCP zwiększał tworzenie reaktywnych form tlenu, indukuje peroksydację lipidów i utlenianie białek. Badany związek indukował również

śmierć apoptotyczną i nekrotyczną. Zaobserwowane zmiany były spowodowane stosunkowo wysokimi stężeniami 2,4-DCP, które nie mogą oddziaływać na organizm człowieka podczas narażenia środowiskowego, a zatem mogą wystąpić jedynie w wyniku ostrego lub podostrego zatrucia tym związkiem [**Publikacja B17**]. Badania zostały rozszerzone również o ocenę wpływu zmian eryptotycznych w krwinkach czerwonych człowieka poddanych działaniu fenolu, 2,4-dichlorofenolu (2,4-DCP), 2,4,6-trichlorofenolu (2,4,6-TCP) i pentachlorofenolu (PCP). A analiza wyników wykazała, że wszystkie badane związki spowodowały translokację fosfatydyloseryny i zwiększały poziom jonów wapnia w cytozolu erytrocytów człowieka. Zauważono również, że fenol i chlorofenole spowodowały wzrost aktywacji kaspazy-3 i kalpajny, co potwierdziło ich zdolność do indukowania samobójczej śmierci erytrocytów. PCP najsilniej zmieniał badane parametry, podczas gdy fenol wykazywał najniższy potencjał eryptotyczny w tych komórkach [**Praca B25**].

5.2.1.2. Bisfenole

Pracowałam jako wykonawca w grantie (NCN 2012/07/B/NZ7/O1174, w którym analizowano mechanizm oddziaływania wybranych bisfenoli na erytrocyty i jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Bisfenol A (BPA) jest związkiem chemicznym stosowanym w syntezie tworzyw poliwęglanowych, żywic epoksydowych (stosowanych do wytwarzania licznych produktów codziennego użytku, w tym opakowań plastikowych, butelek na wodę, folii i zabawek), oraz jest wykorzystywany do produkcji papieru termicznego. Badania toksykologiczne wykazały, że związek ten charakteryzuje się działaniem toksycznym, estrogenym oraz potencjalnie kancerogennym. Został on wykryty w organizmie człowieka we krwi, moczu i tkankach stałych. Dane wskazujące na toksyczność BPA oraz jego obecność w organizmie człowieka, skutkują sukcesywnym zastępowaniem w przemyśle tego związku jego analogami takimi jak: bisfenol S (BPS), bisfenol F (BPF) i Bisfenol AF (BPAF). Celem niniejszego projektu było określenie mechanizmu oddziaływania wybranych bisfenoli, tj. bisfenolu A (BPA), bisfenolu F (BPF), bisfenolu AF (BPAF) i bisfenolu S (BPS) na erytrocyty i jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Wykorzystanie powyższych modeli komórkowych różniących się zasadniczo budową i pełnionymi funkcjami umożliwiło ocenę właściwości cytotoxycznych, i genotoksycznych badanych bisfenoli. Na wstępie oceniono wpływ BPA i jego wybranych analogów na błonę erytrocytów człowieka, która jest pierwszą barierą, pokonywaną przez ksenobiotyki wnikające do komórki, i jest powszechnie wykorzystywana jako model w badaniu wpływu różnych ksenobiotyków na różne typy komórek. Zauważyliśmy, że badane związki zmieniały płynność błony w jej regionie hydrofobowym, zwiększały lepkość wewnętrzną i oporność osmotyczną erytrocytów oraz zmieniały stan konformacyjny białek błonowych. Ponadto badane bisfenole zwiększały poziom grup tiolowych, spowodowały uszkodzenia oksydacyjne białek błonowych, obniżały poziom ATP, zmniejszały aktywność ATPazy Na^+/K^+ oraz zmieniały aktywność acetylocholinoesterazy

w krwinkach czerwonych człowieka. Wykazano, że najsilniejsze zmiany zanotowano w komórkach traktowanych BPAF, podczas gdy BPS spowodował najłagodniejsze zmiany badanych parametrów **[Publikacja B23]**. Ponieważ przypuszcza się, że BPA i niektóre jego analogi wpływają na rozwój nowotworów, oceniliśmy również wpływ BPA, BPS, BPF i BPAF na utlenianie zasad azotowych DNA, co jest kluczowym procesem w powstawaniu mutacji i inicjacji rozwoju nowotworu. Analizę przeprowadzono na ludzkich jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i zaobserwowano że BPA, BPS, BPF, a zwłaszcza BPAF spowodowały uszkodzenia oksydacyjne pirymidyn, a szczególnie puryn DNA. Wyniki wykazały również, że BPS, który jest najczęściej stosowanym substytutem BPA w przemyśle, zdecydowanie najłagodniej utleniał zasady azotowe. Badania dotyczące uszkodzeń DNA zostały przeprowadzone po nawiązaniu współpracy z prof. dr hab. Katarzyną Woźniak z Katedry Genetyki Molekularnej UŁ **[Publikacja B24]**.

5.2.1.3. Pestycydy

Moje zainteresowanie wzbudziło stale rosnące zużycie pestycydów na świecie. W rejestrze środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w Polsce, znajduje się około 110 preparatów herbicydowych opartych na glifosacie. Glifosat jest stosowany w uprawach zbóż, warzyw i owoców w celu ograniczenia lub zahamowania wzrostu chwastów oraz jako środek osuszający w różnych zbożach. Wykazano, że glifosat ulega akumulacji u ludzi i zwierząt poprzez spożywanie żywności pochodzenia zarówno roślinnego, jak i zwierzęcego. Początkowo glifosat był uznawany za substancję bezpieczną dla ludzi, jednak w 2015 r. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem sklasyfikowała go jako związek prawdopodobnie kancerogenny dla człowieka. W owym czasie nie określono jeszcze genotoksycznego mechanizmu działania glifosatu oraz jego głównego metabolitu - kwasu aminometylofosfonowego (AMPA), a także produktu herbicydowego Roundup 360 PLUS. Z tego względu przeprowadzone badania miały na celu ocenę właściwości genotoksycznych tych substancji w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka w zakresie stężeń odpowiadających potencjalnemu narażeniu środowiskowemu i zawodowemu. Badania te zostały wykonane we współpracy z dr inż. Jerzym Zakrzewskim, prof. IPO oraz mgr inż. Bogumiłą Huras z Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytutu Przemysłu Organicznego w Warszawie oraz prof. dr hab. Edytą Reszką z Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi. Uzyskane wyniki wykazały, że badane związki indukują powstawanie zarówno jedno-, jak i dwuniciowych pęknięć DNA oraz uszkodzeń oksydacyjnych w postaci utleniania zasad purynowych i pirymidynowych. Ponadto badania wykazały że glifosat, AMPA oraz Roundup 360 PLUS nie są zdolne do tworzenia adduktów z DNA ale zwiększają generowanie RFT, w tym rodnika hydroksylowego w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Roundup 360 PLUS w porównaniu do glifosatu i AMPA wykazywał najsilniejsze genotoksyczne działanie ponieważ już w stężeniu 5 μM spowodował szereg

uszkodzeń DNA. Uszkodzenia DNA pod wpływem preparatu herbicydowego nie były w pełni naprawiane w przeciwieństwie do uszkodzeń indukowanych przez glifosat i AMPA. Zaobserwowane zmiany nie wiązały się z bezpośrednią interakcją związków z DNA, a najprawdopodobniej wystąpiły jako wynik pośredniego działania tych substancji indukujących reaktywne formy tlenu [**Publikacja B26**].

Oprócz określenia toksyczności glifosatu i Roundap'u 360 PLUS, bardzo ważnym jest zbadanie działania metabolitów i zanieczyszczeń produkcyjnych glifosatu, które również mogą przedostawać się do organizmu człowieka. Dlatego celem następných badań [**Publikacja B28**], była ocena wpływu glifosatu, jego metabolitów: kwasu aminometylofosfonowego (AMPA), kwasu metylofosfonowego i jego produkcyjnych zanieczyszczeń: kwasu (fosfonometylo)iminodioctowego, N-metyloglifosatu, kwasu hydroksymetylofosfonowego i bis(fosfonometylo)aminy na indukcję apoptozy w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Analiza otrzymanych wyników wykazała wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, jonów wapnia w cytozolu oraz obniżenie transbłonowego potencjału mitochondrialnego w komórkach ekspozowanych na badane związki. Wszystkie badane substancje zmieniły przepuszczalność błon badanych komórek, aktywowały kaspazy -8, -9, -3 i spowodowały kondensację chromatyny. Wyniki te wykazały, że są one zdolne do indukowania apoptozy zarówno poprzez szlak zewnętrzny, jak i wewnętrzny. Nie wykazano różnic między zmianami apoptotycznymi indukowanymi przez glifosat, jego metabolity czy zanieczyszczenia, a obserwowane zmiany były wywołane przez wysokie stężenia badanych związków, nie występujące w organizmie człowieka w wyniku narażenia środowiskowego.

Innym pestycydem należącym do insektycydów fosforoorganicznych jest chlorfenwinfos (CFVF). Był on powszechnie stosowany do zwalczania szkodników domowych, takich jak muchy, pchły i roztocza. Stosowanie chlorfenwinfosu zostało częściowo zakazane w Unii Europejskiej i Stanach Zjednoczonych, tym niemniej oznaczono ten związek w znaczących stężeniach w środowisku. Zatem istnieje realne narażenie organizmu człowieka, w tym komórek krwi na ten pestycyd, a badania dotyczące toksyczności tej substancji są prowadzone na w różnych ośrodkach naukowych na świecie. Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu chlorfenwinfosu (CFVF) na śmierć nekrotyczną i apoptotyczną w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka oraz analiza parametrów morfologicznych i biochemicznych, takich jak uszkodzenia białek i powstawanie wolnych rodników. Badania wykazały, że chlorfenwinfos tylko w wysokim stężeniu 250 μ M spowodował spadek żywotności (indukował nekrozę) oraz indukował apoptozę jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka. CFVF indukował także uszkodzenia białek oraz wzmagał tworzenie się reaktywnych form tlenu (RFT). Podsumowując badany związek powoduje zmiany w poziomie powstawania RFT w warunkach odpowiadających narażeniu środowiskowemu, natomiast indukuje pozostałe zmiany w warunkach, które mogą odpowiadać ostremu lub podostremu zatruciu tym związkiem [**Publikacja B13**]. W obrębie tej tematyki powstała również praca

przeglądowa [**Publikacja B32**] omawiająca zaburzenia epigenetyczne spowodowane przez glifosat w układach *in vitro* i *in vivo*.

5.2.1.4. Uniepalniacze (antypireny)

Inną grupą związków, którą badałam w swojej pracy naukowej były bromofenolowe związki ograniczające palność. Są to substancje chemiczne powszechnie występujące w środowisku i bezpośrednim otoczeniu człowieka. Ze względu na swoje zastosowanie, głównie w tworzywach syntetycznych, uniepalniacze bromofenolowe są obecne w produktach powszechnie używanych w gospodarstwach domowych, tj.: sprzęcie elektrycznym i elektronicznym, meblach oraz środkach ochrony zdrowia. Związki te oznaczono także w produktach spożywczych, wodzie pitnej oraz kurzu pomieszczeń użytkowych. Najpowszechniej stosowanym uniepalniaczem bromofenolowym jest tetrabromobisfenol A (TBBPA). Innym uniepalniaczem jest tetrabromobisfenol S (TBBPS), który został wprowadzony na rynek jako substytut dla stosowanego TBBPA. Innymi powszechnie stosowanymi uniepalniaczami bromofenolowymi są 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBP) oraz pentabromofenol (PBP). Narażenie na te substancje jest wynikiem przenikania ich przez skórę oraz wnikanie do układu pokarmowego czy układu oddechowego. Celem badawczym niniejszej pracy było porównanie potencjału proapoptotycznego 2,4,6-tribromofenolu oraz pentabromofenolu w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Stwierdzono, że badane substancje zwiększały liczbę komórek apoptotycznych, podwyższały poziom jonów wapnia w cytozolu, obniżały transbłonowy potencjał mitochondrialny, wzmagaly aktywność kaspazy -8, -9 i -3. indukowały rozszczepienie PARP1 i fragmentację DNA oraz spowodowały zmiany w kondensacji chromatyny. Stwierdzono, większe zmiany w badanych parametrach apoptotycznych pod wpływem PBP w porównaniu do 2,4,6-TBP. Wykazano także, iż analizowane związki w przebiegu procesu apoptotycznego w większym stopniu angażowały szlak mitochondrialny [**Publikacja B33**].

5.2.1.5. Nanocząstki polistyrenu

W chwili obecnej zajmuję się oceną toksycznego działania nanocząstek plastiku, a głównie nanocząstek polistyrenu na komórki krwi człowieka. Na całym świecie szczególną uwagę skupia się na mikroplastiku (MP) i nanoplastiku (NP) w związku z rosnącym tempem ich emisji do środowiska naturalnego oraz zagrożeń wynikających z ich potencjalnego niekorzystnego oddziaływania na organizmy żywe. Jednym z najczęściej wykorzystywanych plastików jest polistyren, którego właściwości i zdolność kumulowania w łańcuchu pokarmowym zostały opisane w pracy przeglądowej [**Publikacja C27**]. W pracy tej dokonano charakterystyki cząstek plastiku, najczęściej stosowanych w różnych gałęziach przemysłu, następnie opisano jego właściwości fizykochemiczne i przedstawiono dane dotyczące

światowego i europejskiego zużycia plastików. Przedstawiono źródła mikro- i nanocząstek polistyrenu w środowisku i ich akumulację w organizmach żywych oraz toksyczność w układach *in vitro* i *in vivo*. Te informacje oraz fakt, iż nanoplastik został wykryty we krwi człowieka stały się podstawą do rozpoczęcia badań dotyczących interakcji nanocząstek polistyrenu z komórkami ludzkiej krwi. Celem badań była ocena wpływu nanocząstek polistyrenu na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka w aspekcie ich działania prooksydacyjnego, genotoksycznego i proapoptotycznego.

Na wstępie dzięki podjęciu współpracy z dr hab. Ireneuszem Piwońskim, prof. UŁ z Katedry Technologii i Chemii Materiałów, Wydziału Chemii UŁ., wykonano zdjęcia nanocząstek o średnicy 29 nm, 44 nm i 72 nm za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM) i skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) oraz oceniono hydrodynamiczny rozmiar nanocząstek polistyrenu za pomocą techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS) w środowisku wodnym i pożywce RPMI. Badania średnicy nanocząstek w środowisku wodnym potwierdziły ich wielkość zgodną z deklaracją producenta. Natomiast w pożywce RPMI (zawierającej albuminę) stwierdzono większą średnicę nanocząstek (szczególnie w przypadku najmniejszych nanocząstek aż 3-krotnie większą), co prawdopodobnie było spowodowane powstaniem korony białkowej [**Publikacja B34**].

Następnie oceniono cytotoksyczne i oksydacyjne właściwości badanych nanocząstek w stosunku do jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka [**Publikacja B31**]. Wykonana jako pierwsza analiza żywotności pozwoliła dobrać odpowiednie ich stężenia do prowadzenia dalszych badań. Analiza parametrów stresu oksydacyjnego wykazała, że analizowane nanocząstki w niskich stężeniach (0,01 µg/ml/0,1 µg/ml) powodowały generowanie reaktywnych form tlenu (RFT), a przy stężeniu 1 µg/ml/10 µg/ml indukowały powstawanie wysoce reaktywnych form tlenu (głównie rodnika hydroksylowego). W związku z tym, że wzrost RFT może powodować uszkodzenia makromolekuł komórkowych, zbadano wpływ nanocząstek polistyrenu na indukcję uszkodzeń oksydacyjnych białek i lipidów. Stwierdzono, że badane cząstki wzmagają peroksydację lipidów oraz utlenianie białek, przy czym najsilniejszy wpływ na zmiany w badanym parametrze wykazują najmniejsze nanocząstki o średnicy 29 nm.

Obserwowany wzrost poziomu reaktywnych form tlenu może przyczyniać się do uszkodzenia białek i lipidów, ale także do oksydacyjnych zmian w strukturze DNA. Tym samym w kolejnym etapie badań dokonano oceny potencjału genotoksycznego badanych nanocząstek w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka co przedstawiono w **publikacji B34**. Stwierdzono, że badane cząstki po 24-godzinnej inkubacji spowodowały powstanie zarówno pojedynczych, jak i podwójnych pęknięć nici DNA. Najsilniejsze uszkodzenia DNA odnotowano pod wpływem najmniejszych nanocząstek o średnicy 29 nm, które były istotne statystycznie już od stężenia 0,01 µg/ml, nieco większe zmiany spowodowały nanocząstki polistyrenu o średnicy 44 nm od stężenia 0,1 µg/ml, a najmniejsze

zmiany zaobserwowano w przypadku największych nanocząstek o średnicy 72 nm dopiero od stężenia 10 µg/ml. Wykazano także, że badane nanocząstki indukowały uszkodzenia dwuniciowe DNA, jednak tylko przy najwyższych stężeniach tj. 10 µg/ml i 100 µg/ml odpowiednio przez nanocząstki o średnicy 29 nm i 44 nm. Następnie oceniono oksydacyjne uszkodzenia puryn i pirymidyn w DNA jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka narażonych na działanie badanych nanocząstek, stwierdzając, silniejsze uszkodzenia w przypadku puryn niż pirymidyn. Dzięki podjęciu współpracy z dr hab. Markiem Foksińskim, prof. UMK z Katedry Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wykonano również dwuwymiarową chromatografię cieczową do analizy 8-okso-2'-deoksyguanozyny (8-oksodG) i wykazano niewielki wzrost poziomu tej pochodnej od stężenia 0,1 µg/ml tylko pod wpływem najmniejszych nanocząstek polistyrenu (29 nm). Dalsze analizy wykazały, że jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka efektywnie naprawiały (w czasie 2 godzin) uszkodzenia DNA spowodowane działaniem nanocząstek o średnicy 44 nm i 72 nm w stężeniu 100 µg/ml, jednak nie były w stanie całkowicie naprawić powstałych uszkodzeń DNA pod wpływem cząstek o najmniejszej średnicy. Przeprowadzone do tej pory badania wykazały, że analizowane nanocząstki spowodowały uszkodzenia w strukturze DNA prawdopodobnie pośrednio na skutek indukowanych przez nie RFT.

Nanocząstki polistyrenu spowodowały wzrost eksternalizacji fosfatydyloseryny (aktywacja apoptozy), który był największy pod wpływem najmniejszych nanocząstek od stężenia 1 µg/ml [**Publikacja B31**]. Z tego względu, przeprowadzono badania mechanizmu proapoptotycznego działania wybranych nanocząstek [**Publikacja B35**]. Zbadano poziom jonów wapnia w cytozolu oraz zmiany w poziomie potencjału transbłonowego mitochondriów w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka inkubowanych przez 24 godziny z nanocząstkami o różnych średnicach w zakresie stężeń od 0,001 do 100 µg/ml. Zaobserwowano, że najmniejsze nanocząstki w niższych stężeniach niż nanocząstki o większych średnicach spowodowały statystycznie istotny wzrost poziomu jonów wapnia w cytozolu oraz spadek potencjału mitochondrialnego. Enzymami odgrywającymi kluczową rolę w procesie apoptozy są kaspazy 9, -8 i -3. Badania wykazały, że tylko nanocząstki o średnicy 29 nm spowodowały istotne statystycznie zmiany aktywności wszystkich testowanych kaspaz. Z kolei cząstki o średnicach 44 nm i 72 nm powodowały zmiany w aktywności kaspazy-9 i kaspazy-3, nie aktywując kaspazy-8. W niniejszej pracy zbadaliśmy również poziom białka mTOR, które jest kinazą serynowo-treoninową zaangażowaną w regulację różnych procesów komórkowych, takich jak przemiany energii komórkowej, a także uczestniczy w regulacji autofagii i apoptozy. Obserwowano wzrost poziomu mTOR przy stężeniach nanocząstek mniejszych niż te, które indukowały apoptozę, a następnie zmniejszenie aktywacji mTOR przy stężeniach nanocząstek, pod wpływem których inicjowana była apoptoza aż do osiągnięcia poziomu próby kontrolnej (29 nm, stężenia 10 µg/ml i 100 µg/ml).

Innym etapem mojej pracy oceniającym wpływ nanocząstek polistyrenu na komórki krwi było określenie ich działania na błonę erytrocytu. Badania te częściowo zostały przeprowadzone po podjęciu współpracy z dr hab. Dorotą Bonarską-Kujawą, prof. UPWr z Katedry Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu gdzie w roku 2021 odbyłam 13 tygodniowy podoktorski staż naukowy. W tym badaniu oceniono potencjalną toksyczność nanocząstek polistyrenu w ludzkich erytrocytach. Zbadano wpływ nanocząstek o różnych średnicach (~30 nm, ~45 nm, ~70 nm) na płynność błony erytrocytów, kształt krwinek czerwonych oraz hemolizę tych komórek. Wykorzystane do badań nanocząstki polistyrenu zwiększały sztywność błony erytrocytów w obszarze hydrofobowym łańcuchów węglowodorowych kwasów tłuszczowych. Nanocząstki indukowały proces hemolizy i spowodowały zmiany morfologiczne krwinek czerwonych, a zaobserwowane zmiany były zależne od wielkości nanocząstek. Najmniejsze nanocząstki polistyrenu ~30 nm (o najmniejszej wartości bezwzględnej ujemnego potencjału zeta $-29,68$ mV) indukowały największą hemolizę, natomiast największe ~70 nm (o najwyższej wartości bezwzględnej ujemnego potencjału zeta) $(-42,00$ mV) spowodowały największe zmiany w kształcie erytrocytów i powstawaniu stomatocytów [**Publikacja B36**].

5.2.1.6. Benzo(a)piren

Innym związkiem, który wzbudził moje zainteresowanie jest benzo(a)piren (B(a)P). B(a)P to wielopierścieniowy węglowodór aromatyczny (WWA), powstający głównie w wyniku spalania paliw kopalnych, drewna i innych materiałów organicznych. Występuje on w dymie papierosowym, produktach spożywczych zwłaszcza przetwarzanych w wysokich temperaturach, a głównym źródłem narażenia ludzi na B(a)P jest żywność, woda pitna i powietrze. W pracy przeglądowej [**Publikacja B30**] omówiono wpływ benzo(a)pirenu na zmiany epigenetyczne, które mogą uczestniczyć w mechanizmach kancerogenności. Opisałam mechanizm zmian epigenetycznych indukowanych przez B(a)P, który wynika głównie z tworzenia adduktów CpG-BPDE pomiędzy metabolitem B(a)P-BPDE a CpG, co prowadzi do zmian w poziomie 5-metylocytozyny. B(a)P działa również poprzez hamowanie aktywności metylotransferaz DNA, a ponadto poprzez zwiększanie aktywności deacetylaz histonowych HDAC, czyli HDAC2 i HDAC3.

5.2.2. Ekstrakty z *Uncaria tomentosa*

Włączyłam się również w badania oceniające wpływ właściwości biologicznych ekstraktów wodnych i etanolowych z czepoty puszystej (*Uncaria tomentosa*) na komórki krwi człowieka. Roślina ta jest południowoamerykańskim pnączem, stosowanym od dziesięcioleci we wspomaganiu leczenia wielu chorób tj.: reumatyzmu, cukrzycy, schorzeń układu pokarmowego oraz chorób nowotworowych. Ekstrakty zostały uzyskane od zespołu prof. dr

hab. Krzysztofa Gulewicza z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Przeanalizowano wpływ ekstraktów z *U. tomentosa* na strukturę i funkcję erytrocytów i jednojądrzastych komórek krwi człowieka. Materiał roślinny stanowiły cztery ekstrakty: ekstrakt wodny i etanolowy z liści oraz ekstrakt wodny i etanolowy z kory. Oceniono wpływ ekstraktów *U. tomentosa* na ludzkie erytrocyty. Przeprowadzając analizę wielkości i kształtu erytrocytów za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii z kontrastem fazowym, zaobserwowałam zaburzenia wielkości i kształtu erytrocytów inkubowanych z ekstraktami etanolowymi i wodnymi w stężeniach odpowiednio 100 µg/ml i 250 µg/ml. Zmiany te były prawdopodobnie związane z wnikaniem związków polifenolowych zawartych w ekstraktach *U. tomentosa* do błony erytrocytów. Ponadto badania wykazały wzrost eksternalizacji fosfatydyloseryny na powierzchni erytrocytów świadczącej o indukcji apoptozy w wyniku narażenia komórek na badane ekstrakty w stężeniu 250 µg/ml. Niemniej jednak wyniki badań wykazały, że znaczne zmiany morfologiczne i apoptotyczne pojawiają się dopiero w wyniku ekspozycji erytrocytów na wysokie stężenia badanych ekstraktów, a zatem nie powinny one prowadzić do klinicznego uszkodzenia erytrocytów, jeśli nie zostaną przekroczone dawki terapeutyczne **[Publikacja B11]**.

W jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka stwierdzono, że tylko bardzo wysokie stężenia ekstraktów etanolowych z kory i liści oraz wodnego ekstraktu z kory *U. tomentosa* powodują spadek żywotności i apoptozę tych komórek oraz indukują wzrost poziomu grup karbonylowych w białkach i poziomu reaktywnych form tlenu. Efekty te były skorelowane z poziomem alkaloidów i polifenoli zawartych w badanych ekstraktach. Największą cytotoksyczność wykazywał ekstrakt etanolowy z kory, następnie etanolowy z liści i wodny z kory. Nie stwierdzono spadku żywotności jednojądrzastych komórek krwi człowieka po inkubacji z ekstraktem wodnym z liści **[Publikacja B12]**.

5.3. Uszkodzenia erytrocytów w różnych jednostkach chorobowych

Podczas trwania mojej pracy naukowej zajęłam się również badaniami oceniającymi zmiany w erytrocytach pacjentów z różnymi jednostkami chorobowymi. Najpierw po nawiązaniu współpracy z prof. dr hab. Tadeuszem Pietrasem z Kliniki Pulmonologii i Alergologii UM Szpitala im. Norberta Barlickiego w Łodzi, zbadałam wpływ przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) na równowagę redoks, właściwości błony komórkowej erytrocytów, aktywność butyrylocholinoesterazy (BChE) i całkowitą pojemność antyoksydacyjną (TAC) osocza osób chorych. U chorych na POChP w stosunku do grupy kontrolnej obserwowano wzrost produktów peroksydacji lipidów oraz spadek zawartości grup –SH w błonie krwinek czerwonych. Stwierdzono wzrost aktywności peroksydazy glutationowej, spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz istotne zmiany w aktywności enzymów błonowych erytrocytów u chorych na POChP, co było widoczne poprzez obniżoną aktywność ATPazy i podwyższoną aktywność acetylocholinoesterazy

[Publikacja B20]. Po raz pierwszy wykazano, że aktywność butyrylocholinoesterazy w osoczu krwi pacjentów z rozpoznaną przewlekłą obturacyjną chorobą płuc jest istotnie obniżona w porównaniu z osobami zdrowymi. Zmianom tym towarzyszył spadek całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) i wzrost peroksydacji lipidów. Obserwowane zaburzenia mogą być wynikiem stresu oksydacyjnego indukowanego pod wpływem przewlekłej obturacyjnej choroby płuc **[Publikacja B22].**

Następna podjęta współpraca z prof. dr hab. Krzysztofem Chojnowskim z Kliniki Hematologii Ogólnej UM Szpitala im. M. Kopernika w Łodzi, miała na celu sprawdzenie i wyjaśnienie czy w czerwienicy prawdziwej (PV) i nadpłytkowości samoistnej (ET) dochodzi do eryptozy dojrzałych erytrocytów. Obie choroby to nowotwory mieloproliferacyjne Philadelphia-ujemne z udokumentowanym upośledzeniem apoptozy na poziomie hematopoetycznych komórek macierzystych. Przeanalizowano markery eryptozy w krwinkach czerwonych pobranych od pacjentów nieleczonych, leczonych hydroksymocznikiem (HU) oraz osób zdrowych. Zaobserwowano wzrost aktywności kalpajny i eksternalizacji fosfatydyloseryny u pacjentów z ET i PV wcześniej nieleczonych, co wskazuje na zwiększoną eryptozę. Wśród pacjentów leczonych HU zaobserwowano istotny wzrost aktywności kalpajny w grupie ET i spadek aktywności tego enzymu w grupie PV w porównaniu z pacjentami nieleczonymi cytoredukcyjnie. Nasilenie eryptozy u pacjentów z ET i PV może być formą ogólnoustrojowej kompensacji patologicznej nadprodukcji erytrocytów w szpiku kostnym. Hydroksymocznik jako lek cytoredukcyjny stosowany w ET i PV, może wpływać na proces eryptozy w różny sposób, w zależności od jednostki chorobowej. Nie zaobserwowano, aby mutacja JAK2V617F miała jakikolwiek wpływ na eryptozę w ET **[Publikacja B29].**

Pozostając w tematyce dotyczącej stresu oksydacyjnego, napisałam dwie prace przeglądowe omawiające wpływ suplementów diety w zespole metabolicznym MS (ang. Metabolic Syndrome). MS jest zbiorem wzajemnie powiązanych czynników takich jak: insulinooporność, hiperinsulinemia, otyłość, zaburzenia lipidowe, nadciśnienie tętnicze. Wskazuje się również, że pierwotnym zjawiskiem inicjującym rozwój insulinooporności związanej z dodatnim bilansem energetycznym jest stres oksydacyjny. Pierwszą linią obrony w walce z ZM jest zmiana stylu życia opierająca się głównie na redukcji masy ciała. Ponadto duże znaczenie ze względu na właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne mogą mieć również suplementy diety takie jak: antyoksydanty, nienasycone kwasy tłuszczowe czy składniki mineralne **[Publikacja B9 i B19].**

W następnej pracy omówiłam rolę suplementacji kwasami omega-3 i omega -6 w różnych jednostkach chorobowych (choroby układu krążenia, otyłość, zespół metaboliczny, stany zapalne, fenylketonuria, choroby nowotworowe, depresja) oraz wpływ diety bogatej w te kwasy na zdrowie matki i rozwój dziecka **[Publikacja B18].**

6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury w szczególności zagranicznej

03.09.2018–31.01.2019 (22 tygodnie) odbyłam staż naukowy w Instytucie Medycyny Pracy im. prof. dr med. Jerzego Nofera w Łodzi w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Epigenetyki (obecna nazwa Zakład Badań Translacyjnych) pod opieką prof. dr hab. Edyty Reszki (Potwierdzenie odbycia stażu **załącznik 7 (S1)**).

W trakcie stażu zapoznałam się z metodyką stosowaną w zakresie genetyki molekularnej i epigenetyki taką jak: izolacja genomowego DNA z komórek ludzkich, synteza cDNA, modyfikacja DNA z wodorosiarczanem sodu, ilościowa analiza ekspresji genów (qRT-PCR) czy metylacja regionów promotorowych.

Wykonywałam samodzielnie badania ekspresji genów, metylacji ogólnej oraz metylacji regionów promotorowych wybranych genów w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka pod wpływem ftalanów (DBP, BBP i ich metabolitów MBP i MBzP). Efektem odbytego stażu jest publikacja, która wchodzi w skład osiągnięcia naukowego.

Sicińska P., Jabłońska E., Bukowska B., Balcerczyk A., Reszka E. „*The selected epigenetic effects of phthalates: DBP, BBP and their metabolites:MBP, MBzP on human peripheral blood mononuclear cells (In Vitro). Toxicol In Vitro. 2022 Aug; 82:105369. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105369 (Publikacja A5).*

01.07–30.09.2021 (13 tygodni) odbyłam podoktorski staż naukowy w Katedrze Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod opieką dr hab. Doroty Bonarskiej-Kujawy, prof. UPWr (Potwierdzenie odbycia stażu **załącznik 7 (S2)**).

Podczas stażu zapoznałam się z metodami oceniającymi parametry fizyczne w erytrocytach człowieka po działaniu różnych ksenobiotyków. Wykonałam pomiary z zastosowaniem spektroskopii fluorescencyjnej, spektroskopii UV-Vis oraz mikroskopii świetlnej. Przy użyciu sond fluorescencyjnych oceniłam zmiany w płynności błon erytrocytów, wykonałam pomiary potencjału transbłonowego erytrocytów oraz oceniłam zmiany kształtu krwinek czerwonych po działaniu wybranych związków. Efektem tego stażu jest publikacja pt. „*The effects of non-functionalized polystyrene nanoparticles with different diameters on human erythrocyte membrane and morphology*” Płuciennik K, **Sicińska P**, Duchnowicz P, Bonarska-Kujawa D, Męczarska K, Solarzka-Ściuk K, Miłowska K, Bukowska B. *Toxicol In Vitro. 2023 Jun 17:105634. doi: 10.1016/j.tiv.2023.105634 (Publikacja B36).*

Współpracowałam również z innymi jednostkami czego efektem były publikacje w czasopiśmie z listy JCR:

1. dr hab. n.med. Hanną Ławnicką i dr hab. n.med. Ewelina Motylewską z Zakładu Immunoendokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

a) Lawnicka H, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, Altmann KH, Hofmann T, Stepien H. Resorcylic acid lactone L-783,277 inhibits the growth of the human adrenal cancer cell line H295R in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009 Oct-Dec;22(4):889-95.

b) Lawnicka H, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, Kazimierczuk Z, Grieb P, Stepien H. Anti-neoplastic effect of protein kinase CK2 inhibitor, 2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole (DMAT), on growth and hormonal activity of human adrenocortical carcinoma cell line (H295R) in vitro. *Cell Tissue Res*. 2010 May;340(2):371-9.

c) Motylewska E, Lawnicka H, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, Niedziela A, Melen-Mucha G, Stepien H. Interferon alpha and rapamycin inhibit the growth of pheochromocytoma PC12 line in vitro. *Endokrynol Pol*. 2013;64(5):368-74.

d) Motylewska E., Lawnicka H., Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P., Niedziela, Gabriela Melen-Mucha A., Stepien H. Interferon alpha and rapamycin inhibit the growth of carcinoid and medullary thyroid cancer in vitro. *Pharmacol Rep*. 2014 Aug;66(4):624-9.

2. dr hab. n.med. Magdaleną Boncler z Zakładu Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

a) Boncler M, Rywaniak J, Sicińska P, Watala C. Effectiveness of modified C-reactive protein in the modulation of platelet function under different experimental conditions. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011 Jun;22(4):301-9.

3. prof. dr hab. n. med. Tadeuszem Pietrasem z Kliniki Pulmonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Szpitala im. Norberta Barlickiego w Łodzi.

a) Sicińska P., Bukowska B., Pajak A., Koceva-Chyła A., Pietras T., Nizinkowski P., Gorski P., Koter-Michalak M. Decreased activity of butyrylcholinesterase in blood plasma of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Archives of Medical Science*, vol. 13, nr 3, 2017, s. 645-651.

b) Bukowska B, Sicińska P, Pajak A, Koceva-Chyła A, Pietras T, Pszczołkowska A, Górski P, Koter-Michalak M. Oxidative stress and damage to erythrocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease - changes in ATPase and acetylcholinesterase activity. *Biochem Cell Biol*. 2015 Dec;93(6):574-80.

4. prof. dr hab. n. med. Krzysztofem Chojnowskim i dr n. med. Pawłem Kopką z Kliniki Hematologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Szpitala im. M. Kopernika w Łodzi.

a) Kopka P., Bliźniewska K., Sicińska P., Duchnowicz P., Bukowska B., Treliński J., Chojnowski K. Eryptosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, vol. 74, 2020, s. 69-76.

5. prof. dr hab. Maciejem Zalewskim i dr Małgorzatą Tarczyńską z Katedry Ekologii Stosowanej UŁ.

a) Majsterek I., Sicińska P., Tarczyńska M., Zalewski M., Walter Z. Toxicity of microcystin from cyanobacteria growing in a source of drinking water. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004 Oct;139(1-3):175-9.

6. dr hab. Magdą Kowalewicz-Kulbat z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ.

a) Mnich E, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, Hinc K, Obuchowski M, Gajewski A, Moran AP, Chmiela M. Impact of *Helicobacter pylori* on the healing process of the gastric barrier. *World J Gastroenterol*. 2016 Sep 7;22(33):7536-58.

7. prof. dr hab. Katarzyną Woźniak z Katedry Genetyki Molekularnej UŁ.

a) Mokra K., Woźniak K., Bukowska B., Sicińska P., Michałowicz J. Low-concentration exposure to BPA, BPF and BPAF induces oxidative DNA bases lesions in human peripheral blood mononuclear cells. *Chemosphere*, vol. 201, 2018, s. 119-126.

b) Woźniak E., Sicińska P., Michałowicz J., Woźniak K., Reszka E., Huras B., Zakrzewski J., Bukowska B. The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral

blood mononuclear cells - genotoxic risk assesment. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 120, 2018, s. 510-522.

c) Sicińska P., Mokra K., Woźniak K., Michałowicz J., Bukowska B. Genotoxic risk assessment and mechanism of DNA damage induced by phthalates and their metabolites in human peripheral blood mononuclear cells. *Scientific Reports, Nature Publishing Group*, vol. 11, nr 1, 2021, 1658, s. 1-9.

8. dr hab. Anetą Balcerczyk prof. UŁ z Katedry Biologii Nowotworów i Epigenetyki UŁ.

a) Sicińska P., Jabłońska E., Bukowska B., Balcerczyk A., Reszka E. The selected epigenetic effects of phthalates: DBP, BBP and their metabolites: MBP, MBzP on human peripheral blood mononuclear cells (In Vitro). *Toxicol In Vitro*. 2022 Aug;82:105369.

9. prof. dr hab. Krzysztofem Gulewiczem z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

a) Bors M, Michałowicz J, Pilarski R, Sicińska P., Gulewicz K, Bukowska B. Studies of biological properties of *Uncaria tomentosa* extracts on human blood mononuclear cells. *J Ethnopharmacol*. 2012 Aug 1;142(3):669-78.

b) Bors M, Sicińska P., Michałowicz J, Wieteska P, Gulewicz K, Bukowska B. Evaluation of the effect of *Uncaria tomentosa* extracts on the size and shape of human erythrocytes (in vitro). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012 Mar;33(2):127-34.

10. dr inż. Jerzym Zakrzewskim, prof. IPO oraz mgr inż. Bogumiłą Huraś z Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytutu Przemysłu Organicznego w Warszawie.

a) Kwiatkowska M., Michałowicz J., Jarosiewicz P., Pingot D., Sicińska P., Huras B., Zakrzewski J., Jarosiewicz M., Bukowska B. Evaluation of apoptotic potential of glyphosate metabolites and impurities in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology* 2020, vol. 135, 110888, s. 1-12.

b) Woźniak E., Sicińska P., Michałowicz J., Woźniak K., Reszka E., Huras B., Zakrzewski J., Bukowska B. The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assesment. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 120, 2018, s. 510-522.

11. prof. dr hab. Edytą Reszką i dr hab. Ewą Jabłońską prof. IMP z Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi.

a) Woźniak E., Sicińska P., Michałowicz J., Woźniak K., Reszka E., Huras B., Zakrzewski J., Bukowska B. The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assesment. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 120, 2018, s. 510-522, DOI:10.1016/j.fct.2018.07.035.

b) Sicińska P., Jabłońska E., Bukowska B., Balcerczyk A., Reszka E. The selected epigenetic effects of phthalates: DBP, BBP and their metabolites: MBP, MBzP on human peripheral blood mononuclear cells (In Vitro). *Toxicology in Vitro*, vol. 82, 2022, 105369, s. 1-7.

12. dr hab. Ireneuszem Piwońskim prof. UŁ z Katedry Technologii i Chemii Materiałów, Wydziału Chemii UŁ.

a) Malinowska K., Bukowska B., Piwoński I., Foksiński M., Kisiełowska A., Zarakowska E., Gackowski D., Sicińska P. Polystyrene nanoparticles: the mechanism of their genotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells. *Nanotoxicology*, 2022, s. 1-21.

13. dr hab. Markiem Foksińskim, prof. UMK z Katedry Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

a) Malinowska K., Bukowska B., Piwoński I., Foksiński M., Kisiełowska A., Zarakowska E., Gackowski D., Sicińska P. Polystyrene nanoparticles: the mechanism of their genotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells. *Nanotoxicology*, 2022, s. 1-21.

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

7.1. Działalność dydaktyczna

7.1.1. Prowadzone zajęcia

W okresie od 2011–2023 prowadziłam następujące zajęcia dydaktyczne na studiach I i II stopnia: Fizyka procesów i zjawisk przyrodniczych z elementami biofizyki, Fizyka z elementami biofizyki, Biofizyka medyczna, Biofizyka skażeń, Podstawy fizyki i biofizyki, Analiza biochemiczno-biofizyczna, Toksykologia, Toksykologia z ekotoksykologią, Ekotoksykologia, Fizyczno-chemiczny monitoring skażeń środowiska miejskiego, Biomarkery stresu oksydacyjnego, Biomarkery specyficzne i niespecyficzne, Biologiczne praktikum kryminalistyczne, Cytologia kliniczna, Pracownia magisterska, Seminarium licencjackie z przygotowaniem pracy licencjackiej i przygotowaniem do egzaminu licencjackiego. Prowadzone przeze mnie zajęcia wielokrotnie były oceniane przez studentów powyżej 4,5 a w roku akademickim 2022/2023 otrzymałam wyróżnienie przyznawane przez studentów w Plebiscycie „Nauczyciel Roku 2022/2023 na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ”.

7.1.2. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego

2016–2020 Byłam Promotorem pomocniczym w rozprawie doktorskiej Lek. Pawła Kopki na stopień doktora nauk medycznych. Uchwała nr 9.28/260/2019 Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z dnia 12 marca 2019r.

Tytuł pracy: „Ocena eryptozy i wybranych parametrów stresu oksydacyjnego u chorych na czerwienicę prawdziwą i nadpłytkowość samoistną” Rozprawa powstała w Zakładzie Zaburzeń Hemostazy Katedry Hematologii UM w Łodzi we współpracy z Katedrą Biofizyki Skażeń Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Promotor: Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Chojnowski

Obecnie jestem Promotorem pomocniczym w dwóch rozprawach doktorskich wykonywanych w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Od 2019 u Mgr Kingi Malinowskiej ze Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej przy Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ. Tytuł pracy: „Ocena właściwości prooksydacyjnych, proapoptotycznych i genotoksycznych nanocząstek polistyrenu w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej”. Promotor: Prof. dr hab. Bożena Bukowska

Od 2021 u Mgra Kamila Płuciennika ze Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UŁ. Tytuł pracy: „Zmiany strukturalne i funkcjonalne błon erytrocytów człowieka narażonych

na działanie nanocząstek polistyrenu o różnych średnicach” Promotor: Prof. dr hab. Bożena Bukowska

7.1.3. Opieka naukowa nad magistrantami i licencjuszami

Byłam Promotorem 4 prac magisterskich oraz 8 prac licencjackich wykonanych w Katedrze Biofizyki Skazań Środowiska na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

7.1.4. Opieka naukowa nad stażystami

W roku 2020 byłam opiekunem stażu Pani Dominiki Jaśniak, studentki 2 roku Biotechnologii, studiów pierwszego stopnia UŁ. Staż odbywał się w ramach projektu „STUDENTS’ POWER – kompleksowy program rozwoju uczelni”. Staż był współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

7.2. Działalność w zakresie organizacyjnym

2020–2024 Członek Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska z wyboru w grupie pracowników niesamodzielných.

2020–2024 Członek Rektorskiej Komisji mieszkaniowej UŁ.

2022/2023 Przewodnicząca Podkomisji Rekrutacyjnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ.

2020/2021 Przewodnicząca Podkomisji Rekrutacyjnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ.

2019/2020 Sekretarz Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej WBiOŚ

2017/2018 Sekretarz Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej WBiOŚ

2016/2017 Członek Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej WBiOŚ

7.3. Działalność w zakresie popularyzacji nauki

14.04.2023 – Warsztaty pt. „Składniki krwi i funkcje hemoglobiny” przeprowadzone dla uczniów Akademickiego Liceum Ogólnokształcącego z Oddziałami Dwujęzycznymi im. Prof. Zbigniewa Religi w Kutnie.

09.02.2023 – Warsztaty pt. „Biofizyka wokół nas” przeprowadzone dla uczniów I Liceum Ogólnokształcącego im. Tadeusza Kościuszki w Wieluniu.

18.11.2022 – Warsztaty w ramach UZO pt. „Różne formy hemoglobiny jako markery zatruc” przeprowadzone dla uczniów Akademickiego Liceum Ogólnokształcącego z Oddziałami Dwujęzycznymi im. Prof. Zbigniewa Religi w Kutnie.

10.01.2020 – Noc Biologów warsztaty pt. „Nie chcę oddychać niezdrowo, pokonajmy smog!”.

03.12.2019 – Warsztaty pt. „Współczesne zagrożenia środowiska: plastik i jego dodatki” wstęp wolny.

06.02.2019 – Warsztaty pt. „Biologia Sądowa” przeprowadzone dla uczniów III Liceum Ogólnokształcącego w Koninie.

27.09.2018 – Warsztaty pt. „Tajemnicze barwniki w przyrodzie: chlorofil i hemoglobina” przeprowadzone dla uczniów I Liceum Ogólnokształcącego im. J. Dąbrowskiego w Tomaszowie Mazowieckim.

08.02.2018 – Warsztaty pt. „Biologia Sądowa” przeprowadzone dla uczniów przeprowadzone dla uczniów III Liceum Ogólnokształcącego im. Cypriana Kamila Norwida w Koninie.

27.09.2017 Warsztaty pt. „Biologia Sądowa” przeprowadzone dla uczniów III Liceum Ogólnokształcącego im. C.K. Norwida w Koninie.

11.05.2017 Warsztaty pt. „Tajemnicze barwniki w przyrodzie: chlorofil i hemoglobina” przeprowadzone dla uczniów Zespołu Szkół Licealno-Gimnazjalnych w Głownie.

13.01.2017 Noc Biologów, warsztaty pt. „Wolne rodniki – dobre, złe, brzydkie”.

12.02.2016 Warsztaty pt. „Otrzymywanie i rozdział chromatograficzny chlorofilu” przeprowadzone dla uczniów XXI Liceum Ogólnokształcącego im. B. Prusa w Łodzi.

09.02.2016 Zajęcia edukacyjne w ramach projektu „Przedszkolak na Uniwersytecie” przeprowadzone dla Przedszkola Miejskiego Nr 52 w Łodzi.

04.04.2012 Przeprowadzenie praktyk w ramach ogólnopolskiego programu „Dzień przedsiębiorczości” pod honorowym patronatem Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Bronisława Komorowskiego dla uczniów XXVI Liceum Ogólnokształcącego im. Krzysztofa Kamila Baczyńskiego w Łodzi.

20.01.2009 Wykład pt. „Zastosowanie techniki cytometrii przepływowej w badaniach biologicznych” wygłoszony na Zebraniu Naukowym Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. M. Kopernika w Łodzi.

14–17.02.2007 Udział w X Łódzkich Targach Edukacyjnych.

18–25.04.2005 Wykład pt. „Sinice i ich wpływ na erytrocyty człowieka” wygłoszony na V Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi.

17.10.2000 Wykład pt. „Sinice i ich toksyny” wygłoszony na Zebraniu Naukowym Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. M. Kopernika w Łodzi.

8. Inne osiągnięcia

8.1. Recenzje artykułów

Byłam recenzentem 12 artykułów z listy Journal Citation Reports (JCR): Antioxidants (1), Canadian Journal of Physiology and Pharmacology (1), Chemosphere (1), Cytotechnology (2),

Environment International (1), Environmental Pollution (3), Nano letters (1), Platelets (1), Toxicology Research (1).

8.2. Szkolenia

23.05.2019 Łódź, Uczestnictwo w szkoleniu pt. „Innowacyjne rozwiązania do hodowli komórek ssaczy” organizowane przez Merck Sp.żo.o.

17-21.10.2016 Juan-les-Pins, Francja, Uczestnictwo w szkoleniu pt. „*In vitro* toxicology for human safety assessment” organizowane przez „stowarzyszenie ESTIV2016”

16-19.09.2014 Olsztyn, Uczestnictwo w szkoleniu pt. „Człowiek, żywność, środowisko – problemy współczesnej toksykologii”

4-5.06.2007 Łódź, Uczestnictwo w szkoleniu VI Edycji Szkoły Cytometrii Przepływowej Becton Dickinson pt. „Diagnostyka Białaczek i Chłoniaków”

24-26.05.2006 Konstancin-Jeziorna, Uczestnictwo w szkoleniu V Edycja Szkoły Cytometrii Przepływowej Becton Dickinson. Uzyskanie certyfikatu z zakresu zaawansowanej pracy z oprogramowaniem FACSDiva.

8-11.09.2002 Łódź, Ukończenie kursu „Toksykologii molekularnej” organizowanego przez Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi

8.3. Nagrody

2020 Łódź Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego, zespołowa stopnia drugiego, za cykl 18 publikacji pt. „Komórki krwi człowieka i ich wykorzystanie w badaniach *in vitro* do oceny mechanizmów działania wybranych ksenobiotyków”

2018 Łódź Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego, zespołowa drugiego stopnia, za cykl publikacji pt. „Cytotoksyczność, stres oksydacyjny, uszkodzenia struktury DNA i zmiany epigenetyczne oraz regulacja szlaków sygnałowych prawidłowym materiale biologicznym i narażonym na ksenobiotyki środowiskowe i potencjalne chemioterapeutyki”

2017 Brązowy medal za długoletnią służbę.

2014 Łódź Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego, zespołowa drugiego stopnia, za cykl publikacji dotyczących stresu oksydacyjnego powstającego w różnych układach biologicznych *in vitro* i *in vivo*.

2013 Łódź Nagroda naukowa Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, zespołowa pierwszego stopnia, za cykl prac pt. „Badania nad rolą neuropeptydów oraz cytokin angiogennych w patogenezie nowotworów gruczołów dokrewnych”.

2010 Łódź Nagroda naukowa Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, zespołowa pierwszego stopnia, za cykl prac opublikowanych w latach 2007–2009 pt. „Badania nad rolą angiogennych czynników wzrostowych w patogenezie nowotworów gruczołów dokrewnych”.

2008 Łódź Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego, za współautorstwo w cyklu publikacji pt. „Oddziaływanie związków chemicznych z erytrocytami człowieka oraz ocena występowania niektórych z nich w środowisku”.

9. Bibliometryczne podsumowanie dorobku publikacyjnego

Prace stanowiące podstawę osiągnięcia naukowego (A1-A5)

Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji: **23,906**

Sumaryczna liczba punktów MEiN: **620**

Pozostałe prace

Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji: **112,870**

Sumaryczna liczba punktów MEiN: **3280**

Całość dorobku publikacyjnego łącznie:

Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji: **136,776**

Sumaryczna liczba punktów MEiN: **3900**

1. Web of Science:

Liczba cytowań: **818**

Liczba cytowań bez autocytowań: **790**

Indeks Hirsha: **15**

2. Scopus:

Liczba cytowań: **861**

Liczba cytowań bez autocytowań: **833**

Indeks Hirsha: **16**

10. Literatura

- Al-Saleh I., Elkhatib R. *Screening of phthalate esters in 47 branded perfumes*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2016;23(1), 455e468. Jan.
- Arimon M., Takeda S., Post K.L., Svirsky S., Hyman B.T., Berezovska O. *Oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology*. Neurobiol Dis 2015, 84, 109–119.
- Bahadar H., Maqbool, F., Abdollahi, M. *Consumption of phthalates coated pharmaceutical tablets: an unnoticed threat*. Int. J. Pharmacol. 2014, 10 (2), 78–81.
- Blount B.C., Silva M.J., Caudill S.P., Needham L.L., Pirkle J.L., Sampson E.L., Lucier G.W., Jackson R.J., Brock J.W. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* 2000, 108(10), 979–982.
- Borghini A., Cervelli T., Galli A., Andreassi M. G. *DNA modifications in atherosclerosis: from the past to the future*. Atherosclerosis 2013, 230, 202–209.
- Bornehag C., Sundell J., Weschler J., Sigsgaard T., Lundgren B., Hasselgren M., Engman Hagerhed L. *The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study*. Environ. Health Perspect. 2014, 112 (14), 1393–1397.
- Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C. *Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria*. Cell Death Differ 2001, 8, 1143e1156.
- Bukowska B., Michalowicz J., Pieniazek D., Sicińska P., Duda W. *Superoxide Dismutases and their Inhibitors-the role in some diseases*. Current Enzyme Inhibition, 2006, 2, 379–397.

- Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J. *Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features*. *Mutat. Res.* 2003, 531, 5–23.
- Ceretti E., Zani C., Zerbini I., Guzzella L., Scaglia M., Berna V., Donato F., Monarca S., Feretti D. *Comparative assessment of genotoxicity of mineral water packed in polyethylene terephthalate (PET) and glass bottles*. *Water Res.* 2010. 44 (5), 1462e1470. Mar.
- Chen J. A., Liu H., Qiu Z., Shu W. *Analysis of di-n-butyl phthalate and other organic pollutants in Chongqing women undergoing parturition*. *Environ. Pollut.* 2008, 156(3), 849–853.
- Cheng L., Li J., Cheng J., Wu Z. *Dibutyl phthalate-induced activation of ROS and ERK1/2 causes hepatic and renal damage in Kunming mice*. *Hum Exp Toxicol.* 2019, 38, 938–950.
- Chi Z., Zhao J., You H., Wang M. *Study on the Mechanism of Interaction between Phthalate Acid Esters and Bovine Hemoglobin*. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 3, 6035–6041.
- Dickson-Spillmann M., Siegrist M., Keller C., Wormuth M. *Phthalate exposure through food and consumers' risk perception of chemicals in food*. *Risk Anal.* 200929 (8), 1170e1181.
- Dizdaroglu M. *Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer*. *Mutat. Res.* 2015, 763, 212–245.
- Elmore S. *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol. Pathol.* 200735, 495–516.
- Frederiksen H., Skakkebaek N.E., Andersson A.M. *Metabolism of phthalates in humans*. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51 (7), 899e911.
- Fromme H., Bolte B., Koch H.M., Angerer J., Boehmer S., Drexler H., Mayer R., Liebl B. *Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population*. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2007, 210(1), 21–33.
- Fromme, H. et al. *Phthalates and their metabolites in breast milk results from the Bavarian monitoring of breast milk*. *Environ. Int.* 2011, 37(4), 715–722.
- Genuis S. J., Beeson S., Lobo R. A., Birkholz D. *Human elimination of phthalate compounds: blood, urine, and sweat (BUS) study*. *Sci. World J.* 2012, 31, 615068.
- Ghosh J., Das J., Manna P., Sil P.C. *Hepatotoxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate is attributed to calcium aggravation, ROS-mediated mitochondrial depolarization, and ERK/NF- κ B pathway activation*. *Free Radical Bio. Med.* 2010, 49, 1779–1791.
- Halit S, Salameh P. *Exposure to toxins during pregnancy and childhood and asthma in children: A pilot study*. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 2017,7, 147–154.
- Hartmann, C. et al. *Human biomonitoring of phthalate exposure in Austrian children and adults and cumulative risk assessment*. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218(5), 489–499 (2015).
- Hartung T., Corsini E. *Immunotoxicology: challenges in the 21st century and in vitro opportunities*. *Altern. Animal Exp.* 2013. 30, 411–426.
- Hauser R., Meeker J. D., Park S., Silva M. J., Calafat A. M. *Temporal variability of urinary phthalate metabolite levels in men of reproductive age*. *Environ. Health Perspect.* 2004. 112(17), 1734–1740.
- Hernández-Díaz S., Mitchell A.A., Kelley K.E., Calafat A.M., Hauser R. *Medications as a potential source of exposure to phthalates in the U.S. population*. *Environ. Health Perspect.* 2009.117, 185–189.
- Heudorf U., Mersch-Sundermann V., Angerer J. *Phthalates: toxicology and exposure*. *Int. J. Hyg Environ. Health* 2007, 210, 623–634.
- Hines C., Hopf N., Deddens J., Silva M., Calafat A. *Estimated daily intake of phthalates in occupationally exposed groups*. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 2011. 21, 133–141.
- Jakkola J.J., Knight T.L. *The role of exposure to phthalates from polyvinylchloride*. *Environ. Health Perspect.* 2008. 116, 845e853.
- Jarosiewicz M., Duchnowicz P., Włuka A., Bukowska B. *Evaluation of the effect of brominated flame retardants on hemoglobin oxidation and hemolysis in human erythrocytes*. *Food Chem. Toxicol.* 2017, 109, 264e271.
- Jena N. R. *DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair*. *J. Biosci.* 2012, 37(3), 503–517).
- Jiang M., Li Y., Zhang B., Zhou A., Zhu Y., Li J., Zhao H., Chen L., Hu J., Wu C., Peng Y., Liao J., Xia Z., Cai Z., Chen X., Xu B., Xia W., Xu S. *Urinary concentrations of phthalate metabolites associated with changes in clinical hemostatic and hematologic parameters in pregnant women*. *Environ Int.* 2018, Nov;120:34-42.
- Just A., Whyatt R., Perzanowski M., Calafat A., Perera F., Goldstein I., Chen Q., Rundle A., Miller R. *Prenatal exposure to butylbenzyl phthalate and early eczema in an urban cohort*. *Environ. Health Perspect.* 2012. 120 (10), 1475–1480.
- Kaufman R.J., Scheuner D., Schroeder M. *The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2023, 411–421.
- Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P. *NTP center for the evaluation of risks to human reproduction; phthalates expert panel report on the and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate*. *Reprod. Toxicol.* 2002, 16, 529–653.
- Kim H., Kil M., Han Ch. *Urinary phthalate metabolites and anemia: Findings from the Korean National Environmental Health Survey (2015-2017)*. *Environ Res.* 2022, Dec;215(Pt 2):114255.
- Kolarik B., Naydenov K., Larsson M., Bornehag C.G., Sundell J. *The association between phthalates in dust and allergic diseases among Bulgarian children*. *Environ. Health Perspect* 2008. 116 (1), 98–103 Jan.
- Kolarik B., Naydenov K., Larsson M., Bornehag C.G., Sundell J. *The association between phthalates in dust and allergic diseases among Bulgarian children*. *Environ. Health Perspect.* 2008, 116 (1), 98–103.
- Kolena B., Petrovicova I., Pilka T., Pucherova Z., Munk M., Matula B., Vankova V., Petlus P., Jenisova Z., Rozova Z., Wimmerova S., Trnovec T. *Phthalate exposure and health-related outcomes in specific types of work environment*. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 2014. 11 (6), 5628e5639.

- Kwiatkowska M., Reszka E., Wozniak K., Jabłonska E., Michałowicz J., Bukowska B. *DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study)*. Food Chem. Toxicol. 2017;105, 93–98.
- Lang F., Lang E., Föllmer M. *Physiology and pathophysiology of eryptosis*. Transfus Med Hemother 2012, 39, 308e314.
- Lang K.S., Lang P.A., Baue C., Duranton C., Wiede T., Huber S.M., Lang F. *Mechanisms of suicidal erythrocyte death*. Cell. Physiol. Biochem. 2005;15 (5),195e202.
- LaRosa F.D., Orange S.J. *Lymphocytes*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2008. 121,364–369.
- Lee J., Lee J.H., Kim C.K., Thomsen M. *Childhood exposure to DEHP, DBP and BBP under existing chemical management systems: a comparative study of sources of childhood exposure in Korea and in Denmark*. Environ. Int. 2014, 63,77e91. Feb.
- Lin J., Chen W., Zhu H., Wang C. *Determination of free and total phthalates in commercial whole milk products in different packaging materials by gas chromatography mass spectrometry*. J. Dairy Sci. 2015. 98 (12), 8278e8284.
- Ling L., Li-Xing Z., Yue-Ping G., Jie-Yun W., Yun-Hui Z., Wei-Min. *SongLevels of environmental endocrine disruptors in umbilical cord blood and maternal blood of low-birth-weight infants*. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2008 Mar;42(3):177-80.
- Liu Y., Tavana O., Gu W. *p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian*. J. Mol. Cell Biol. 2019, 19, 564–577.
- Marczak A. *Apoptosis of human erythrocytes*. Adv. Cell Biol. 2005, 32, 359e373
- Nagababu E., Chrest F.J., Rifkind J.M. *Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: The protective roles of catalase and glutathione peroxidase*. Biochim.Biophys. Acta. 2003, 16201, 211–217.
- Net S., Rabodonirina S., Sghaie R.B. *Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (FranceeBelgium)*. Sci. Total Environ. 2015, 521e522 (1),152e159.
- Ortiz A.B., Garcia D., Vicente Y., Palka M., Bellas C., Martin P. *Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma*. PLoS One 2017, 12, e0188068.
- Paco L., Galarneau A., Drone J., Fajula F., Bailly C., Pulvin S., Thomas D. *Catalase-like activity of bovine Met-hemoglobin: Interaction with the pseudo-catalytic peroxidation of anthracene traces in aqueous medium*. Biotechnol. J. 2009, 4, 1460–1470.
- Page B.D., Lacroix G.M. *Studies into the transfer and migration of phthalate esters from aluminum esters from aluminum foil-paper laminates to butter and margarine*. Food Addit. Contam. 1992;9, 197e212.
- Park Y., Best C., Badizadegan K., Dasari K., Feld M., Kuriabova T., Alex D., Popescua G. *Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes*. Appl. Biol. Sci. Proc Natl Acad Sci. 2010, 107 (15), 6731e6736.
- Perng W. et al. *Exposure to phthalates is associated with lipid profile in peripubertal Mexican youth*. Environ. Res.2017, 154, 311–317.
- Pie X.Q., Song M., Guo M., Mo F.F., Shen X.Y. *Concentration and risk assessment of phthalates present in indoor air from newly decorated apartments*. Atmos. Environ. 2013. 68, 17e23.
- Pogribny I.P., Tryndyak V.P., Boureiko A., Melnyk S., Bagnyukova T.V., Montgomery B., Rusyn I. *Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver*. Mutat. Res. 2008, 26, 17–23.
- Pogribny I.P., Tryndyak V.P., Woods C.G., Witt S.E., Rusyn I. *Epigenetic effects of the continuous exposure to peroxisome proliferator WY-14,643 in mouse liver are dependent upon peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. Mutat. Res. 2007, 625,62–71.
- Polanska K., Ligocka D., Sobala W., Hanke W. *Effect of environmental phthalate exposure on pregnancy duration and birth outcomes*. Int. J. Occup. Med. Environ. Health 2016, 29(4), 683 697.
- Prasanth G.K., Divya L.M., Sadasivan C. *Effects of mono and di(n-butyl) phthalate on superoxide dismutase*. Toxicology. 2009, 28, 38–42.
- Ratomski K., Skotnicka B., Kasprzycka E., Żelazowska-Rutkowska B., Wysocka J., Anisimowicz S. *Evaluation of percentage of the CD19+ CD5+ lymphocytes in hypertrophied adenoids at with otitis media with effusion*. Otolaryngologia Polska. 2007;61, 962–966.
- Scoumanne A., Chen X. *Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation*. Histol. Histopathol. 2008. 23, 1143–1149.
- Serrno, S., Braun, J., Trasande, L., Dills, T., Sathuanarayana, S. *Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data*. Environ. Health. 2014, 13 (43), 1–14.
- Sharapova T., Talaty N., Buck W.R., Fossey S., Liguori M.J., Van Vleet T.R. *Reduced hepatic global hydroxymethylation in mice treated with non-genotoxic carcinogens is transiently reversible with a methyl supplemented diet*. Toxicol. Appl. Pharmacol, 2021. 15 (415), 115439.
- Shu H., Jönsson B.A., Larsson M., Nånberg E., Bornehag C.G. *PVC flooring at home and development of asthma among young children in Sweden, a 10-year follow-up*. Indoor Air 2014, 24 (3), 227–235 Jun.
- Silva M. J. et al. *Detection of phthalate metabolites in human saliva*. Arch Toxicol 2005;79, 647–652.
- Skinner M. K. *What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2*. 2008, Reprod. Toxicol. 25, 2–6.
- Ścibor D., Czacot H. *Catalase: Structure, properties, functions*. Postepy Hig. Med. Dosw. 2006, 60, 170–180.
- Tan S., Wang D., Chi Z., Li W., Shan Y. *Study on the interaction between typical phthalic acid esters (PAEs) and human haemoglobin (hHb) by molecular docking*. Environ Toxicol Pharmacol. 2017, 53, 206–211.
- Tranfo G., Paci E., Pignini D., Bonanni C., Capanna S., Carolis C., Iavicoli S. *Phthalate Metabolites in Amniotic Fluid and Maternal Urine Samples*. J. Environ. Prot. Ecol. 2014, 5, 1411–1418.
- Trasande L., Sathyanarayana S., Messito M.J., Gross R.S., Attina T.M., Mendelsohn A.L. *Phthalates and the diets of US children and adolescents*. Environ Res 2013. 126, 84e90.

- Vafa O., Wade M., Kern S., Beeche M., Pandita T.K., Hampton G.H., Wahl G.M. *c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability*. Mol. Cell. 2002, 9, 1031–1044.
- Wan H., Leung P., Zhao G., Wei X., Wong M.H., Chris K., Wong C. *Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations*. J. Hazard. Mater. 2013, 261, 763–769.
- Wang Z., Wang F., Tang T., Guo C. *The role of PARP1 in the DNA damage response and its application in tumor therapy*. Front. Cardiovas. 2012. Med. 6, 156–164.
- Xiaowei L., Jianghong S., Ting B., Huiyuana L., Crittenden J.C. *Occurrence and risk assessment of selected phthalates in drinking water from waterworks in China* Environmental Science and Pollution Research. Environ. Sci. Pollut. Control Ser. 2015, 41 (13), 4555e4560.
- Yan B., Guo J., Liu X., Li J., Yang Ma. P., Wu Y. *Oxidative stress mediates dibutyl phthalate-induced anxiety like behavior in Kunming mice*. Environ Toxicol. Pharmacol. 2016, 45, 45–51.
- Yu M., Li S.M., Li X.Y., Zhang B.J., Wang J.J. *Acute effects of 1-octyl- 3 methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system of mouse liver*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2008, 71, 903–908.
- Yujing H., Junnan L., Jose M G., Hui L., Yanzhou W., Ping Y., Lingqiao W., Yao T., Jiaohua L., Zhiqun Q., Ji-an Ch., Weiqun S. *Phthalate levels in cord blood are associated with preterm delivery and fetal growth parameters in Chinese women*. PLoS ONE 2014, 9(2), e87430.
- Zhao R.I et al. *The risk of missed abortion associated with the levels of tobacco, heavy metals and phthalate in air of pregnant woman: a case control study in Chinese women*. Medicine (Baltim.) 2017, 96(51), e9388.
- https://joint-research-centre.ec.europa.eu/scientific-activities-z/alternatives-animal-testing-and-safety-assessment-chemicals_en.
- <https://echa.europa.eu/-/chemicals-in-our-life-chemicals-of-concern-svhc>

Paulina Sicińska
.....
(podpis wnioskodawcy)