

Załącznik nr 2
do wniosku o przeprowadzenie
postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

1. IMIĘ I NAZWISKO: Mariola Śliwińska-Mossoń

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE:

- ❖ 2003 r. tytuł magistra analityki medycznej (dyplom z wyróżnieniem, Promotor pracy magisterskiej – Prof. dr hab. Halina Milnerowicz)
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- ❖ 2003 r. uzyskanie prawa wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego nr 31/2003, nadany przez Prezesa Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych
- ❖ 2005 r. tytuł inżyniera technologii żywności i żywienia człowieka,
Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- ❖ 2007 r. dyplom ukończenia studiów doktoranckich,
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- ❖ 2009 r. stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych w zakresie biochemii klinicznej i toksykologicznej, uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Zaburzenie funkcji trzustki u pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym i środowiskowo narażonych na dym papierosowy” (Promotor – Prof. dr hab. Halina Milnerowicz)
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- ❖ 2012 r. dyplom i tytuł menedżera projektu badawczo-rozwojowego,
Studia podyplomowe na kierunku: Menedżer projektu badawczo-rozwojowego w Wyższej Szkole Bankowej we Wrocławiu.

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

Od ukończenia studiów doktoranckich do chwili obecnej jestem pracownikiem Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej we Wrocławiu, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (do 2009 roku: Akademia Medyczna we Wrocławiu).

❖ 1.10.2007 r. do 30.09. 2009 r.

✓ Asystent w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych

❖ 1.10.2009 r. do nadal

✓ Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych.

4. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE, WYNIKAJĄCE Z ART.16 UST.2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR. 65, POZ. 595 ZE ZM.)

4.1. Cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

„OCENA BIOMARKERÓW FUNKCJI TRZUSTKI U PACJENTÓW Z PRZEWLEKŁYMI SCHORZENIAMI TEGO NARZĄDU”

(łącznie: IF: **14.898**; łącznie punktacja: MNiSW/KBN: **160**)

❖ **M. Śliwińska-Mossoń***, H. Milnerowicz, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, J. Rabczyński †. The effect of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2012 Vol.12 no.4; s.295-304.

IF: 2.043; MNiSW/KBN: 25

Wkład habilitanta: koncepcja pracy, udział w wykonywaniu analiz ilościowych interleukiny-6 (IL-6) w surowicy i antyoksydantów: miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej (Cu/Zn SOD) i glutationowej peroksydazy (GPx) w płynach trzustkowych oraz immunohistochemicznej lokalizacji: metalotioneiny1/2 (MT1/2), IL-6, Cu/Zn SOD i GPx w tkankach trzustki, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 50 %.*

[pozycja I.1. w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- ❖ **M. Śliwińska-Mossoń***, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, I. Kokot, M. Nowak, H. Milnerowicz. The effect of smoking on endothelin-1 in patients with chronic pancreatitis. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 2015 Vol.23 no.4; s.288-296.
IF: 1.553; MNiSW/KBN: 25
Wkład habilitanta: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, udział w wykonywaniu analiz ilościowych endoteliny-1 (ET-1) w osoczu oraz immunohistochemicznej lokalizacji: ET-1 w tkankach trzustki, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 70 %.*
[pozycja I.2. w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- ❖ **M. Śliwińska-Mossoń***, M. Jeleń, H. Milnerowicz. Somatostatin expression in the pancreatic cells of smoking and nonsmoking chronic pancreatitis patients with or without diabetes. *Pancreatology* 2016 Vol.16 no.2; s.225-230.
IF: 2.580; MNiSW/KBN: 25
Wkład habilitanta: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, wykonywanie immunohistochemicznej lokalizacji somatostatyny w tkankach trzustki, analizy densytometrycznej i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 85 %.*
[pozycja I.3. w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- ❖ **M. Śliwińska-Mossoń***, H. Milnerowicz. Distribution of pancreatic polypeptide-secreting endocrine cells in nondiabetic and diabetic cases. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2017 Vol.25 no.6; s.422-431.
IF: 1.634; MNiSW/KBN: 25
Wkład habilitanta: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, wykonywanie immunohistochemicznej lokalizacji polipeptydu trzustkowego w tkankach trzustki, analizy densytometrycznej i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 85 %.*
[pozycja I.4. w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- ❖ **M. Śliwińska-Mossoń***, H. Milnerowicz. The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* 2017 Vol.14 no.4; s.265-276.
IF: 3.417; MNiSW/KBN: 30
Wkład habilitanta: koncepcja i plan pracy, zebranie danych literaturowych, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 90 %.*

[pozycja I.5. w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- ❖ **M. Śliwińska-Mossoń***, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* 2018 Vol.15 no.3; s.243-259

IF: 3.417; MNiSW/KBN: 30

Wkład habilitanta: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, udział w wykonywaniu analiz ilościowych IL-6, ET-1, insuliny, kotyniny, parametrów profilu lipidowego w osoczu oraz immunohistochemicznej lokalizacji: IL-6, ET-1, insuliny i glukagonu w tkankach trzustki, analizy densytometrycznej i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.*

[pozycja I.6. w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów prac, określające indywidualny wkład każdego z Nich w ich powstanie – załącznik nr 6.

*prace, w których byłam autorem korespondencyjnym (6).

† osoba zmarła

b. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Cel badawczy:

Przewlekłe zapalenie trzustki (PZT) jest chorobą charakteryzującą się stopniową destrukcją tego narządu, prowadzącą do nieodwracalnego, postępującego zaniku mięszu, włóknienia oraz rozwoju niewydolności zewnątrz- i wewnątrzwydzielniczej trzustki [1-2]. W ostatnich latach zaobserwowano istotny wzrost zapadalności na przewlekłe zapalenie trzustki z jednoczesnym obniżaniem się wieku pojawienia się pierwszych objawów oraz ostatecznego rozpoznania tej choroby. PZT w zależności od czynnika etiologicznego może mieć różnorodny obraz kliniczny i przebieg choroby. Poznanie etiopatogenezy przewlekłego zapalenia trzustki ułatwia opracowanie strategii postępowania klinicznego u chorych na PZT. Opracowana klasyfikacja TIGAR-O, określa następujące kategorie ryzyka w zależności od przyczyny choroby: toksyczno-metaboliczne (alkohol, papierosy, hiperkalcemia, hiperlipidemia, nadczynność przytarczyc, przewlekła niewydolność nerek, niektóre leki i toksyny), idiopatyczne (postać wczesna lub późna, tropikalna, inne), genetyczne, autoimmunologiczne,

nawracające i ciężkie ostre zapalenie trzustki i zaporowe [3]. Zdecydowanie najlepiej poznaną przyczyną PZT jest nadmierne spożywanie alkoholu etylowego, jednak bardzo ważnym, niezależnym od alkoholu czynnikiem ryzyka rozwoju PZT jest palenie tytoniu [4,5]. W wielu badaniach wykazano, że palenie tytoniu, w szczególności papierosów, zwiększa ryzyko wystąpienia chorób trzustki, takich jak zapalenie i rak trzustki, a ryzyko zachorowania zwiększa się w zależności od liczby wypalanych dziennie papierosów i czasu trwania nałogu [6-8]. Jednak mechanizm działania substancji zawartych w dymie papierosowym na trzustkę na poziomie komórkowym, nie został w pełni ustalony, jak również patogeneza PZT nie została do końca wyjaśniona. Prawdopodobnie choroba rozwija się w wyniku wzajemnego oddziaływania wielu różnych czynników, wyzwalających stan zapalny i indukujących włóknienie. Dotychczas zaproponowano kilka teorii patogenezy PZT: 1) teorię toksyczno-metaboliczną, 2) teorię złożeń i blokady przewodów, 3) teorię stresu oksydacyjnego, 4) teorię martwicy i włóknienia oraz 5) hipotezę pierwotnego uszkodzenia przewodów [9-11]. Substancje obecne w dymie tytoniowym niewątpliwie wyzwalają procesy wolnorodnikowe, zakłócają homeostazę naczyniową i prawidłowe funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego, a także nasilają stany zapalne i stres oksydacyjny [12]. Zgodnie z ostatnią hipotezą patogenezy PZT, zdarzenie inicjujące, powodujące aktywację trzustkowych gwiazdzistych (ang. *pancreatic stellate cells*, PSCs) jest wymagane do rozwoju przewlekłego zapalenia trzustki. PSCs w prawidłowo funkcjonującej trzustce, znajdują się w stanie spoczynkowym. Po ich stymulacji przez stres oksydacyjny (wynikający z palenia papierosów), alkohol (i jego metabolity) oraz cytokiny, PSCs ulegają aktywacji i przekształcają się w miofibroblasty [13], zdolne do wytwarzania macierzy pozakomórkowej i różnych cząsteczek adhezyjnych. Pobudzone komórki gwiazdziste przyczyniają się również do nadmiernej produkcji kolagenu typu I, przez co PSCs uważane są za główne źródło włóknienia w PZT.

Jednym z powikłań przewlekłego zapalenia trzustki jest powstanie cukrzycy wtórnej, nazywanej także cukrzycą pochodzenia trzustkowego. Zdiagnozowanie tego rodzaju cukrzycy jest rzadkością w praktyce codziennej. Jednak najnowsze dane na temat choroby sugerują, że jest ona stosunkowo bardziej powszechna, a jej sporadyczność wynika z błędnej diagnozy oraz klasyfikacji. Wśród pacjentów z ustalonym rozpoznaniem PZT częstość występowania cukrzycy wtórnej ocenia się nawet do 70% [14-17]. Ryzyko wystąpienia cukrzycy u pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki wzrasta wraz z dłuższym czasem trwania choroby, z pogarszającymi się uszkodzeniami trzustki, zwłaszcza wczesnym pojawieniem się zwapnienia trzustki [17]. Dodatkowo ustalono, iż ryzyko wystąpienia ognisk zwapnienia w trzustce jest o 20% większe u palących niż u osób niepalących [18]. Główną cechą cukrzycy pochodzenia trzustkowego jest stopniowa utrata funkcji komórek beta (B; β) prowadząca do zaburzeń

wydzielania insuliny lub braku wydzielania insuliny [14,15,19]. Ponadto stwierdzono, że komórki B są bardziej podatne na uszkodzenia ze strony wolnych rodników z powodu słabo rozwiniętego systemu antyoksydacyjnego [20-22]. W skład tego systemu wchodzi m.in.: niskocząsteczkowe białka – metalotioneiny (MTs) oraz enzymy antyoksydacyjne wśród których istotną rolę odgrywają dysmutaza ponadtlenkowa (Cu/Zn SOD) oraz peroksydaza glutationowa (GPx) [21-24]. Chociaż uważa się, że stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę w patofizjologii przewlekłego zapalenia trzustki oraz cukrzycy brak było doniesień dotyczących lokalizacji tych antyoksydantów w tkance trzustkowej niepalących i palących pacjentów z PZT. Aktywności GPx, Cu/Zn SOD i stężenie MT w płynie trzustkowym tych pacjentów również nie były znane.

W przebiegu cukrzycy pochodzenia trzustkowego niewiele było informacji na temat czynności pozostałych komórek endokrynych wydzielających hormony trzustkowe: glukagon, somatostatynę i polipeptyd trzustkowy oraz czynności zewnątrzwydzielniczej w postaci aktywności enzymów: amylazy i lipazy. W ostatnich badaniach wykazano dodatnią korelację między stężeniem HDL, a aktywnością amylazy u chorych na cukrzycę typu 2 [25]. Według mojej wiedzy, nie wykonano żadnych badań wskazujących na korelację stężenia cholesterolu z aktywnością amylazy u pacjentów z cukrzycą pochodzenia trzustkowego. Zwiększona hiperlipidemia w połączeniu ze stresem oksydacyjnym (wynikającym z hiperglikemii i palenia papierosów) jest jednym z głównych czynników wywołujących miażdżycę, agonię cukrzycową, incydenty zakrzepowe i problemy sercowo-naczyniowe, które należą do powszechnie obserwowanych powikłań cukrzycy [26].

Ponadto przewlekłe zapalenie trzustki jest chorobą o złym rokowaniu klinicznym. Prawie połowa pacjentów z poalkoholowym PZT umiera po 20–25 latach trwania choroby [27]. Rozwój cukrzycy wtórnej w przebiegu PZT stanowi niezależny czynnik ryzyka zgonu w tej grupie chorych [28]. Toczące się przez kilka lat zapalenie trzustki może mieć wpływ również na inne narządy w organizmie. Do tej pory niewiele jest informacji na temat odległych następstw w wyniku trwającego PZT u palących pacjentów z cukrzycą. Tym bardziej, iż u palących pacjentów dochodzi dość często do epizodów ostrego stanu zapalnego trzustki (OZT) [29], skutkującego niedokrwieniem narządu i mogącym spowodować powikłania typowe dla przebiegu OZT (wstrząs, zespół ostrej niewydolności oddechowej, ostrą niewydolność nerek i inne) [30]. Ostra niewydolność nerek występuje u około 10-14 % chorych z OZT i jest obarczona dużą śmiertelnością (80-90%). Po stabilizacji stanu ostrego w przebiegu PZT, monitorowana jest przede wszystkim funkcja zewnątrzwydzielnicza i wewnątrzwydzielnicza trzustki, rzadko są sprawdzane odległe następstwa narządowe.

Schorzenia trzustki, pomimo znacznego rozwoju medycznego, wydają się być w dalszym ciągu dużym problemem klinicznym i diagnostycznym. Dlatego tak ważne jest

znalezienie odpowiedniego markera, który odzwierciedlałby stopień zaawansowania procesu zapalnego w grupie osób narażonych na dym tytoniowy.

Zważywszy, że palenie papierosów odgrywa istotną rolę w patogenezie PZT i cukrzycy, oraz że oznaczanie stężeń omawianych parametrów diagnostycznych w płynach ustrojowych oraz w tkankach trzustki, znajduje coraz szersze zastosowanie w praktyce klinicznej, zasadniczym celem cyklu prac, pod wspólnym tytułem „**OCENA BIOMARKERÓW FUNKCJI TRZUSTKI U PACJENTÓW Z PRZEWLEKŁYMI SCHORZENIAMI TEGO NARZĄDU**” była,

przeprowadzona w materiale biologicznym pozyskanym od niepalących i palących pacjentów ze stwierdzonym przewlekłym zapaleniem trzustki z lub bez cukrzycy, ocena:

- ❖ materiału tkankowego trzustki pacjentów z PZT bez lub z cukrzycą, obejmująca określenie stopnia zwłóknienia, zwapnienia i stanu zapalnego trzustki, z uwzględnieniem czynnika palenia papierosów;
- ❖ uszkodzenia komórek śródbłonna układu naczyniowego w trzustce, oparta o analizę ilościową endoteliny-1 (ET-1) w osoczu jak również – o jakościową i ilościową charakterystykę tego peptydu w tkance trzustki;
- ❖ mechanizmów przemian zachodzących w przebiegu zapalenia trzustki w wyniku palenia papierosów w oparciu o:
 - ✓ określenie nasilenia stanu zapalnego trzustki, poprzez oznaczenie stężenia prozapalnej cytokiny interleukiny-6 (IL-6) we krwi i jej immunohistochemicznej analizy w tkance trzustki;
 - ✓ określenie statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego, jako czynnika o istotnym znaczeniu w rozwoju stanu zapalnego trzustki i cukrzycy, poprzez oznaczenia stężeń i aktywności wybranych antyoksydantów (odpowiednio): metalotioneiny-1/2 oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) w płynach trzustkowych oraz oznaczenie stężenia końcowych produktów peroksydacji lipidów (TBARS) w osoczu, odzwierciedlających stopień uszkodzenia komórkowego;
 - ✓ ocenę immunohistochemicznej lokalizacji antyoksydantów w tkankach trzustki pacjentów z PZT: MT-1/2, Cu/ZnSOD i GPx.
- ❖ wpływu, toczącego się stanu zapalnego w przebiegu PZT na funkcjonowanie czynności komórek endokrynych wydzielających: insulinę, glukagon, somatostatynę i polipeptyd trzustkowy, jak również określenie związku pomiędzy liczbą występowania tych komórek w trzustce, zmianą ich lokalizacji a natężeniem zmian zapalnych w narządzie w przebiegu PZT i cukrzycy. Ważne było również wykazanie negatywnego działania dymu tytoniowego na zaburzenia związane z funkcją komórek endokrynych trzustki.
- ❖ odległych następstw w wyniku trwającego PZT u palących pacjentów

z cukrzycą w oparciu o:

- ✓ ocenę ilościową profilu lipidowego osocza na podstawie analizy stężenia poszczególnych składników profilu: cholesterolu całkowitego, LDL-CH, HDL-CH, trójglicerydów, jak również wartości współczynnika Castelli I - wskaźnika aterosklerozy - określającego ryzyko wystąpienia miażdżycy;
 - ✓ ocenę stężenia kreatyniny i kwasu moczowego w surowicy oraz wartości współczynnika filtracji kłębuszkowej (estimated glomerular filtration rate – eGFR) mających znaczący wpływ na funkcję nerek;
 - ✓ ocenę wartości BUN, jako wskaźnika niedożywienia pacjentów z powodu zaburzonego wchłaniania składników pokarmowych wynikającego z zapalenia trzustki
- ❖ i dodatkowo wykazanie wpływu palenia na rozwój cukrzycy typu 2 i na komplikacje z nią związane.

Uzyskanie odpowiedzi na założone cele może mieć duże znaczenie poznawcze. Ponadto nie można wykluczyć praktycznego znaczenia wyników uzyskanych w czasie badań nad stężeniami we krwi chorych na PZT bez lub z cukrzycą parametrów i czynników stymulujących włóknienie trzustki.

Material i metody:

Material biologiczny do badań stanowiły próbki krwi, płynu trzustkowego oraz skrawki tkanek trzustkowych pozyskane od pacjentów obojga płci, w wieku od 32 do 74 roku życia, z rozpoznaniem przewlekłym zapaleniem trzustki, hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Rozpoznanie PZT u pacjentów ustalono, na podstawie: rutynowych badań klinicznych (badania podmiotowe – okoliczności pojawienia się bólu, czasu trwania choroby; badania przedmiotowe), badań radiologicznych, badań USG i tomografii komputerowej jamy brzusznej, w wyjątkowych przypadkach ERCP (endoskopowej cholangiopankreatografii wstecznej) trzustki i dróg żółciowych. Ponadto, trafność diagnozy potwierdzono wynikami laboratoryjnych badań diagnostycznych, w tym: leukocytozy, aktywności amylazy, stężenia bilirubiny, mocznika, kreatyniny, albumin w surowicy, w niektórych przypadkach także aktywności aminotransferaz asparaginowej i alaninowej oraz fosfatazy alkalicznej.

Przeprowadzone badania podmiotowe, uzupełnione wymienionymi powyżej badaniami diagnostycznymi oraz danymi dotyczącymi palenia tytoniu oraz spożywania alkoholu, które zostały zebrane z bezpośredniego indywidualnego wywiadu z każdym pacjentem, pozwoliły w większości przypadków określić etiologię zapalenia trzustki.

Diagnoza przewlekłego stanu zapalnego trzustki była łączona z historią nadużycia alkoholu, gdy pacjent spożywał powyżej 40 g alkoholu na dzień dłużej niż pięć lat. Etiologia obturacyjnego zapalenia trzustki została określona na podstawie badań ERCP i USG. Typ rodzinnego zapalenia trzustki nie został zdiagnozowany. W tych przypadkach, które nie mogły być sklasyfikowane według powyższych kryteriów, określono idiopatyczne zapalenie trzustki. Na podstawie wywiadu na temat palenia oraz na podstawie podwyższonego stężenia kotyniny – metabolitu nikotyny w osoczu pacjentów z zapaleniem trzustki podzielono na niepalących i palących. W grupie badanej: dziewięciu niepalących pacjentów i piętnaście palących pacjentów miało zdiagnozowaną cukrzycę [15].

Materiał kontrolny do badań stanowiły próbki krwi, pobrane od zdrowych pracowników Uniwersytetu Medycznego, w odpowiednio dobranych grupach wiekowych, u których wykonywano badania profilaktyczne. Skrawki kontrolne trzustki pochodziły od czterech zdrowych osób, które zginęły w wypadkach komunikacyjnych. Wśród osób zdrowych wykluczono osoby z cukrzycą i z historią lub objawami zapalenia trzustki.

Ponadto, jeszcze przed pozyskaniem materiału biologicznego, wszyscy hospitalizowani pacjenci i ochotnicy z grupy kontrolnej wyrazili zgodę na udostępnienie i wykorzystanie pobranego materiału biologicznego, pozostającego po wykonaniu zleconych badań diagnostycznych. Na przeprowadzenie niniejszych badań wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (Nr KB: 4353/2011).

Uzyskany materiał biologiczny w postaci tkanek trzustki poddany został procedurze badawczej, obejmującej utrwalenie w 10% zbuforowanej formalinie, przeprowadzenie przez szereg alkoholowy i zatopienie w parafinie. Błoczki parafinowe cięto na skrawki o grubości 5 μm na mikrotomie i umieszczano na szkiełkach typu Super Frost Plus. Preparaty barwione hematoksyliną – eozyną, poddawane były weryfikacji histopatologicznej. Następnie lokalizowano w nich metodą immunohistochemiczną przy użyciu monoklonalnych lub poliklonalnych przeciwciał: hormony trzustkowe (insulinę, glukagon, somatostatynę i polipeptyd trzustkowy), endotelinę-1, interleulinę-6, metalotioninę-1/2 i enzymy antyoksydacyjne: miedziowo-cynkowo zależną dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę glutationową. Do każdego skrawka tkankowego wykonano kontrolę negatywną, gdzie w miejsce przeciwciała pierwotnego stosowano przeciwciało IgG – przeciwciało charakteryzujące się brakiem specyficznej reakcji z tkanką ludzką, w celu oceny niespecyficznego barwienia oraz lepszej interpretacji wyników barwienia pozytywnego i właściwej lokalizacji antygeny. Rozcieńczenie przeciwciał oraz czasy inkubacji poszczególnych etapów testu były dobrane doświadczalnie w warunkach laboratorium. Histopatologiczna ocena intensywności barwienia skrawków tkankowych

w kierunku badanych antygenów została wykonana w sposób półilościowy według następującej skali: 0 – brak reakcji immunohistochemicznej, +/- słaba reakcja immunohistochemiczna, + umiarkowana reakcja immunohistochemiczna, ++ silna reakcja immunohistochemiczna, +++ bardzo silna reakcja immunohistochemiczna i przy użyciu mikrokomputerowego analizatora obrazu, stosując program pomiarowy komputerowy Multi-Scan Base V.8 lub the Fiji pracujący w środowisku Windows wraz z dokumentacją fotograficzną.

Płyn trzustkowy uzyskano z torbieli trzustki od 23 pacjentów (18 mężczyzn, 5 kobiet) poddanych chirurgicznej eksploracji zmian torbielowatych trzustki. Zgodnie z klasyfikacją D'Egidio i Scheina [31], pacjentów poddanych operacji podzielono na: pacjentów z torbielami, które rozwinęły się po epizodzie ostrego zapalenia trzustki w przebiegu przewlekłego zapalenia trzustki, ze zmianami w przewodzie trzustkowym typowym dla przewlekłego zapalenia trzustki. Płyn trzustkowy pobierano przez aspirację śródoperacyjną lub, gdy planowano całkowitą resekcję, przez aspirację igłową natychmiast po chirurgicznym usunięciu torbieli. Krew w celu uzyskania surowicy lub osocza pobierano zgodnie z standardowymi procedurami.

Ilościowej oceny stężeń interleukiny-6, endoteliny-1, insuliny oraz kotyniny w osoczu/surowicy, dokonano metodą immunoenzymatyczną. Aktywności enzymów: GPx i Cu/Zn SOD w płynie trzustkowym zmierzono metodą kolorymetryczną. Natomiast, oznaczenie stężenia metalotioneiny-1/2 wykonano metodą radioizotopową z użyciem Cd109 (kod: CUS1-100 μ Ci, Amersham, UK) według Eaton i wsp [32]. Z kolei, analizę ilościową aktywności amylazy i lipazy w surowicy, a także profilu lipidowego, stężenia glukozy, kreatyniny, kwasu moczowego i mocznika przeprowadzono z wykorzystaniem metod kolorymetrycznych z użyciem testów diagnostycznych, zgodnie z procedurami podanymi przez producenta.

Piśmiennictwo:

1. Sarles H.: Definitions and classifications of pancreatitis. *Pancreas* 1991; 6, 470-474.
2. DiMagno M.J., DiMagno E.P.: Chronic pancreatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2006; 22, 487-497.
3. Etemad B., Whitcomb D.C.: Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001; 120,682-707.
4. Talamini G., Bassi C., Falconi M., Sartori N., Salvia R., Rigo L., Castagnini A., Di Francesco V., Frulloni L., Bovo P., Vaona B., Angelini G., Vantini I., Cavallini G., Pederzoli P.: Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig. Dis. Sci.*, 1999; 44, 1303-1311.
5. Maisonneuve P., Frulloni L., Mullhaupt B., Faitini K., Cavallini G., Lowenfels A.B., Ammann R.W.: Impact of smoking on patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Pancreas*, 2006, 33, 163-168.
6. Alexandre M., Pandol S. J., Gorelick F. S., Thrower E. C.: The emerging role of smoking in the development of pancreatitis. *Pancreatology* 2011, 5, 469-474.
7. Edderkaoui M., Thrower E. C.: Smoking and Pancreatic Disease. *J. Cancer Ther.* 2013, 4, 34-40.
8. Śliwińska-Mossoń M., Milnerowicz H Tobacco smoking and the diseases of pancreas. *Przegl. Lek.* 2005; 62, 1163-66.
9. Stevens T., Conwell D.L., Zuccaro G.: Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am. J. Gastroenterol.*, 2004; 99, 2256-2270.

10. Cavallini G.: Is chronic pancreatitis a primary disease of pancreatic ducts? A new pathogenic hypothesis. *Ital. J. Gastroenterol.*, 1993; 25, 400-407.
11. Witt H., Apte M.V., Keim V., Wilson J.S.: Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* 2007; 132, 1557-1573.
12. Śliwińska-Mossoń M., Sciskalska M., Karczewska-Górska P., Milnerowicz H.: The effect of endothelin-1 on pancreatic diseases in patients who smoke. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2013; 22: 745–52.
13. Apte M.V., Haber P.S., Darby S.J., Rodgers S.C., McCaughan G.W., Korsten M.A., Pirola R.C., Wilson J.S.: Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 1999; 44, 534-541.
14. Ewald N., Kaufmann C., Raspe A., Kloer H. U., Bretzel R. G., Hardt P. D.: Prevalence of diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c). *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2012; 28, 338–342.
15. Ewald N., Bretzel R. G.: Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (Type 3c) — are we neglecting an important disease?. *Eur. J. Intern. Med.* 2013; 24: 203–206.
16. Wang W., Guo Y., Liao Z., Zou D. W., Jin Z. D., Zou D. J., Jin G, Hu X. G., Li Z. S.: Occurrence of and risk factors for diabetes mellitus in Chinese patients with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2011; 40, 206–12.
17. Malka D., Hammel P., Sauvanet A., Rufat P., O’Toole D., Bardet P., Belghiti J., Bernades P., Ruszniewski P., Lévy P.: Risk factors for diabetes mellitus in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 119, 1324–1332.
18. Cavallini G., Talamini G., Vaona B., Bovo P., Filippini M., Rigo L., Angelini G., Vantini I., Riela A., Frulloni L.: Effect of alcohol and smoking on pancreatic lithogenesis in the course of chronic pancreatitis. *Pancreas* 1994; 9, 42–46.
19. Hart P.A., Bellin M.D., Andersen D.K., Bradley D., Cruz-Monserrate Z., Forsmark C.E., Goodarzi M.O., Habtezion A., Korc M., Kudva Y.C., Pandol S.J., Yadav D., Chari S.T.; Consortium for the Study of Chronic Pancreatitis, Diabetes, and Pancreatic Cancer (CPDPC): Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 1, 226–237.
20. Park B.K., Chung J.B., Lee J.H., Suh J.H., Park S.W., Song S.Y., Kim H., Kim K.H., Kang J.K.: Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 2003; 9, 2266-2269.
21. Ohly P., Dohle C., Abel J., Seissler J., Gleichmann H.: Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia* 2000; 43, 1020-1030.
22. Sakubara H., Mizukami H., Yagihashi N., Wada R., Hanyu C., Yagihashi S.: Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese type II diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45, 85-96.
23. Cullen J.J., Mitros F.A., Oberley L.W.: Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas* 2003; 26, 23-27.
24. Milnerowicz H., Chmerek M., Rabczyński J., Milnerowicz S., Nabzdyk S., Knast W.: Immunohistochemical localization of metallothionein in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004; 29, 28-32.
25. Yadav R., Bhartiya Verma S.K., Nandkeoliar MK.: The evaluation of serum amylase in the patients of type 2 diabetes mellitus, with a possible correlation with the pancreatic functions. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013; 7, 1291–1294.
26. Wautier J.L., Guillausseau P.J.: Diabetes, advanced glycation end products and vascular disease. *Vasc. Med.* 1998; 3, 131–137.
27. Mariani A., Curioni S., Zanello A., Passaretti S., Masci E., Rossi M., Del Maschio A., Testoni P.A.: Secretin MRCP and endoscopic pancreatic manometry in the evaluation of sphincter of Oddi function: a comparative pilot study in patients with idiopathic recurrent pancreatitis. *Gastrointest. Endosc.* 2003; 58, 847–852.
28. Wakasugi H., Funakoshi A, Iguchi H.: Clinical assessment of pancreatic diabetes caused by chronic pancreatitis. *J. Gastroenterol.* 1998; 33, 254–259.
29. Sliwinska-Mossoń M., Milnerowicz H., Milnerowicz S., Nowak M., Rabczyński J.: Immunohistochemical localization of somatostatin and pancreatic polypeptide in smokers with chronic pancreatitis. *Acta Histochem.* 2012; 114, 495-502.
30. Golay V., Roychowdhary A.: Acute pancreatitis in chronic kidney disease – a common but often misunderstood combination. *Ren. Fail.* 2012; 34, 1338–1340.

31. D'Egidio A., Schein M.: Pancreatic pseudocysts: a proposed classification and its management implications. *Br. J. Surg.* 1991; 78, 981-984.
32. Eaton DL, Toal BF. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1982; 66, 134-142.

Wyniki i wnioski:

- ❖ **Palenie papierosów poprzez zwiększenie stężenia we krwi oraz ekspresji w tkankach trzustki, cytokiny prozapalnej IL-6 u pacjentów z PZT przyczynia się do nasilenia procesu zapalnego trzustki i rozwoju cukrzycy.**

Każdy wypalony papieros prowadzi do reakcji zapalnej w organizmie i znacząco wpływa na wytwarzanie krążących prozapalnych cytokin, takich jak interleukina-6 (IL-6). U zdrowych osób oraz pacjentów z PZT bez lub z współistniejącą cukrzycą, narażonych na dym papierosowy stwierdziłam wzrost stężenia IL-6 we krwi. Jednocześnie potwierdziłam statystycznie wyższe stężenie IL-6 u palących osób zdrowych i pacjentów z PZT bez lub z cukrzycą w porównaniu do niepalących populacji. Najwyższe stężenie IL-6 stwierdziłam we krwi palących pacjentów z cukrzycą. Dodatkowo zauważyłam, iż wzrost stężenia IL-6 korelował z ciężkością przebiegu zapalenia trzustki i w przypadku jednej osoby, u której zaobserwowano gwałtowny wzrost IL-6, choroba zakończyła się zgonem. Drastyczny wzrost badanej cytokiny we krwi palących pacjentów wskazuje na prozapalne działanie dymu papierosowego i nasilenie procesu zapalnego w trzustce. W grupie niepalących pacjentów z PZT bez/i cukrzycą stężenie IL-6 było siedmiokrotnie i czterokrotnie niższe (odpowiednio), a stan ogólny pacjentów szybciej ulegał normalizacji oraz przebieg kliniczny był łagodniejszy w porównaniu do palących pacjentów [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, J. Rabczyński †. *The effect of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. Pancreatology 2012 Vol.12 no.4; s.295-304; M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. *Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259. I.1.; I.6. numeracja zgodna z wykazem prac naukowych, załącznik 3].**

Interesujące okazały się wyniki immunohistochemicznej lokalizacji IL-6 w skrawkach tkankowych trzustki. W preparatach histologicznych pochodzących od palących pacjentów z PZT bez cukrzycy stwierdziłam znacznie silniejszą immunoreaktywność dla IL-6 w porównaniu do grupy kontrolnej i niepalących pacjentów z PZT. IL-6 zaobserwowałam zarówno w komórkach wysp trzustkowych, komórkach pęcherzykowych, jak i przewodów trzustkowych [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, J. Rabczyński †. *The effect*

of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. Pancreatology 2012 Vol.12 no.4; s.295-304, I.1.]. Aczkolwiek najsilniejszą ekspresję IL-6 (dyfuzyjną i ogniskową) wykazałam w tkance trzustki palących pacjentów z PZT i cukrzycą, charakteryzującą się znacznym stopniem zwłóknienia, nieregularnym poszerzeniem przewodów trzustkowych i destrukcją wysp trzustkowych. Największa intensywność immunobarwienia IL-6 w tkankach palących pacjentów z cukrzycą (potwierdzona w analizie densytometrycznej), korelowała z najwyższymi oznaczonymi stężeniami cytokiny we krwi tych pacjentów. Silna ekspresja IL-6 w komórkach wysp trzustki zniszczonych procesem zapalnym, potwierdza tezę, iż średnie i wysokie stężenia IL-6 mogą być cytotoksyczne dla prawidłowych komórek B, a stwierdzona ujemna korelacja między stężeniem cytokiny a insuliną (wzrost IL-6 korelował ze spadkiem stężenia insuliny) wskazuje, iż intrelukina-6 może być prognostycznym wskaźnikiem cukrzycy [*M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.6.].*]

Palenie papierosów jest czynnikiem, który wyzwała zapalenie trzustki i indukuje zwłóknienie narządu poprzez aktywację trzustkowych komórek gwiaździstych do wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie kolagenu, o czym świadczą wzrost stężenia we krwi i ekspresja w uszkodzonej tkance intrelukiny-6 u palących pacjentów, oraz silnie dodatnia korelacja między stężeniem kotyniny a stężeniem tej cytokiny. Dodatkowo aktywne PSCs mogą produkować autokrynne czynniki, wśród których ważną rolę pełni interleukina-6 oraz endotelina-1, która może stymulować migrację i kurczenie się PSCs [*M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, M. Jabłowska, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, J. Rabczyński †. The effect of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. Pancreatology 2012 Vol.12 no.4; s.295-304, M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.1.; I.6.].*]

- ❖ **Zaburzenia czynności śródbłonka naczyń krwionośnych, nasilenie stanu zapalnego oraz procesu włóknienia tkanki trzustki, towarzyszące rozwojowi cukrzycy w przebiegu PZT, znajdują wyraz zarówno w zwiększeniu stężenia ET-1 w osoczu, jak i we wzroście ekspresji tego peptydu w tkankach palących pacjentów.**

W opisanych przez ze mnie badaniach wykazano, że palenie papierosów zwiększa stężenie osoczowej endoteliny-1, która prawdopodobnie poprzez wywoływanie skurczu

naczyń i następnej tkankowej hipoksemii zmniejsza obwodowe zużycie glukozy [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. *The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2017 Vol.14 no.4; s.265-276, I.5*]. Wykazałam znacznie wyższe stężenie ET-1 w osoczu palących osób zdrowych i pacjentów z zapaleniem trzustki bez lub z cukrzycą, w porównaniu z niepalącymi, co jednocześnie było zbieżne z silnym stopniem ekspresji ET-1 w tkankach trzustki pacjentów [M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, I. Kokot, M. Nowak, H. Milnerowicz. *The effect of smoking on endothelin-1 in patients with chronic pancreatitis. Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. 2015 Vol.23 no.4; s.288-296; M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. *Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.2.; I.6*]. Statystyczny wzrost stężenia tego peptydu w surowicy palących osób zdrowych i pacjentów jest dowodem, że palenie papierosów wpływa na funkcjonowanie śródbłonna naczyń krwionośnych. Tezę tę potwierdza silnie dodatnia korelacja między stężeniem kotyniny a stężeniem ET-1. Co ciekawe, zaobserwowałam wyższe stężenia ET-1 w osoczu zdrowych palących osób w porównaniu do niepalących pacjentów z PZT bez cukrzycy [M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, I. Kokot, M. Nowak, H. Milnerowicz. *The effect of smoking on endothelin-1 in patients with chronic pancreatitis. Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. 2015 Vol.23 no.4; s.288-296; I.2*]. Najwyższe stężenia ET-1 w osoczu stwierdziłam u niepalących i palących pacjentów z cukrzycą [M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. *Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.6*]. Wysokie stężenie endoteliny-1 u pacjentów z cukrzycą jest wynikiem braku równowagi między czynnikami wydzielanymi przez śródbłonek odpowiedzialnymi za utrzymanie prawidłowego napięcia ścian naczyń (redukcja syntezy NO na korzyść ET-1). Zjawisko to jest szczególnie widoczne w grupie osób palących, gdzie substancje zawarte w dymie papierosowym powodują rozkład tlenu azotu, co prowadzi do nadmiernej produkcji ET-1. Przewlekle podwyższone stężenie ET-1 przyczynia się, lub nasila oporność tkanek na insulinę w stanach patologicznych [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. *The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2017 Vol.14 no.4; s.265-276, I.5*]. Stwierdziłam, iż endotelina-1 wywiera bardzo negatywny wpływ na strukturę cytoszkieletu naczyń krwionośnych, istotną dla właściwego działania insuliny. Na osłabienie działania insuliny wpływa także palenie papierosów. A indukowany tym procesem wzrost syntezy ET-1, przyczynia się do lokalnego niedotlenienia tkanek, przekładającego się na spadek obwodowego zużycia glukozy, co zostało potwierdzone silnie dodatnią korelacją pomiędzy stężeniami ET-1,*

a stężeniem glukozy u palących pacjentów [M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. *Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.6*].

Reakcja immunohistochemiczna dla ET-1 była negatywna lub słabo pozytywna w komórkach wysp i pęcherzykach trzustki niepalących osób zdrowych, a słaba lub umiarkowana w komórkach wysp, pęcherzykowych oraz przewodów trzustkowych trzustki palących osób zdrowych. Zaobserwowałam znacznie silniejszą immunoreaktywność ET-1 w grupie palących pacjentów z PZT, w porównaniu do grupy kontrolnej oraz niepalących pacjentów z PZT. Podobnie jak u palących osób zdrowych, lokalizację endoteliny-1 stwierdziłam w komórkach wysp trzustki, komórkach pęcherzykowych oraz przewodów trzustkowych. Analiza densytometryczna, potwierdziła wzrost ekspresji ET-1 u pacjentów palących z PZT, w porównaniu do niepalącej grupy z PZT oraz niepalącej i palącej grupy kontrolnej [M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, S. Nabzdęk, I. Kokot, M. Nowak, H. Milnerowicz. *The effect of smoking on endothelin-1 in patients with chronic pancreatitis. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2015 Vol.23 no.4; s.288-296; I.2*]. Aczkolwiek najsilniejszą ekspresję ET-1 zaobserwowałam w zniszczonych wyspach trzustkowych trzustki palących pacjentów z PZT i współistniejącą cukrzycą. Obecność badanego peptydu stwierdziłam także w licznych komórkach pęcherzykowych i przewodów trzustkowych, a reakcję immunohistochemiczną oceniłam na bardzo silną, silną lub umiarkowaną. Statystycznie wyższą immunoreaktywność ET-1 stwierdziłam u niepalących i palących pacjentów z cukrzycą w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazałam, iż stopień immunoreaktywności ET-1 zależał również od ciężkości fibrogenyzy badanych tkanek. Endotelina-1 jest aktywatorem komórek gwiazdzistych do syntezy kolagenu, co sugeruje, jak ważny jest ten hormon w rozwoju PZT. Dodatkowo składniki dymu papierosowego uszkadzają komórki śródbłonna naczyń [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. *The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2017 Vol.14 no.4; s.265-276, I.5*] powodując, nadmierne wydzielanie ET-1, która z kolei stymuluje te komórki do wytwarzania interleukiny-6, która oprócz stymulacji PSCs jest przede wszystkim prozapalną cytokiną. Stwierdziłam silną korelację między ET-1 i IL-6 u palących pacjentów z cukrzycą, co potwierdza związek między tymi dwoma czynnikami. Na podstawie uzyskanych wyników, udowodniłam, że ET-1 wzmacnia lokalną odpowiedź zapalną w trzustce. U palących pacjentów, u których stwierdziłam silne zapalenie, widoczne było wieloogniskowe zwłóknienie między- jak i wewnątrz płacikowe oraz znaczna redukcja podścieliska, i właśnie w tych tkankach obserwowałam silną ekspresję endoteliny-1. Ze względu na jej silne działanie zwężające naczynia krwionośne, wysokie stężenie tego peptydu w tkankach przyczynia się do

miejscowego niedokrwienia tkanek, prowadząc do uszkodzenia tkanki trzustkowej. [M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, I. Kokot, M. Nowak, H. Milnerowicz. *The effect of smoking on endothelin-1 in patients with chronic pancreatitis. Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 2015 Vol.23 no.4; s.288-296; M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. *Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res.* 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.2; I.6].

❖ **Zmiany wybranych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w przebiegu PZT zależą od czynnika ryzyka tego schorzenia – palenia papierosów**

Dym tytoniowy zawiera szereg reaktywnych form tlenu (RFT), które odpowiedzialne są za nasilenie stresu oksydacyjnego i wystąpienie zmian patologicznych w organizmie. Dodatkowo ocenia się, że w jednej porcji wdychanego przez palacza dymu znajduje się aż 10^{16} wolnych rodników, w większości bardzo stabilnych, których źródłem są substancje smoliste [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. *The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. Diabetes Vasc. Dis. Res.* 2017 Vol.14 no.4; s.265-276, I.5]. Dla oceny stanu oksydacyjnego oznaczyłam w osoczu niepalących i palących osób zdrowych oraz pacjentów z PZT i cukrzycą, stężenie końcowych produktów peroksydacji lipidów (TBARS), które odzwierciedla stopień uszkodzenia komórkowego. Palenie papierosów powoduje indukcję procesów peroksydacji lipidów, a także zwiększa stężenia substratów tej reakcji. W osoczu palących pacjentów z PZT i cukrzycą stwierdziłam statystycznie wyższe stężenie TBARS w porównaniu do niepalących osób zdrowych. Dodatkowo oznaczone stężenie TBARS było najwyższe u tych pacjentów, co potwierdza, że palenie papierosów i hiperglikemia powoduje wzrost stresu oksydacyjnego [M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. *Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res.* 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.6].

Organizm osoby narażonej na wdychanie dymu papierosowego stopniowo wytwarza mechanizmy adaptacyjne do reakcji ze składnikami dymu tytoniowego, które chronią go przed skutkami toksycznego działania dymu. Broniący się przed atakiem reaktywnych form tlenu organizm uwalnia większą ilość antyoksydantów, które częściowo niwelują utleniające właściwości RFT.

W przeprowadzonym badaniu wykazałam, iż niskocząsteczkowe białko metalotioneina-1/2 (MT-1/2), jako zmiatacz wolnych rodników hydroksylowych, odgrywa istotną rolę w obronie przed skutkami działania stresu oksydacyjnego

w przebiegu przewlekłego zapalenia trzustki u niepalących i palących pacjentów z PZT. Następnie na podstawie dokonanej po raz pierwszy ocenie wpływu palenia papierosów na stężenie MT-1/2 w płynie trzustkowym wykazałam statystycznie istotny wzrost tego białka u palących pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki w porównaniu z niepalącymi pacjentami. Zaobserwowany wzrost stężenia metalotioneiny u palących pacjentów z PZT, potwierdza biologiczną reakcję ochronną organizmu przeciwko RFT i uszkodzeniom DNA powodowanym przez substancje obecne w dymie papierosowym. Dodatkowo wykazałam interesującą zależność między interleukiną-6 a metalotioneiną, co przedstawiłam w postaci stosunku MT-1/2/IL-6, którego wartość u pacjentów palących była mniejsza w porównaniu do niepalących pacjentów (odpowiednio: 1,1; 5,6). Otrzymany wynik potwierdza bardzo silne prozapalne działanie dymu papierosowego na trzustkę. Ponadto wykazałam dodatnią korelację pomiędzy stężeniami IL-6 i MT-1/2 u pacjentów palących, potwierdzając istotną rolę MT w odpowiedzi zapalnej trzustki na składniki dymu papierosowego [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, J. Rabczyński †. *The effect of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. Pancreatology 2012 Vol.12 no.4; s.295-304, I.1.*].

Na podstawie immunohistochemicznej lokalizacji MT-1/2 w tkankach trzustki pochodzących od niepalących i palących pacjentów z PZT wykazałam znacznie silniejszą ekspresję MT-1/2 w porównaniu z tkanką zdrową. Ekspresja tego antyoksydanta była znacznie silniejsza w licznych komórkach pęcherzykowych i wysp trzustkowych (zarówno w sposób rozlany jak i ogniskowy). Metalotioneina-1/2 obecna była zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórek trzustkowych. Lokalizacja MT-1/2 w jądrze komórkowym potwierdza hipotezę stymulacji syntezy tego białka, oraz jego funkcję ochronną przed działaniem RFT na strukturę DNA, co zwiększa odporność komórek trzustki na uszkodzenia ze strony RFT. Niższa ekspresja MT-1/2 w tkankach trzustki (szczególnie w wyspach) palących pacjentów, w porównaniu do niepalących może świadczyć o zaburzonej indukcji ekspresji genów metalotioneiny w przewlekłych stanach zapalnych tego narządu oraz o zaburzonej homeostazie układu istotnych antyoksydantów MT-1/2 – Cu/Zn SOD w konsekwencji palenia papierosów, o czym świadczy nieznaczna korelacja tych dwóch antyoksydantów u palących pacjentów [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, J. Rabczyński †. *The effect of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. Pancreatology 2012 Vol.12 no.4; s.295-304, I.1.*].

MT-1/2 poza funkcjami antyoksydacyjnymi i detoksykacyjnymi może także funkcjonować jako donator jonów Zn^{+2} niezbędnych do syntezy insuliny i metaloenzymów obecnych w trzustce między innymi właśnie dla miedziowo-cynkowo zależnej dysmutazy ponadtlenkowej.

Następnie, aby potwierdzić tezę, że trzustka pacjentów z PZT narażonych na działanie dymu papierosowego jest bardziej podatna na stres oksydacyjny, zmierzyłam aktywność dwóch enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (która katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru i tlenu) i peroksydazy glutationowej (która neutralizuje nadtlenek wodoru). Na podstawie po raz pierwszy oznaczonych wartości aktywności enzymów: Cu/Zn SOD i GPx w płynach trzustkowych niepalących i palących pacjentów z PZT wykazałam statystyczny wzrost aktywności tych enzymów (odpowiednio: dwukrotny i czterokrotny) u palących w porównaniu do niepalących. Istnieją różnorodne teorie na temat związku pomiędzy systemem antyoksydacyjnym a paleniem tytoniu. Kilku autorów sugeruje, iż palenie powoduje zużycie zasobów antyoksydantów i nasilenie stresu oksydacyjnego. W moich badaniach stwierdziłam wyższą aktywność antyoksydacyjnych enzymów w płynach trzustkowych torbieli pozapalnych palących pacjentów z PZT, w porównaniu do niepalących. Fakt ten może przemawiać za tym, że palenie tytoniu zwiększa zdolność trzustki do obrony antyoksydacyjnej w warunkach stanu zapalnego.

Aczkolwiek kadm – składnik dymu tytoniowego – obniża biodostępność selenu, powodując depresyjny wpływ kadmu na stężenie selenu w surowicy, co stanowić może uzasadnienie zaobserwowanej niższej ekspresji selenozależnej peroksydazy glutationowej w tkankach u pacjentów palących z PZT. Zróznicowanie stopnia ekspresji GPx w tkankach trzustki w zależności od palenia świadczy o tym, że jest enzymem szczególnie wrażliwym na wpływ palenia tytoniu. Nie stwierdziłam (poza pojedynczymi ogniskami słabej reakcji) ekspresji GPx w zdrowej trzustce. Istotne jest jednak, iż wykazana została reakcja immunohistochemiczna w trzustkach wszystkich niepalących i palących pacjentów z PZT, co świadczy o tym, że wykazują one wyższą zawartość GPx w trzustce zapalnej niż trzustki zdrowe. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być przypisanie trzustce zdolności do nasilenia obrony antyoksydacyjnej w warunkach stresu oksydacyjnego. Interesującą informacją dostarcza porównanie ekspresji dwóch antyoksydantów: miedziowo-cynkoozależnej dysmutazy ponadtlenkowej oraz selenozależnej peroksydazy glutationowej u osób zdrowych i u pacjentów z PZT. W zdrowych tkankach trzustki dominującym antyoksydantem jest Cu/Zn SOD. Podobnie jak to się dzieje z GPx, obserwujemy nasilenie ekspresji Cu/Zn SOD w tkance zmienionej zapalnie, względem tkanki zdrowej. Równoczesna nadekspresja obu tych enzymów wydaje się uzasadniona, jako że jednym z substratów dla GPx jest produkt działania Cu/Zn SOD. Wysoka aktywność Cu/Zn SOD, skutkująca nagromadzeniem H_2O_2 , może zatem stymulować wzrost poziomu GPx.

Wyniki immunohistochemicznego badania wyraźnie wykazują umiarkowaną i silną ekspresję MT1/2, Cu/Zn SOD i GPx w komórkach pęcherzykowych i wysp trzustkowych w tkankach pacjentów palących z PZT. Natomiast silna reakcja

immunohistochemiczna enzymów w komórkach przewodów trzustkowych wskazuje na ich funkcję wewnątrzkomórkowych antyoksydantów i może kompensować brak MT1/2 w tych komórkach trzustki. Na podstawie otrzymanych wyników wskazałam rolę stresu oksydacyjnego w rozwoju zapalenia trzustki związanego z przewlekłym narażeniem na wdychanie dymu papierosowego [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, J. Rabczyński †. *The effect of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. Pancreatology 2012 Vol.12 no.4; s.295-304, I.1.*].

- ❖ **Istnieje ścisła zależność pomiędzy paleniem papierosów, a zwiększającym się stężeniem glukozy i zmniejszającym się stężeniem insuliny we krwi zarówno u osób zdrowych, jak i pacjentów z PZT z lub bez cukrzycy.**

Dane epidemiologiczne i doświadczalne sugerują, że palenie papierosów upośledza tolerancję glukozy oraz wrażliwość na insulinę. Ryzyko insulinooporności wzrasta z każdym wypalonym papierosem, co dokładnie opisałam w publikacji: "The impact of smoking on the development of diabetes and its complications." w czasopiśmie *Diabetes & Vascular Disease Research*. [I.5.]. Towarzyszący paleniu papierosów spadek łaknienia i tym samym masy ciała nie rekompensuje negatywnego wpływu nikotyny na metabolizm glukozy, a ostateczny bilans energii wpływa niekorzystnie na funkcjonowanie całego organizmu. W osoczu palących osób zdrowych, wykazano istotny spadek stężenia insuliny w porównaniu do niepalących osób zdrowych [M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. *Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.6.*]. U palących pacjentów z PZT wartości te były około 2-krotnie niższe, porównując z wynikiem uzyskanym w populacji pacjentów niepalących. Podobny wynik uzyskano w grupie pacjentów z PZT bez cukrzycy, jak i z cukrzycą. Najniższa wartość dla stężenia insuliny została oznaczona w osoczu palących pacjentów z PZT i cukrzycą, aczkolwiek zaobserwowano również niskie wartości insuliny u palących pacjentów z PZT bez cukrzycy [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. *Distribution of pancreatic polypeptide-secreting endocrine cells in nondiabetic and diabetic cases. Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. 2017 Vol.25 no.6; s.422-431, I.4.*]. Stan taki, może świadczyć o zwiększonym ryzyku wystąpienia cukrzycy w tej grupie chorych. Wykazano również znaczne upośledzenie wydzielania insuliny u pacjentów, u których stwierdzono obecność zwapnień miąższowych trzustki i postępujący proces włóknienia spowodowanym stanem zapalnym, stymulowanym paleniem papierosów. Istotnie niższe stężenie insuliny oraz wyższe stężenie glukozy we krwi u palących pacjentów

w porównaniu do niepalących było zbieżne ze stopniem zaawansowania zmian struktury i upośledzeniem czynności endokrynej narządu. [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. *Distribution of pancreatic polypeptide-secreting endocrine cells in nondiabetic and diabetic cases. Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. 2017 Vol.25 no.6; s.422-431, M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.4; I.6.].*

- ❖ U palących pacjentów z PZT ze współistniejącą cukrzycą dochodzi do znacznej redukcji liczby komórek B i A, a zwiększenie ilości komórek D i PP oraz zmiana ich lokalizacji w wyspach i mięszu trzustki, znajdujących odzwierciedlenie w ilościowych oraz jakościowych badaniach ekspresji hormonów wydzielanych przez te komórki endokryjne. Dowodzi to o istotnej roli palenia tytoniu w powstawaniu zaburzeń endokrynych w przebiegu PZT.

Rozwój cukrzycy, jako powikłanie PZT jest spowodowany przez panujący proces zapalny - wynikający między innymi z palenia papierosów - który prowadzi do niszczenia komórek wysp Langerhansa. W opublikowanych dotychczas pracach badano jedynie strukturę wysp trzustkowych u chorych na PZT, brak było natomiast informacji o wpływie palenia papierosów na komórki endokryjne u tych chorych oraz u pacjentów z cukrzycą. Przeprowadzone badania immunohistochemicznej lokalizacji hormonów w wyspach Langerhansa w skrawkach trzustki od palących i niepalących pacjentów z PZT bez lub i cukrzycą oraz analiza densytometryczna określająca intensywność ekspresji tych hormonów wykazały różnicę w ekspresji insuliny, glukagonu, a szczególnie somatostatyny i polipeptydu trzustkowego (PP) [M. Śliwińska-Mossoń, M. Jeleń, H. Milnerowicz. *Somatostatin expression in the pancreatic cells of smoking and nonsmoking chronic pancreatitis patients with or without diabetes. Pancreatology 2016 Vol.16 no.2; s.225-230; M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. Distribution of pancreatic polypeptide-secreting endocrine cells in nondiabetic and diabetic cases. Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. 2017 Vol.25 no.6; s.422-431, M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.3.; I.4.; I.6.].*

Stwierdziłam, iż nacieczenie wysp przez jednojądrowe komórki oraz wokół- i wewnątrz wyspowe włóknienie powoduje obniżenie wyspowej ekspresji insuliny, a także zmniejszenie liczby komórek A produkujących glukagon. Ponadto w przebiegu PZT wykazałam istotny wpływ redukcji ilości komórek B wysp trzustkowych na rozwój

cukrzycy. Fakt ten odzwierciedla się niedoborem insuliny oraz defektem jej uwalniania. Zaobserwowałam również, że wraz z rozwojem zwłóknienia trzustki u palących pacjentów z PZT i cukrzycą maleje stosunek komórek B do komórek A. Analiza densytometryczna określająca intensywność ekspresji tych hormonów u niepalących i palących pacjentów z PZT i cukrzycą wykazała istotnie statystycznie zmniejszone wydzielanie insuliny i glukagonu w tkankach trzustki w porównaniu do osób zdrowych. Zaobserwowałam również istotny spadek intensywności reakcji immunohistochemicznej na insulinę i glukagon u palących pacjentów z cukrzycą w porównaniu z niepalącymi pacjentami z cukrzycą. Uzyskane wyniki stanowią wyraz dużych zmian zapalnych, które przekładają się na znaczny spadek liczby komórek B i A oraz istotny defekt czynnościowy tych komórek charakteryzujący się upośledzonym wydzielaniem insuliny i glukagonu u palących pacjentów z cukrzycą [*M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.6.*].

Badania eksperymentalne sugerują istotną funkcjonalną zależność między poszczególnymi komórkami wysp Langerhansa, a niewystarczająca ilość badań oraz informacji dotyczących rozmieszczenia komórek D w tkankach trzustki u pacjentów ze stanem zapalnym i cukrzycą skłoniła mnie do przeanalizowania lokalizacji i nasilenia immunoreaktywności somatostatyny (SS) w tkankach tych pacjentów [*M. Śliwińska-Mossoń, M. Jeleń, H. Milnerowicz. Somatostatin expression in the pancreatic cells of smoking and nonsmoking chronic pancreatitis patients with or without diabetes. Pancreatology 2016 Vol.16 no.2; s.225-230; I.3.*].

Somatostatyna uczestniczy w kontrolowaniu wydzielania glukagonu i insuliny, czyli dwóch hormonów uczestniczących w regulowaniu homeostazy glukozy. W warunkach fizjologicznych parakrynnie działanie SS hamuje ekspresję genu insuliny, glukagonu i PP. Dlatego też, przez interakcję z komórkami A i B w wyspie, hormon ten może wpłynąć na regulację gospodarki węglowodanowej.

W przeprowadzonym doświadczeniu u wszystkich palących pacjentów z PZT ze współistniejącą cukrzycą zaobserwowałam zdecydowanie silniejszą reakcję immunohistochemiczną dla somatostatyny oraz zwiększenie ilości komórek D a także zmianę w ich dystrybucji (oprócz w wyspach Langerhansa, reakcja była obserwowana w komórkach pomiędzy komórkami pęcherzykowymi i przewodowymi) we wszystkich częściach trzustki (głowa, trzon, ogon) w porównaniu do niepalących pacjentów z PZT oraz osób zdrowych. Dodatkowo, dzięki analizie densytometrycznej, stwierdziłam dwa razy wyższą ekspresję somatostatyny u badanych chorych w porównaniu ze zdrowymi osobami. Zwiększone stężenie glukozy na obwodzie, które towarzyszy cukrzycy doprowadza komórki D do sekrecji somatostatyny. Wykazano również, że zwiększone

wydzielanie somatostatyny u palących pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki z cukrzycą koreluje ze zmniejszoną ekspresją glukagonu i insuliny w tkankach pochodzących od badanych pacjentów [M. Śliwińska-Mossoń, M. Jeleń, H. Milnerowicz. *Somatostatin expression in the pancreatic cells of smoking and nonsmoking chronic pancreatitis patients with or without diabetes. Pancreatology 2016 Vol.16 no.2; s.225-230; M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.3.; I.6.].*

Dodatkowo w obecnym doświadczeniu u pacjentów z PZT zaobserwowałam lokalizację komórek D między komórkami pęcherzykowymi gruczołu - główna lokalizacja komórek gwiaździstych trzustki - co wskazuje, że somatostatyna może wywierać wpływ na komórki uczestniczące w procesie zwłóknienia. Silniejsza immunoreaktywność i dodatkowa ekspresja komórek D w części egzokrynej trzustki może wynikać z fizjologicznej roli somatostatyny, która hamuje syntezę czynnika wzrostu płytek krwi (PDGF), uznanego stymulatora PSCs i tym samym przyczynia się do zmniejszenia proliferacji komórek uczestniczących w procesach zwłóknienia podczas PZT.

Kolejnym czynnikiem stymulującym komórki gwiaździste są cytokiny, a zwiększony stres oksydacyjny w odpowiedzi na palenie papierosów jest związany z wytwarzaniem krążących prozapalnych cytokin, co potwierdziłam w badaniu przeprowadzonym u palących pacjentów z PZT, w którym wykazałam 7-krotnie zwiększenie stężenia IL-6 w surowicy oraz znacznie silniejszą reakcję immunohistochemiczną IL-6 w komórkach wysp Langerhansa, komórkach pęcherzykowych oraz przewodowych trzustki w porównaniu z niepalącymi chorymi z PZT podczas stanu zapalnego w trzustce [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz, S. Nabzdyk, J. Rabczyński †. *The effect of smoking on expression of IL-6 and antioxidants in pancreatic fluids and tissues in patients with chronic pancreatitis. Pancreatology 2012 Vol.12 no.4; s.295-304, I.1].* W przeprowadzonym badaniu u pacjentów z PZT stwierdziłam silną reakcję immunohistochemiczną dla somatostatyny i dodatkową zmianę w lokalizacji komórek D między komórkami pęcherzykowymi podczas toczącego się stanu zapalnego. Wyniki badań mogą świadczyć o podjęciu obrony poprzez zmniejszenie lokalnej sekrecji prozapalnych cytokin w gruczole, ponieważ somatostatyna poprzez receptory może bezpośrednio wpływać na miofibroblasty i hamować wydzielanie IL-6 i IL-8 oraz składników macierzy pozakomórkowej.

Podsumowując, uzyskane wyniki świadczą o hipertrofii oraz hiperplazji komórek D. Silna reakcja immunohistochemiczna dla somatostatyny, rozrost, zwiększenie ilości oraz

dotatkowa lokalizacja komórek D w części zewnątrzwydzielniczej trzustki u palących pacjentów z PZT i cukrzycą może wynikać z „nakładania się” fizjologicznych kompensacyjnych efektów SS: hamowania nadmiernej sekrecji glukagonu w cukrzycy oraz działania przeciwzapalnego hormonu [M. Śliwińska-Mossoń, M. Jeleń, H. Milnerowicz. *Somatostatin expression in the pancreatic cells of smoking and nonsmoking chronic pancreatitis patients with or without diabetes. Pancreatology 2016 Vol.16 no.2; s.225-230, I.3.*].

Cukrzyca pochodzenia trzustkowego jest związana nie tylko z niedoborem insuliny, glukagonu i wzrostem SS, ale również z zaburzeniami sekrecji PP przez komórki wysp trzustki. Fizjologicznie komórki PP zlokalizowane są głównie na obrzeżach wysp Langerhansa głowy trzustki i taka reakcja była obserwowana w moich badaniach. Stwierdziłam, silną reakcję immunohistochemiczną PP w pojedynczych komórkach na obrzeżach wysp w zdrowej tkance. Prawdopodobnie komórki B, produkujące insulinę, znajdujące się w „centrum” wysp trzustki, są chronione przed zniszczeniem przez otaczające komórki PP. W związku z powyższym zaburzona produkcja PP może być pierwszym sygnałem nieprawidłowych funkcji komórek wysp trzustki. W przeprowadzonych immunohistochemicznych badaniach oraz na podstawie analizy densytometrycznej wykazałam istotne różnice w intensywności reakcji immunohistochemicznej dla PP oraz w rozmieszczeniu komórek PP w trzustkach palących i niepalących pacjentów z PZT i lub bez cukrzycy. Wykazałam statystycznie istotną bardzo silną intensywność reakcji dla PP w skrawkach tkankowych, pochodzących od palących pacjentów z cukrzycą. Intensywność reakcji immunohistochemicznej na obecność PP, u palących pacjentów bez cukrzycy i niepalących pacjentów z cukrzycą, określono jako silną, a w trzech tkankach jako bardzo silną. Natomiast u niepalących pacjentów bez cukrzycy ekspresja PP była słabsza, porównywalna do zdrowej kontroli. Rozkład komórek PP w tkankach trzustki palących pacjentów z cukrzycą był bardzo zróżnicowany. W wyspach trzustkowych (skupionych w jednym polu widzenia w wyniku silnej redukcji podścieliska tkankowego), komórki PP obserwowałam w całym aparacie wyspowym. Interesująca wydaje się również obserwacja dotycząca występowania zwiększonej liczby komórek PP w części egzokrynej trzustki dotkniętej procesem włóknienia przy jednoczesnym braku komórek PP w wyspach trzustki w analizowanym obszarze tkanki. Wzrost ilości komórek PP w wyspach oraz pomiędzy komórkami pęcherzykowymi u palących pacjentów z cukrzycą świadczy o zaburzeniu czynności wewnątrzwydzielniczej trzustki oraz sugeruje negatywny wpływ palenia papierosów na wydolność narządu. Dodatkowo pojawienie się komórek PP w przewodach trzustkowych przemawia za pogłębieniem się stanu zapalnego w tkance i dysfunkcji trzustki. Uzyskane wyniki potwierdzają, iż palenie papierosów negatywnie wpływa na czynność wewnątrzwydzielniczą trzustki, powodując

wzrost ekspresji PP w tkance. Stwierdziłam również, że utrata komórek B wysp w wyniku toczącego się stanu zapalnego sprawia, że trzustka poprzez zwiększoną produkcję PP rekompensuje zachwianą równowagę czynności wewnętrzwydzielniczej. Istotne kliniczne manifestacje zaburzeń hormonalnych występują późno w przebiegu cukrzycy. Dlatego, sugeruje się rolę PP, jako wczesnego markera niewydolności wewnętrzwydzielniczej trzustki a także specyficznego parametru prognostycznego rozwijającej się cukrzycy w przebiegu PZT [*M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. Distribution of pancreatic polypeptide-secreting endocrine cells in nondiabetic and diabetic cases. Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. 2017 Vol.25 no.6; s.422-431, I.4.*].

❖ **Palenie papierosów przyczynia się do nasilenia się odległych następstw w wyniku trwającego PZT u pacjentów z cukrzycą w postaci zaburzeń metabolicznych oraz dysfunkcji nerek.**

Cukrzyca w przebiegu przewlekłego zapalenia trzustki jest trudna do kontrolowania, chociaż istnieje tylko kilka starszych badań na ten temat. Stan ten wynika między innymi z tego faktu, iż cukrzyca pochodzenia trzustkowego jest zaburzeniem wieloczynnikowym, oprócz dysfunkcji trzustki w postaci utraty głównych hormonów trzustkowych i niewydolności zewnątrzwydzielniczej, znaczącą rolę odgrywa zaburzony metabolizm węglowodanów, białek i lipidów.

U niepalących i palących pacjentów z PZT i współistniejącą cukrzycą stwierdziłam dyslipidemie z podwyższonym stężeniem cholesterolu całkowitego (TCH), lipoprotein o małej gęstości (LDL-CH) i trójglicerydów (TG) w porównaniu do niepalących osób zdrowych. Hiperglikemia może niekorzystnie wpływać na lipoproteiny co w konsekwencji sprzyja rozwojowi aterosclerozy. Ponadto palenie papierosów, które jest uważane za główny czynnik ryzyka miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca, może prowadzić do zmian w prawidłowym profilu lipidowym, nawet u zdrowych ludzi, u których zaobserwowałam statystyczny wzrost stężenia TG w porównaniu do niepalących zdrowych. Wykazałam również silną dodatnią korelację między stężeniem kotyniny a stężeniami TCH, LDL-CH i TG w surowicy pacjentów palących z cukrzycą. Uzyskane wyniki sugerują istotny wpływ palenia papierosów na ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych u tych pacjentów. Dodatkowo stwierdziłam statystycznie większą wartość wskaźnika Castelli I - wskaźnika aterogenności - u pacjentów z cukrzycą w porównaniu do zdrowej kontroli. Otrzymany wynik potwierdził ryzyko rozwoju miażdżycy i dyslipidemii u pacjentów z cukrzycą. Wykazałam dodatnią korelację pomiędzy stężeniami cholesterolu i TG, a aktywnością amylazy i lipazy w surowicy tych pacjentów. Wysoka aktywność enzymatyczna u pacjentów z PZT i cukrzycą, może być związana ze zwiększonym ryzykiem miażdżycy i prawdopodobnie wskazuje na

wydłużony efekt upośledzonego wydzielania insuliny i glukagonu oraz zaburzeń czynności trzustki [*M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.6.*].

Powikłania związane z przewlekłym zapaleniem trzustki są bardziej powszechne u palących pacjentów niż u niepalących [*M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2017 Vol.14 no.4; s.265-276, I.5.*]. Wykazałam statystycznie wyższe stężenie kreatyniny i kwasu moczowego u palących pacjentów z cukrzycą w porównaniu do niepalących osób zdrowych. Stwierdzone zwiększone stężenie kwasu moczowego (niskocząsteczkowego antyoksydanta) w surowicy u palących pacjentów z PZT i cukrzycą w porównaniu z niepalącymi może być wynikiem stresu oksydacyjnego wywołanego paleniem papierosów. Konsekwencją PZT jest niedożywienie i biegunka tłuszczowa w wyniku upośledzenia trawienia. Zaburzone wchłanianie pokarmów może jednak prowadzić do jakościowego niedożywienia w odniesieniu do wchłaniania rozpuszczalnych w tłuszczach witamin (A, D, E i K), zwłaszcza witaminy D. Ponadto, wtórne niedożywienie w niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki odgrywa rolę prognostyczną u pacjentów z PZT. Wykazałam znaczącą różnicę między średnią wartością azotu mocznikowego (BUN) u niepalących i palących pacjentów z cukrzycą, a niepalącymi i palącymi osobami zdrowymi. Niskie stężenie mocznika występujące u niepalących i palących pacjentów z PZT i cukrzycą wiąże się ze zmniejszoną syntezą mocznika spowodowaną niewielką ilością aminokwasów dostępnych do deaminacji. Jednak niewielka podaż aminokwasów wynika z nieprawidłowego wchłaniania lub głodzenia. Stwierdziłam, iż oznaczone stężenie kreatyniny (w zakresie referencyjnym) oraz niskie stężenie mocznika w surowicy pacjentów z PZT i cukrzycą wskazują na zmniejszenie katabolizmu białek. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdziłam, że długotrwały proces chorobowy - przewlekłe zapalenie trzustki - prowadzi do zaburzeń stanu odżywienia, które ulega pogłębieniu u palących pacjentów z PZT i cukrzycą.

Nefropatia cukrzycowa jest chorobą, która ma swój początek w momencie pojawienia się hiperglikemii i pozostaje bezobjawowa przez wiele lat. U palących pacjentów z PZT i współistniejącą cukrzycą wykazałam statystycznie niższą wartość eGFR w porównaniu do niepalących osób zdrowych, a dodatkowo otrzymana wartość współczynnika filtracji kłębuszkowej (nieznacznie poniżej wartości referencyjnej) wskazuje na uszkodzenie nerek. U palących pacjentów z cukrzycą stwierdziłam negatywną korelację między stężeniem kreatyniny a wartością eGFR. Uzyskana zależność potwierdza wpływ palenia papierosów na rozwój nefropatii u tych pacjentów [*M. Śliwińska-Mossoń, S. Milnerowicz, H. Milnerowicz. Diabetes mellitus secondary to*

pancreatic diseases (type 3c) - the effect of smoking on the exocrine-endocrine interactions of the pancreas. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2018 Vol.15 no.3; s.243-259, I.6.].

❖ Palenie papierosów wpływa na rozwój cukrzycy i na komplikacje z nią związane

Cukrzyca jest jednym z najczęstszych zaburzeń metabolicznych, wynikających z interakcji między czynnikami genetycznymi, środowiskowymi i stylami życia. W publikacji: "The impact of smoking on the development of diabetes and its complications." [I.5.] opisałam potencjalną rolę palenia papierosów w predyspozycji rozwoju cukrzycy oraz wpływ palenia na rozwój powikłań naczyniowych w tym stanie. Istnieje wiele badań dokumentujących wpływ palenia na zdrowie, ale niewiele było prac, które koncentrowałyby się na pacjentach chorych na cukrzycę, sugerując że narażenie zdrowia u tych osób jest co najmniej porównywalne do tego obserwowanego w populacji ogólnej. Aczkolwiek badania dotyczące wpływu palenia u pacjentów z cukrzycą jednoznacznie potwierdziły zwiększoną częstość występowania i wyższe ryzyko przedwczesnej śmierci związane z rozwojem powikłań makroangiopatycznych u tych pacjentów. Palenie jest również związane z przedwczesnym rozwojem powikłań mikronaczyniowych i może przyczyniać się do patogenezy cukrzycy typu 2. Wykazano, że palenie tytoniu jest predyktorem progresji nietolerancji glukozy zarówno po przejściu od normoglikemii do upośledzonego stanu tolerancji glukozy, jak i zwiększonego ryzyka rozwoju cukrzycy. Mechanizmy wyjaśniające związek między paleniem tytoniu a rozwojem cukrzycy nie są w pełni zrozumiałe, chociaż wysunięto szereg hipotez. Dym papierosowy zawiera ponad 7 tysięcy związków chemicznych i od 10^{15} do 10^{17} wolnych rodników i oprócz dobrze poznanych związków, takich jak tlenek węgla, smoła, arsen, ołów i nikotyna, jest wiele nieznanymi związków, co prowadzi do indukcji wielu szlaków biochemicznych w organizmie, które mogą brać udział w patogenezie cukrzycy.

Aktualne dowody wskazują, że zaprzestanie palenia jest ważne nie tylko w zapobieganiu powikłaniom makronaczyniowym w cukrzycy, ale także ma wpływ na ograniczanie chorób mikronaczyniowych i może również ułatwić kontrolę glikemii w tym stanie. Podsumowując palenie papierosów powoduje zmiany w wydzielaniu insuliny przez komórkę β trzustki i może pośredniczyć w oporności na insulinę, co powoduje upośledzenie metabolizmu glukozy i co w konsekwencji prowadzi do cukrzycy. Co więcej, dysfunkcja śródbłonna wywołana paleniem ma kluczową rolę w rozwoju powikłań naczyniowych w tym stanie.

Pomimo przekonujących faktów dotyczących szkodliwych skutków palenia w cukrzycy, nie jest jasne, dlaczego pacjenci z cukrzycą nadal palą z co najmniej z taką samą częstotliwością, jak w populacji ogólnej. Może to być związane z ogólnym niezdrowym stylem życia lub może po prostu odzwierciedlać brak skutecznego programu

edukacyjnego dla pacjentów w tej grupie. Rzucenie palenia stopniowo zmniejsza ryzyko rozwoju cukrzycy lub powikłań naczyniowych u osób z ustaloną chorobą. Dlatego należy położyć większy nacisk edukacyjny na rzucenie palenia w grupie wysokiego ryzyka pacjentów z cukrzycą, chociaż najskuteczniejsza strategia dotycząca rzucania palenia nie została jeszcze ustalona [M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. *The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. Diabetes Vasc. Dis. Res. 2017 Vol.14 no.4; s.265-276, I.5*].

Cykl prac jest podsumowaniem wiedzy klinicznej i naukowej dotyczącej wpływu palenia papierosów na trzustkę oraz tego, w jaki sposób może on przyczynić się do przewlekłego zapalenia trzustki oraz rozwoju cukrzycy i komplikacjami z nią związanymi.

Najważniejsze osiągnięcia i wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

1. Wykazanie, że palenie papierosów u pacjentów z cukrzycą powoduje zwiększone wydzielanie cytokiny zapalnej IL-6, z jednoczesnym zaburzeniem przepływu krwi w trzustce, zwiększoną aktywnością lipazy i amylazy oraz zmniejszonym wydzielaniem insuliny.
2. Wykazanie, iż u palących pacjentów z PZT podwyższona aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenie metalotioneiny-1/2 w płynach trzustkowych jest wynikiem wzmożonej obrony antyoksydacyjnej trzustki.
3. Wykazanie, iż u palących pacjentów z PZT i cukrzycą w wyniku nasilenia działania reaktywnych form tlenu oraz wyczerpania endogennych układów antyoksydacyjnych, przy jednoczesnym występowaniu zaburzeń ilościowych frakcji lipidów osocza, dochodzi do zmożonej peroksydacji lipidów, następstwem tego jest wzrost stężenia TBARS – wskaźnika stresu oksydacyjnego .
4. Dowiedzenie, iż palenie tytoniu może być uznane jako główny czynnik sprawczy utraty komórek A i B w przebiegu przewlekłego zapalenia trzustki.
5. Wykazanie, iż silna reakcja immunohistochemiczna dla somatostatyny, rozrost, zwiększenie ilości oraz dodatkowa lokalizacja komórek D w części zewnątrzwydzielniczej trzustki u palących pacjentów z PZT i cukrzycą może wynikać z „nakładania się” fizjologicznych kompensacyjnych efektów SS: hamowania nadmiernej sekrecji glukagonu w cukrzycy oraz działania przeciwzapalnego hormonu.
6. Stwierdzenie, iż polipeptyd trzustkowy ze względu na swoje właściwości może być przydatnym markerem niewydolności wewnątrzwydzielniczej trzustki a także specyficznym parametrem prognostycznym rozwijającej się cukrzycy w przebiegu PZT.

7. Potwierdzenie, iż wśród palących pacjentów z ustalonym rozpoznaniem PZT ryzyko wystąpienia cukrzycy jest dość duże, dlatego należy monitorować jej rozwój.
8. Opracowanie immunohistochemicznej metody oznaczania hormonów trzustki (insuliny, glukagonu, somatostatyny i polipeptydu trzustkowego), enzymów antyoksydacyjnych (Cu/Zn SOD i GPx), IL-6 oraz ET-1 w tkankach trzustki.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. Analiza dorobku naukowego

Poza cyklem publikacji, wybranych jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje:

- ❖ **33 publikacje** o łącznej wartości IF **19.920**, na które składa się 19 publikacji eksperymentalnych (9 opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz 14 publikacji poglądowych (1 opublikowana przed uzyskaniem stopnia doktora).
- ❖ **38 komunikatów**, na które składa się **19** komunikatów prezentowanych na zagranicznych konferencjach i zjazdach naukowych (przed uzyskaniem stopnia doktora – 7 komunikatów) oraz **19** komunikatów prezentowanych na konferencjach i zjazdach krajowych (przed uzyskaniem stopnia doktora – 2 komunikatów).
- ❖ współautorstwo **książki**
- ❖ **2 rozdziały** w monografii w postaci książki

Jestem pierwszym autorem 20 prac i autorem korespondencyjnym 24 prac. Moje publikacje są cytowane w międzynarodowych czasopismach m.in. przez: *Sahin-Toth M, Hegyi P. Smoking and Drinking Synergize in Pancreatitis: Multiple Hits on Multiple Targets. Gastroenterology, 2017, 153 (6): 1479-1481; Barreto S. G. How does cigarette smoking cause acute pancreatitis? Pancreatology, 2016, 16(2): 157-163.*

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych wraz z analizą bibliometryczną dorobku naukowego, sporządzoną przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu im. Piastów Śląskich, zawarto w załączniku nr 3.

- ❖ Sumaryczny *impact factor* za całokształt dorobku naukowego wynosi – według listy Journal Citation Reports - **34.795** oraz **545** punktów według punktacji MNiSW (w tym po uzyskaniu stopnia doktora IF= 31.221, MNiSW = 473)
- ❖ Analiza publikacji w bazie:
 - ✓ **Web of Science – Science Citation Index- Expanded** wykazała **93 cytowań**,
 - Indeks Hirsha wynosi **6**
 - ✓ **Scopus** wykazała **151 cytowań**,
 - Indeks Hirsha wynosi **7**

5.2. *Główne kierunki pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora*

Moja działalność naukowo-badawcza, prowadzona w początkowym okresie po ukończeniu studiów i podjęciu studiów doktoranckich w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych, dotyczyła wpływu palenia na egzokrynną i endokrynną funkcję trzustki u zdrowych osób i pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki. Mój dorobek naukowy, powstały przed uzyskaniem doktora nauk farmaceutycznych obejmuje tematykę badawczą, dotyczącą:

❖ *oceny czynności zewnątrzwydzielniczej i wewnątrzwydzielniczej trzustki u zdrowych osób, osób narażonych zawodowo na metale ciężkie oraz pacjentów ze schorzeniami trzustki*

Powyższe zagadnienie stały się przedmiotem siedmiu prac doświadczalnych oraz jednej pracy poglądowej, zamieszczonych na łamach *Neoplasma* [II.A.1]; *Pancreas* [II.A.2] *Przeglądu Lekarskiego* [II.B.1; II.B.2; II.B.3; II.B.6; II.B.7; III.B.1]. Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: IF: 3.547, MNiSW = 62.

Od początku pracy zawodowej moje zainteresowania skupiały się wokół wpływu palenia papierosów na funkcję trzustki. Z tego powodu dogłębnie zapoznałam się z tematem wpływu palenia tytoniu na powstanie i przebieg schorzeń trzustki, co zostało opisane w: *M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. Palenie tytoniu a schorzenia trzustki. Przegl.Lek. 2005 T.62 nr 10; s.1163-1166. MNiSW=5.*

W opublikowanych do 2004 roku pracach wykazano znaczny wzrost aktywności enzymów trawiennych we krwi, a w szczególności amylazy po pobudzeniu sekretyną u osób palących, brak było informacji o wpływie palenia papierosów na aktywność lipazy i na aktywność amylazy bez stymulacji. W związku z powyższym zostało przeprowadzone badanie celem którego było wykazanie wpływu palenia tytoniu na czynność zewnątrzwydzielniczą trzustki mierzoną wielkością aktywności amylazy we krwi i moczu oraz lipazy we krwi niepalących i palących zdrowych osób i pacjentów ze stwierdzonym: ostrym, przewlekłym nawracającym i przewlekłym zapaleniem trzustki (OZT, PNZT i PZT). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że u palących pacjentów z OZT, PNZT, PZT aktywność amylazy była odpowiednio wyższa o 30%, 58%, 13% w porównaniu do niepalących pacjentów. Zaobserwowano, że u palących zdrowych aktywność lipazy była o 116% wyższa niż u niepalących. U pacjentów palących z OZT i PNZT stwierdzono istotny statystyczny wzrost aktywności enzymu w porównaniu do pacjentów niepalących. Wykazanie różnic w aktywności amylazy

zarówno w surowicy jak i w moczu oraz w aktywności lipazy we krwi u palących pacjentów ze schorzeniami trzustki w porównaniu do chorych niepalących wskazuje na istotny wpływ palenia papierosów na czynność zewnątrzwydzielniczą tego narządu. Wyniki przedstawione powyżej opublikowano w dwóch pracach oryginalnych: *H. Milnerowicz, M. Śliwińska, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz. Wpływ palenia papierosów na poziom amylazy u pacjentów z procesem zapalnym trzustki. Przegl. Lek. 2004 T.61 nr 10; s.1071-1072, M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. Wpływ palenia tytoniu na aktywność lipazy u pacjentów z procesem zapalnym trzustki. Przegl. Lek. 2005 T.62 nr 10; s.1058-1061; MNiSW=10.*

Z doniesień *Donaldson i wsp.* oraz *Warshaw* wynika, że amylazy pochodzące z różnych źródeł różnią się termowrażliwością. W oparciu o powyższe przesłanki podjęliśmy badania nad ilościową oceną amylazy termolabilnej w surowicy niepalących i palących osób zdrowych, pacjentów ze stwierdzonym OZT, PNZT i PZT oraz pacjentów z cukrzycą. Poddając surowicę niepalących i palących osób zdrowych i pacjentów ze schorzeniami trzustki działaniu temperatury 65°C przez okres 15 minut stwierdzono znaczne ilościowe różnice w aktywności frakcji termolabilnej amylazy. W surowicy niepalących osób zdrowych procentowy udział aktywności frakcji amylazy termolabilnej określono na 44%, a u palących osób zdrowych na 63%. Wykazano istotnie statystycznie różnicę w wartości stosunku aktywności termolabilnej amylazy do termostabilnej osób palących w porównaniu do niepalących.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż w surowicy pacjentów ze stanem zapalnym trzustki dominującą frakcją jest amylaza termolabilna, charakterystyczna dla amylazy pochodzenia trzustkowego.

Środowiskowe narażenie na metale ciężkie odgrywa znaczącą rolę w indukowaniu patologicznych zmian w trzustce u zwierząt. W opublikowanych pracach do 2008 roku brak było informacji jak palenie papierosów oraz jednocześnie ekspozycja na metale ciężkie wpływa na funkcję trzustki ludzi. Dlatego kolejnym etapem badań było wykazanie wpływu palenia papierosów na całkowitą i termolabilną aktywność amylazy w surowicy palących i niepalących pracowników Huty Miedzi Legnica zawodowo narażonych na metale ciężkie m. in: kadm, arsen, ołów. Materiał do badań został pobrany od osób zdrowych i hutników. Wykazanie istotnych statystycznie różnic w całkowitej aktywności amylazy i jej formy termolabilnej w surowicy u niepalących i palących hutników w porównaniu do niepalących osób zdrowych wskazuje na znaczący wpływ ekspozycji na metale ciężkie na czynność zewnątrzwydzielniczą tego narządu. Ponadto uzyskane wyniki wzrostu aktywności amylazy we krwi u niepalących i palących hutników, świadczą o wpływie procesu interakcji środowiskowych ksenobiotyków, pochodzących z dymu tytoniowego i zawodowej ekspozycji na metale ciężkie.

Wyniki przedstawione powyżej opublikowano w dwóch pracach oryginalnych: *M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. Aktywność termolabilnej amylazy w surowicy u niepalących i palących zdrowych osób i pacjentów z procesem zapalnym trzustki. Przegl. Lek. 2008 T.65 nr 10; s.491-494* i *M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, A. Zuchniewicz, R. Andrzejak, J. Antonowicz-Juchniewicz. Wpływ palenia papierosów na aktywność amylazy w surowicy osób narażonych zawodowo na metale ciężkie. Przegl. Lek. 2008 T.65 nr 10; s.495-497; MNiSW/KBN: =12.*

W zaawansowanych procesach zapalnych w trzustce obserwuje się uszkodzenia morfologiczne i czynnościowe układu wyspowego. Wykazano istotne zmniejszenie liczby komórek B u chorych na przewlekłe zapalenie trzustki. Dlatego celem kolejnej pracy było wykazanie szkodliwego działania palenia tytoniu na funkcję endogenną trzustki poprzez oznaczenie stężenia glukozy i insuliny w surowicy oraz wykonanie oceny histopatologicznej i immunohistochemicznej lokalizacji insuliny i glukagonu w skrawkach tkankowych tego narządu pochodzących od osób zdrowych i palących i niepalących pacjentów ze stwierdzonym PZT. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazałam znacząco wyższe stężenie glukozy w surowicy u palących pacjentów z PZT i osób zdrowych w porównaniu z niepalącymi chorymi i zdrowymi. Stężenie insuliny u palących pacjentów, w porównaniu do niepalących było statystycznie niższe. Natomiast po przeprowadzeniu immunohistochemicznej lokalizacji insuliny i glukagonu oraz analizy densytometrycznej określającej intensywność ekspresji tych hormonów, stwierdziłam istotne zmniejszenie liczby komórek B i A u palących pacjentów z PZT w porównaniu do niepalących chorych i osób zdrowych oraz wykazałam u palących pacjentów istotnie niższą ekspresję insuliny oraz glukagonu w tkankach w porównaniu do niepalących chorych oraz zdrowych osób.

Wyniki przeprowadzonego badania stały się podstawą do publikacji: *H. Milnerowicz, M. Śliwińska-Mossoń, J. Rabczyński, M. Nowak, S. Milnerowicz.: Dysfunction of the pancreas in healthy smoking persons and patients with chronic pancreatitis. Pancreas 2007 Vol.34 no.1; s.46-54. IF: 2.300; MNiSW/KBN: 20.*

W ostatnich latach opisano nieliczne przypadki współistnienia surowiczego gruczolaka torbielowatego (SCA) z guzem endokrynnym trzustki. W tych przypadkach obserwowano nowotwór zbudowany z dwóch struktur: mikrotorbieli i części endokrynej - wydzielającej hormony. Do 2006 roku nikt na świecie nie opisał przypadku SCA produkującego hormony. W opublikowanej pracy przedstawiłam obraz kliniczny i badania histochemiczne niezwyklego przypadku surowiczego gruczolaka torbielowatego trzustki wydzielającego hormony wyspowe - somatostatynę i polipeptyd trzustkowy. Materiał do badań uzyskano od 5 chorych, wszystkie przypadki dotyczyły

kobiet. U jednej z pacjentek w badaniu ultrasonografii zaobserwowano nieregularną przestrzeń płynową odpowiadającą wielokomorowej torbieli. Zmianę tą potwierdziło badanie tomografii komputerowej i rezonans magnetyczny. W badaniu dopplerowskim stwierdzono patologiczne unaczynienie badanego w głowie trzustki ogniska. Metodą immunohistochemiczną w preparatach histologicznych torbielaka tej pacjentki wykazano silnie dodatnią ekspresję dla somatostatyny i polipeptydu trzustkowego w nabłonku wyściółki torbieli nowotworu. W pozostałych przypadkach surowiczego gruczolaka torbielowatego trzustki nie wykazano patologicznego unaczynienia torbieli nowotworowych oraz immunoreaktywności na obecność hormonów trzustki.

Pozostaje otwarty problem, która komórka jest punktem wyjścia dla surowiczego gruczolaka torbielowatego. W przeprowadzonym badaniu opisywany przypadek klasycznej postaci surowiczego gruczolaka torbielowatego wykazywał ekspresję somatostatyny i PP, co wskazywało by, że SCA być może wywodzi się z utkania endokrynnego. Przedstawiony niezwykle przypadek SCA jest pierwszym nowotworem o klasycznym utkaniu SCA i wydzielaniu hormonów.

Wyniki badania zostały opublikowane: *Rabczyński, H. Milnerowicz, M. Śliwińska-Mossoń, M. Jabłonowska, S. Milnerowicz, W. Knast, M. Zabel. Hormone-producing serous cystadenoma of the Pancreas. Neoplasma 2006 Vol.53 no.6; s.495-499. IF: 1.247; MNiSW/KBN: 10.*

❖ *oceny wpływu palenia tytoniu na aktywność fizyczną młodych osób*

Polska od ponad 20 lat jest krajem o jednym z najwyższych na świecie spożyciu tytoniu. Palenie papierosów wśród młodzieży staje się coraz poważniejszym problemem. Wykazano, że osoby które rozpoczęły nałóg przed 15 rokiem życia, żyją o 8 lat krócej. Wraz z upowszechnieniem tego nałogu szczególnej wagi nabiera uzależnienie kobiet od dymu tytoniowego. Dlatego też celem prac było opracowanie i przeprowadzenie wstępnych badań ankietowych zmierzających do określenia skali zjawiska czynnego i biernego palenia papierosów przez młode kobiety i młodych mężczyzn oraz oceny wpływu palenia na wysiłek fizyczny. Badanie przeprowadzono w formie anonimowej ankiety wśród absolwentów szkół średnich, zdających egzaminy wstępne w tym egzamin sprawnościowy na Akademię Wychowania Fizycznego we Wrocławiu. Stwierdziłam istotny wpływ palenia papierosów na obniżenie wydolności fizycznej, czego skutkiem była zmniejszona liczba punktów uzyskiwanych w testach sprawnościowych przez ankietowane palące kobiety i palących mężczyzn w porównaniu do niepalących. Wykazałam, że palenie papierosów powyżej 10 sztuk dziennie oraz w dniu egzaminu sprawnościowego przez absolwentów istotnie wpłynęło na ich sprawność fizyczną. Wykazałam również, iż paląca młodzież poświęcała mniej czasu na cotygodniowy

trening fizyczny w porównaniu do niepalących – co niewątpliwie również wpłynęło niekorzystnie na wynik testu. Ponadto kobiety palące miały wyższy wskaźnik BMI w porównaniu do niepalących. Uzyskane dane potwierdzają fakt, że wraz ze wzrostem liczby wypalanych papierosów oraz czasem trwania nałogu zmniejsza się wydolność fizyczna osób palących.

Powyższe zagadnienie stały się przedmiotem dwóch prac doświadczalnych, zamieszczonych na łamach *Przeglądu Lekarskiego* [II.B.4 i II.B.5]. Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: MNiSW/KBN: 10.

5.3. Główne kierunki pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych konsekwentnie kontynuowałam badania nad problematyką, będącą przedmiotem moich wcześniejszych zainteresowań naukowych, koncentrując się głównie na zagadnieniach dotyczących wpływu palenia papierosów na równowagę pro/antyoksydacyjną, parametry zapalenia oraz na wydzielanie hormonów trzustki w przebiegu wybranych schorzeń trzustki.

Ponadto zgodnie z tematyką badań i dydaktyki prowadzonej w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych prowadziłam badania dotyczące szeroko pojętej medycyny laboratoryjnej i toksykologicznej. Cykle publikacji powstałe w tym czasie współtworzone są, poza osiągnięciem wskazanym jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, przez 10 prac doświadczalnych, 13 prac poglądowych oraz dwóch rozdziałów monografii, wśród których wyodrębnić można grupy tematyczne:

❖ ocena wpływu palenia na parametry biochemiczne oraz diagnostyczne ich znaczenie w przebiegu wybranych schorzeń.

Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem pięciu prac doświadczalnych oraz pięciu prac poglądowych, zamieszczonych na łamach *Acta Histochemica*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *Przeglądu Lekarskiego* i *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *Postępów Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, *Annales d'Endocrinologie* [II.A.4, II.A.5, II.B.8, II.B.10, II.B.11 i III.A.2, III.A.3, III.A.5, III.A.8, III.B.2]. Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF:6.937, MNiSW/KBN:124.**

Wcześniejsze moje badania wskazują na znaczący wpływ palenia papierosów na całkowitą aktywność amylazy w surowicy u palących pacjentów ze schorzeniami trzustki w porównaniu do chorych niepalących. W oparciu o powyższe informacje podjęłam badania nad elektroforetycznym rozdziałem amylazy w surowicy niepalących i palących

osób zdrowych oraz pacjentów ze stwierdzonym przewlekłym nawracającym i przewlekłym zapaleniem trzustki. W surowicy niepalących osób zdrowych dominował typ I i II izoenzymów amylazy. Izoenzymogram amylazy surowicy palących osób zdrowych i pacjentów wykazał obecność izoenzymu typu II i III oraz wzrost ekspresji barwy tych izoenzymów. Stwierdzona w badaniu elektroforetycznym dodatkowa forma izoenzymu amylazy w surowicy u palących osób zdrowych i chorych, świadczy o szkodliwym oddziaływaniu dymu papierosowego na trzustkę.

Palenie papierosów, które jest uznane za główny czynnik ryzyka miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca, może prowadzić do zmiany prawidłowego profilu lipidowego osocza. Celem następnej pracy była ocena wpływu palenia papierosów na parametry gospodarki lipidowej i stężenie produktów peroksydacji lipidów u młodych zdrowych osób w wieku 19-26 lat. Wykazałam, że stężenia parametrów profilu lipidowego w grupach badanych pozostawały w zakresie wartości referencyjnych, jednakże w palącej grupie osób zdrowych były one wyższe w porównaniu z niepalącymi osobami zdrowymi, za wyjątkiem frakcji HDL. Stwierdziłam istotną różnicę pomiędzy średnią wartością stężenia produktów peroksydacji lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w grupie niepalących osób zdrowych, a średnią wartością TBARS w grupie palących osób. Uzyskane wyniki potwierdzają, że palenie papierosów jest ważnym czynnikiem potencjalnych zmian w profilu lipidowym już u młodych zdrowych osób, co w przyszłości może skutkować wystąpieniem miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca.

W opublikowanych dotychczas pracach badano jedynie wpływ palenia papierosów na wydzielanie insuliny u osób zdrowych i chorych na PZT, brak było natomiast informacji o wpływie palenia papierosów na komórki endokrynne wydzielające somatostatynę i polipeptyd trzustkowy (PP) u tych chorych. Aby dokładnie poznać znaczenie kliniczne tych hormonów, celem moich prac przeglądowych było opisanie ich działania, które są ściśle związane z funkcją hormonów w organizmie, w szczególności w trzustce - w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Celem pracy doświadczalnej była ocena wpływu palenia papierosów na wydzielanie somatostatyny i PP u osób zdrowych oraz pacjentów palących i niepalących z PZT. Kolejna praca dotyczy określenia wpływu palenia u narażonych zawodowo na metale ciężkie hutników bez lub z cukrzycą. Udowodniono, że arsen, ołów i kadm, silne toksyczne substancje środowiskowe, indukują cukrzycę, ale jej potencjalny mechanizm biologiczny nie był przedmiotem wielu badań. Celem pracy była korelacja parametrów równowagi pro/antyoksydacyjnej z narażeniem zawodowym na metale ciężkie u palących pracowników Huty. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż akumulacja ołowiu we krwi palących hutników z cukrzycą związana jest z jednoczesnym narażeniem zawodowym na ten metal oraz na dym tytoniowy. Dowiedziono, iż oznaczenie

aktywności gamma-glutamylotransferazy może być przydatne do określenia stresu oksydacyjnego w surowicy hutników oraz zwiększenie stężenia metalotioneiny (ważnego antyoksydanta) w osoczu hutników z cukrzycą, może być związane z efektem synergicznego działania metali ciężkich, dymu tytoniowego i współistniejącej cukrzycy. Stwierdzono, iż podprzewlekła ekspozycja na arsen, ołów i kadm wywołuje stan cukrzycowy, w którym pośredniczy zwiększony stres oksydacyjny wywołany paleniem papierosów.

❖ **określenie roli metalotioneiny w procesie nowotworzenia oraz w narażeniu środowiskowym na kadm**

Metalotioneina-1/2 (MT-1/2) to niskocząsteczkowe białko (6-7kDa), bogate w grupy sulfhydrylowe. Reszty cysteinowe metalotioneiny odgrywają główną rolę w procesach fizjologicznych, takich jak: homeostaza pierwiastków niezbędnych, detoksykacja metali ciężkich oraz usuwanie wolnych rodników tlenowych. Zaangażowanie białka w apoptozę, proliferację, angiogenezę oraz detoksykację metali ciężkich zasugerowało jego udział w procesie nowotworzenia oraz w leczeniu chorych z chorobami nowotworowymi.

Celem zaplanowanej pracy było określenie stopnia ekspresji metalotioneiny i białka p53 w surowiczych gruczolakach torbielowatych trzustki. Ekspresja metalotioneiny w gruczolakach była słaba, a reakcję immunohistochemiczną dla antygeny metalotioneiny zaobserwowałam jedynie w komórkach nabłonkowych tkanki nowotworowej. W badanych tkankach nie wykazałam ekspresji białka p53. Na podstawie wyników stwierdziłam, iż słaba ekspresja metalotioneiny i brak ekspresji białka p53 w surowiczych gruczolakach torbielowatych trzustki potwierdza niezłśliwy charakter zmiany nowotworowej.

MT-1/2 odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu kadmu (Cd) w tkankach i dramatycznie zmniejsza wydzielenie żółci z Cd. Cd związany z MT-1/2 jest odpowiedzialny za akumulację Cd w tkankach i długi biologiczny okres półtrwania Cd w organizmie. Typowym modelem stosowanym w toksykologii do oszacowania potencjalnego zagrożenia powodowanego przez zanieczyszczenia dla ludzkiego zdrowia jest szczur, dla którego indukcja MT-1/2 w kilku tkankach, zwłaszcza w wątrobie, po ekspozycji na Cd została dobrze udokumentowana.

Celem doświadczenia była ocena ekspresji metalotioneiny w tkankach szczurów narażonych na przewlekłą ekspozycję na kadm przed i po terapii ozonem (OT) lub tlenem (Ox), w porównaniu do grupy kontrolnej, która nie była narażona ani na kadm, ani na ozon. Czterdzieści samców szczurów Wistar podzielono na 5 grup: kontrolną, narażonych na: Cd, Cd i Ox, Cd i Oz oraz Oz. Podczas naszych badań oznaczano stężenie Cd (ASA)

i stężenie MT (ELISA) w supernatantach nerek, wątroby i trzustki. Do oceny poziomu ekspresji MT w tkance wykorzystano analizę SDS-PAGE i lokalizację immunohistochemiczną. W grupie szczurów narażonych na Cd zaobserwowałam najwyższe stężenie zarówno Cd, jak i MT w nerkach i wątrobie, ze znacznie niższym stężeniem mierzonym tych parametrów w trzustce. Stwierdzałam, iż terapia ozonem zmniejsza akumulację kadmu w wątrobie i nerkach, powodując obniżoną ekspresję metalotioneiny w tych tkankach.

Powyższe zagadnienie stały się przedmiotem dwóch prac doświadczalnych, zamieszczonych na łamach *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* i *Environmental Toxicology and Pharmacology* [II.A.3 i II.A.6]. Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: IF: 4.302, MNiSW/KBN: 38.

❖ **Usystematyzowanie wiedzy na temat preparatów leczniczych stosowanych w nikotynizmie**

Palenie tytoniu często prowadzi do uzależnienia, a substancją uzależniającą jest nikotyna. Najczęściej stosowanym w Polsce kwestionariuszem do rozpoznawania uzależnienia od nikotyny jest Test Fagerstōma. Obecnie przypisuje się dość duże znaczenie „rozmowie lekarza z pacjentem” i motywowaniem go do zaprzestania palenia oraz jak najdłuższego utrzymania abstynencji. Jednak poza „rozmową” stosuje się także leczenie farmakologiczne jako pomoc dla pacjenta w rzuceniu palenia, a szczególnie w celu złagodzenia objawów abstynencyjnych. Obecnie badania i próby kliniczne prowadzi się w dwóch zasadniczych kierunkach – a) podawanie środków nie-nikotynowych osobno oraz b) w połączeniu z zastępczą terapią nikotynową.

Opublikowana praca pt.: „Preparaty stosowane w leczeniu uzależnienia od nikotyny”, koncentruje się na charakterystyce preparatów wykorzystywanych w leczeniu uzależnienia od nikotyny, uwzględniając m.in. mechanizm ich działania, sposób i czas stosowania, skuteczność w terapii oraz działań niepożądanych mogących wystąpić w czasie stosowania tych substancji. Natomiast celem kolejnej pracy pt.: „New trends in the treatment of nicotine addiction” było omówienie substancji leczniczych stosowanych w leczeniu nikotynizmu, niezarejestrowanych w Polsce. W pracy omówiono mechanizmy ich działania oraz przedstawiono wyniki najnowszych badań klinicznych, nad możliwością ich zastosowania w leczeniu nikotynizmu. Dwa pierwsze omówione leki – klonidyna i nortryptylina zalecane są przez wytyczne praktyki klinicznej AHRQ (*Agency for Healthcare Research and Quality*) do substancji drugiego rzutu stosowanych w walce z nałogiem. Pozostałe omówione związki takie jak *wenflaksyna*, *fluoksetyna*, *moklobemid* i *rimonabant* nie są zarejestrowane ze wskazaniem leczenia nikotynizmu w żadnym kraju, jednak ze względu na mechanizm, w jaki działają rozważa się możliwość

zastosowania ich w terapii tego schorzenia. Ciekawą propozycją walki z uzależnieniem są szczepionki nikotynowe – *NicVAX*, *CYT002-NicQb* oraz *TA-NIC*. Obecnie trwają badania kliniczne I i II fazy nad ich opracowaniem. Zagadnienie dotyczące preparatów stosowanych w leczeniu uzależnienia od nikotyny zostało opisane w dwóch pracach: *I. Zieleń, M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz. Preparaty stosowane w leczeniu uzależnienia od nikotyny. Przegl.Lek. 2012 T.69 nr 10; s.1098-1102, MNiSW = 5 oraz M. Śliwińska-Mossoń, I. Zieleń, H. Milnerowicz. New trends in the treatment of nicotine addiction. Acta Pol.Pharm. 2014 Vol.71 no.4; s.525-530. IF: 0.737, MNiSW/KBN: 15.*

❖ **Określenie diagnostyki i leczenia zatruc toksyną botulinową oraz przedstawienie jej zastosowania w medycynie konwencjonalnej i estetycznej**

Toksyna botulinowa - popularnie zwana jadem kiełbasianym - jest niezwykle groźną neurotoksyną, wytwarzaną przez beztlenowe bakterie *Clostridium botulinum*. Zapadalność z powodu zatrucia jadem kiełbasianym, czyli botulizm, jest w Polsce najwyższa wśród krajów Unii Europejskiej. Dlatego celem opublikowanej pracy pt. "Diagnostyka i leczenie zatruc toksyną botulinową" była ocena aktualnego stanu wiedzy lekarzy i studentów Akademii Medycznej oraz przypadkowych mieszkańców Wrocławia na temat diagnostyki i leczenia zatruc toksyną botulinową. Metodą badawczą był sondaż diagnostyczny przeprowadzony na podstawie autorskiego kwestionariusza ankiety na trzech grupy respondentów. Porównując wiedzę trzech ankietowanych grup na temat działania toksyny botulinowej, wyraźnie widać, że największą wiedzę wykazali się lekarze, a najmniejszą przypadkowi mieszkańcy Wrocławia. Niepokojące jest to, że tylko $\frac{3}{4}$ ankietowanych lekarzy i $\frac{1}{4}$ ankietowanych studentów wiedziało jak się diagnozuje botulizm. Po przeprowadzonym badaniu stwierdziłam, iż należy zadbać o zwiększenie poziomu wiedzy studentów oraz lekarzy na temat sposobu diagnostyki i leczenia zatrucia toksyną botulinową.

Toksyna botulinowa podawana w małych dawkach, jako jedyna toksyna, znajduje zastosowanie jako skuteczny lek przeciwko różnym schorzeniom dermatologicznym i neurologicznym. Dlatego też powstała praca pt. "Botulinum toxin in conventional and aesthetic medicine". W pierwszej części pracy opisane zostały właściwości biochemiczne i biofizyczne toksyny botulinowej oraz z mechanizm jej działania w organizmie. Następnie zostało omówione zastosowanie toksyny botulinowej w wielu dziedzinach medycyny: w okulistyce, w nieprawidłowym wydzielaniu, w achlazji przełyku a przede wszystkim w chorobach neurologicznych przebiegających z nadmiernym napięciem mięśni (m. in. w dystoniach, w drzeniu, w spastyczności) oraz skuteczność działania toksyny w tych schorzeniach. Z przedstawionych informacji wynika, iż preparaty

zawierające toksynę botulinową stosowane są nie tylko w medycynie estetycznej (zazwyczaj w likwidacji zmarszczek mimicznych), ale także coraz częściej w powyżej wymienionych schorzeniach, w wielu przypadkach, uważanych dawniej za nieuleczalne. Być może preparaty zawierające toksynę botulinową niedługo całkowicie zastąpią zabiegi operacyjne i farmakoterapię w przypadku niektórych chorób.

Powyższe zagadnienie stały się przedmiotem jednej pracy doświadczalnej oraz jednej pracy poglądowych: *M. Śliwińska-Mossoń, H. Milnerowicz, K. Małolepsza.: Botulinum toxin in conventional and aesthetic medicine. Adv.Clin.Exp.Med. 2010 Vol.19 no.2; s.271-278. IF: 0.103, MNiSW/KBN: 13* oraz *M. Śliwińska-Mossoń, K. Małolepsza. Diagnostyka i leczenie zatruc toksyną botulinową. Fam. Med. Prim. Care Rev. 2011 Vol.13 no.1; s.68-73. MNiSW/KBN: 6.*

❖ **Przedstawienie hepatotoksyczności i nefrotoksyczności N-acetylo-p-aminofenolu**

N-acetylo-p-aminofenol jest lekiem pochodzącym z grupy nienarkotycznych leków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych stosowanym w leczeniu bólu słabego do umiarkowanego. Jest częstym składnikiem wielu analgetyków dostępnych bez recepty (OTC – ang. over-the-counter), co sprzyja szybkiemu przedawkowaniu i licznym przypadkom zatruc. Szczególnie często groźnym powikłaniem przedawkowania N-acetylo-p-aminofenolu jest uszkodzenie wątroby. Jednak epidemiologiczne badania wykazały, że chroniczne stosowanie N-acetylo-p-aminofenolu jest również skorelowane z dysfunkcją nerek. W metabolizmie nerkowym leku, podobnie jak w wątrobowym, istotne znaczenie wykazuje działanie utleniające enzymów cytochromu P450. Najistotniejszym izoenzymem biorącym udział w biotransformacji N-acetylo-p-aminofenolu w nerkach jest CYP2E1, który może być indukowany przez testosteron, co tłumaczy różnicowanie płciowe w metabolizmie i nefrotoksyczności N-acetylo-p-aminofenolu. Nefropatia może się pojawić już w wyniku podawania dużo niższych dawek niż te, które wywołują hepatotoksyczność. Dlatego niewydolność nerek nie musi być wyłącznie efektem, który współtowarzyszy uszkodzeniu wątroby. Po przeanalizowaniu dostępnej literatury stwierdziłam, iż efekt nefrotoksyczności jest zależny od czasu i dawki N-acetylo-p-aminofenolu ale zależność stopnia uszkodzenia nerek od dawki leku nie jest tak oczywista, jak w przypadku uszkodzenia wątroby. Efekt nefrotoksyczności N-acetylo-p-aminofenolu wyjaśniają inne mechanizmy, takie jak: metabolizm z udziałem syntazy endonadtlenku prostaglandyny czy N-deacetylazy.

Powyższe zagadnienie zostało opisane w dwóch pracach: „*Mechanisms of interaction of acetaminophen metabolites in terms of hepatotoxicity.*” *Curr.Issues Pharm.Med.Sci. 2013 Vol.26 no.2; s.206-210. MNiSW/KBN: 4* i „*Mechanisms of*

interaction of the N-acetyl-p-aminophenol metabolites in terms of nephrotoxicity.” Drug Chem.Toxicol. 2015 Vol.38 no.2; s.121-125. IF: 1.653; MNiSW/KBN: 15.

❖ **Ocena wpływu doustnych środków antykoncepcyjnych na profil lipidowy oraz aktywność paraoksonaz i enzymów wątrobowych**

Doustne środki antykoncepcyjne (OC) są najszerzej stosowaną metodą antykoncepcji, dlatego informacje o ryzyku i korzyściach terapii są niezwykle ważne. Wykazano, że stosowanie OC zwiększa stres oksydacyjny, zaburza profil lipidowy oraz wpływa na enzymy wątrobowe: aminotransferazę asparaginianową (AST), aminotransferazę alaninową (ALT) i gamma-glutamylotransferazę (GGT). Estrogeny i progestogeny stosowane w doustnych środkach antykoncepcyjnych zmieniają również aktywność paraoksonaz (PON). Celem badania była weryfikacja wpływu doustnych środków antykoncepcyjnych na profil lipidowy i aktywności powyżej wymienionych enzymów. Badanych podzielono na dwie grupy: kobiety nie zażywające (grupa A) i kobiety zażywające OC (grupa B). Wyższe stężenia trójglicerydów i niższe stężenia lipoprotein o niskiej gęstości zaobserwowano w grupie B niż w grupie A, wartość wskaźnika ryzyka Castelli I była znacząco wyższa w grupie B w porównaniu z grupą A, w grupie B stwierdzono wzrost aktywności ALT, AST i GGT, podczas gdy stosunek de Ritis był niższy w grupie B niż w grupie A. W grupie B stwierdzono niższą aktywność fosfotriesterazy oraz wyższą aktywność arylesterazową i laktonazową w porównaniu do grupy A. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż wyższe aktywności ALT, AST i GGT w surowicy, a także zmiany profilu lipidowego i aktywności PON wskazują, że stosowanie OC mogą powodować zaburzenia w tych parametrach w surowicy kobiet przyjmujących doustne środki antykoncepcyjne.

Powyższe zagadnienie zostało opisane w pracy: „*Influence of oral contraceptives on lipid profile and paraoxonase and commonly hepatic enzymes activities.*” *J.Clin.Lab.Anal. 2018 Vol.32 no.1; art.e22194 [7 s.]. IF: 1.262, MNiSW/KBN: 20.*

❖ **Ocena substancji psychoaktywnej – psylocybiny oraz jej zastosowanie w leczeniu depresji, uzależnień i klasterowych bólów głowy**

Psylocybina jest substancją psychoaktywną o niskiej toksyczności, zawartą w grzybach gatunku *Psilocybe*. Jest agonistą receptorów serotoninowych, przez co wpływa na działanie ośrodkowego układu nerwowego. Dodatkowo psylocybina wykazuje działanie regulujące aktywność obszarów mózgu odpowiedzialnych za emocje, nastroj, pamięć i naukę. Celem opublikowanych prac było przedstawienie wyników najnowszych badań nad zastosowaniem psylocybiny w leczeniu depresji, uzależnień i klasterowych bólów głowy, pochodzących z różnych, niezależnych ośrodków

badawczych. Wybrane artykuły naukowe stanowiły jedynie część wszystkich opublikowanych wyników, pozwalając jednak na pokazanie, że psylocybina jest substancją o wciąż niewykorzystanym potencjale terapeutycznym. Psylocybina jest substancją, która wymaga przeprowadzenia jeszcze wielu badań, na większych grupach pacjentów, aby móc w pełni potwierdzić jej terapeutyczne działanie, ocenić bezpieczeństwo stosowania i określić długoterminowe skutki działania na organizm. Niemniej jest to substancja, której warto poświęcić więcej naukowej uwagi, mimo kontrowersji, jakie może wzbudzać jako psychodysleptyk.

Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem trzech prac poglądowych, zamieszczonych na łamach *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, *Journal of Psychiatry and Clinical Psychology* i *Pharmacotherapy in Psychiatry and Neurology* [III.A.7, III.B.5, III.B.6]. Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: *IF: 0.769, MNiSW/KBN: 45*.

❖ **Usystematyzowanie wiedzy na temat wybranych roślin trujących oraz sposobów zatrucia nimi, objawów zatrucia, mechanizmów działania substancji czynnej danej rośliny i możliwości leczenia tych zatruc**

Królestwo roślin jest niezmiernie bogate. Dotychczas opisano ponad 310 tysięcy różnych gatunków, chociaż szacuje się, że jeszcze około 80 tysięcy jest nieodkrytych. Rośliny są przydatnym surowcem, szeroko wykorzystywanym przez człowieka w wielu dziedzinach życia, między innymi w przemyśle tekstylnym, barwnikarskim, w rolnictwie, lecznictwie i innych. Oprócz wielu zalet, niestety, rośliny mają też negatywne działanie. Znaczna część z nich zawiera substancje trujące dla zwierząt, jak i dla człowieka. Lista roślin trujących cały czas wzbogaca się o nowe gatunki. Dlatego zostały opublikowane dwie prace o roślinach trujących, z którymi mamy kontakt codzienny lub przebywając w egzotycznych krajach. Zostały omówione następujące gatunki roślin: *Hippomane mancinella*, *Nerium oleander* i *Dendrocnide moroides*, sposób zatrucia nimi, objawy zatrucia, mechanizm działania substancji czynnej danej rośliny oraz możliwość leczenia zatrucia. Niektóre rośliny spożywane w nadmiernej ilości mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia, a nawet życia, gdyż zawierają związki trujące takie jak np. solaninę czy amigdalinę. Opisując substancje trujące roślin jadalnych potwierdziłam, iż trucizny są wszędzie, a – „wszystko jest trucizną i nic nie jest trucizną...”. Eksperymentując w kuchni, należy zachować zdrowy rozsądek i zastanowić się nad wszystkimi składnikami, tak, by uniknąć przypadkowych zatruc.

Powyższe zagadnienie stało się przedmiotem dwóch rozdziałów w książce: *Trucizny, trucielki i truciele: medyczne i kulturowe aspekty trucia na przestrzeni dziejów* [IV.B.1, IV.B.2], *MNiSW/KBN: 10*.

5.3. *Udział w projektach badawczych*

Realizowałam naukowe badania w ramach 11 projektów finansowanych ze środków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, w tym jako kierownik projektu:

- ❖ „Ocena endokrynnej funkcji trzustki u palących pacjentów z przewlekłym zapaleniem tego narządu i współistniejącą cukrzycą”.
Projekt badawczy dla młodych naukowców, numer: 59/Pbmn; (2011-2013 r.)
Charakter udziału w projekcie: kierownik projektu.
- ❖ „Wpływ ksenobiotyków dymu tytoniowego na status antyoksydacyjny i parametry diagnostyczne u pacjentów ze schorzeniami trzustki”
Projekt w ramach działalności statutowej, numer: ST-766; (2013-2015 r.)
Charakter udziału w projekcie: kierownik projektu.
- ❖ „Profil antyoksydacyjny u pacjentów z guzami nowotworowymi płuc leczonych radioterapią stereotaktyczną.” (2014-2016 r.)
Charakter udziału w projekcie: kierownik projektu.

oraz jako współwykonawca projektu:

- ❖ „Zaburzenie funkcji trzustki u osób narażonych na dym tytoniowy”
Projekt własny, numer: 1320; (2005-2007 r.)
Charakter udziału w projekcie: współwykonawca projektu.
- ❖ „Udział metalotioneiny i Cu/Zn dysmutazy ponadtlenkowej w utrzymaniu równowagi pro/antyoksydacyjnej trzustki u pacjentów ze schorzeniami tego narządu”.
Projekt w ramach działalności statutowej (2005-2007 r.)
Charakter udziału w projekcie: współwykonawca projektu.
- ❖ „Zaburzenie funkcji trzustki u pacjentów ze stanem zapalnym i środowiskowo narażonych na dym papierosowy”.
Projekt promotorski, numer: 1668; (2007-2008 r.)
Charakter udziału w projekcie: współwykonawca projektu.
- ❖ „Rola peroksydazy glutationowej i glutationu w utrzymaniu równowagi pro/antyoksydacyjnej u pacjentów ze schorzeniami trzustki”.
Projekt w ramach działalności statutowej, numer: ST-292; (2007-2009 r.)
Charakter udziału w projekcie: współwykonawca projektu.
- ❖ „Rozdział izoform metalotioneiny w materiale biologicznym z zastosowaniem różnych metod elektroforetycznych”.
Projekt w ramach działalności statutowej, numer: ST-424; (2009-2011 r.)
Charakter udziału w projekcie: współwykonawca projektu.

- ❖ „Ocena profilu antyoksydacyjnego i parametrów diagnostycznych u pacjentów ze schorzeniami trzustki” (2014-2016 r.)
Charakter udziału w projekcie: współwykonawca projektu.
- ❖ „Dynamika zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych u pacjentów ze stanem zapalnym trzustki”.
Projekt w ramach działalności statutowej, numer: ST.170.16.014; (2016-2018 r.)
Charakter udziału w projekcie: współwykonawca projektu.
- ❖ „Markery zaburzeń metabolicznych i stresu oksydacyjnego wynikających z narażenia środowiskowego”.
Projekt w ramach działalności statutowej; (2018-2019 r.)
Charakter udziału w projekcie: współwykonawca projektu.

5.5. Międzynarodowe i krajowe wyróżnienia i nagrody za działalność naukową

Zostałam wyróżniona nagrodami **JM Rektora Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich** we Wrocławiu za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowo-badawczej:

- ❖ **zespolowa nagroda** za cykl publikacji i monografię dotyczącą wpływu palenia papierosów na stan zdrowia ludzi i poziomy oznaczanych markerów zapalenia trzustki, **2011 r.**
- ❖ **zespolowa nagroda** za cykl prac dotyczących zaburzeń metabolizmu wywołanych narażeniem ludzi na ksenobiotyki środowiskowe, **2013 r.**
- ❖ **zespolowa nagroda** za cykl prac dotyczących zaburzeń molekularnych spowodowanych narażeniem na dym tytoniowy, **2015 r.**
- ❖ **indywidualna nagroda stopnia I** za cykl prac dotyczących wpływu ksenobiotyków na zdrowie ludzi, **2016 r.**
- ❖ **zespolowa nagroda** za cykl prac dotyczących wybranych parametrów równowagi pro/antyoksydacyjnej u osób narażonych na ksenobiotyki środowiskowe, **2017 r.**

Inne nagrody i wyróżnienia w pracy naukowo-badawczej:

- ❖ Odznaka Wzorowego Studenta JM Rektora Akademii Medycznej (**średnia ocen: 5,25** – co pozwoliło znaleźć się w 5% najlepszych absolwentów kończących studia na Akademii Medycznej w **2003 roku**).
- ❖ Nagroda JM Rektora Akademii Medycznej oraz Dziekana Wydziału Farmaceutycznego, a także od Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej w uznaniu za **najwyższą średnią ocen – dyplom z oceną bardzo dobrą oraz celującą pracę magisterską** pt.: „Immunohistochemiczna lokalizacja

- metalotioneiny w surowiczych gruczolakach torbielowatych i gruczolakorakach trzustki” (promotor Prof. dr hab. Halina Milnerowicz).
- ❖ Nagroda w konkursie prac magisterskich w kategorii: praca doświadczalna na Oddziale Analityki Medycznej w 2003 r.
 - ❖ **Nagroda naukowa I°** za pracę pt. „Palenie papierosów a zaburzenie funkcji endokrynnej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki” podczas IV Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej: „Tytoń a zdrowie. Choroby odtytoniowe” w 2003 r.
 - ❖ **Nagroda naukowa w kategorii BEST ABSTRACT** na 14th United European Gastroenterology Week w Berlinie w 2006 r. W związku z powyższym otrzymałam również **Travel Grant**.
 - ❖ **Zespołowa Nagroda Ministra Zdrowia** za cykl 7 publikacji dotyczących stresu oksydacyjnego, antyoksydantów i zaburzeń funkcji trzustki, 2010 r.
 - ❖ **Nagroda za wyróżniającą się pracę doktorską** pt. „Zaburzenia funkcji trzustki u pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym i środowiskowo narażonych na dym papierosowy” przyznana przez Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce, Kraków, 2011 r.
 - ❖ **Stypendium naukowe dla najzdolniejszych osób zajmujących się pracą naukową**, będących po doktoracie w ramach projektu pt. „Program rozwoju Akademii Medycznej we Wrocławiu ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Kapitał Ludzki (Umowa nr UDA-POKL.04.01.01-00-010/08-00)”, 2011 r.
 - ❖ **Nagroda Naukowego Towarzystwa Biochemicznego** w formie stypendium (opłata rejestracyjna na 38th FEBS Congress. Saint Petersburg (Russia), July 6-11, 2013 r. (FEBS Bursary).

5.6. Staże naukowe

- ❖ Tygodniowy staż w ramach programu Erasmusa z hodowli komórkowej (przygotowanie, hodowla, badania i interpretacja wyników dotycząca hodowli komórkowej nowotworów trzustki w wymiarze 2D i 3D) w Karolińskim Instytucie CLINTEC, K53 Klinika Gastroenterologii Chirurgicznej, pod kierunkiem prof. Matthias Löhr w Sztokholmie, we Szwecji, 2014 r.
- ❖ Trzymiesięczny staż naukowy w ramach projektu „Innowacyjny Transfer”, dotyczący diagnostyki, leczenia farmakologicznego i rehabilitacji dzieci z porażeniem mózgowym, ze zdiagnozowanym wcześniactwem oraz z rzadkimi zespołami neurologicznymi – podopiecznych Fundacji „Promyk Słońca” we Wrocławiu, maj-lipiec 2014 r.

- ❖ Tygodniowy staż w ramach programu Erasmusa z hodowli komórkowej w ramach programu Erasmus+ (przygotowanie, hodowla, badania i interpretacja wyników dotycząca hodowli komórkowej keratynocytów) w Katedrze Dermatologii i Wenerologii, Uniwersytetu w Debreczynie, pod kierunkiem dr Gabriella Emri, na Węgrzech, 2018 r.

5.7. Recenzje do czasopism zagranicznych

Wykonałam 40 recenzji prac zgłoszonych do recenzji w czasopismach międzynarodowych, w tym:

- ❖ *Pancreatology* (IF=2.724) – 12 recenzji (11 prac doświadczalnych, 1 pracy pogładowej)
W uznaniu za wykonanie recenzji prac naukowych dwa razy (czerwiec 2017, wrzesień 2017) otrzymałam „Certificate of Reviewing” od International Association of Pancreatology and European Pancreatic Club i od edytorów czasopisma *Pancreatology*.
- ❖ *World Journal of Gastroenterology* (IF=3.365) – 10 recenzji (9 prac doświadczalnych, 1 pracy pogładowej)
- ❖ *Preventive Medicine* (IF=3.434) – 2 recenzje prac doświadczalnych
- ❖ *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences* – 2 recenzje prac doświadczalnych
- ❖ *Journal of Clinical Intensive Care and Medicine* – 2 recenzje prac doświadczalnych
- ❖ oraz po jednej recenzji pracy doświadczalnej w następujących czasopismach: *Cellular Physiology and Biochemistry* (IF=5.104), *Phytotherapy Research* (IF=3.092), *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* (IF=2.661), *Diabetology & Metabolic Syndrome* (IF= 2.347), *International Journal of Molecular Medicine* (IF=2.341), *Molecular Biology Reports* (IF=1.828), *Immunological Investigations* (IF=1.824), *Journal of Stem Cells Research, Reviews & Reports*, *International Journal of Agricultural Policy and Research*, *Biochemistry and Biotechnology Research*, *International Journal of Clinical Toxicology*, *Journal of Clinical Case Studies*.

5.8. Wygłoszone referaty i wkłady na naukowych konferencjach

Wyniki swoich badań przedstawiłam na naukowych konferencjach, jako:

- ❖ Referat pt.: „Immunohistochemiczna lokalizacja metalotioneiny i białka p53 w surowiczych gruczolakach torbielowatych trzustki” wygłoszony podczas XVI Kongresu Polskiego Towarzystwa Patologów, Wrocław, 2004 r.

- ❖ Referat pt.: Wpływ palenia papierosów na poziom amylazy u pacjentów z procesem zapalnym trzustki” wygłoszony podczas V Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej "Tytoń a zdrowie-aktywne i bierne palenie" Poznań, **2004r.**
- ❖ Referat pt.: „Palenie tytoniu a rozwój, progresja i leczenie cukrzycy” wygłoszony podczas XII Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej "Tytoń a zdrowie - przyszłość wolna od dymu". Poznań, **2011 r.**
- ❖ Referat pt.: „Ocena profilu lipidowego u niepalących i palących młodych zdrowych osób” wygłoszony podczas XV Ogólnopolskiej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej "Tytoń a zdrowie - 15 lat doświadczeń w badaniach nad uzależnieniami od tytoniu, alkoholu, narkotyków i leków". Poznań, **2014 r.**
- ❖ Wykład plenarny pt.: „Ekspozycja na dym papierosowy jako czynnik rozwoju cukrzycy” wygłoszony podczas Konferencji Naukowej "Wpływ związków toksycznych na zdrowie ludzi i zwierząt". Wrocław, **2017 r.**
- ❖ Referat pt.: „Palenie papierosów jako czynnik indukujący zapalenie trzustki” wygłoszony podczas Konferencji Szkoleniowo-Naukowej Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego "Różne oblicza toksykologii". Puławy, **2017 r.**

5.9. Kursy, szkolenia i seminaria doszkalające

- ❖ Kurs The Sea Environment (BSE) - Zagrożenie i ochrona środowiska rejonów Morza Bałtyckiego i własnego rejonu. Organizatorzy: Akademia Medyczna we Wrocławiu i Szwedzki Uniwersytet w Uppsali (**2003 r.**)
- ❖ Szkolenie dotyczące metody hybrydyzacji *in situ* i wykorzystania metod biologii molekularnej w diagnostyce wirusów Papilloma z zastosowaniem systemu DAKO GenPointCatalysed Signal Amplification System. Zakład Patomorfologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Zakład Radiobiologii Klinicznej Centrum Onkologii-Instytut w Krakowie (**2003 r.**)
- ❖ Szkolenie dotyczące metody hybrydyzacji *in situ* stosowanej do wykrywania wirusów Epstein-Barr na skrawkach parafinowych. Zakład Patomorfologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Zakład Patologii Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie (**2004 r.**)
- ❖ Szkolenie z teorii i praktyki dotyczącej wykorzystania nowoczesnych technik biologii molekularnej pt. "Techniki analizy i detekcji kwasów nukleinowych i białek". Seminarium oraz praktyczny kurs technik biologii molekularnej został zorganizowany przez Pilotową Stację Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz firmę Merck Sp.z o.o i Millipore Sp. z o.o. (**2005 r.**)

- ❖ Kurs „Wybranych zagadnień nauczania w szkole wyższej” – uzyskanie podstawowych kompetencji umożliwiających realizację procesu kształcenia w szkole wyższej (2006 r.).
- ❖ Szkolenie w zakresie „Statystyka podstawowa- I stopień” – Studium Szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu (2007 r.).
- ❖ Podstawowe szkolenie z teorii i praktyki dotyczącej wykorzystania aparatu do elektroforezy kapilarnej PA 800 plus Pharmaceutical Analysis System w Zakładzie Biomedycznych Analiz Środowiskowych Akademii Medycznej we Wrocławiu (2009 r.).
- ❖ Kurs doskonalący kompetencje dydaktyczne pracowników Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (2009 r.).
- ❖ Trzymiesięczny kurs języka angielskiego w medycynie z dostępem online (Online English for Medical Purposes (2011 r.)
- ❖ Szkolenie dotyczące zastosowania testów toksykologicznych na komórkach macierzystych: „Pluripotent Stem Cell assays and pioneer predictive toxicology” w Biotechnologicznym i Biomedycznym Centrum SCR&Tox. w Lipsku w Niemczech (2012 r.)
- ❖ Szkolenie i Uzyskanie tytułu: „Auditor wewnętrzny Systemu Zarządzania Jakością zgodnego z wymaganiami ISO 9001:2008”. (2014 r.).
- ❖ Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie, dla osób wykonujących procedury na zwierzętach, dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach organizowane przez Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław (2017 r.).
- ❖ Szkolenia z zakresu diagnostyki laboratoryjnej w ramach posiedzeń naukowo-szkoleniowych Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej, Oddział Wrocław (w latach 2007-2018).

5.10. Udział w komitetach naukowych konferencji naukowych i naukowo-szkoleniowych

- ❖ Byłam członkiem komitetu naukowego sesji: „Diagnostyka toksykologiczna” konferencji naukowej pt. "Wpływ związków toksycznych na zdrowie ludzi i zwierząt". Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław 30 marca 2017.

5.11. Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

- ❖ Członek komitetu redakcyjnego czasopisma *International Journal of Clinical Toxicology* od **2014** r.
- ❖ Członek komitetu redakcyjnego czasopisma *World Journal of Biological Chemistry (WJBC)* od **2016** r.
- ❖ Członek komitetu redakcyjnego czasopisma *Journal of Clinical Intensive Care and Medicine* od **2017** r.

5.12. Przynależność do towarzystw naukowych i organizacji

Jestem członkiem towarzystw naukowych:

- ❖ Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Oddział Wrocław od **2009** roku do chwili obecnej, w latach 2014-2016 pełniłam funkcję przewodniczącej Komisji Rewizyjnej, od **2017** roku jestem członkiem zarządu Oddziału Wrocławskiego Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego
- ❖ Polskiego Towarzystwa Biochemicznego od **2013** r
- ❖ Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej - Oddział Wrocław od **2007** r.

Małgorzata Skrzypczak