

*Załącznik nr 2*



Emilia Grosicka-Maciąg

**Autoreferat**

Katedra i Zakład Biochemii  
I Wydział Lekarski  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Warszawa 2019**

### **1. Imię i nazwisko**

Emilia Grosicka-Maciąg

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

**2001 r.** – dyplom magistra biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Biologii Molekularnej, tytuł pracy magisterskiej: „ Ekspresja białka rybosomalnego P0 w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*.”

Promotor: prof. dr hab. Nikodem Grankowski

**2010 r.** – stopień doktora nauk medycznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, tytuł rozprawy doktorskiej: „Ditiokarbaminy jako induktory stresu oksydacyjnego w komórce”.

Promotor: dr hab. Iwona Rahden-Staroń

Recenzenci: prof. dr hab. Barbara Tudek;  
prof. dr hab. Józef Sawicki

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

**od X. 2011** – adiunkt, Katedra i Zakład Biochemii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

**XI. 2001 – IX. 2011** – asystent, Katedra i Zakład Biochemii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)**

a) tytuł osiągnięcia naukowego

**DZIAŁANIE N-ACETYLO-L-CYSTEINY ORAZ SELENU (IV) W KOMÓRKACH NARAŻONYCH NA STRES OKSYDACYJNY LUB STAN ZAPALNY**

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

**H1. \*Grosicka-Maciąg E.:** Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 357-366 (*praca przeglądowa*)

**IF = 0,654; Punkty MNiSW = 15**

**H2. Grosicka-Maciąg E.,** Kurpios-Piec D., Szumiło M., Grzela T., Rahden-Staroń I.: Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against maneb induced oxidative and apoptotic injury in Chinese hamster V79 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 2011; 49(4): 1020-1025

**IF= 2,999; Punkty MNiSW = 35**

**H3. Grosicka-Maciąg E.,** Kurpios-Piec D., Szumiło M., Grzela T., Rahden-Staroń I.: Dithiocarbamate fungicide zineb induces oxidative stress and apoptosis in Chinese hamster lung fibroblasts. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2012; 102: 95-101

**IF = 2,111; Punkty MNiSW = 25**

**H4. Rahden-Staroń I., Grosicka-Maciąg E.,** Kurpios-Piec D., Czczot H., Grzela T., Szumiło M.: The effects of sodium diethyldithiocarbamate in fibroblasts V79 cells in relation to cytotoxicity, antioxidative enzymes, glutathione, and apoptosis. *Arch. Toxicol.*, 2012; 86(12): 1841-50

**IF = 5,215; Punkty MNiSW= 30**

**H5. \*Grosicka-Maciąg E.,** Szumiło M., Czczot H., Kurpios-Piec D., Skrzycki M., Rahden-Staroń I.: Modulation of antioxidant defense system by the dithiocarbamate fungicides Maneb

and Zineb in Chinese hamster V79 cells and the role of N-acetyl-L-cysteine. *Food Chem. Toxicol.*, 2013; 60: 130-4

**IF = 2,610; Punkty MNiSW = 35**

**H6. \*Grosicka-Maciąg E.**, Kurpios-Piec D., Woźniak K., Kowalewski C., Szumiło M., Drela N., Kiernożek E., Suchocki P., Rahden-Staroń I.: Selol (Se+4) modulates adhesive molecules in control and TNF- $\alpha$ -stimulated HMEC-1 cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2019; 51: 106-114

**IF = 3,755; Punkty MNiSW = 20**

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) artykułów naukowych (**H1-H6**) wchodzących w skład cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi **17,344** i odpowiada **160** punktom MNiSW.

\* – prace, w których byłam autorem korespondencyjnym

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

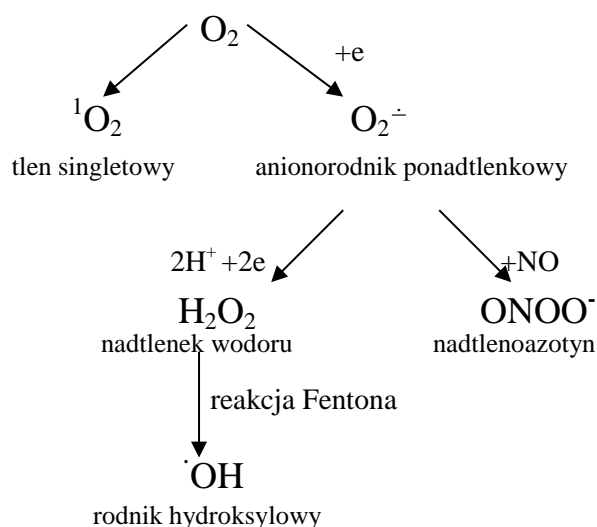
Wprowadzenie i cel naukowy prowadzonych badań

### **Stres oksydacyjny**

Stres oksydacyjny definiuje się jako zaburzenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT) a ich neutralizacją przez systemy antyoksydacyjne komórek. Długotrwały lub nasilony stres oksydacyjny może prowadzić do powstawania trwałych zmian w strukturze DNA, lipidów i białek. Zmiany te prowadzą do zaburzeń ich funkcji co z kolei może być przyczyną nieprawidłowości w metabolizmie komórkowym. Istnieje coraz więcej dowodów wskazujących na to, że stres oksydacyjny może współodpowiadać za powstawanie wielu chorób, np. chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera i choroba Parkinsona), chorób nowotworowych, miażdżycy, cukrzycy, astmy czy katarakty jak również jest odpowiedzialny za procesy starzenia się komórek [1].

W prawidłowych i sprawnie funkcjonujących komórkach panuje równowaga pomiędzy RFT a ich usuwaniem przez komórkowe systemy antyoksydacyjne.

**Anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ )** to najważniejszy przedstawiciel RFT. Jest on prekursorem innych RFT (Schemat 1), powstaje w wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu w reakcji łańcucha oddechowego jak również w wyniku reakcji nieenzymatycznej, w której pojedynczy elektron przenoszony jest bezpośrednio na atom tlenu. Zbyt wysokie stężenie anionorodnika ponadtlenkowego może prowadzić do uwolnienia atomów żelaza z białek i utlenienia kwasów tłuszczowych oraz steroidów, a także powodować uszkodzenia oksydacyjne składników kwasów nukleinowych [2].



**Schemat 1: Mechanizm powstawania wolnych rodników tlenowych w komórce.**

**Nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ )** jest znacznie trwalszy niż anionorodnik ponadtlenkowy i ma zdolność dyfuzji przez błony komórkowe. Wzrost jego stężenia w komórkach aktywuje czynniki transkrypcyjne, takie jak NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa B*) czy HIF-1 (ang. *hypoxia-inducible factor 1*), a także może powodować zwiększoną proliferację komórek i angiogenezę, wzrost oporności na apoptozę oraz zwiększać inwazyjność nowotworów [2,3].

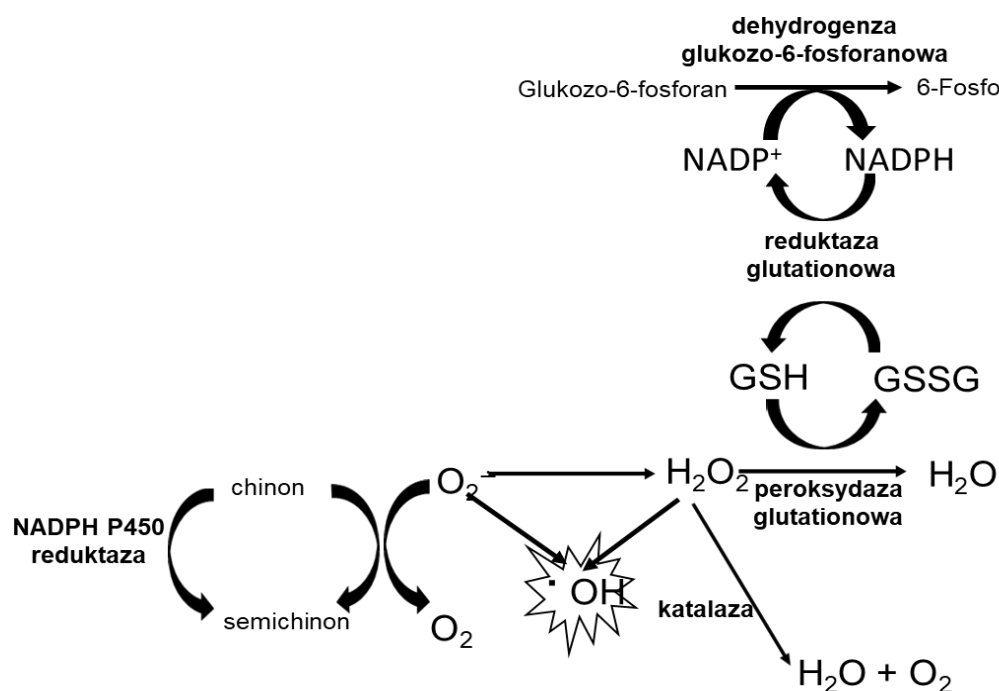
Nadtlenek wodoru może być zredukowany w obecności jonów żelaza (II) lub innych metali (miedź, kobalt, nikiel) do **rodnika hydroksylowego ( $\cdot OH$ )** najbardziej reaktywnego oksydanta. Jest on odpowiedzialny za peroksydację lipidów poprzez tworzenie rodników peroksydacyjnych.

**Nadtlenoazotyn ( $ONOO^{\cdot-}$ )** reaguje przede wszystkim z lipidami i białkami [2,4]. Odpowiada m.in. za utlenienie kwasów tłuszczowych oraz nitrozylację grup tiolowych w glutatione

(GSH) i reszt tyrozyny w centrach aktywnych wielu enzymów a ponadto indukuje uszkodzenia DNA [2,5].

### Enzymatyczna obrona antyoksydacyjna

Najważniejsze układy enzymatyczne uczestniczące w obronie antyoksydacyjnej to: **dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)**, **katalaza (CAT)** oraz **peroksydaza glutationowa (GPx)**, **reduktaza glutationowa (GR)** i **transferaza glutationowa (GST)**, dla których **glutation** jest ko-substratem (Schemat 2).



Schemat 2: Schemat działania enzymów antyoksydacyjnych [6].

**Dysmutazy ponadtlenkowe (SOD)** uważane są za enzymy stanowiące pierwszą linię obrony w walce z RFT. Jest to grupa enzymów katalizujących reakcje dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot -}$ ) do  $O_2$  i mniej reaktywnego  $H_2O_2$  (Schemat 2). Ponadto enzymy te utrzymują stężenie nadtlenu wodoru na poziomie odpowiednim do pełnienia przez ten związek funkcji cząsteczki sygnałowej. W komórkach występują 3 izoenzymy SOD: mitochondrialny (MnSOD; SOD2), enzym cytozolowy (CuZnSOD; SOD1) oraz enzym zewnątrzkomórkowy (ang. *extracellular superoxide dismutase*) (EC-SOD; SOD3)

Dysmutazy ściśle współpracują z enzymami usuwającymi z komórki nadtlenek wodoru, takimi jak **katalaza (CAT)** i **selenozależna peroksydaza glutationowa (SeGPx)**. Oba te

enzymy różnią się powinowactwem do  $H_2O_2$ . Enzymem o wyższym powinowactwie jest Se-GPx, która w związku z tym jest aktywniejsza przy niższych stężeniach nadtlenu wodoru, podczas gdy CAT przy jego wyższych stężeniach. Obok Se-GPx w komórkach występuje również **selenoniezależna GPx (non-Se-GPx)**, która redukuje nadtlenuki lipidowe.

**GPx** współdziała z **reduktazą glutationową (GR)**, która dostarcza niezbędny do aktywności GPx zredukowany glutation.

### **Glutation i jego funkcja antyoksydacyjna w komórce**

W obronie komórki przed RFT bardzo ważną rolę pełnią antyoksydanty drobnocząsteczkowe. Związki te działają jako druga linia obrony, usuwając RFT, które „umknęły” katalazie lub dysmutazie ponadtlenkowej. Wśród antyoksydantów drobnocząsteczkowych najważniejszą rolę pełni zredukowany **glutation (GSH)**, redukuje nadtlenek wodoru i nadtlenuki organiczne w reakcji katalizowanej przez **GPx**. Powstający utleniony glutation (GSSG) jest ponownie zredukowany przez **GR** w obecności NADPH. W komórkach bardzo ważny jest stosunek stężeń [R] formy zredukowanej do utlenionej glutationu [GSH]/[GSSG]. Wartość stosunku stężeń stanowi miarę stanu oksydoredukcyjnego komórki. W warunkach fizjologicznych w komórkach wątroby [R] wynosi 300-400, podczas głodu około 150, a pod wpływem silnego stresu oksydacyjnego może nawet obniżyć do 2 [7,8]. Inną ważną funkcją glutationu jest tworzenie S-koniugatów (tioeterów GSH) z endo- i egzogennymi związkami elektrofilowymi w procesie S – glutationylacji. Prowadzi to do ich inaktywacji i obniżenia toksyczności. Reakcje te są katalizowane przez transferazę glutationową.

### **Pestycydy a stres oksydacyjny**

**Stres oksydacyjny** jest indukowany przez wiele czynników fizycznych i chemicznych, w tym również przez pestycydy, które są powszechnie stosowane nie tylko w rolnictwie, ale również w różnych gałęziach przemysłu. Termin "pestycydy" to ogólna nazwa, która obejmuje liczne związki chemiczne. Ze względu na budowę chemiczną można je podzielić na pestycydy nieorganiczne (insektydy arsenowe i insektydy fluorkowe) oraz pestycydy organiczne (fosforoorganiczne, chloroorganiczne, karbaminiany, pochodne kwasu fenoksyoctowego oraz pochodne triazynowe).

W związku z coraz szybszym rozwojem rolnictwa i zwiększonym zapotrzebowaniem na żywność na świecie, w rolnictwie wprowadza się coraz więcej nowych, bardziej skutecznych

środków ochrony roślin (pestycydów). W 2018 roku w Unii Europejskiej zarejestrowano około 500 aktywnych substancji (pestycydów) z różnych grup chemicznych zgodnie z rozporządzeniem Komisji Europejskiej No 1107/2009 [8]. Tylko niewielka część stosowanych w UE pestycydów jest objęta programem monitorowania. Z badań wynika, że prawie 50% owoców, warzyw i zbóż dostępnych na rynku jest zanieczyszczona pozostałościami pestycydów, a ponad 25% monitorowanej żywności zawiera pozostałości przynajmniej dwóch pestycydów. Ponadto żywność przetworzona, w tym również przeznaczona dla niemowląt, jest zanieczyszczona pozostałościami pestycydów. Badania przeprowadzone w USA, jak i w nielicznych państwach europejskich, wykazują obecność pozostałości pestycydów we krwi, w moczu i włosach u osób nienarażonych zawodowo [10-12]. Wiele laboratoriów prowadzi badania, które mogą pozwolić wyjaśnić mechanizmy toksycznego działania pestycydów na organizmy ludzkie i zwierzęce. Dane naukowe wskazują, że toksyczność pestycydów może być związana m.in. z nagromadzeniem się RFT w komórce i związanym z tym stresem oksydacyjnym [13-15].

W swoich badaniach zajęłam się pestycydami z grupy ditiokarbaminianów. Mój wybór podyktowany był tym iż związki te są stosowane nie tylko jako środki ochrony roślin, głównie jako fungicydy, ale znalazły również zastosowanie w medycynie, kosmetologii oraz przemyśle gumowym. Konsekwencją tego jest stałe narażenie populacji na obecność tych związków lub/i ich pozostałości w wyniku wchłaniania przez układ pokarmowy, skórę czy układ oddechowy.

**Charakterystyka ditiokarbaminianów** (metyloditiokarbaminy, dimetyloditiokarbaminy, dietylditiokarbaminy (DEDC) oraz etylenobisditiokarbaminiany (EBDC).

- należą do związków z grupy karbaminianów zawierających siarkę i nie są inhibitorami acetylocholinoesterazy
- zaliczane są do związków z IV klasy toksyczności, tzn. są substancjami szkodliwymi, ich LD<sub>50</sub> (dawka związku w mg/kg masy ciała potrzebna do spowodowania śmierci 50% badanej populacji po jej wchłonięciu) mieści się w zakresie 501-5000 mg/kg masy ciała [16]
- charakteryzują się niską toksycznością dla ludzi i zwierząt. Przewlekłe narażenie na działanie ditiokarbaminianów może powodować m.in. działanie neurotoksyczne.

Pomimo wielu badań *in vitro* i *in vivo* dotyczących toksyczności oraz mutagennych i genotoksycznych właściwości ditiokarbaminianów mechanizm ich cytotoksycznego działania



nie został w pełni poznany. Warto podkreślić, że są to związki o wysokiej aktywności biologicznej, silnie wiążące metale i mogące oddziaływać z białkowymi i niebiałkowymi grupami -SH.

Po obronie pracy doktorskiej, której tematem było poznanie mechanizmów działania dwóch powszechnie stosowanych ditiokarbaminianów: tiuramu i disulfiramu, kontynuowałam badania nad wyjaśnieniem cytotoksycznego działania innych pestycydów z tej grupy. Do badań wybrałam dwa związki należące do etyleno-bis-ditiokarbaminianów: maneb i zineb oraz dietyloditiokarbaminian (DEDC), który oprócz zastosowania jako pestycyd jest również głównym metabolitem disulfiramu (lek Antabus). W swoich badaniach skupiłam się również nad sposobami zapobiegania biologicznym skutkom stresu oksydacyjnego, którym jest m.in. stan zapalny. Postawiłam pytanie, czy zastosowanie związków o charakterze antyoksydacyjnym zniweluje lub osłabi efekty cytotoksycznego działania badanych pestycydów, a także wpłynie na parametry stanu zapalnego.

**Celem naukowym przedstawionego cyklu prac było określenie:**

- potencjału manebu, zinebu i dietyloditiokarbaminianu sodu do wywołania stresu oksydacyjnego w układzie *in vitro*
- roli enzymów antyoksydacyjnych, wpływu stężenia endogennego glutationu oraz rola N-acetylo-L-cysteiny (NAC) - antyoksydanta i prekursora syntezy endogennego glutationu, w mechanizmie cytotoksycznego działania badanych ditiokarbaminianów
- działania Se (IV) obecnego w preparacie Selol na parametry stanu zapalnego wywołanego stresem oksydacyjnym.

Cykl otwiera praca przeglądowa [H1] ”Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów”, opublikowana w Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej. Omówione w tej pracy piśmiennictwo stanowi uzupełnienie wstępu do omawianego osiągnięcia naukowego.

We wstępie pracy obok ogólnych danych na temat klasyfikacji i właściwości pestycydów zwróciłam uwagę na istotne problemy związane z biologicznymi konsekwencjami narażenia ludzi na pestycydy i ich pozostałości. W tym celu przedstawiłam aktualne wówczas dane statystyczne mówiąc o ilości stosowanych pestycydów w krajach Unii Europejskiej oraz przedstawiłam wyniki badań monitorujących zanieczyszczenia żywności dostępnej na polskim rynku pozostałościami pestycydów. Z dostępnych wówczas danych wynikało że z

roku na rok ilość sprzedawanych w Unii Europejskiej różnych rodzajów pestycydów rośnie. Niestety tendencja ta w wielu krajach Unii Europejskiej, w tym również w Polsce, utrzymuje się na niezmiennym poziomie. Z najnowszych badań statystycznych przeprowadzonych w Unii Europejskiej w latach 2011-2016 dotyczących ilości sprzedanych pestycydów wynika, że w Polsce w tym okresie liczba sprzedanych pestycydów wzrosła o 12,3% [17]. Wzrost ten jest związany z dynamicznym rozwojem rolnictwa i ze zwiększonym zapotrzebowaniem na skuteczniejsze środki ochrony roślin. Wydaje się więc, że tematyka poruszona w tej pracy poglądowej pozostaje nadal aktualna.

W dalszej części pracy przedstawiłam aktualne dane na temat najważniejszych markerów stresu oksydacyjnego.

Znakiem mówiącym o poziomie oksydacyjnych uszkodzeń białek jest stężenie **białkowych grup karbonylowych (PC)** obecnych w pochodnych aminokwasów o charakterze aldehydów lub ketonów. Pochodne te powstają na skutek utlenienia reszt aminokwasowych z wolną grupą aminową, amidową lub hydroksylową oraz reszt tryptofanu, proliny i histydyny. Ponadto grupy karbonylowe powstają również w wyniku przerywania łańcucha polipeptydowego podczas tworzenia rodnika alkoksylowego. Powstałe grupy karbonylowe są stosunkowo stabilne chemicznie i możliwe jest ich jakościowe i ilościowe oznaczenie. Pozwala to na ocenę uszkodzeń struktury białek. Wzrost poziomu grup karbonylowych zaobserwowano w komórkach ekspozowanych na pestycydy z grupy ditikarbaminianów [18,19]. Cząsteczki białek uszkodzone w wyniku utlenienia mają tendencje do gromadzenia się w tkankach i odgrywają rolę w patogenezie wielu chorób oraz w procesie starzenia.

Wśród lipidów najbardziej podatne na peroksydację są wielonienasycone kwasy tłuszczowe wchodzące w skład fosfolipidów (głównie fosfatydyloetanolaminy i fosfatydylocholiny) będących podstawowym składnikiem błon biologicznych. Proces peroksydacji ma charakter lawinowy oraz wolnorodnikowy, i prowadzi do powstania nadtlenuków lipidowych. Najważniejszymi produktami końcowymi powyższych reakcji i jednocześnie markerami peroksydacji lipidów są m.in. **dialdehyd malonowy (MDA)** i **trans-4-hydroksynonenal (4HNE)**, które mogą uszkadzać cząsteczki kwasów nukleinowych i białek. 4HNE jest najbardziej toksycznym i aktywnym produktem, może tworzyć kowalencyjne addukty z nukleofilowymi grupami w białkach, kwasach nukleinowych oraz lipidach błonowych

wpływając w ten sposób na wiele komórkowych szlaków sygnałowych. MDA natomiast jest mutageny dla komórek bakteryjnych i komórek ssaków, a ponadto kancerogeny dla szczurów. Oba związki mają dłuższy czas półtrwania niż RFT oraz zdolność do dyfuzji do odległych obszarów komórki. Parametrem do oceny stopnia peroksydacji lipidów jest poziom TBARS (*ang. thiobarbituric reactive substances*). Poziom TBARS odzwierciedla stężenie głównie MDA oraz w mniejszym stopniu stężenie innych produktów peroksydacji lipidów. Wykazano, że za proces peroksydacji lipidów mogą być odpowiedzialne m.in. pestycydy z grupy ditiokarbaminianów [18,19].

Za oksydacyjne uszkodzenia DNA odpowiedzialny jest przede wszystkim rodnik hydroksylowy (OH). Reakcje rodnika hydroksylowego z kwasami nukleinowymi prowadzić mogą do uszkodzenia zasad azotowych, reszt cukrowych, powstania pęknięć nici kwasów nukleinowych, a także do powstania wiązań poprzecznych DNA-białko. Produktem reakcji rodnika hydroksylowego np. z guaniną jest **8-hydroksyguanina**, która jest najbardziej mutagenym uszkodzeniem DNA. Wynikiem powyższej zmiany jest indukcja mutacji typu transwersji G-C→T-A.

Ostatnim tematem który poruszyłam w pracy przeglądowej było zagadnienia dotyczące wpływu pestycydów i indukowanego przez nich stresu oksydacyjnego na rozwój wybranych chorób cywilizacyjnych. Skupiłam się na dwóch schorzeniach neurodegeneracyjnych: chorobie Parkinsona i chorobie Alzheimera zaliczanych do chorób cywilizacyjnych. Objawy charakterystyczne dla choroby Parkinsona zaobserwowano u ludzi stale narażonych na działanie m.in. pestycydów z grupy ditiokarbaminianów. Jednocześnie podałam dane naukowe, które podkreślają rolę stresu oksydacyjnego w patogenezie tej choroby. Neurony dopaminergiczne są w szczególności narażone na stres oksydacyjny, ponieważ zachodzi w nich synteza i rozkład dopaminy. W trakcie tych procesów powstają duże ilości RFT. W badaniach *post mortem* mózgow osób chorych na Parkinsona stwierdzono podwyższony poziom białkowych grup karbonylowych (PC) oraz wzrost produktów peroksydacji lipidów i utleniania nukleotydów [20,21].

Zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej są również jedną z przyczyn choroby Alzheimera. Choroba ta występuje przede wszystkim u osób powyżej 70 r.ż. Za rozwój choroby odpowiedzialne są współdziałania wielu różnych czynników, m.in. genetycznych, bodźców neurotoksycznych, RFT, odczynów zapalnych lub obecność glinu. Za podstawowy czynnik uważa się nadmierną akumulację i agregację białka β-amyloidowego.

W dalszej części pracy omówiłam związek stresu oksydacyjnego z rozwojem chorób nowotworowych. Trwałe zmiany w genomie komórek, powstałe na skutek stresu oksydacyjnego, to pierwszy etap charakterystyczny dla procesu mutagenyzy, kancerogenezy i starzenia się komórek. Powstawanie mutacji w łańcuchu DNA to krytyczny etap w procesie kancerogenezy. Pestycydy, które indukują w komórce stres oksydacyjny mogą pośrednio wpływać na rozwój chorób nowotworowych. W tej części zwróciłam uwagę, że dla wielu powszechnie stosowanych pestycydów nie wykazano właściwości kancerogennych, aczkolwiek wiadomo, że niektóre z nich są odpowiedzialne za rozwój pewnych typów nowotworów. Z drugiej strony zaobserwowano, że wśród osób zawodowo narażonych na wysokie stężenie pestycydów znacznie częściej pojawiają się niektóre typy nowotworów, takie jak nowotwory krwi, płuc, żołądka, warg i prostaty a także skóry.

W ostatniej części pracy zwróciłam uwagę na problem bezpłodności. Temat ten od lat pozostaje aktualny. Badania wskazują, że w krajach rozwiniętych częstość występowania bezpłodności wzrasta, a jako przyczynę podaje się zanieczyszczenie środowiska, również przez pestycydy i ich pozostałości. W pracy przedstawiłam wyniki badań przeprowadzonych na szczurach poddanych działaniu różnych pestycydów, u których wzrasta poziom markerów stresu oksydacyjnego oraz zmienia się aktywność hormonów związanych z procesem rozmnażania. Przedstawiłam również dane wskazujące na podwyższony poziom RFT w próbkach nasienia od bezpłodnych mężczyzn. Wyniki badań naukowych wskazują, że wzrost RFT w plemnikach wpływa niekorzystnie na ich aktywność i może prowadzić do zmian chorobowych. Ponadto w badaniach przeprowadzonych wśród kobiet stale narażonych na działanie pestycydów zaobserwowano liczne zaburzenia cyklu owulacyjnego w porównaniu do kobiet nie mających kontaktu z pestycydami [22-24].

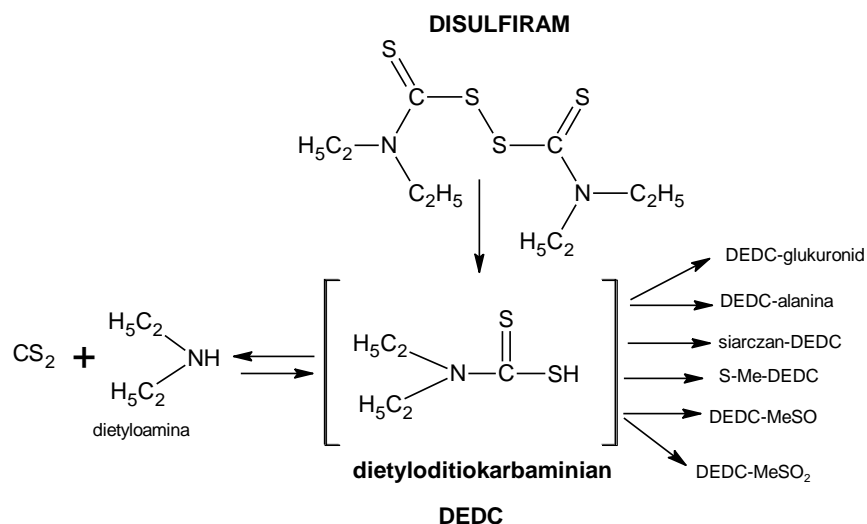
Ponieważ pestycydy są i będą stosowane należy prowadzić zakrojoną na szeroką skalę akcję informacyjną w celu uświadomienia przede wszystkim rolników o niebezpieczeństwie jakie niesie ze sobą nieprzestrzeganie zasad dotyczących okresów karencji, przechowywania, i utylizacji pestycydów.

Praca [H1] była podstawą do moich dalszych badań.

Po obronie rozprawy doktorskiej kontynuowałam badania nad mechanizmami cytotoksycznego działania związków z grupy ditiokarbaminianów tj. DEDC, manebu i zinebu oraz rolą endo- i egzogennych antyoksydantów w tych procesach. Badania prowadziłam w układzie *in vitro* w komórkach fibroblastów chomika chińskiego linii V79. Komórki

inkubowano przez 1h z wybranymi ditiokarbaminianami w stężeniach od 0 do 300  $\mu\text{M}$ . W tym zakresie stężeń przeżywalność komórek utrzymywała się na poziomie ok. 70% (test barwienia komórek błękitem trypanu).

Zajęłam się głównym metabolitem disulfiramu – dietyloditiokarbaminianem sodu (DEDC) (CAS No 148-18-5). Jedna cząsteczka disulfiramu jest metabolizowana do dwóch cząsteczek DEDC w wyniku redukcji wewnątrzcząsteczkowego mostku disiarczkowego (Schemat 3).



Schemat 3. Metabolizm disulfiramu w komórkach zwierzęcych [25].

Moje zainteresowanie DEDC wynikało nie tylko dlatego, że jest on głównym metabolitem disulfiramu (DSF) i powszechnie stosowanym w rolnictwie pestycydem, ale również z faktu, że DEDC oraz jego analogi są wykorzystywane w medycynie m.in. w chemoterapii, w terapii eksperymentalnej AIDS oraz jako leki hamujące wzrost lekoopornych bakterii *Mycobacterium tuberculosis* [26-28]. Ponadto charakterystyczna budowa chemiczna DEDC, tzn. obecność wolnych grup  $-\text{SH}$ , nadaje mu silne właściwości chelatujące, w związku z czym DEDC znalazł zastosowanie w leczeniu zatruc metalami ciężkimi i metaloidami. Jest również związkiem o wysokiej reaktywności. Planując badania opisane w pracy doświadczalnej [H4] opublikowanej w Archives of Toxicology przyjął założenie, że cytotoksyczne działanie DEDC podobnie jak jego prekursora – disulfiramu, może być związane z zaburzeniami komórkowego układu redoks. Moje wcześniejsze badania wykazały pro-oksydacyjne działanie disulfiramu. Ze względu na obecność wolnych grup  $-\text{SH}$ , DEDC mógł okazać się związkiem bardziej reaktywnym niż DSF. W związku z tym jednym z celów moich badań było porównanie czy DEDC podobnie jak DSF wpływa na tiolowy układ redoks w komórce oraz czy oba związki, które są ze sobą metabolicznie/chemicznie ściśle powiązane

wykazują podobny mechanizm działania. Kolejnym celem było sprawdzenie czy jak w przypadku DSF, cytotoksyczne działanie zostało zniesione w skutek zastosowania NAC-antyoksydanta i zarazem prekursora syntezy glutationu. W badaniach tych szukałam odpowiedzi czy podwyższony poziom endogennego glutationu będzie działał ochronnie na komórki. Doświadczenia przeprowadziłam na linii komórkowej V79. Badane stężenia DEDC mieściły się w zakresie od 0 do 300  $\mu$ M.

Doświadczenia rozpoczęłam od określenia cytotoksyczności DEDC, następnie określiłam jego wpływ na poziom wewnątrzkomórkowego glutationu, białkowych grup karbonylowych PC (utlenienie białek), TBARS (peroksydacja lipidów) oraz wpływ na najważniejsze enzymy bariery antyoksydacyjnej tj. CAT, Se-GPx i non-Se-GPx oraz GR. Ostatnim etapem mojej pracy było sprawdzenie czy śmierć komórek indukowana działaniem DEDC zachodzi na drodze apoptozy czy nekrozy. Badania wykazały, że cytotoksyczne działanie DEDC na komórki V79 zależy od wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu. Pozytywny efekt działania podwyższonego stężenia GSH zaobserwowałam w przeprowadzonych standardowych testach na przeżywalność komórek (test MTT i test barwienia błękitem trypanu). Wyniki obu testów wykazały, że preinkubacja komórek z NAC niwelowała cytotoksyczny wpływ DEDC na przeżywalność komórek V79. Posłużyłam się również kluczowym parametrem stosunku GSH/GSSG [R] którego wartość mówi o stanie oksydoredukcyjnym komórek. W zakresie badanych stężeń DEDC znacząco obniżał wartość R, jednocześnie zaobserwowałam, że spadkowi towarzyszył istotny wzrost stężenia GSH. Z drugiej strony w komórkach wykazałam podwyższony poziom GSSG. Obniżona wartość parametru R wskazywała na zaburzenie stanu redoks w komórkach V79 i stres oksydacyjny. W warunkach tych dochodzi do peroksydacji białek i lipidów. Uzyskane wyniki potwierdziły, że DEDC indukuje w komórce wzrost stężenia PC oraz TBARS. W komórkach poddanych działaniu NAC oba powyższe parametry wracały do poziomu obserwowanego w komórkach kontrolnych. **Uzyskane na tym etapie badań wyniki wskazywały, że DEDC wykazywał pro-oksydacyjne działanie, któremu można zapobiec zwiększając poziom endogennego glutationu.**

Jak już wspomniałam, istotną rolę w obronie komórki przed stresem oksydacyjnym pełnią enzymy antyoksydacyjne. Wykazałam, że DEDC znacząco podwyższa aktywność GR, a obserwowany wzrost aktywności tego enzymu korelował z podwyższonym stężeniem GSH w komórkach V79. Jednocześnie stwierdziłam spadek aktywności obu peroksydaz

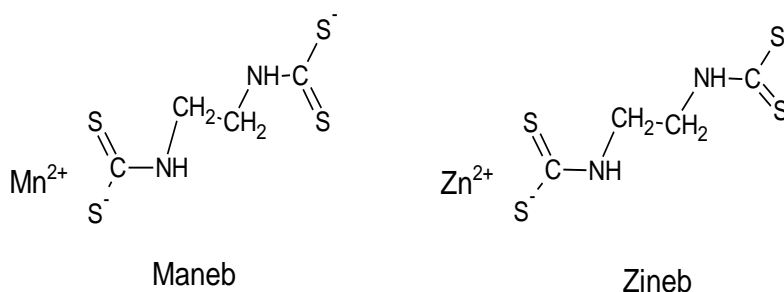
glutationowych (Se-GPx i non-Se-GPx), kluczowych enzymów usuwających RFT i nadtlenu lipidowe. Z drugiej strony w badanych komórkach pod wpływem DEDC wzrosła aktywność CAT. Równocześnie interesującym jest, że w komórkach preinkubowanych z NAC aktywność GR również była wysoka, natomiast aktywność obu GPx pozostała obniżona. Jednocześnie aktywność CAT wróciła do poziomu kontroli. **Uzyskane wyniki wykazały że w obronie komórki przed cytotoksycznym działaniem DEDC pierwszoplanową rolę odgrywają dwa enzymy: CAT oraz GR. Wzrost aktywności obu enzymów jest najprawdopodobniej adaptacją komórek do warunków stresu oksydacyjnego a cytotoksyczne działanie DEDC może wynikać z nagromadzenia się w komórkach  $H_2O_2$ .**

Z piśmiennictwa wynika, że stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w procesie apoptozy. Obniżony poziom GSH a także wzrost stężenia RFT, głównie  $H_2O_2$ , to jedne z kluczowych czynników wprowadzających komórkę na szlak apoptozy. W pracy [H4] przedstawiłam wyniki dwóch niezależnych testów wykrywających apoptozę w komórkach. Pierwszy z nich wykrywa charakterystyczną dla apoptozy fragmentację DNA (test TUNEL), natomiast drugi ujawnia wczesne zmiany, które zachodzą w błonie cytoplazmatycznej komórek (test z Aneksyną V). Wyniki uzyskane dla DEDC nie były jednoznaczne. W teście TUNEL nie stwierdzono komórek ze zmianami charakterystycznymi dla apoptozy, natomiast wyniki testu z Aneksyną V wykazały, że DEDC indukuje apoptozę w większości (90%) zbadanych komórek. Pozostałe komórki wykazywały zmiany charakterystyczne dla procesu nekrozy/późnej apoptozy. W tym przypadku również potwierdziła się teza wskazująca na ochronne działanie NAC. W wyniku jego działania liczba komórek które uległy apoptozie znacząco spadła. **Powyższe wyniki wskazywały i jednocześnie potwierdziły tezę, że stres oksydacyjny wywołany działaniem DEDC prowadził do śmierci komórek na drodze apoptozy, bądź nekrozy, a zastosowanie czynnika o działaniu antyoksydacyjnym temu zapobiega.**

Uzyskane w pracy [H4] wyniki są uzupełnieniem badań dotyczących wyjaśnienia mechanizmów działania DEDC, również w kontekście jego terapeutycznego wykorzystania. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że jest to związek, który może mieć pro-oksydacyjne działanie, ale może również wykazywać działanie antyoksydacyjne. Ze względu na „podwójne oblicze” DEDC niezbędne wydaje się przeprowadzenie dodatkowych badań zarówno w układzie *in vitro* jak i *in vivo*.

Wyniki moich badań opublikowanych w pracy [H4] pozwoliły na porównanie mechanizmu działania dwóch ściśle powiązanych ze sobą związków, które poza rolnictwem są również stosowane w medycynie. Wykazałam, że DEDC działa podobnie do DSF (disulfiram) na komórkowy układ redoks. Uważam, że istotnym wnioskiem wynikającym z tych badań jest fakt, że cytotoksyczność badanych związków zależy od stężenia glutationu lub innego tiolowego buforu. Należy również podkreślić że DSF, który pod względem chemicznym jest disiarczkiem DEDC, wydaje się być związkiem bezpieczniejszym.

W kolejnych badaniach zajęłam się inną grupą związków należących do ditiokarbaminianów, tj. etyleno-bis-ditiokarbaminianami (EBDC). Do grupy tej zaliczamy maneb, zineb, mankozeb, nabam i metriam. EBDC są to głównie fungicydy o szerokim zastosowaniu przede wszystkim w uprawie ziemniaków i pomidorów, ale także innych warzyw, owoców oraz upraw polowych. Ponadto, stosowane są do ochrony nasion przed chorobami grzybowymi. Wszystkie etyleno-bis-ditiokarbaminiany należą do związków o stosunkowo niskiej toksyczności i są uważane za bezpieczne. Ich toksyczne działanie ujawnia się dopiero przy długotrwałym działaniu. Do swoich badań wybrałam dwa powszechnie stosowane fungicydy: maneb i zineb



Schemat 4. Wzór strukturalny manebu (CAS No 12427-38-2) i zinebu (CAS No 12122-67-7)

Maneb (Mn – etyleno-bis-ditiokarbaminian; Mn-EBDC) (CAS No 12427-38-2) wykazuje stosunkowo niską toksyczność: LD<sub>50</sub> (doustnie) dla myszy wynosi 2600mg/kg m.c., a dla szczurów: 3000 do 7990 mg/kg m.c.[29]. Przy długotrwałym narażeniu, maneb ma szkodliwy wpływ na układ nerwowy i może być przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Zineb (Zn- etyleno-bis-ditiokarbaminian; Zn-EBDC) również nie jest związkiem o wysokiej toksyczności LD<sub>50</sub> (doustnie) dla szczurów wynosi 1850 do 8900 mg/kg m.c., dla myszy



7600 do 8200-8900 mg/kg m.c., a dla królików 4450 mg/kg m.c. [29]. Zineb podobnie jak maneb wykazuje działanie neurotoksyczne przy długotrwałym narażeniu.

Działanie toksyczne manebu, według dostępnego piśmiennictwa jest związane z jego szkodliwym wpływem na mitochondria oraz system dopaminergiczny co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia układu motorycznego (ruchowo - mięśniowego), a ostatecznie może być przyczyną rozwoju choroby Parkinsona [30]. Wykazano również, że maneb jest inhibitorem i/lub związkami rozprzegającym łańcuch oddechowy. Pomimo, że jest związkiem chemicznie trwałym, w komórkach jest metabolizowany do Mn i etyleno-bis-ditiokarbaminianu, które mają działanie neurotoksyczne [31].

Podobnie jak w przypadku manebu, toksyczne działanie zinebu jest związane z tym, że w komórkach jest on metabolizowany do potencjalnie neurotoksycznych Zn i EBDC. Cynk jest pierwiastkiem, który reaguje z beta-amyloidem oraz jego białkowym prekursorem, a więc może być odpowiedzialny za procesy neurodegeneracyjne zachodzące w mózgu np. w czasie choroby Alzheimerera [32,33]. Ponadto, uważa się że EBDC może być odpowiedzialny za rozwój choroby Parkinsona [34].

Układ nerwowy oraz choroby neurodegeneracyjne są tematem wielu badań. Mechanizm rozwoju tych chorób jest w licznych przypadkach niewyjaśniony. Może to wynikać z faktu, że nie jest jasne czy przyczyny mają podłoże genetyczne czy raczej środowiskowe, a być może za rozwój choroby odpowiadają oba te czynniki. Wiadome jest, że jednym z takich czynników jest stres oksydacyjny [35,36]. EBDC są związkami, które wiążą jony metali, np. obecne w enzymach. W ten sposób mogą wpływać na aktywność enzymów antyoksydacyjnych prowadząc do zmiany statusu antyoksydacyjnego komórek. Istnieją dane pokazujące, że akumulacja RFT w komórce i nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów towarzyszą rozwojowi chorób układu nerwowego: choroby Alzheimerera, Parkinsona, Huningtona oraz stwardnienia rozsianego bocznego (SLA). W badaniach przeprowadzonych *post mortem* wykazano że chorobom tym towarzyszy zaburzenie układu homeostazy glutationu [37,38].

W moich badaniach podjęłam próbę wyjaśnienia w jaki sposób maneb i zineb wpływają na układ osydoredukcyjny komórek, i czy jak w przypadku wcześniej badanych związków NAC będzie wykazywał działanie ochronne. Wyniki opublikowałam w Food and Chemical Toxicology [H2] i Pesticide and Biochemistry Physiology [H3]. Dodatkowo w pracy [H3]

przedstawiłam wyniki badań dotyczące wpływu zinebu na aktywność topoizomerazy I – kluczowego enzymu w jądrze komórkowym związanego z prawidłowym funkcjonowaniem DNA, głównie w procesach replikacji i transkrypcji. Podstawą do przeprowadzenia tych badań było założenie, że ze względu na obecność grup -SH ditiokarbaminiany mogą być potencjalnymi inhibitorami topoizomerazy. Uważa się, że inhibitory topoizomeraz są induktorami procesu apoptozy. Jednocześnie wskazuje się, że procesy neurodegeneracyjne są wynikiem śmierci komórek na drodze apoptozy [39,40]. Biorąc to pod uwagę, poznanie wpływu manebu i zinebu na rodzaj śmierci komórek pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów procesów, które mogą ostatecznie doprowadzić do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych.

W pracy [H2] opublikowanej w Food Chemical and Toxicology przedstawiłam wyniki opisujące wpływ manebu na przeżywalność komórek, poziom markerów stresu oksydacyjnego (GSH/GSSG, PC oraz TBARS) i rodzaj śmierci komórkowej. Komórki V79 poddałam działaniu manebu w zakresie stężeń jak dla poprzednich związków (0 - 300  $\mu$ M). Uzyskane wyniki testu MTT, który ocenia przeżywalność komórek na podstawie aktywności enzymów mitochondrialnych, potwierdziły że związek ten może mieć szkodliwy wpływ na metabolizm mitochondriów. Przeżywalność komórek spadła o 75% i 85% odpowiednio przy stężeniach 200  $\mu$ M i 300  $\mu$ M. Wyników takich nie uzyskałam w teście z błękitem trypanu, w którym przeżywalność komórek przy najwyższym stężeniu obniżyła się jedynie o 30%. W komórkach preinkubowanych z NAC i następnie eksponowanych na maneb przeżywalność utrzymywała się na poziomie notowanym w komórkach kontrolnych. Działał on więc ochronnie na komórki, podobnie jak w przypadku wcześniej badanych związków. W dalszych doświadczeniach wykazałam, że maneb wywołuje zmiany w poziomie GSH oraz GSSH. W komórkach eksponowanych na Maneb w stężeniu 100  $\mu$ M, stwierdzono 10-krotny spadek stężenia zredukowanego glutationu w porównaniu do komórek kontrolnych, natomiast w komórkach poddanych działaniu manebu w stężeniu 200  $\mu$ M poziom zredukowanego glutationu był taki, jak w komórkach kontrolnych. Jednocześnie, w zakresie stosowanych stężeń maneb indukował wzrost stężenia GSSG. W komórkach eksponowanych na maneb w stężeniu 200  $\mu$ M poziom GSSG wzrósł 34-krotnie w porównaniu do komórek kontrolnych. Obserwowane zmiany w poziomie GSH i GSSG wskazują, że maneb zaburza homeostazę glutationu i obniża wartości parametru R (GSH/GSSG), co wskazuje na warunki stresu oksydacyjnego w badanych komórkach. Ciekawym spostrzeżeniem było to, że w przypadku ekspozycji na wyższe stężenie manebu 200  $\mu$ M zastosowanie NAC nie działało ochronnie na

komórki. Mimo obniżenia poziomu GSSG w komórkach wartość parametru R nie wróciła do poziomu obserwowanego w komórkach kontrolnych. W pracy wykazałam również, że zaburzonej homeostazie glutationu w komórkach V79 towarzyszy wzrost peroksydacji lipidów. Stężenie TBARS po ekspozycji komórek na maneb znacząco wzrastało. Z drugiej strony, zastosowanie NAC przeciwdziało indukowanej przez maneb peroksydacji lipidów. Można przypuszczać, że obserwowany wzrost stężenia TBARS jest nie tylko następstwem zaburzenia układu redoks, ale może wynikać z hamującego wpływu manebu na enzymy mitochondrialne usuwające nadtlutki lipidowe (dehydrogenazy aldehydu ALDH2 i ALDH5A). Jednocześnie nie odnotowałam zmian w poziomie białkowych grup karbonylowych (PC), których wzrost odzwierciedla zmiany oksydacyjne w białkach. Wykazałam również, że w wyniku zaburzenia układu redoks, komórki poddane działaniu manebu wchodzi na drogę apoptozy, natomiast preinkubacja komórek z NAC zapobiega śmierci komórkowej wywołanej przez maneb.

**Uzyskane wyniki potwierdziły tezę, że cytotoksyczność manebu podobnie jak innych ditiokarbaminianów jest związana z jego wpływem na poziom zredukowanego glutationu i indukcję stresu oksydacyjnego. Zastosowanie NAC obniża cytotoksyczność manebu.**

W pracy [H3] opublikowanej w *Pesticide Biochemistry and Physiology* zamieszczone zostały wyniki badań związanych z mechanizmem cytotoksycznego działania zinebu (CAS No 12122-67-7). Poprzez zastosowanie takiego samego modelu badawczego oraz tych samych metod, uzyskane wyniki stanowią nie tylko próbę wyjaśnienia mechanizmów cytotoksycznego działania zinebu, ale dodatkowo pozwalają również ocenić i porównać mechanizmy działania dwóch podobnych do siebie pod względem chemicznym związków (Mn-EBDC i Zn-EBDC), różniących się jedynie obecnym w ich cząsteczce metalem. Wyniki testów na przeżywalność komórek wykazały, że zineb podobnie jak maneb wykazywał cytotoksyczne działanie na mitochondria. W teście MTT, zineb obniżał żywotność komórek o 66% już przy 100µM stężeniu. Przy wyższych stężeniach przeżywalność komórek utrzymywała się na tym samym poziomie. Dla porównania test z błękitem trypanu wykazał spadek przeżywalności komórek przy najwyższym stężeniu jedynie o 35%. W obu testach wzrost stężenia endogennego glutationu w wyniku preinkubacji z NAC chronił komórki przed cytotoksycznym działaniem zinebu. Żywotność komórek utrzymywała się na poziomie kontroli. W kolejnych doświadczeniach wykazałam, że zineb podobnie jak maneb wpływa na

wewnątrzkomórkowy poziom glutationu. W komórkach eksponowanych na stężenie zinebu 100  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$ , stężenie zredukowanego glutationu nie zmieniało się, natomiast stężenie utlenionego glutationu znacząco wzrastało. Konsekwencją tego był spadek wartości parametru R, wskazujący na warunki stresu oksydacyjnego. Wynikiem zaburzenia homeostazy glutationu może być wzrost wrażliwości komórek na oksydacyjne zmiany w lipidach i białkach komórkowych wywołane działaniem zinebu. Uzyskane wyniki, jednoznacznie wskazują, że zineb indukuje w komórce proces peroksydacji lipidów o czym świadczy wzrost stężenia TBARS, ale nie wpływa na proces utlenienia białek. Ciekawym spostrzeżeniem jest, że preinkubacja komórek z NAC nie znosiła cytotoksycznego wpływu zinebu na poziom glutationu w komórce. Uzyskane wyniki wykazały, że w komórkach preinkubowanych z NAC i poddanych działaniu zinebu, poziom GSSG wzrastał w porównaniu do komórek preinkubowanych z NAC. Jednocześnie stężenie GSH w tych komórkach było niższe niż w komórkach preinkubowanych z NAC. Konsekwencją powyższych zmian był znaczny spadek wartości parametru R. Jednocześnie należy podkreślić, że preinkubacja komórek z NAC chroniła komórki przed cytotoksycznym wpływem zinebu na lipidy komórkowe. W komórkach preinkubowanych z NAC i następnie narażonych na zineb, poziom TBARS utrzymywał się na poziomie obserwowanym w komórkach tylko preinkubowanych z NAC. W pracy po raz pierwszy wykazałam, że zineb w zakresie badanych stężeń jest inhibitorem topoizomerazy I. Tym samym jego obecność w komórce powoduje indukcję fragmentacji DNA, co prowadzi do śmierci komórek na drodze apoptozy. Wynik wskazujący że zineb jest inhibitorem topoizomerazy uzupełnił ówczesne nieliczne doniesienia na temat jego wpływu na metabolizm DNA, które głównie opisywały zineb jako związek indukujący aberracje chromosomalne w badanych komórkach. Uzyskane wyniki były również zgodne z danymi, które wskazywały na zineb jako związek indukujący wymianę chromatyd siostrzanych w DNA [41,42]. Proces ten jest inicjowany przez pęknięcia DNA do których dochodzi na skutek działania czynników endo- i egzogennych. Czynniki te mogą być pochodzenia biologicznego i chemicznego, zaliczamy do nich m.in. RFT oraz leki, a wśród nich związki wpływające na aktywność topoizomeraz. Nagromadzenie pęknięć w nici DNA może skutkować wejściem komórek na szlak apoptozy. W kolejnym etapie wykazałam proapoptotyczne właściwości zinebu stosując test TUNEL oraz test z Aneksyną V. Również w tych wypadkach preinkubacja z NAC chroniła komórki przed cytotoksycznym działaniem zinebu i zapobiegała procesowi apoptozy.

**Zaobserwowane zmiany w komórkach V79 poddanych działaniu zinebu pozwoliły mi nakreślić przypuszczalny mechanizm jego działania. Zineb wykazywał pro-oksydacyjne działanie, zaburzał komórkowy układ redoks, skutkiem czego był obserwowany wzrost peroksydacji lipidów. Zmiany oksydacyjne wywołane działaniem zinebu wynikały najprawdopodobniej z nagromadzenia się RFT w komórkach. Konsekwencją powyższych zmian była śmierć komórek na drodze apoptozy. Równocześnie po raz pierwszy udokumentowałam, że proapoptotyczne działanie zinebu może wynikać z faktu, że jest on inhibitorem topoizomerazy I. Istotnym wnioskiem również jest to, że wzmacniając potencjał antyoksydacyjny przez zastosowanie antyoksydanta można częściowo obniżyć cytotoksyczne efekty działania zinebu w komórkach.**

Zarówno maneb i zineb zaburzały homeostazę glutationową w konsekwencji prowadząc do oksydacyjnych uszkodzeń w strukturach komórkowych. Dlatego w kolejnej pracy [H5] opublikowanej na łamach Food and Chemical Toxicology zamieściłam wyniki opisujące wpływ obu związków na aktywność najważniejszych enzymów należących do komórkowej bariery antyoksydacyjnej. Aktywność wszystkich badanych enzymów opisałam również w układzie, w którym zastosowano preinkubację z NAC. Różnice aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz związane z tym zmiany stężenia komórkowych antyoksydantów mogą pełnić rolę markerów, które wskazują na to czy dane komórki są wrażliwe na warunki stresu oksydacyjnego lub czy wykształciły mechanizmy adaptacyjne pozwalające im przetrwać w niekorzystnych warunkach. Aktywność enzymów przedstawionych na Schemacie 2 zbadalam w komórkach kontrolnych oraz w komórkach, które zostały poddane działaniu manebu lub zinebu w stężeniu 200  $\mu\text{M}$ . Przy tym stężeniu zaobserwowałam największe zmiany w poziomie GSH i GSSG, które wskazują jednoznacznie na zaburzenia układu antyoksydacyjnego opartego na glutationie, jako przyczynę tego można wskazać nadmierną produkcję RFT w komórkach eksponowanych na badane fungicydy. Uzyskane i opublikowane w pracy [H5] wyniki wykazały że maneb i zineb wykazują podobny efekt działania na enzymy GSH-zależne, natomiast w różny sposób wpływają na aktywność enzymów zaangażowanych w detoksykację RFT. Wykazałam, że oba badane związki w sposób istotny hamują aktywność reduktazy glutationowej (GR), co koreluje z wynikami opublikowanymi w pracy [H2] i [H3] wskazującymi, że oba związki powodowały istotny wzrost stężenia GSSG. Wysoki poziom GSSG może w sposób niekorzystny wpływać na aktywność obu peroksydaz glutationowych, które do swojej aktywności wymagają GSH jako ko-substratu. Założenie to znalazło potwierdzenie w uzyskanych przeze mnie wynikach, które

jednoznacznie wykazały hamujący wpływ manebu i zinebu na aktywność obu GPx. Ponadto przyjmując założenie, że toksyczność obu związków jest związana z generowaniem RFT w komórce, w tym  $O_2^{\cdot-}$ , można przypuszczać, że obniżona aktywność Se-GPx jest spowodowana utlenieniem atomu Se obecnego w jej centrum aktywnym.

Jednak pierwszą linią obrony przed stresem oksydacyjnym są izoenzymy SOD, a od ich poziomu aktywności zależy reakcja pozostałych enzymów na pochodne anionorodnika ponadtlenkowego. W pracy [H5] wykazałam, że aktywność cytoplazmatycznej SOD1 nie uległa zmianie w wyniku ekspozycji na oba związki w porównaniu do aktywności obserwowanej w komórkach kontrolnych. Jednocześnie zaobserwowałam wzrost aktywności mitochondrialnej SOD2 w komórkach ekspozowanych tylko na maneb. Wynikiem podwyższonej aktywności SOD2 może być wzrost stężenia  $H_2O_2$ . Nadtlenek wodoru jest znacznie mniej reaktywny od pozostałych RFT. Ma on jednak zdolność przenikania przez błony mitochondrialne oraz cytoplazmatyczne, i może być aktywatorem wielu szlaków komórkowych (głównie procesu apoptozy lub proliferacji komórek). Należy też podkreślić, że podwyższona aktywność SOD2 może wskazywać na adaptację komórek do warunków stresu oksydacyjnego i jest odpowiedzią na wzrost stężenia  $O_2^{\cdot-}$ . Ponadto podwyższona aktywność SOD2 wywołana działaniem manebu potwierdza tezę mówiącą o jego negatywnym wpływie na metabolizm mitochondriów.

W prawidłowo funkcjonujących komórkach  $H_2O_2$  jest usuwany przez CAT i Se-GPx, które redukują go do tlenu cząsteczkowego i wody. W warunkach stresu oksydacyjnego to przede wszystkim peroksydaza jest odpowiedzialna za eliminację nadmiaru  $H_2O_2$ . Ponieważ oba badane związki hamowały aktywność obu peroksydaz, komórki mogły być w sposób szczególnie narażone na jego szkodliwe działanie. Jednocześnie w pracy wykazałam, że z obu badanych związków tylko zineb obniżał aktywność CAT. Przyczyną tego może być utlenienie znajdującego się w centrum aktywnym atomu Fe, który w sposób szczególnie jest narażony na działanie RFT.

**Na podstawie uzyskanych wyników oraz dostępnego piśmiennictwa można przypuszczać, że cytotoksyczność zinebu oraz manebu wynika, przede wszystkim, z zaburzenia równowagi pomiędzy reakcją dysmutacji  $O_2^{\cdot-}$  do  $H_2O_2$  przeprowadzaną przez SOD, a reakcjami katalizowanymi przez CAT i GPx w których nadtlenek wodoru jest usuwany z komórek. Nieprawidłowe funkcjonowanie enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej prowadzi do nagromadzenia się w komórkach  $H_2O_2$ . Ponadto,**

**uzyskane wyniki wskazują że cytotoksyczność manebu wynika z jego oddziaływania na mitochondria prowadząc do zaburzenia ich metabolizmu.**

Kolejnym etapem w pracy [H5] była ocena wpływu NAC na aktywność powyższych enzymów. W pracach [H2] i [H3] wykazałam, że NAC ma działanie ochronne i niweluje cytotoksyczne działania obu fungicydów w odniesieniu do większości badanych parametrów, i co najważniejsze zapobiega śmierci komórek na drodze apoptozy. Zmiany tych parametrów odzwierciedlają, przede wszystkim, sprawność działania enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej. W pracy [H5] pokazałam, że w przypadku manebu, NAC wykazał ochronne działanie na badane komórki. Świadczył o tym wzrost aktywności GR wskazujący na regenerację buforu glutationowego. Jednocześnie aktywność obu SOD i GPx utrzymywała się na poziomie obserwowanym w komórkach kontrolnych. Zmiany te jednoznacznie wskazują na ochronne działanie antyoksydantu. Interesujące wyniki uzyskałam dla komórek eksponowanych na zineb po preinkubacji z NAC. Zaobserwowane zmiany aktywności a w szczególności spadek aktywności obu peroksydaz glutationowych i znaczny, można powiedzieć kompensacyjny wzrost CAT mogą świadczyć o zaburzeniu układu redoks. Wyniki te są zgodne z danymi opublikowanymi w pracy [H3], które jednoznacznie wskazują że w komórkach preinkubowanych z NAC, a następnie eksponowanych na zineb zaburzona jest homeostaza glutationu. Interpretacja tych wyników była trudniejsza ponieważ brak było danych na temat wpływu NAC lub innych antyoksydantów na mechanizmy cytotoksycznego działania zinebu. **Mogłam jedynie przypuszczać, że opisane zmiany wskazują na odmienny cytotoksyczny mechanizm działania zinebu w porównaniu do manebu, w związku z czym preinkubacja z NAC w tym wypadku była niewystarczająca.**

Praca [H5] zamyka cykl publikacji dotyczących mechanizmów cytotoksycznego działania pestycydów z grupy ditiokarbamininów. Omówione prace pokazały w sposób przekrojowy wpływ grupy związków należących do jednej klasy pestycydów na komórkowy układ redoks. Uzyskane wyniki są istotnym uzupełnieniem piśmiennictwa na temat mechanizmów cytotoksycznego działania ditiokarbamininów.

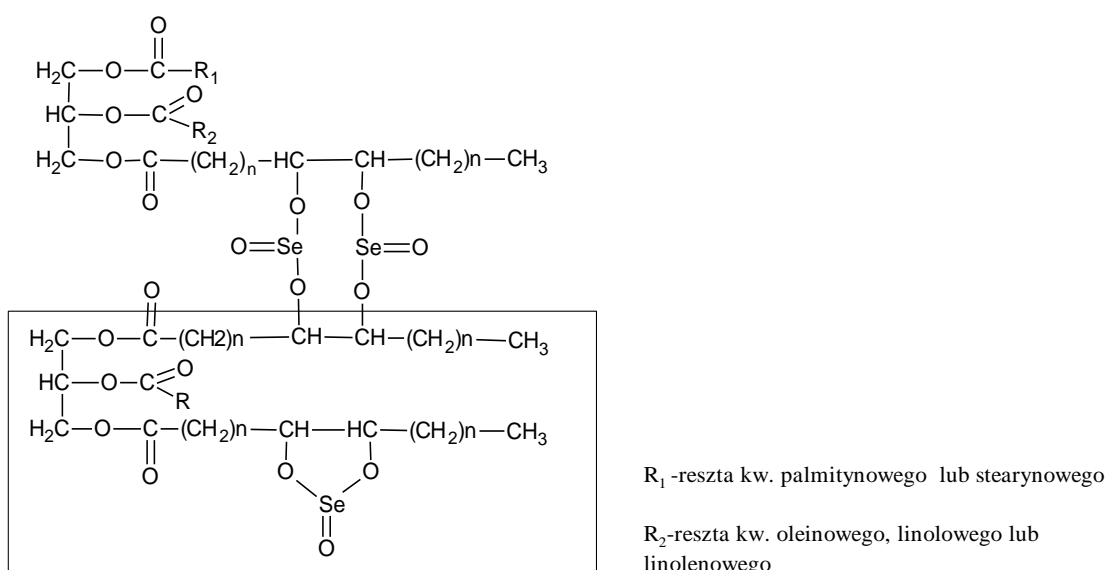
**W swoich badaniach wykazałam, że ditiokarbaminiany pomimo swojej stosunkowo niskiej cytotoksyczności zaburzają homeostazę glutationową w komórce i indukują związany z tym stres oksydacyjny, który w konsekwencji prowadzi do śmierci komórek. Jednocześnie zwróciłam uwagę, że wszystkie opisane zmiany zależą od stanu metabolicznego komórek, a przede wszystkim od wyjściowego poziomu endogennego**

**GSH. Podwyższenie jego poziomu w komórce w wyniku zastosowania prekursora syntezy glutationu – NAC znacznie ogranicza cytotoksyczne następstwa działania pestycydów.**

W kolejnym etapie moich badań zajęłam się procesem zapalnym z uwzględnieniem roli stresu oksydacyjnego w jego rozwoju. Procesy zapalne stanowią ważną odpowiedź adaptacyjną organizmu pozwalającą na wyeliminowanie czynnika zapalnego oraz zainicjowanie procesu regeneracji komórek/tkanek co umożliwia utrzymanie homeostazy w organizmie. W sytuacji kiedy mechanizmy obronne nie działają właściwie, w komórkach zaczynają dominować procesy zapalne prowadzące do zaburzenia homeostazy. Chroniczny i nasilony stan zapalny odgrywa pierwszoplanową rolę w licznych procesach chorobowych. Stan zapalny obejmując coraz większą liczbę komórek oraz aktywując różne szlaki immunologiczne prowadzi do rozwoju zawału mięśnia sercowego, cukrzycy, reumatoidalnego zapalenia stawów, sepsy, nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych. Od przeszło 20 lat wskazuje się, że stres oksydacyjny jest ściśle związany ze stanem zapalnym. Czynniki o właściwościach oksydacyjnych wpływają na wszystkie etapy procesu począwszy od momentu kiedy z uszkodzonych komórek uwolnione zostają substancje będące endogennymi czynnikami zapalnymi poprzez aktywację receptorów z rodziny Toll-like receptor (TLRs) i NOD-like receptor (NLRs), a kończąc na aktywacji szlaków komórkowych będących odpowiedzią adaptacyjną na stan zapalny. Badania *in vitro* jednoznacznie potwierdzają, że komórki stymulowane czynnikami prozapalnymi produkują w odpowiedzi RFT [43-45], a ostry i przewlekły stan zapalny *in vivo* jest powiązany z zaburzeniem układu redoks w wyniku wzmożonej produkcji RFT [46,47]. W ostatnich latach coraz częściej podkreśla się możliwość wykorzystania antyoksydantów jako związków, które potencjalnie mogą wykazywać działanie przeciwzapalne poprzez zahamowanie stresu oksydacyjnego. Zaliczamy do nich liczne antyoksydanty o pochodzeniu endogennym i egzogennym. W publikacjach [H1-H5] wykazałam, że NAC będący egzogennym antyoksydantem działa ochronnie na komórki i niweluje skutki stresu oksydacyjnego wywołanego obecnością pestycydów. Ochronne działanie NAC wynika przede wszystkim z faktu, że jest on prekursorem w syntezie GSH. Ponadto wykazano, że może on również bezpośrednio usuwać RFT a w szczególności rodnik hydroksylowy. Właściwości te powodują, że NAC wykazuje działanie przeciwzapalne i jest wykorzystywany terapeutycznie [48].



W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się selenowi oraz związkom zawierającym ten pierwiastek. Uważa się, że wysoki potencjał antyoksydacyjny i szerokie spektrum działania związków selenu mogą mieć zastosowanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Właściwości te stanowiły asumpt do opracowania pracy przeglądowej pt. „Biomedical effects of selenium in a human organism” opublikowanej w *Journal of Elementology*. Publikacja ta nie wchodzi w skład omawianego cyklu naukowego i jest wymieniona w spisie pozostałych publikacji [P2]. Zebrałam i omówiłam w niej najnowsze dane naukowe dotyczące biomedycznych właściwości selenu, który jako pierwiastek śladowy jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Należy jednak podkreślić, że selen jest pierwiastkiem, który wzbudza liczne kontrowersje. Z jednej strony wykazuje działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne sugerujące jego znaczenie przeciwnowotworowe, z drugiej zaś strony jego nadmiar jest szkodliwy dla organizmu. O kierunku i końcowych efektach działania decyduje forma chemiczna Se i jego dawka. W diecie selen przede wszystkim występuje na II stopniu utlenienia w postaci selenometioniny lub w mniejszym stopniu selenocysteiny, a jego źródłem są białka zwierzęce. W postaci nieorganicznej selen spożywany jest jako selenianu sodu (SeIV), który głównie jest stosowany w suplementach diety. Z piśmiennictwa wynika, że Se na plus czwartym stopniu utlenienia ma najwyższą aktywność biologiczną oraz ma najskuteczniejsze działanie antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe [49]. Trzeba przy tym podkreślić, że różnica między dawką toksyczną a dawką niezbędną jest wąska [ $\mu\text{g}/\text{kg}$  masy ciała]. Nieorganiczne związki selenu są słabiej przyswajalne i bardziej toksyczne od związków organicznych. Powyższe właściwości selenu zostały uwzględnione podczas opracowania preparatu Selol, który jest mieszaniną selenotrójglicerydów zawierających organiczny (SeIV).



**Schemat 5. Budowa chemiczna Selolu określona na podstawie widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR oraz badań MS/MS (w ramce) - ester kwasu oktadeka-9,11-dieno-1-[7-(5-non-3-enylo-2- $\lambda$ 4-[1,3,2]-dioksasele-nolano-4-ylo-heptanoksylo-metylo]-2-oktadeka-9,13-dienoyl-oksy-etylowego.**

W pracy [H6] opublikowanej w *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* przedstawiłam wyniki badań dotyczących wpływu Se obecnego w preparacie Selol na komórki śródbłoka naczyń włosowatych skóry HMEC-1 w układzie kontrolnym oraz w komórkach, w których zaindukowano stan zapalny za pomocą TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy guza; ang. tumor necrosis factor). Dane naukowe wskazują, że w badaniach *in vivo* i *in vitro* Selol wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Wyniki potwierdzające to uzyskano m. in. w badaniach nad rakiem prostaty i sutka [50-52]. We krwi zdrowych myszy wykazano, że Selol wpływa na aktywność enzymów selenozależnych i status antyoksydacyjny [53]. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na mózгах zdrowych szczurów zaobserwowano, że Selol redukuje stres oksydacyjny wywołany działaniem LPS (lipopolisacharyd) oraz wykazuje właściwości przeciwzapalne [54]. Pomimo szerokiego spektrum badań dotyczących właściwości Selolu, brak jest informacji na temat jego wpływu na komórki śródbłoka, a to właśnie te komórki pełnią istotną funkcję w regulacji i wzmacnianiu reakcji zapalnych. Powyższa praca [H6] jest zatem pierwszą próbą wyjaśnienia mechanizmu działania Selolu na ludzkie komórki śródbłoka. Swoją uwagę skupiłam przede wszystkim na wpływie Selolu na poziom ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Wynika to z faktu, że cząsteczki adhezyjne odgrywają istotną rolę w reakcjach immunologicznych w procesach zapalnych np. w migracji

leukocytów do ogniska zapalnego oraz oddziaływaniach międzykomórkowych czy oddziaływaniach między komórką a matriks. Poziom ekspresji i profil cząsteczek adhezyjnych zmienia się w ostrym i chronicznym stanie zapalnym. W związku z tym mogą być celem w terapii medycznej. Wiele mediatorów stanu zapalnego w tym TNF- $\alpha$  czy interleukina - IL-1 aktywują komórki śródbłonne. Pod wpływem TNF- $\alpha$  w cytoplazmie dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, który następnie przechodzi do jądra komórkowego i indukuje ekspresję wielu genów pro-zapalnych. W komórkach endotelium NF- $\kappa$ B reguluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych (CAM- ang. cellular adhesion molecules), takich jak cząsteczki adhezji komórkowej naczyń – VCAM-1 (ang. vascular cell adhesion molecule) (CD106), cząsteczki adhezji międzykomórkowej – ICAM-1 (ang. intercellular adhesion molecule) (CD54) oraz cząsteczki adhezji komórkowej płytkowo-śródbłonnej – PECAM -1 (CD31) (ang. platelet/endothelial cell adhesion molecule). W odpowiedzi na działanie TNF- $\alpha$  na powierzchni komórek śródbłonkowych dochodzi do zmiany poziomu ekspresji powyższych cząsteczek adhezyjnych co znacząco wpływa na przepuszczalność komórek śródbłonna i funkcje śródbłonna jako bariery ochronnej. Obserwowane zmiany są charakterystyczne dla stanu zapalnego. Należy podkreślić, że do aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B dochodzi nie tylko pod wpływem TNF- $\alpha$ , ale również w wyniku podwyższenia stężenia RFT i zaburzenia układu redoks w komórce. Aktywacja NF- $\kappa$ B jest jednym z czynników, które regulują ekspresję cząsteczek adhezyjnych. Temat oddziaływania Se, głównie jego nieorganicznej postaci, na ekspresję cząsteczek adhezyjnych oraz na mechanizmy regulujące ich ekspresję nie jest tematem nowym, brak jest jednak danych dotyczących wpływu organicznego selenu IV.

Swoje badania oparłam na tezie, że działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne Selolu jest dwufazowe. W pierwszej fazie Selol indukuje w komórkach stres oksydacyjny, który stanowi impuls do uruchomienia mechanizmów obronnych i naprawczych stanowiących drugą fazę działania Selolu, są to m.in. podwyższenie stężenia GSH czy wzrost ekspresji Se-GPx, a w komórkach nowotworowych indukcja procesu apoptozy [52]. W pracy [H6] pokazałam, że Selol w badanych stężeniach (4 $\mu$ gSe/ml i 8 $\mu$ gSe/ml) wykazuje działanie pro-oksydacyjne w komórkach HMEC-1 i prowadzi do nagromadzenia się w komórce RFT. Skutkiem tego jest zaobserwowana przeze mnie aktywacja czynnika NF- $\kappa$ B oraz zmiany ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Wykazałam, że Selol podwyższa ekspresję ICAM-1, i jednocześnie powoduje spadek ekspresji PECAM-1 i VCAM-1. Zmiany te wskazują na prozapalne właściwości Selolu. Wszystkie obserwowane zmiany były istotne statystycznie. Ciekawym i zarazem

ważnym rezultatem opublikowanym w tej pracy jest fakt, że w komórkach HMEC-1 z zaindukowanym stanem zapalnym Selol wzmacniał zmiany charakterystyczne dla stanu zapalnego. Świadczy o tym zwiększona ilość czynnika NF- $\kappa$ B w jądrze komórkowym i dalszy wzrost ekspresji cząsteczek ICAM-1 i VCAM-1 przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji PECAM-1 w porównaniu do komórek eksponowanych jedynie na TNF- $\alpha$ .

Wydaje się zatem, że Selol wykazuje odmienny efekt działania na poziom ekspresji VCAM-1, który zależy od obecności TNF- $\alpha$ . Należy podkreślić, że zarówno ICAM-1 i VCAM-1 odgrywają istotną rolę w procesach zapalnych, a ich ekspresja jest regulowana pod wpływem tych samych czynników prozapalnych. Jednocześnie wiadomo, że pod wpływem niektórych cytokin czy też stanu redoks komórki, ekspresja VCAM-1 może być niezależna od ekspresji ICAM-1. Wynika to ze specyficznej budowy sekwencji promotora genu dla VCAM-1[55]. Ponadto ekspresja tej cząsteczki adhezyjnej zależy od typu komórki oraz czynnika stymulującego [56]. Jednocześnie ekspresja ICAM-1 jest indukowana przez nagromadzenie się w komórce RFT. Tłumaczyć to może obserwowany wzrost ekspresji ICAM-1 przy jednoczesnym spadku ekspresji VCAM-1 w komórkach eksponowanych tylko na Selol. Odmienny wpływ Selolu na ekspresję CAM w komórkach z zaindukowanym stanem zapalnym może wynikać z faktu, że Selol wzmacnia działanie TNF- $\alpha$  i w efekcie prowadzi do jeszcze większej kumulacji RFT w komórkach. Należy podkreślić, że działanie samego tylko TNF- $\alpha$  prowadzi do akumulacji w komórce RFT i aktywacji NF- $\kappa$ B. W związku z tym kiedy komórki eksponowano na oba czynniki, prowadziło to do wzmocnienia i utrwalenia stanu zapalnego.

**Podsumowując uzyskane wyniki badań na ludzkich komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych skóry HMEC-1 w których po raz pierwszy zastosowano Selol (SeIV) należy podkreślić, że preparat ten w warunkach przeprowadzanych doświadczeń wykazał działanie pro-oksydacyjne i prozapalne. Jednocześnie bardzo istotną obserwacją jest, że Selol podany w warunkach stanu zapalnego nie wykazywał działania przeciwzapalnego, a wręcz przeciwnie go nasilał. Wskazuje to, że stosowanie Selolu w terapii chorób o podłożu zapalnym może wymagać dokładnej analizy każdego przypadku. Należy jednak podkreślić, że uzyskane wyniki mimo, że zostały potwierdzone analizą statystyczną, mają charakter wstępny i wymagają dalszych pogłębionych badań.**

## Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych przeze mnie prac oraz wnioski

### **Mechanizm cytotoksycznego działania wybranych ditiokarbaminów**

- DEDC, maneb i zineb podobnie do wcześniej badanych przeze mnie tiuramu i disulfiramu indukują w badanych komórkach ssaków stres oksydacyjny wynikający z zaburzenia homeostazy glutationu. Świadczy o tym spadek wartości stosunku GSH/GSSG i równoczesny wzrost stężenia utlenionego glutationu (GSSG).
- DEDC wywołuje oksydacyjne zmiany zarówno w białkach jak i w lipidach komórkowych podczas gdy maneb i zineb powodują oksydacyjne zmiany tylko w lipidach; wskazuje to na odmienny mechanizm działania tych pestycydów w badanych komórkach.
- Różnice w mechanizmie działania testowanych ditiokarbaminów wynikają przede wszystkim, z ich odmiennego wpływu na komórkowe enzymy antyoksydacyjne.
- Pod wpływem DEDC komórki uruchamiają system obronny, w którym pierwszoplanową rolę odgrywają dwa enzymy: CAT oraz GR; ich podwyższona aktywność jest najprawdopodobniej adaptacją komórek do warunków stresu oksydacyjnego.
- Maneb i zineb wykazują podobny efekt działania na enzymy GSH-zależne. Oba badane związki w sposób istotny hamują aktywność GR oraz aktywność obu GPx.
- W warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem manebu funkcję obronną pełni mitochondrialna SOD2, której obserwowany wzrost aktywności może być odpowiedzią adaptacyjną komórek na podwyższone stężenie RFT, głównie anionorodnika ponadtlenkowego. Jednocześnie w badanych komórkach aktywność CAT nie zmienia się w porównaniu do komórek kontrolnych.
- W odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany działaniem zinebu dochodzi do zahamowania aktywności CAT w badanych komórkach, przy czym aktywność SOD1 i SOD2 nie zmienia się. Obserwowane zmiany aktywności wspomnianych enzymów mogą prowadzić do nagromadzenia w komórce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Zaburzenia układu redoks w komórkach pod wpływem DEDC, manebu lub zinebu prowadzą do śmierci komórek na drodze apoptozy i/lub nekrozy.
- Po raz pierwszy wykazałam, że proapoptotyczne działanie zinebu wynika z zahamowania aktywności topoizomerazy I.

### **Wpływ N-acetylo-L-cysteiny (NAC) i rola endogennego glutationu w mechanizmie cytotoksycznego działania badanych ditiokarbaminianów**

Cytotoksyczność badanych ditiokarbaminianów jest związana z poziomem endogennego zredukowanego glutationu (GSH) w komórkach. Preinkubacja komórek z NAC podwyższa poziom endogennego glutationu i w konsekwencji osłabia efekty cytotoksycznego działania badanych związków.

- Nie stwierdzono zmian oksydacyjnych w białkach i lipidach komórkowych w komórkach preinkubowanych z NAC, a następnie eksponowanych na działanie DEDC, maneb lub zineb.
- Podwyższony poziom GSH w komórce znosi cytotoksyczny wpływ DEDC, manebu i zinebu. Komórki nie ulegają apoptozie i/lub nekrozie.
- Preinkubacja z NAC moduluje aktywność najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych, w następstwie czego chronią one komórki przed skutkami działania badanych pestycydów.

### **Stan zapalny wywołany stresem oksydacyjnym: działanie selenu(IV)**

- Se(IV) w postaci preparatu Selol indukuje wzrost stężenia RFT oraz aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B w ludzkich komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych skóry HMEC-1. Skutkiem tego są zmiany ekspresji cząsteczek adhezyjnych CAM. Wyniki te wskazują na pro-oksydacyjne i prozapalne działanie tej formy Se.
- W komórkach z zaindukowanym stanem zapalnym w wyniku działania TNF- $\alpha$ , Se(IV) nie wykazuje działania przeciwzapalnego, a wręcz przeciwnie, nasila go.

### **WNIOSKI KOŃCOWE OMAWIANEGO CYKLU PRAC:**

1. Pestycydy z grupy ditiokarbaminianów wywołują zmiany charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego.
2. Zastosowanie NAC (N-acetylo-L-cysteiny) jako związku wzmacniającego potencjał antyoksydacyjny jest skutecznym czynnikiem ochronnym przed cytotoksycznym działaniem związków z grupy ditiokarbaminianów.
3. Wykazane pro-oksydacyjne i prozapalne działanie Se(IV) w postaci preparatu Selol może mieć korzystny wpływ na wczesną odpowiedź zapalną, której celem jest neutralizacja czynnika uszkodzającego oraz pobudzenie w organizmie procesów umożliwiających przywrócenie pierwotnego stanu.

Piśmiennictwo:

1. Zarkovic N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.*, 2003; 24: 281-91.
2. Woźniak M., Czyż M. Mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej – potencjalne zastosowanie kliniczne. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2008; 62: 613-624.
3. Lopez-Lazaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer. Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett.*, 2007; 252: 1-8.
4. Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C., Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 1451-1464.
5. Buetler T.M., Krauskopf A., Ruegg U.T. Role of superoxide as a signaling molecule. *News Physiol. Sci.*, 2004; 19: 120-123.
6. Descamps O. Stress oxydant et vieillissement: aspects mitochondriaux et stratégies nutritionnelles anti-cancer et anti-vieillessement chez la souris OH. Thèse effectuée au laboratoire NVMC., 2004
7. Gilber H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, 1990; 63: 69-172.
8. Bliska A., Kryczyk A., Włodek L. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2007; 61: 438-453.
9. European Commission, 2017. EU Pesticides Database. (Available: [http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides\\_en](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en). Last visit: March 28th, 2017).
10. Mage D.T., Allen R.H., Gondy G., Smith W., Barr D.B., Needham L.L. Estimating pesticide dose from urinary pesticide concentration data by creatine correction in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-III). *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 2004; 14: 457-465.
11. Bjørling-Poulsen M., Andersen H.R., Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ. Health.*, 2008; 7: 50.
12. Béranger R., Hardy E.M., Dexet C, Guldner L., Zaros C., Nougadère A., Metten M.A, Chevrier C, Appenzeller B.M.R Multiple pesticide analysis in hair samples of pregnant French women: Results from the ELFE national birth cohort. *Environ. Int.*, 2018; 120: 43-53.
13. Wang X., Martínez M.A., Wu Q., Ares I., Martínez-Larrañaga M.R., Anadón A., Yuan Z. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2016; 46(10): 876-899.
14. Boussabbeh M., Ben Salem I., Hamdi M., Ben Fradj S., Abid-Essefi S., Bacha H. Diazinon, an organophosphate pesticide, induces oxidative stress and genotoxicity in cells deriving from large intestine. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2016; 23(3): 2882-2889.
15. Grosicka E., Sadurska B., Szumiło M., Grzela T., Łazarczyk P., Niderla-Bielińska J., Rahden-Staroń I. Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in Chinese hamster fibroblasts. *Int. Immunopharmacol.*, 2005; 5: 1945-1956.
16. Rozporządzenie Ministra Zdrowia dnia 4.09.2007. Kryteria i sposób klasyfikacji substancji i preparatów chemicznych. *Dz. U. 07. 174. 1222.*
17. Eurostat, 2017. [http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/aei\\_fm\\_salpest09](http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/aei_fm_salpest09).
18. Grosicka E., Czczot H., Skrzycki M., Szumiło M., Podsiad M., Rahden-Staroń I. Wpływ tiuramu i disulfiramu na stan redox w komórkach fibroblastów płuca chomika chińskiego. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2006; 4: 383-390.
19. Grosicka E., Sadurska B., Szumiło M., Grzela T., Łazarczyk P., Niderla-Bielińska J., Rahden-Staroń I. Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in Chinese hamster fibroblasts. *Int. Immunopharmacol.*, 2005; 5: 1945-1956.
20. Floor E., Wetzel M.G. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J. Neurochem.* 1998; 70: 268-275.

21. Yoritaka A., Hattori N., Uchida K., Tanaka M., Stadtman E.R., Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 2696-2701.
22. de Cock J., Westveer K., Heederik D., te Velde E., van Kooij R. Time to pregnancy and occupational exposure to pesticides in fruit growers in the Netherlands. *Occup. Environ. Med.*, 1994; 51: 693–699.
23. Farr S.L., Cooper G.S., Cai J., Savitz D.A., Sandler D.P.: Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the Agricultural Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 2004; 160: 1194–120.
24. Larsen S.B., Giwercman A., Spano M., Bonde J.P. A longitudinal study of semen quality in pesticide spraying Danish farmers. The ASCLEPIOS Study Group. *Reprod. Toxicol.*, 1998; 12: 581–589.
25. Pike M.G., Mays D.C., Macomber D.W., Lipsky J.L. Metabolism of disulfiram metabolite, S-methyl N,N- diethyldithiocarbamate, by flavin monooxygenase in human renal microsomes. *Drug. Metab. Dispos.*, 2001; 29(2): 127-132.
26. Pande V, Ramos M.J., Nuclear factor kappa B; a potential target for anti-HIV chemotherapy. *Curr Med. Chem.*, 2003; 10:1603-1615.
27. Byrne S.T., Gu P., Zhou J., Denkin S.M., Chong C., Sullivan D., Liu J.O., Zhang Y. Pyrrolidone dithiocarbamate and diethyldithiocarbamate are active against growing and nongrowing persisted *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 4495-4497.
28. Pang H., Chen D., Cui Q.C., Dou QP. Sodium diethyldithiocarbamate , an AIDS progression inhibitor and a copper –binding compound, has proteasome-inhibitory and apoptosis inducing activities in cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 2007; 19: 809-816.
29. Extension Toxicology Network: Pesticide Information Profiles  
<http://extoxnet.orst.edu/pips/thiram.html/>
30. Zhou Z., Shie F.S., Piccardo P., Montine T.J., Zhang J. Proteasomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: relevance to Parkinson’s disease. *Neuroscience*, 2004; 128: 281-291.
31. Domico L.M., Zeevalk G.D., Bernard L.P., Cooper K.R. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology*, 2006; 27: 816-825.
32. Curtian C.C, Ali F., Volitakis R.A., Cherny R.A., Norton R.S., Beyreuther K., Barrow C.J., Masters C.L., Bush A.I., Barnham K.J. Alzheimer’s disease amyloid beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 20466-20473.
33. Cuajungco M.P., Faget K.Y. Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer’s disease. *Brain Res. Rev.*, 2003; 41: 44-56.
34. Soleo L., Defazio G., Scarselli R., Zefferino R., Livrea P., Foa V. Toxicity of fungicides containing ethylene-bis-dithiocarbamate in serumless dissociated mesencephalic-striatal primary coculture. *Arch. Toxicol.* 1996; 70: 678-682.
35. Drechsel D.A., Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson’s disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 44: 1873-1886.
36. Miligore L., Coppede F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat. Res.*, 2009; 674: 73-84.
37. Mytilineou C., Kramer B.C., Yabut J.A. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2002, 8: 385-387



38. Sims N.R., Nilsson M., Muyderman H. Mitochondrial glutathione: A modulator of brain cell death. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2004; 36: 329-333.
39. Franco R., Sanchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M., Panayiotidis M.I. Environmental toxicity , oxidative stress and apoptosis: ménage a trois. *Mutat. Res.*, 2009; 674: 3-22.
40. Song C., Kanthasamy A., Anantharam V., Sun F., Kanthasamy A.G. Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol. Pharmacol.*, 2010; 77: 621-632.
41. Soloneski S., Gonzales M., Piaggio E., Apezteguia M., Reigosa M.A., Larramendy M.L. Effect of the dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutagenesis*, 2001; 16: 487-493.
42. Soloneski S., Reigosa M.A, Larramendy M.L. Vitamin E prevents ethylene bis(dithiocarbamate) pesticide zineb-induced sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis*, 2003; 18: 505-510.
43. Meier B., Radeke H.H., Selle S., Younes M., Sies H., Resch K., Habermehl G.G. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem. J.*, 1989; 263:539–545.
44. Meier B., Radeke H.H., Selle S., Raspe H.H., Sies H., Resch K., Habermehl, G.G. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to treatment with synovial fluids from patients suffering from arthritis. *Free Radic. Res. Commun.*, 1990; 8: 149–160.
45. Lugin J., Rosenblatt-Velin N., Parapanov R., Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol. Chem.*, 2014; 395: 203–230.
46. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 2007; 87: 315–424.
47. Li H., Horke S., Forstermann U. Oxidative stress In vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2013; 34: 313–319.
48. Saso L., Firuzi O. Pharmacological Applications of Antioxidants: Lights and Shadows. *Curr. Drug Targets*, 2014; 15: 1-23.
49. Lu J., Holmgren A. Selenoproteins. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 723-727.
50. Estevanato L.L, Da Silva J.R., Falqueiro A.M., Mosiniewicz-Szablewska E., Suchocki P., Tedesco A.C., Morais P.C., Lacava Z.G.M. Co-nanoencapsulation of magnetic nanoparticles and Selol for breast tumor treatment: in vitro evaluation of cytotoxicity and magneto-hyperthermia efficacy. *Int. J. Nanomed.*, 2012; 7: 5287-5299.
51. Falqueiro A.M., Siqueira-Moura M.P., Jardim D.R., Primo F.L., Morais P.C., Mosiniewicz-Szablewska E., Suchocki P., Tedesco A.C. In vitro cytotoxicity of Selol-loaded magnetic nanocapsules against neoplastic cell lines under AC magnetic field activation. *J. Appl. Phys.*, 2012; 111: 07B335.
52. Flis A., Suchocki P., Królikowska M.A., Suchocka Z., Remiszewska M., Śliwka L., Książek I., Sitarz K., Sochacka M., Hoser G., Anuszewska E., Wroczyński E., Jastrzębski Z., Selenitetriglycerides-Redox-active agents. *Pharmacol. Rep.*, 2015; 67: 1-8.
53. Sochacka M., Giebułtowicz J., Remiszewski M., Suchocki P., Wroczyński P. Effects of Selol 5% supplementation on the activity or concentration of antioxidants and malondialdehyde level in the blood of healthy mice. *Pharmacol. Rep.*, 2014; 66: 301-310.
54. Dominiak A., Wilkaniec A., Jęsko H., Czapski G.A., Lenkiewicz A.M., Kurek E., Wroczyński P., Adamczyk A. Selol, an organic selenium donor, prevents lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat brain. *Neurochem Int.* 2017; 108: 66-77.

55. Nizamutdinova I.T., Kim Y.M., Lee J.H., Chang K.C., Kim H.J. MKP-7, a negative regulator of JNK, regulates VCAM-1 expression through IRF-1. *Cell Signal.* 2012; 24:866-872.
56. Wang B.J., Sheu H.M., Guo Y.L., Lee Y.H., Lai C.S., Pan M.H., Wang Y.J. Hexavalent chromium induced ROS formation, Akt, NF-kappaB, and MAPK activation, and TNF-alpha and IL-1alpha production in keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 2010; 198:216-224.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

### a) Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Swoją działalność naukową rozpoczęłam na IV roku studiów włączając się do prac doświadczalnych prowadzonych w Zakładzie Biologii Molekularnej w Instytucie Mikrobiologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej. Pracę magisterską pt. „Ekspresja rybosomalnego P0 w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*” wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Nikodema Grankowskiego. Uzyskałam ocenę bardzo dobrą oraz solidne podstawy do dalszej pracy naukowej.

Od 2001 roku, po ukończeniu studiów, rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Biochemii Akademii Medycznej (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny), kierowanej przez prof. dr hab. Annę Barańczyk-Kuźmę. Od początku swojej działalności naukowej związana jestem z Zespołem prof. dr hab. Iwonny Rahden-Staroń, do którego dołączyłam po rozpoczęciu pracy w Zakładzie. W tym czasie Zespół prowadził badania finansowane przez Unię Europejską we współpracy z prof. dr hab. Małgorzatą Zdzenicką z Zakładu Genetyki Radiacyjnej i Mutagenety Chemicznej na Uniwersytecie w Leiden (Holandia). W ramach tej współpracy badałam udział topoisomerazy DNA w naprawie uszkodzeń DNA w komórkach wrażliwych na promieniowanie jonizujące w układzie *in vitro*. Komórki zastosowane do badań okazały się bardzo interesujące, gdyż dodatkowo obok wielu mutacji posiadały uszkodzony gen *Brca2*, jeden z genów zaangażowanych w indukcję nowotworu sutka. Badania przeprowadzono na komórkach fibroblastów chomika chińskiego: (i) VC8 z defektywnym genem supresorowym *Brca2*, wykazujących zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące a także obniżoną szybkość naprawy uszkodzeń podwójnych nici DNA, (ii) komórkach VC8 z uzupełnionym mysim genem *Brca2*, (iii) komórkach VC8 uzupełnionych ludzkim chromosomem 13 zawierającym gen *BRCA2*, (iiii) komórkach V79 - typ dziki. Nasze badania wykazały udział topoisomerazy I w naprawie uszkodzeń DNA. Topoisomeraza I izolowana z komórek VC8 była 10-krotnie wrażliwsza na działanie

kamptotecyny (inhibitor topoiizomerazy I), ponadto wykazywała 4-krotnie niższą aktywność relaksacyjną w porównaniu do enzymu izolowanego z komórek V79. Wykazaliśmy również, że w komórkach z ludzkim lub mysim genem Brca2 aktywność topoiizomerazy I była zbliżona do aktywność obserwowanej w komórkach dzikich oraz wykazywała znacznie mniejszą wrażliwość na kamptotecynę w porównaniu do komórek VC8. Różnice w aktywności topoiizomerazy oraz wrażliwości na kamptotecynę w badanych komórkach nie wynikały z różnicy w poziomie ekspresji enzymu. Obniżona aktywność i wyższa wrażliwość enzymu w komórkach VC8 mogła wynikać z postranslacyjnych modyfikacji lub oddziaływania z innymi białkami. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 2003 roku w *Acta Biochimica Polonica* [O1], oraz przedstawione na dwóch zjazdach (międzynarodowym [K2] i krajowym [K1]). W 2004 roku publikacja ta została nagrodzona Nagrodą Naukową zespołową III stopnia JMR prof. dr hab. Janusza Piekarczyka.

W następnych latach nasz zespół skoncentrował się na poznaniu epigenetycznych mechanizmów działania pestycydów z grupy ditiokarbaminianów. W swoich badaniach zajęłam się skutkami zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej wywołanymi działaniem tych związków. Na początku ważnym pytaniem było czy dochodzi do zmian w poziomie peroksydacji lipidów i białek komórkowych oraz jaka jest rola enzymów antyoksydacyjnych w obronie komórki przed skutkami działania pestycydów. Moje zaangażowane w ten temat badawczy było poprzedzone napisaniem pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Medycyna, Dydaktyka i Wychowanie* pt. „Epigenetyczne mechanizmy kancerogenezy” [P1]. Praca ta stanowiła wstęp do moich głównych badań mających na celu ocenę zagrożenia zdrowia człowieka wynikającym z powszechnej obecności pestycydów w środowisku. Szybki rozwój rolnictwa i coraz większe zapotrzebowanie na żywność sprawiają, że jesteśmy narażeni na działanie pozostałości pestycydów w żywności, ale także w wodzie, glebie czy powietrzu. Ponadto temat ten nie dotyczy tylko ludzi, zwierzęta również są narażone na kontakt z pozostałościami pestycydów obecnymi w środowisku ich życia oraz pokarmie. Swoją uwagę skupiłam na dwóch powszechnie stosowanych pestycydach: tiuramie (TMTD) i jego analogu - disulfiramie. Oba związki, poza zastosowaniem w rolnictwie jako fungicydy, znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym (TMTD – m.in. środek przeciwświerzbowy, disulfiram – Antabus - lek stosowany w terapii uzależnienia od alkoholu). Tiuram znalazł również zastosowanie w przemyśle gumowym, m.in. jako przyspieszacz wulkanizacji przy produkcji niektórych wyrobów gumowych. Ponadto, jest on szczególnie interesującym związkiem ze względu na swoje działanie alergizujące, wywołuje

m.in. alergiczne atopowe zapalenie skóry. W badaniach dotyczących cytotoksyczności obu pestycydów skupiłam się na ich wpływie na parametry związane z układem oksydoredukcyjnym komórek. Ponadto zbadalam czy śmierć komórek narażonych na działanie obu związków zachodzi na drodze apoptozy czy nekrozy. Tę część pracy wykonałam we współpracy z dr Tomaszem Grzelą i jego zespołem z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii AM obecnie WUM. Badania prowadziłam na komórkach fibroblastów chomika chińskiego V79, (i) w układzie kontrolnym oraz (ii) w komórkach w których podwyższono poziom endogennego glutationu w wyniku preinkubacji z NAC (*N*-acetylo-cysteina; aktywator syntezy glutationu) oraz (iii) w komórkach z obniżonym poziomem endogennego glutationu w wyniku preinkubacji z BSO (butioninosulfoksymina; inhibitor syntezy glutationu). Wykazałam, że związkiem o wyższej cytotoksyczności jest tiuram. Jednocześnie oba pestycydy indukowały w komórce stres oksydacyjny. Świadczył o tym spadek wartości stosunku GSH/GSSG. Towarzyszyły temu zmiany oksydacyjne w białkach komórkowych (wzrost poziomu grup karbonylowych - PC) i lipidach komórkowych (wzrost poziomu TBARS). Oba związki wpływały również na aktywność najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych (SOD1 i SOD2, CAT, GR i Se-GPx oraz non-Se-GPx). Tę część pracy wykonałam we współpracy z Zespołem prof. dr hab. Hanny Czeczot z Katedry i Zakładu Biochemii IWL. Tiuram znacząco podwyższał aktywność SOD1 i obniżał aktywność CAT. Ponadto tiuram podwyższał aktywność GR i aktywność Se-GPx, natomiast hamował aktywność non-Se-GPx. Wyniki uzyskane dla disulfiramu wskazywały, że jego cytotoksyczne działanie jest raczej związane z wpływem na mitochondria. Podwyższał on aktywność mitochondrialnej dysmutazy SOD2, oraz podwyższał aktywność CAT. Disulfiram, podobnie jak tiuram, podwyższał aktywność GR i obniżał aktywność non-Se-GPx. Ponadto wykazałam, że cytotoksyczność obu związków jest związana z poziomem endogennego GSH. Preinkubacja komórek z NAC wpływała bowiem ochronnie na powyższe parametry, natomiast obniżony poziom GSH, w skutek działania BSO, pogłębiał efekty cytotoksycznego działania obu związków. Badania jednoznacznie wykazały, że śmierć komórek pod wpływem tiuramu zachodzi na drodze apoptozy, natomiast pod wpływem disulfiramu jest to późna apoptoza/nekroza. Preinkubacja komórek z NAC znosiła cytotoksyczny efekt działania obu związków. Wyniki zostały opublikowane w 5 recenzowanych czasopismach [O2-O6], oraz przedstawione na dwóch zjazdach krajowych [K3,K5] i pięciu międzynarodowych [K4,K6-K8,K11]. Stały się również podstawą mojej rozprawy doktorskiej pt „Ditiokarbaminiany jako induktory stresu oksydacyjnego w komórce”. Obrona odbyła się na I Wydziale Lekarskim WUM w 2009r. Badania których wyniki zostały umieszczone w mojej rozprawie doktorskiej

były finansowane w ramach Projektu Młodego Badacza nr 1WK/WB4/05 pt. „Epigenetyczne mechanizmy działania związków chemicznych z grupy ditiokarbaminianów” realizowanego w latach 2005-2006 oraz projektu promotorskiego 1WK/WP2/07 pt. „Wpływ ditiokarbaminianów na wybrane parametry stresu oksydacyjnego” realizowanego w latach 2007-2009.

Mój dorobek przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 4 publikacje oryginalne, 1 artykuł przeglądowy oraz 11 komunikatów prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Całkowity **IF** artykułów opublikowanych przez obronę pracy doktorskiej wynosi **5,11** a ich wartość odpowiada **57** punktom MNiSW.

b) Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

W następnych latach nasz zespół kontynuował badania związane z mechanizmami cytotoksycznego działania tiuramu (TMTD). Swoje badania oparliśmy na tezie, że narażenie na tiuram, głównie w miejscu pracy jest przyczyną alergicznego kontaktowego zapalenia skóry (ACD). Podstawą do naszych badań były wcześniejsze wyniki, które jednoznacznie wskazywały, że tiuram zaburza układ redoks w komórkach i indukuje stres oksydacyjny. Mimo, że podstawy ACD są coraz lepiej poznane, to molekularne mechanizmy towarzyszące powstawaniu odpowiedzi zapalnej w fazie efektorowej uczulenia wywołanego działaniem tiuramu nie były w pełni wyjaśnione. Zagadnienie to okazało się na tyle interesujące i mało poznane, że zostało finansowane przez KBN w ramach grantu o tytule „Zmiany parametrów stanu zapalnego wywołanego działaniem disiarczku czterometylotiuramu (TMTD) – związku prowadzącego do powstania wyprysku kontaktowego alergicznego; wpływ preparatu zawierającego selen w modelu *in vitro*” o nr 1WK/3E144 (N N402 210235), którego kierownikiem była dr hab. Iwonna Rahden-Staroń. Podjęliśmy również współpracę z dr Piotrem Suchockim z Zakładu Bioanalizy i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego WUM, który syntetyzował Selol (SeIV). Projekt dotyczył dwóch zagadnień: (i) wpływu disiarczku czterometylotiuramu (TMTD) wywołującego alergiczne kontaktowe zapalenie skóry na kaskadę zjawisk zapalnych w wyprysku, (ii) przeciwzapalnego oddziaływania preparatu zawierającego selen (Selol) na komórki stymulowane tiuramem *in vitro*. Badania prowadzono na linii komórkowej makrofagów mysich (RAW 264.7) oraz linii ludzkich komórek nabłonka naczyń włosowatych skóry (HMEC-1). Wykazaliśmy, że tiuram indukował w komórkach RAW 264.7 spadek stosunku stężeń GSH/GSSG oraz wzrost

poziomu  $H_2O_2$ . Ponadto działając jako pro-oksydant, aktywował jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B w obu badanych liniach. Konsekwencją aktywacji NF- $\kappa$ B był wzrost wydzielania tlenku azotu (NO) przez komórki RAW 264.7, a także obserwowany w komórkach HMEC-1 wzrost ekspresji cząsteczki adhezji komórkowej ICAM-1, który odzwierciedlał natężenie procesu zapalnego w śródbłonku naczyń. Równocześnie stwierdziliśmy, że tiuram obniżał ekspresję cząsteczek adhezyjnych VCAM-1 oraz w mniejszym stopniu cząsteczki PECAM-1, co może wskazywać na czynny udział tiuramu i/lub jego metabolitów w złożonych procesach zachodzących w komórce. Wyniki naszych badań jednoznacznie wskazywały, że tiuram wywołuje w komórce powstanie zmian charakterystycznych dla stanu zapalnego. Można więc założyć, że w odpowiedzi alergicznej na TMTD bierze udział element stanu zapalnego. W badaniach dotyczących działania Selolu, uzyskaliśmy interesujące wyniki. Zgodnie z danymi naukowymi Selol wykazywał działanie pro-oksydacyjne i generował w badanych komórkach wzrost stężenia  $H_2O_2$ . Podany razem z czynnikami prozapalnymi LPS lub TNF- $\alpha$  wykazywał dwojaki charakter działania. Selol zmniejszał stopień aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, ekspresję iNOS na poziomie białka, wydzielanie NO, PGE2 w komórkach makrofagów. Z drugiej strony wzmacniał zmiany odzwierciedlające natężenie procesu zapalnego w śródbłonku naczyń (wzrost ekspresję ICAM-1 i spadek ekspresji VCAM-1). Podany razem z tiuramem osłabiał aktywację NF- $\kappa$ B, zmniejszał ilość wydzielanego NO, ale zwiększał ekspresję ICAM-1. Wyniki tych badań zostały przedstawione na zjazdach krajowych [K12-K13, K15, K19] oraz międzynarodowym [K16] oraz opublikowane w monografii pokonferencyjnej [O8] i pracy oryginalnej [O9]. Część eksperymentów została wykonana w ramach współpracy z prof. dr hab. Katarzyną Woźniak i prof. dr hab. Cezarym Kowalewskim z Kliniki Dermatologii i Immunodermatologii WUM oraz z zespołem prof. dr hab. Nadzieji Dreli z Zakładu Immunologii UW. W ramach współpracy z dr hab. Piotrem Suchockim, równolegle prowadziłam i nadal kontynuuję badania związane z wpływem Selolu na komórki raka prostaty PC3. Komórki PC3 są odmianą komórek hormono-niewrażliwych i cechują się wysoką inwazyjnością. Istotną cechą tych komórek decydującą o ich inwazyjności jest fakt, że nie wchodzi one na szlak apoptozy. Badania te realizowałam w ramach Projektu Młodego Badacza „Ocena działania Se (IV) (Selol) w komórkach raka prostaty oraz w stanie zapalnym wywołanym działaniem tiuramu” (1WK/PM11/12), którego byłam kierownikiem. Projekt ten realizowany był w latach 2011-2012. Badania prowadziłam we współpracy z dr Joanną Trzeińską-Danielewicz z Zakładu Biologii Molekularnej UW oraz z wymienionymi wcześniej: Kliniką Dermatologii i Immunodermatologii WUM oraz Zakładem Immunologii

UW. Wyniki naszych badań wskazują że Selol w komórkach PC3 wykazuje działanie prooksydacyjne, i aktywuje czynnik NF- $\kappa$ B oraz wpływa na ekspresję cząstek adhezyjnych (ICAM-1, ALCAM-1), których zmiany ekspresji na powierzchni komórek decydują o procesie przerzutowania. Jednocześnie przeprowadziliśmy badania, których wstępne wyniki wskazują że Selol wykazuje działanie antyapoptotyczne. W komórkach w których zaindukowano zewnątrzkomórkowy szlak apoptozy za pomocą białka TRAIL (ang. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis - Inducing Ligand) oraz poddano działaniu Selolu zaobserwowaliśmy istotny spadek liczby komórek apoptotycznych. Warto podkreślić jest również to, że wszystkie doświadczenia prowadzone na komórkach PC3 wykonaliśmy w 3 stężeniach tlenu: 21%, 10% (normoksja tkankowa) oraz 1% (hipoksja – odzwierciedla stężenie tlenu w komórkach guza). Badania prowadziliśmy w kolejnych latach w ramach projektu 1WK/PM11/12 „Aktywność biologiczna SELOLU – preparatu zawierającego selen (IV) w komórkach PC3 raka prostaty. Badania te są kontynuowane do chwili obecnej. Zaplanowane mamy również doświadczenia, w których ocenimy wpływ Selolu na inny typ komórek raka prostaty – LNCap. Komórki te są hormonowrażliwe i charakteryzują się niższą inwazyjnością. Wstępne wyniki naszych badań zostały przedstawione na dwóch zjazdach krajowych [K17,K18]. Po zakończeniu wszystkich badań, wyniki zostaną opublikowane w czasopismach recenzowanych.

Prowadząc powyższe badania, które stanowią trzon mojej pracy w Katedrze i Zakładzie Biochemii WUM, w latach 2013-2015 zespół nasz współpracował z zespołem prof. dr hab. Jadwigi Turło z Katedry i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej WUM. W ramach tej współpracy badaliśmy cytotoksyczne i antyproliferacyjne właściwości selenowanych ekstraktów izolowanych z grzyba Shitake *Lentinula edodes*. Doświadczenia wykonywane były w ramach projektu „Potencjalne przeciwnowotworowe działanie wysokoselenowanych ekstraktów z grzybni *Lentinula edodes* w komórkach raka prostaty” nr 1WK/PM11D/15. Wyniki opublikowano w czasopiśmie International Journal of Medicinal Mushrooms [O10]. Od 2018 roku współpracuję z dr Aleksandrą Drzewiecką z Instytutu Fizyki PAN. W ramach tej współpracy badam cytotoksyczne właściwości kompleksów kwasu MPCA (herbicyd) z metalami ciężkimi.

Mój dorobek po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 11 publikacji oryginalnych, 2 artykuły przeglądowe oraz 8 komunikatów prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Całkowity IF artykułów opublikowanych po obronie pracy doktorskiej wynosi **25,62** a ich wartość odpowiada **263** punktom MNiSW.

## 6. Pozostałe publikacje oryginalne

**O1.** Rahden-Staroń I., Szumiło M., **Grosicka E.**, Kraakman van der Zwet M., Zdzienicka MZ.: Defective Brca2 influences topoisomerase I activity in mammalian cells. *Acta Biochim. Pol.*, 2003; 50(1):139-44.

**IF 0.629; Punkty MNiSW 8**

**O2.** **Grosicka E.**, Czczot H., Skrzycki M., Szumiło M., Podsiad M., Rahden-Staroń I.: Wpływ tiuramu i disulfiramu na stan redox w komórkach fibroblastów płuca chomika chińskiego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2006, 4: 383-390.

**Punkty MNiSW 4**

**O3.** **Grosicka E.**, Sadurska B., Szumiło M., Grzela T., Łazarczyk P., Niderla-Bielińska J., Rahden-Staroń I.: Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in Chinese hamster fibroblasts. *Int. Immunopharmacol.*, 2005; 5(13-14):1945-56.

**IF 2.008; Punkty MNiSW 15**

**O4.** **Grosicka-Maciąg E.**, Kurpios D., Czczot H., Szumiło M., Skrzycki M., Suchocki P., Rahden-Staroń I.: Changes in antioxidant defense systems induced by thiram in V79 Chinese hamster fibroblasts. *Toxicol. In Vitro.*, 2008; 22(1): 28-35.

**IF 2.473; Punkty MNiSW 27**

**O5.** Kurpios-Piec D., **Grosicka-Maciąg E.**, Czczot H., Szumiło M., Grzela T., Rahden-Staroń I.: Ochronny wpływ N-acetylocysteiny na prooksydacyjne i proapoptotyczne działanie tiuramu w komórkach V79 chomika chińskiego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010; 43(3): 354-361.

**Punkty MNiSW 6**

**O6.** **Grosicka-Maciąg E.**, Kurpios-Piec D., Grzela T., Czczot H., Skrzycki M., Szumiło M., Rahden-Staroń I.: Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against disulfiram-induced oxidative stress and apoptosis in V79 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010; 248(3): 210-6.

**IF 3.993; Punkty MNiSW 32**



**O7. Grosicka-Maciąg E.,** Kurpios-Piec D., Szumiło M., Rahden-Staroń I.: Ochronny wpływ N-acetylocysteiny na prooksydacyjne i proapoptotyczne działanie manebu w komórkach V79 chomika chińskiego – Monografia - Konferencja szkoleniowo-naukowa PTTox „Toksykologia w służbie publicznej” Warszawa 2011 str.117-125

**O8.** Kurpios-Piec D., **Grosicka-Maciąg E.,** Kiernożek E., Szumiło M., Rahden-Staroń I Wpływ tiuramu na wybrane parametry stanu zapalnego w układzie in vitro. Monografia – Konferencja szkoleniowo-naukowa PTTox „Toksykologia w służbie publicznej” Warszawa 2011 str 161-170

**O9.** Kurpios-Piec D, **Grosicka-Maciąg E,** Woźniak K, Kowalewski C, Kiernożek E, Szumiło M, Rahden-Staroń I. Thiram activates NF-kappaB and enhances ICAM-1 expression in human microvascular endothelial HMEC-1 cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2015; 118:82-9.  
**IF 2.388; Punkty MNiSW 30**

**O10.** Turło J, Klimaszewska M, Górka S, Dawidowski M, Podsadni P, Orzechowska E, Szczepańska A, Kurpios-Piec D, **Grosicka-Maciąg E,** Rahden-Staroń I. Selective Cytotoxic Activity of Se-methyl-seleno-L-cysteine and Se-polysaccharide Containing Extracts from *Lentinula edodes*. *Int. J. Med. Mushrooms.* 2017; 19(8): 709-716.

**IF 1.211; Punkty MNiSW 20**

## **7. Prace przeglądowe**

**P1.** Rahden-Staroń I, **Grosicka E.** Epigenetyczne mechanizmy kancerogenezy. *Medycyna, Dydaktyka, Wychowanie.* 2006, XXXVIII (4): 20-26.

**Punkty MNiSW 6**

**P2. \*Grosicka – Maciąg E.,** Szumiło M., Kurpios Piec D., Rahden-Staroń I. Biomedical effects of selenium in a human organism. *J. Elem.,* 2017; 22: 1269-1284

**IF 0.684; Punkty MNiSW 15**

\* – prace, w których byłam autorem korespondencyjnym

## 8. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

**K1. Grosicka E.,** Rahden-Staroń I., Szumiło M. Zmiany wrażliwości topoizomerazy I na kamptotecynę w komórkach mutantów chomika chińskiego nadwrażliwych na promieniowanie jonizujące zawierających ludzki lub mysi gen BRCA2. XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław 2002

**K2. Grosicka E.,** Szumiło M., Kraakman-van der Zwet M., Zdzienicka M.Z., Rahden-Staroń I. Defective Brca2 influences topoisomerase I activity in V79 Chinese hamster cells. 12th International symposium „Molecular and Physiological aspects of regulatory processes of the organism” Kraków, 5-6.06. 2003

**K3. Grosicka E.,** Sadurska B., Szumiło M., Rahden-Starin I. Changes in prooxidative state within V79 cells induced by thiram *in vitro*. 38<sup>th</sup> Meeting of the Polish Biochemical Society, Gdańsk 16-20.09. 2003

**K4.** Rahden-Staroń I., **Grosicka E.,** Sadurska B., Grzela T., Niderla J., Łazarczyk M., Szumiło M. Protein oxidation and induced apoptosis in thiram-treated Chinese hamster fibroblasts: redox related processes. 29<sup>th</sup> Meeting of the federation of the European Biochemical Societies, Warszawa 26.06-1.07. 2004

**K5. Grosicka E.,** Skrzycki M., Podsiad M, Czczot H, Rahden-Staroń I. Changes in antioxidant system induced by thiram in V79 chinese hamster fibroblasts. 40<sup>th</sup> Meeting of the Polish Biochemical Society, Lublin 19-23.09. 2005

**K6. Grosicka E.,** Skrzycki M., Czczot H., Grzela T., Podsiad M., Szumiło M., Rahden-Staroń I. Changes in antioxidant system induced by dithiocarbamates in lung fibroblasts. 15<sup>th</sup> International Symposium “Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”, Kraków, 1-2.06.2006

**K7. Grosicka E.,** Szumiło M., Rahden-Staroń I., Changes of oxidoreductive status by thiram, an inducer of allergic contact dermatitis. 9<sup>th</sup> CEEPUS – Biomedicine Students Council Summer University, Chorwacja, Zadar, 24-31.07.2006

**K8. Grosicka-Maciąg E.**, Kurpios D., Czczot H., Szumiło M., Skrzycki M., Podsiad M., Grzela T., Rahden-Staron I. Prooxidative and proapoptotic properties of disulfiram. 16<sup>th</sup> International Symposium „Molecular and Physiological Aspects of regulatory processes of the organism”, Kraków, 4-6.06.2007

**K9.** Kurpios-Piec D., **Grosicka-Maciąg E.**, Szumiło M., Czczot H., Rahden-Staron I. Dithiocarbamate induced cytotoxicity in Chinese hamster fibroblasts *in vitro*. An American Association for Cancer Research International Conference: Advances in Cancer Research: from the laboratory to the Clinic, Jordania, 16-19.03.2008

**K10.** Kurpios-Piec D., **Grosicka-Maciąg E.**, Skrzycki M., Czczot H., Szumiło M., Rahden-Staron I. Changes in antioxidant defense systems induced by diethyldithiocarbamate (DETC) in V79 Chinese hamster fibroblasts. 10<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 39th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), 18th Annual Meeting of the Italian Environmental Mutagen Society (SIMA). The Renaissance of Environmental Mutagenesis, Włochy, Florencja, 20-25.08. 2009

**K11.** Grosicka-Maciąg E, Kurpios-Piec D, Skrzycki M, Czczot H, Szumiło M, Rahden-Staron I. Disulfiram-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster fibroblasts. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 39th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), 18th Annual Meeting of the Italian Environmental Mutagen Society (SIMA). The Renaissance of Environmental Mutagenesis, Włochy, Florencja, 20-25.08. 2009

**K12.** Kurpios-Piec D., **Grosicka-Maciąg E.**, Kiernozek E., Woźniak K., Kowalewski C., Szumiło M., Rahden-Staron I. Thiram affects NF- $\kappa$ B and selected cell adhesion molecules in human microvascular endothelial cell (HMEC-1). II Ogólnopolski Kongres Biochemii i Biologii Komórki, Kraków 5-9.09.2011

**K13. Grosicka-Maciąg E.**, Kurpios-Piec D., Szumiło M., Suchocki P., Rahden-Staron I. Organo-selenium compound Selol attenuates pro-inflammatory response in murine macrophages induced by LPS. II Ogólnopolski Kongres Biochemii i Biologii Komórki, Kraków 5-9.09.2011

**K14. Grosicka-Maciąg E.,** Kurpios-Piec D., Szumiło M., Rahden-Staroń I. Protective effect of N-acetylo-L-cysteine against maneb induced oxidative and apoptotic injury in Chinese hamster V79 cells. Konferencja Szkoleniowo–Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego “Toksykologia w służbie publicznej”, Jurata, 19-22.09.2011

**K15.** Kurpios-Piec D., **Grosicka-Maciąg E.,** Kiernożek E., Szumiło M., Rahden-Staroń I. Wpływ tiuramu na wybrane parametry stanu zapalnego w układzie *in vitro*. Konferencja Szkoleniowo–Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego “Toksykologia w służbie publicznej”, Jurata, 19-22.09.2011

**K16.** Kurpios-Piec D., **Grosicka-Maciąg E.,** Woźniak K., Kowalewski C., Szumiło M., Suchocki P., Rahden-Staroń I. Selol attenuates pro-inflammatory parameters induced by LPS in mouse RAW 264.7 macrophages. European Environmental Mutagen Society, Annual Meeting, Warszawa, 16-20.09.2012

**K17.** Dółka T., **Grosicka-Maciąg E.,** Kurpios-Piec D., Kiernożek E., Suchocki P., Szumiło M., Rahden-Staroń I. Semi-synthetic organo-selenium compound Selol affects apoptosis and CAMs expression in prostate cancer PC3 cells. 1<sup>st</sup> Congress of the Polish Biochemistry Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics, Warszawa, 9-12.09. 2014

**K18.** Kurpios-Piec D., **Grosicka-Maciąg E.,** Orzechowska E., Kiernożek E., Suchocki P., Szumiło M., Rahden-Staroń I. Selol –organo-selenium compound affects apoptosis and CAMs expression in prostate cancer cells. EMBO Young Scientists Forum, Warszawa, 2-3.07.2015

**K19. Grosicka-Maciąg E.,** Kurpios-Piec D., Kiernożek E., Woźniak K., Kowalewski C., Szumiło M., Nadziejka D., Suchocki P., Rahden-Staroń I. Se(IV) obecny w Selolu wywołuje w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych skóry zmiany charakterystyczne dla stanu zapalnego. Konferencja Szkoleniowo–Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego ”Różne oblicza toksykologii”, Puławy, 19-22.09.2017

## 9. Współpraca naukowa

### a) z jednostkami WUM:

- Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny – dr hab. Tomasz Grzela – w zakresie badania apoptotycznych właściwości ditiokarbaminanów ; 2005-2007 r
- Klinika Dermatologii i Immunodermatologii, Wydział Lekarsko – Dentystyczny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego; prof. dr hab. Katarzyna Woźniak, prof. dr hab. Cezary Kowalewski – w zakresie prowadzenia badań immunocytochemicznych; 2008 – 2017 r.
- Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny; prof. dr hab. Jadwiga Turło - w zakresie badania antyproliferacyjnych właściwości ekstraktów z grzybni *L. edodes.*; 2013 – 2015 r.
- Zakład Bioanalizy i Analizy Leków, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny; dr hab. Piotr Suchocki – Współpraca w ramach realizowanych badań nad Selolem finansowanych przez MNiSW; od 2007 r. do chwili obecnej

### b) międzyuczelniana

- Zakład Biologii Molekularnej, Uniwersytet Warszawski; dr Joanna Trzcńska-Danielewicz – w zakresie badań apoptotycznych właściwości Selolu i białka TRAIL; 2011 r. do chwili obecnej
- Zakład Immunologii, Uniwersytet Warszawski; prof. dr hab. Nadzieja Dreła, dr Ewelina Kiernożek – w zakresie badania ekspresji cząstek adhezyjnych i apoptozy na cytometrze przepływowym; od 2008 r. do chwili obecnej
- Instytut Fizyki PAN w Warszawie; dr Aleksandra Drzewiecka-Antonik – w zakresie badania biologicznych właściwości kompleksów kwasu MPCA z metalami ciężkimi; od 2018 r. do chwili obecnej

## 10. Udział w projektach badawczych

W trakcie dotychczasowej pracy naukowej uczestniczyłam lub nadal uczestniczę w realizacji następujących projektów i grantów badawczych:

### Projekty finansowane przez AM/WUM

- 2005-2006 r. Projekt Młodego Badacza, Akademia Medyczna; „Epigenetyczne mechanizmy działania związków chemicznych z grupy ditiokarbaminianów”, WK/WB4/05; **kierownik projektu**
- 2007-2009 r. Projekt promotorski, Akademia Medyczna; “Wpływ ditiokarbaminianów na wybrane parametry stresu oksydacyjnego” 1WK/WB4/2007; **kierownik projektu**
- 2011-2012 r. Projekt Młodego Badacza, Warszawski Uniwersytet Medyczny; “Ocena działania selenu (IV) (SELOL) w komórkach raka prostaty oraz w stanie zapalnym wywołanym tiuramem” 1WK/PM11/11; **kierownik projektu**
- 2012 –2013 r. Projekt Młodego Badacza, Warszawski Uniwersytet Medyczny; „Aktywność biologiczna SELOLU – preparatu zawierającego selen (IV) w komórkach PC3 raka prostaty. 1WK/PM11/12; **wykonawca**
- 2014-2015 r. Projekt Młodego badacza, Warszawski Uniwersytet Medyczny, „Potencjalne przeciwnowotworowe działanie wysokoselenowanych ekstraktów z grzybn *Lentinula edodes* w komórkach raka prostaty, WK/PM11D/15; **wykonawca**

### Granty MNiSW

- 2008-2011 r. Grant MNiSW, Zmiany parametrów stanu zapalnego wywołanego działaniem disiarczku czterometylotiuamu (TMTD) – związku prowadzącego do powstania wyprysku kontaktowego alergicznego; wpływ preparatu zawierającego selen w modelu *in vitro*” NN402 210235, MNiSW, **wykonawca**

## 11. Nagrody za działalność naukową

Jestem laureatką Nagród Naukowych JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach:

- 2014 r. - **nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia** za współautorstwo cyklu prac dotyczących antyoksydacyjnych i antymutagennych mechanizmów obrony komórek przed stresem oksydacyjnym
- 2013 r. - **nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia** za współautorstwo prac oryginalnych w zakresie badań mechanizmów cytotoksyczności, stresu oksydacyjnego oraz apoptozy wywołanych działaniem leku i pestycydu z grupy ditiokarbaminianów
- 2009 r. - **nagroda zespołowa naukowa drugiego stopnia** za współautorstwo pracy eksperymentalnej pt: „Changes in antioxidant defense systems induced by thiram in V79 Chinese hamster fibroblasts”
- 2006 r. – **nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia** za współautorstwo pracy w „International Immunopharmacology” opisującej zmiany parametrów stresu oksydacyjnego i indukcje apoptozy pod wpływem tiuramu
- 2004 r. – **nagroda zespołowa naukowa trzeciego stopnia** za współautorstwo pracy w języku angielskim dotyczącej badań aktywności topoizomerazy DNA I w hodowli komórek chomika chińskiego V79 z uszkodzonym genem Brca2

## **12. Członkostwo w towarzystwach naukowych**

2003- 2005 r. - Członek Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Od 2018 r. roku jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego.

## **13. Działalność organizacyjna**

- członek Komisji Uczelnianego Egzaminu Wstępnego z chemii i biologii (2011r)
- członek Komisji Skrutacyjnej w Wyborach Elektorów (2004 r., 2016 r.,)

## **14. Recenzje prac naukowych**

Byłam recenzentem następujących prac:

Diagnostyka Laboratoryjna (1); Biomedicine & Pharmacotherapy (1)

## **15. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych**

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 15 prac oryginalnych (11 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym 11 w czasopiśmie znajdujących się na liście *Journal Citation Reports (JCR)*. W 9 pracach byłam autorem pierwszym lub/i korespondencyjnym
- 3 prace przeglądowe, z czego 2 zostały opublikowane w czasopiśmie indeksowanym w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*. W 2 pracach byłam autorem pierwszym i korespondencyjnym
- 19 streszczeń z doniesień zaprezentowanych na konferencjach naukowych
- udział w 5 (w 3 byłam kierownikiem projektu) projektach badawczych finansowanych przez WUM i jednym finansowanym przez MNiSW (wykonawca)
- sumaryczny współczynnik *Impact Factor* według listy *JCR* zgodnie z rokiem opublikowania: 30.73; łączna punktacja MNiSW: 320
- liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy *Web of Science™ Core Collection*: 100
- index Hirscha (*h-index*) według *Web of Science™ Core Collection*: 6

## **16. Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę**

### a) Działalność dydaktyczna

- od 11.2001 r. prowadzenie zajęć ćwiczeniowych i seminaryjnych z przedmiotu „Biochemia z elementami chemii” dla studentów II roku I Wydziału Lekarskiego i Wydziału Lekarsko-Dentystycznego
- od 2002-2006 r. prowadzenie zajęć ćwiczeniowych i seminaryjnych ze studentami Wydziału Nauki o Zdrowiu
- od 2009 r. prowadzenie zajęć ćwiczeniowych z Biochemii dla studentów II roku Oddziału English Division - Medicine oraz English Dentistry Division
- od 2017 r. organizacja i prowadzenie zajęć ćwiczeniowych, seminaryjnych oraz wykładów z biochemii dla studentów II roku Oddziału English Division – Medicine oraz English Dentistry Division
- od 2017 r. występuję jako przedstawiciel Zakładu na Radzie Pedagogicznej Oddziału Nauczania w Języku Angielskim



- od 2017 r. przygotowanie egzaminu testowego i kolokwium testowych z biochemii dla studentów drugiego roku Oddziału English Division – Medicine oraz English Dentistry Division

- 2017 r. przygotowanie skryptu do ćwiczeń laboratoryjnych z biochemii dla studentów II roku Wydziału Lekarskiego oraz studentów Oddziału English Division – Medicine oraz English Dentistry Division

b) Działalność popularyzująca naukę

- 24-31.07.2006 r. – wystąpienie ustne „Changes of oxidoreductive status by thiram, an inducer of allergic contact dermatitis” w czasie szkoły letniej na 9th CEEPUS – Biomedicine Students Council Summer University, Chorwacja, Zadar

- 30.05.2011 r. - wystąpienie ustne „Ochronny wpływ N-acetylocysteiny na prooksydacyjne i proapoptotyczne działanie związków z grupy ditiokarbaminianów na VII Konferencji Naukowej I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego”

- 2005-2011 r - opieka merytoryczna nad pracami badawczymi studentów z Indonezji, Japonii, Hiszpanii, Chorwacji w ramach wymiany ERASMUS/SOCRATES

- 21.10.2016 r. – wykład „Dwa oblicza selenu” na sesji plenarnej z okazji Jubileuszu 100-lecia Katedry i Zakładu Biochemii

*Emilia Grosickiej-Maciąg*