

1. IMIĘ I NAZWISKO: **Anna Bizoń**

2. **POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE:**

- ❖ 2003 r. tytuł magistra inżyniera biotechnologii ze specjalizacją biotechnologia molekularna i biokataliza na podstawie pracy magisterskiej pt. „Wpływ represji białka 14-3-3 na metabolizm węglowodanów i odpowiedź roślin na stres” (Promotor pracy magisterskiej – Prof. dr hab. Jan Szopa), Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, Kierunek Biotechnologia.
- ❖ 2009 r. dyplom ukończenia studiów doktoranckich, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.
- ❖ 2010 r. stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych w zakresie toksykologii uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Udział metalotioneiny w równowadze pro/oksydacyjnej osób narażonych na ksenobiotyki środowiskowe” (Promotor pracy doktorskiej – Prof. dr hab. Halina Milnerowicz), Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

3. **INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

Od ukończenia studiów doktoranckich do chwili obecnej jestem pracownikiem Katedry i Zakładu Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (do 2009 roku: Akademia Medyczna we Wrocławiu). Dodatkowo w roku akademickim 2011/2012 byłam zatrudniona na stanowisku starszego wykładowcy w Państwowej Wyższej Szkole Zawodowej im. Angelusa Silesiusa w Wałbrzychu, w Instytucie Turystyki i Rekreacji, na kierunku: Kosmetologia.

- ❖ 1.10.2005 – 30.09.2009

- ✓ Dzielne studia doktoranckie, Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych;
- ❖ 1.10.2009 – 30.09.2011
 - ✓ Asystent, Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych,
- ❖ 1.10.2011 – 30.06.2012
 - ✓ Starszy wykładowca, Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Angelusa Silesiusa, Wałbrzych;
- ❖ 1.10.2011 – nadal
 - ✓ Adiunkt, Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO 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. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ. 1311)

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem sześciu prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych, zagranicznych czasopismach ze współczynnikiem wpływu. W pięciu pracach jestem pierwszym autorem, a także w pięciu autorem do korespondencji (*). Wszystkie wymienione prace zostały opublikowane po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk farmaceutycznych (tj. po 14 października 2010 roku).

4.1. Cykl sześciu doświadczalnych publikacji powiązanych tematycznie pod tytułem:

„Przydatność oznaczeń aktywności formy I paraoksonazy i γ -glutamylotransferazy w ocenie narażenia ludzi na ksenobiotyki”

Łączny współczynnik wpływu prac składających się na „osiągnięcie naukowe” wynosi: **12,472** a łączna liczba punktów MNiSW wynosi: **145**.

I. 1. **Anna Bizoń***, Halina Milnerowicz: *The effect of divalent metal chelators and cadmium on serum phosphotriesterase, lactonase and arylesterase*

activities of paraoxonase 1. Environ Toxicol Pharmacol. 2018 Vol.58; s.77-83.
Pkt. IF: 2,776; Pkt. MNiSW/KBN: 25.

[wykaz opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- I. 2.** **Anna Bizoń**, Marta Kepinska, Krzysztof Snacki, Halina Milnerowicz.: *The impact of environmental and biological factors on paraoxonase 1 and γ -glutamyltranspeptidase activities in the blood of smelters. Int J Environ Health Res.* 2016 Vol.26 no.2; s.222-238.

Pkt. IF: 1,485; Pkt. MNiSW/KBN: 25.

[wykaz opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- I. 3.** **Anna Bizoń***, Jolanta Antonowicz-Juchniewicz, Małgorzata Milnerowicz, Mariola Śliwińska-Mossoń, Halina Milnerowicz.: *The effect of occupational exposure on pro/antioxidant balance in the blood of non-smoking and smoking smelters with diabetes. Environ Toxicol Pharmacol.* 2016 Vol.44; s.99-106.

Pkt. IF: 2.313; Pkt. MNiSW/KBN: 25.

[wykaz opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- I. 4.** Katarzyna Kowalska, Milena Ściskalska, **Anna Bizoń***, Mariola Śliwińska-Mossoń, Halina Milnerowicz; *Influence of oral contraceptives on lipid profile and paraoxonase and commonly hepatic enzymes activities. J Clin Lab Anal.* 2018 Jan;32(1). doi: 10.1002/jcla.22194.

Pkt. IF: 1,303; Pkt. MNiSW/KBN: 20.

[wykaz opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- I. 5.** **Anna Bizoń***, Halina Milnerowicz: *Changes in lipid profile and paraoxonase activities in the blood of non smoking and smoking pregnant women in first trimester of pregnancy. Environ Toxicol Pharmacol.* 2017 Vol.53; s.74-80.

Pkt. IF: 2,776; Pkt. MNiSW/KBN: 25.

[wykaz opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

I. 6. Anna Bizoń*, Monika Ołdakowska, Halina Milnerowicz.: Effects of paraoxonase 1 L55M gene polymorphisms on enzymes activity and lipid profile in healthy persons. *Inhal Toxicol.* Published online: 08 Jan 2019; doi.org/10.1080/08958378.2018.1554014.

Pkt. IF: 1.819; Pkt. MNiSW/KBN: 25.

[wykaz opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

Kopie prac stanowiących „osiągnięcie naukowe” znajdują się w załączniku nr 5, oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku nr 6, natomiast analiza bibliometryczna publikacji wykonana przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu znajduje się w załączniku nr 3. W załączniku nr 3 zamieściłam również informacje określające **mój indywidualny wkład w powstanie każdej z publikacji.**

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

„Przydatność oznaczeń aktywności formy 1 paraoksonazy i γ -glutamylotransferazy w ocenie narażenia ludzi na ksenobiotyki”

Wprowadzenie

Wiele ksenobiotyków jest zdolnych do indukowania różnego stopnia stresu oksydacyjnego, stanów zapalnych, dysfunkcji naczyniowej oraz uszkodzeń istotnych narządów, między innymi wątroby. W wątrobie zachodzi wiele kluczowych procesów metabolicznych a zaburzenia jej funkcjonowania przyczyniają się do dalszych zmian biochemicznych w organizmie. Ksenobiotyki łączą się wiązaniem kowalencyjnym ze składnikami hepatocytów, w tym z błonami komórkowymi, doprowadzając do ich uszkodzenia oraz wpływają na strukturę i funkcję kluczowych dla organizmu enzymów takich jak: γ -glutamylotransferaza (GGT, ang. *γ -glutamyltransferase*) oraz forma pierwsza paraoksonazy (PON1, ang. *paraoxonase*) (Araoud et al., 2010).

Gamma-glutamylotransferaza (EC 2.3.2.2) jest glikoproteina o masie cząsteczkowej 68 kDa, związaną z błonami komórkowymi głównie hepatocytów, skąd przy uszkodzeniu wątroby bardzo łatwo przechodzi do krwioobiegu (Bulusu and Sharma, 2016). Główną rolą GGT jest rozkład zewnątrzkomórkowego glutationu (GSH), który umożliwia transport aminokwasów do wnętrza komórki i resyntezę GSH. Jednocześnie, odłączenie od cząsteczki GSH reszty γ -glutamylowej powoduje powstanie cysteinilo-glicyny, która w warunkach ekspozycji na metale ciężkie, takie jak miedź (Cu) i żelazo (Fe), indukuje syntezę toksycznego rodnika hydroksylowego (OH^\bullet) w reakcjach *Fentona* i *Habera-Weissa*. Wzrost stężenia wolnych rodników skutkuje peroksydacją lipidów, w tym utlenianiem lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), co przyspiesza tworzenie blaszki miażdżycowej. W konsekwencji zwiększa się ryzyko wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego, udaru lub zaostrzenia przewlekłej niewydolności serca, dlatego oznaczanie aktywności GGT w surowicy może być przydatne w ocenie ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, nadciśnienia, udaru i cukrzycy typu 2 (Ndrepepa and Kastrati, 2016). Jednym z głównych enzymów przeciwdziałających oksydacji LDL (oxLDL) jest PON1 (EC 3.1.1.2). Enzym ten jest również glikoproteina syntetyzowaną w wątrobie, skąd ulega sekrecji do krwioobiegu, gdzie wiąże się za pomocą N-hydrofobowego końca z cząsteczką lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL) (Rom and Aviram, 2017). Paraoksonaza 1 posiada trzy aktywności: fosfotriesterazową, aryloesterazową oraz laktonazową, dzięki którym pełni wiele kluczowych funkcji w organizmie (Aggarwal et al., 2016): uczestniczy w przeciwmiażdżycowym i przeciwutleniającym działaniu HDL (Mackness and Mackness, 2015), hamuje syntezę cholesterolu w makrofagach oraz stymuluje jego wpływ z tych komórek, co przeciwdziała ich przekształceniu w komórki piankowe i ostatecznie rozwojowi miażdżycy (Rosenblat et al., 2006; Rozenberg et al., 2003). Ponadto jedynie PON1 rozkłada w surowicy tiolakton homocysteiny (niezależny czynnik ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych), który poprzez homocysteinylację reszt lizynowych, zwiększa agregację LDL i potęguje aktywację makrofagów (Jakubowski, 2000). PON1 hydrolizuje również wiązania estrowe w nadtlenkach fosfolipidowych i wodoronadtlenkach estrów cholesterolu oraz bierze udział w rozkładzie nadtlenku wodoru (H_2O_2), który jest główną reaktywną formą tlenu (RFT) produkowaną podczas miażdżycy i stanów zapalnych w organizmie człowieka (Gözükara et al., 2015). Dodatkowo PON1 hydrolizuje czynnik aktywujący płytki krwi

(PAF; ang. *platelet-activating factor*), który jest mediatorem procesów promiażdżycowych i zapalnych w organizmie (Martini et al., 2017). Uczestniczy także w rozkładzie insektycydów fosforoorganicznych (Costa et al., 1999), które obecnie uważane są za jeden z głównych składników zanieczyszczenia środowiskowego.

Ponadto ostatnie wyniki badań wykazały, że wzrost aktywności GGT oraz podwyższone stężenia oxLDL we krwi starszych osób potęguje synergistyczne interakcje między tymi parametrami, indukując tworzenie blaszki miażdżycowej w tętnicach mózgowych i wieńcowych, będącej główną przyczyną incydentów sercowo-naczyniowych i śmierci osób w starszym wieku (Spoto et al., 2017). Aktywności PON1 ulegają obniżeniu wraz z wiekiem, co skutkuje obniżoną ochroną LDL przed oksydacją i wskazuje na pośredni, negatywny związek między aktywnością PON1 i GGT a stężeniem oxLDL u osób w starszym wieku.

Istotnym czynnikiem środowiskowym wpływającym na aktywności obu enzymów jest ekspozycja na dym tytoniowy. Palenie jest ważnym, niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej (Shunmoogam et al., 2018). Etiologia chorób sercowo-naczyniowych spowodowana ekspozycją na dym tytoniowy wiąże się z aktywacją płytek krwi, wywołaniem zapalenia śródbłonna oraz promowaniem dysfunkcji naczyniowej, prowadzącej do miażdżycy tętnic, pęknięcia blaszki miażdżycowej i w konsekwencji do ostrego zespołu wieńcowego i śmierci (Reilly, 2013). Palenie papierosów powoduje także generowanie wolnych rodników, a ich nadmiar wywołuje depolaryzację błony lipidowej, czego następstwem jest wzrost jej przepuszczalności i napływ wapnia do komórek (Pham-Huy et al., 2008). W konsekwencji dochodzi do uszkodzenia błony komórkowej, w tym błony komórkowej hepatocytów, co zwiększa uwalnianie GGT do krwioobiegu. Wzrost aktywności GGT w surowicy może być także związany z odpowiedzią organizmu na stres oksydacyjny wynikający ze zwiększonego transportu prekursorów glutationu do wnętrza komórki w celu jej ochrony przed toksycznym działaniem RFT (Greabu et al., 2008). Pośrednio, GGT przy udziale GSH, pełni istotną funkcję w procesie detoksykacji ksenobiotyków i tworzenia kwasów merkapturowych, w wyniku którego ksenobiotyki są usuwane z komórki a następnie wydalane z organizmu.

Składniki dymu tytoniowego mogą również modulować status PON1 (stężenie i aktywności) w organizmie poprzez:

- a) modyfikacje wolnej grupy sulfhydrylowej (w pozycji 284),

- b) hamujące działanie metali ciężkich (nikiel, ołów, rtęć czy kadm) zawartych w dymie tytoniowym na reszty histydyny w pozycji 115 i 134,
- c) wypieranie jonów wapnia z centrum strukturalnego i katalitycznego,
- d) obniżenie stężenia HDL oraz wzrost oksydacji LDL (Milnerowicz et al., 2015; Reed et al., 2017).

Wykazano także, że stopień zahamowania aktywności PON1 spowodowany paleniem papierosów jest wprost proporcjonalny do ilości wypalanych papierosów i czasu trwania nałogu (James et al., 2000).

W literaturze od dawna podkreśla się także indywidualne uwarunkowania genetyczne, które stanowią istotny czynnik wrażliwości wewnątrzsobniczej na ksenobiotyki oraz predysponujące do rozwoju zaburzeń metabolicznych i chorób sercowo-naczyniowych (Roberts, 2015). W sekwencji genu kodującego PON1 zidentyfikowano około 200 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*) (Mackness and Mackness, 2015). Jeden z najczęściej występujących polimorfizmów PON1 w rasie kaukaskiej wynika ze zmiany sekwencji nukleotydowej z TTG na ATG w pozycji 55, co skutkuje substytucją leucyny (L) na metioninę (M) (Mitra and Kshatriya, 2016). Dotychczas nie oceniano wpływu występowania polimorfizmu L55M na stężenie PON1, jej trzy aktywności oraz parametry profilu lipidowego a także nie badano zależności między tym polimorfizmem a narażeniem na dym tytoniowy oraz występowaniem nadwagi i otyłości w polskiej populacji.

Cykl sześciu doświadczalnych prac stanowiących podstawę mojego postępowania habilitacyjnego, dotyczy „**Przydatności oznaczeń aktywności formy I paraoksonazy i γ -glutamylotransferazy w ocenie narażenia ludzi na ksenobiotyki**”. Tematyką tą zajmuję się od momentu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych, a swoje główne zainteresowanie skupiłam na badaniu wpływu czynników środowiskowych takich jak narażenie na metale ciężkie i dym tytoniowy na aktywności PON1 i GGT we krwi (Anna Bizoń, Halina Milnerowicz: *The effect of divalent metal chelators and cadmium on serum phosphotriesterase, lactonase and arylesterase activities of paraoxonase 1. Environ Toxicol Pharmacol.* 2018 Vol.58; s.77-83; Anna Bizoń, Marta Kepinska, Krzysztof Snacki, Halina Milnerowicz.: *The impact of environmental and biological factors on paraoxonase 1 and γ -glutamyltranspeptidase activities in the blood of smelters. Int J Environ Health Res.*

2016 Vol.26 no.2; s.222-238; **Anna Bizoń**, Jolanta Antonowicz-Juchniewicz, Małgorzata Milnerowicz, Mariola Śliwińska-Mossoń, Halina Milnerowicz.: *The effect of occupational exposure on pro/antioxidant balance in the blood of non-smoking and smoking smelters with diabetes. Environ Toxicol Pharmacol.* 2016 Vol.44; s.99-106; **Anna Bizoń**, Halina Milnerowicz: *Changes in lipid profile and paraoxonase activities in the blood of non smoking and smoking pregnant women in first trimester of pregnancy. Environ Toxicol Pharmacol.* 2017 Vol.53; s.74-80; załącznik nr 3).

Swoje badania koncentrowałam również na ocenie wpływu narażenia na metale ciężkie i dym tytoniowy na aktywność GGT oraz na wieloparametrową analizę systemu antyoksydacyjnego we krwi hutników chorujących na cukrzycę (**Anna Bizoń**, Jolanta Antonowicz-Juchniewicz, Małgorzata Milnerowicz, Mariola Śliwińska-Mossoń, Halina Milnerowicz.: *The effect of occupational exposure on pro/antioxidant balance in the blood of non-smoking and smoking smelters with diabetes. Environ Toxicol Pharmacol.* 2016 Vol.44; s.99-106; załącznik nr 3). Oceniałam także wpływ stosowania doustnej dwuskładnikowej antykoncepcji hormonalnej u młodych kobiet oraz palenia papierosów podczas ciąży u kobiet powyżej 35 roku życia na aktywności wyżej wymienionych enzymów i parametry profilu lipidowego (Katarzyna Kowalska, Milena Ściskalska, **Anna Bizoń**, Mariola Śliwińska-Mossoń, Halina Milnerowicz; *Influence of oral contraceptives on lipid profile and paraoxonase and commonly hepatic enzymes activities. J Clin Lab Anal.* 2018 Jan;32(1). doi: 10.1002/jcla.22194; **Anna Bizoń**, Halina Milnerowicz: *Changes in lipid profile and paraoxonase activities in the blood of non smoking and smoking pregnant women in first trimester of pregnancy. Environ Toxicol Pharmacol.* 2017 Vol.53; s.74-80; załącznik nr 3).

W ostatnim etapie badań analizowałam związek między polimorfizmem genów kodujących PON1 a aktywnościami i stężeniem tego enzymu oraz parametrami profilu lipidowego (**Anna Bizoń**, Monika Ołdakowska, Halina Milnerowicz.: *Effects of paraoxonase 1 L55M gene polymorphisms on enzymes activity and lipid profile in healthy persons. Inhal Toxicol.* Published online: 08 Jan 2019; doi.org/10.1080/08958378.2018.1554014; załącznik nr 3).

Literatura:

Aggarwal, G., Prajapati, R., Tripathy, R.K., Bajaj, P., Iyengar, A.R.S., Sangamwar, A.T., Pande, A.H., 2016. Toward Understanding the Catalytic Mechanism of

- Human Paraoxonase 1: Site-Specific Mutagenesis at Position 192. *PLOS ONE* 11, e0147999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147999>
- Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Najjar, M.F., Kenani, A., 2010. Paraoxonase 1 correlates with butyrylcholinesterase and gamma glutamyl transferase in workers chronically exposed to pesticides. *J. Occup. Health* 52, 383–388.
- Bulusu, S., Sharma, M., 2016. What does serum γ -glutamyltransferase tell us as a cardiometabolic risk marker? *Ann. Clin. Biochem.* 53, 312–332. <https://doi.org/10.1177/0004563215597010>
- Gözükara, M.Y., Börekçi, A., Gür, M., Aksoy, N., Şeker, T., Kaypaklı, O., Uçar, H., Türkoğlu, C., Koç, M., Makca, İ., Akyol, S., Selek, Ş., Çaylı, M., 2015. Gamma Glutamyl Transferase Activity is Associated With Both Paraoxonase Activity and Aortic Stiffness in Hypertensive Patients. *J. Clin. Lab. Anal.* 29, 390–396. <https://doi.org/10.1002/jcla.21785>
- Greabu, M., Totan, A., Battino, M., Mohora, M., Didilescu, A., Totan, C., Spinu, T., 2008. Cigarette smoke effect on total salivary antioxidant capacity, salivary glutathione peroxidase and gamma-glutamyltransferase activity. *BioFactors Oxf. Engl.* 33, 129–136.
- Jakubowski, H., 2000. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylolation. *J. Biol. Chem.* 275, 3957–3962.
- James, R.W., Leviev, I., Righetti, A., 2000. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 101, 2252–2257.
- Mackness, M., Mackness, B., 2015. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene* 567, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.088>
- Martini, D., Del Bo', C., Porrini, M., Ciappellano, S., Riso, P., 2017. Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. *J. Nutr. Biochem.* 48, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.06.002>
- Milnerowicz, H., Kowalska, K., Socha, E., 2015. Paraoxonase Activity as a Marker of Exposure to Xenobiotics in Tobacco Smoke. *Int. J. Toxicol.* 34, 224–232. <https://doi.org/10.1177/1091581815584624>
- Mitra, S., Kshatriya, G.K., 2016. Genetic variation at Q192R and L55M polymorphisms in PON1. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.06.004>
- Ndrepepa, G., Kastrati, A., 2016. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. *Ann. Transl. Med.* 4, 481. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.12.27>
- Paul, K.C., Sinsheimer, J.S., Cockburn, M., Bronstein, J.M., Bordelon, Y., Ritz, B., 2017. Organophosphate pesticides and PON1 L55M in Parkinson's disease progression. *Environ. Int.* 107, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.018>
- Reed, R.M., Borgan, S.M., Eberlein, M., Goldklang, M., Lewis, J., Miller, M., Navab, M., Kim, B.S., 2017. Tobacco Smoke Exposure Reduces Paraoxonase Activity in a Murine Model. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* 13, 20–25.
- Reilly, M.P., 2013. Tobacco-related cardiovascular diseases in the 21st century. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1458–1459. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301632>
- Roberts, R., 2015. A genetic basis for coronary artery disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 25, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2014.10.008>

- Rom, O., Aviram, M., 2017. High-density lipoprotein-associated paraoxonase 1: a possible prognostic biomarker for heart failure? *Eur. J. Heart Fail.* 19, 756–759. <https://doi.org/10.1002/ejhf.817>
- Rosenblat, M., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Vaya, J., Oren, R., Tawfik, D.S., Aviram, M., 2006. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 281, 7657–7665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512595200>
- Rozenberg, O., Shih, D.M., Aviram, M., 2003. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 461–467. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000060462.35946.B3>
- Shunmoogam, N., Naidoo, P., Chilton, R., 2018. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vasc. Health Risk Manag.* 14, 137–143. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S165173>

Poniżej przedstawiam szczegółowy opis sześciu prac doświadczalnych wchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących „osiągnięcie naukowe”

Publikacja I.1

Anna Bizoń, Halina Milnerowicz: *The effect of divalent metal chelators and cadmium on serum phosphotriesterase, lactonase and aryloesterase activities of paraoxonase 1.* *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2018 Vol.58; s.77-83 (**załącznik 3**).

Cel naukowy pracy:

Punktem wyjścia do prowadzonych przez mnie badań było ustalenie warunków oznaczania aktywności PON1: aryloesterazowej, fosfotriesterazowej oraz laktonazowej w surowicy metodą kinetyczną. Jak wspomniano we wstępie, PON1 jest syntetyzowana w wątrobie, a następnie wydzielana do krwioobiegu, gdzie łączy się z cząsteczką HDL. Związek PON1 z HDL jest niezbędny do utrzymania prawidłowej aktywności oraz struktury enzymu a w zaburzeniach, w których występuje niedobór HDL obserwuje się wyraźny spadek stężenia i aktywności PON1. Dlatego jednym z celów pracy była ocena obecności wolnej PON1 oraz enzymu związanego z cząsteczką HDL na podstawie oznaczenia trzech aktywności PON1 w wybranych frakcjach surowicy przy użyciu filtracji wirówkowej z zastosowaniem membran ≤ 30 kDa oraz ≥ 50 kDa. Wybór membran wynikał z uwzględnienia masy cząsteczkowej PON1 (około 40 kDa) oraz zakresu mas dla cząsteczek HDL.

Dotychczas nie analizowano także stabilności aktywności PON1 w surowicy podczas jej przechowywania, dlatego kolejnym celem prezentowanej pracy było zbadanie wpływ czasu i temperatury przechowywania surowicy na aktywności PON1.

Ostatnim etapem badań była ocena wpływu inkubacji surowicy z wybranymi ksenobiotykami: chlorkiem kadmu (CdCl_2) oraz z chelatorami jonów metali dwuwartościowych: kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) i D-penicylaminy na aktywności PON1. Metale ciężkie oraz chelatory jonów dwuwartościowych mogą wpływać na stabilność PON1 poprzez wypieranie z centrum aktywnego jonów Ca^{2+} . Dodatkowo metale ciężkie mogą blokować grupę sulfhydrylową w pozycji 284 oraz inaktywować reszty histydynowe. Dotychczas w dostępnej literaturze nie oceniano także wpływu D-penicylaminy na aktywności PON1.

Syntetyczne omówienie wyników:

Po przeanalizowaniu danych literaturowych dotyczących warunków manualnego oznaczania aktywności PON1 dopracowałam następujące warunki: a) aktywność aryloesterazowa PON1: 20 mM Tris(hydroksymetylo)aminometan-kwas solny (Tris-HCl) bufor o $\text{pH}=8,0$ zawierający 1 mM CaCl_2 w temperaturze 37°C wobec octanu fenylu jako substratu; b) aktywność fosfotriesterazowa PON1: 10 mM Tris-HCl bufor o $\text{pH}=8,0$ zawierający 2 mM CaCl_2 i 2 M NaCl w temperaturze 37°C wobec paraoksonu jako substratu oraz c) aktywność laktonazowa PON1: 50 mM Tris-HCl bufor o $\text{pH}=7,0$ zawierający 1 mM CaCl_2 w temperaturze 37°C wobec dihydrokumaryny jako substratu.

Na podstawie pracy dotyczącej strategii ultrafiltracji wirówkowej, umożliwiającej izolację białek z ludzkiego osocza (Greening and Simpson, 2010), oznaczyłam aktywności PON1 we frakcjach surowicy krwi zawierającej białka o masie: ≤ 30 kDa, 30-50 kDa oraz >50 kDa. Oznaczając aktywności PON1 we frakcjach: ≤ 30 kDa oraz w zakresie 30-50 kDa stwierdziłam brak lub bardzo niskie aktywności PON1. We frakcji surowicy zawierającej białka ≥ 50 kDa jednoznacznie potwierdziłam obecność PON1, co uwzględniając masę cząsteczkową PON1 (około 40 kDa) oraz cząsteczki HDL sugeruje, że enzym ten we krwi zdrowych osób występuje w połączeniu z cząsteczką HDL.

Analizując stabilność PON1 w surowicy przechowywanej w temperaturze 4°C (przez 24 i 48 godzin oraz 1, 2, 4 tygodnie) a także w temperaturze -28°C przez 4 tygodnie poprzez oznaczanie aktywności PON1 i porównanie ich wartości do

oznaczeń otrzymanych w surowicy uzyskanej bezpośrednio po pobraniu krwi (dzień 0) wykazałam, że najbardziej optymalne warunki przechowywania surowicy w celu oznaczenia aktywności PON1 występują w temperaturze -28°C do 4 tygodni od momentu pobrania. Przechowywanie surowicy w temperaturze 4°C nie jest rekomendowane do oznaczenia aktywności PON1.

Oceniając wpływ następujących, toksycznych stężeń CdCl_2 : 0,02; 0,05 i 0,08 mg/ml na aktywności PON1 wykazałam największy procentowy spadek aktywności fosfotriesterazowej. Najwyższe stężenie Cd (0,08 mg/ml) niemal całkowicie zahamowało tę aktywność. Również godzinna inkubacja surowicy z D-penicylaminą w stężeniach 0,2; 1,0 i 2,0 mg/ml wykazała największy spadek aktywności fosfotriesterazowej. Z kolei inkubacja surowicy z EDTA w stężeniach 0,05; 0,09 i 0,2 mg/ml powodowała największy spadek aktywności laktonazowej, a następnie fosfotriesterazowej PON1. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że zarówno jony Cd^{2+} , jak i chelatory jonów dwuwartościowych hamują aktywność PON1, a wraz ze wzrostem stężenia analizowanych ksenobiotyków aktywności PON1 ulegają dalszemu obniżeniu. D-penicylamina w zakresie stężeń terapeutycznych jest silniejszym inhibitorem aktywności PON1 niż EDTA. Uzyskane wyniki badań opisane w pracy nr 1 stanowią uzupełnienie badań biochemicznych nad strukturą i właściwościami paraoksonazy 1.

Na podstawie przeprowadzonych badań do najważniejszych osiągnięć zaliczam:

- opracowanie warunków oznaczania trzech aktywności PON1;
- wykazanie w surowicy obecności PON1 połączonej z cząsteczką HDL dzięki wykorzystaniu techniki ultrafiltracji wirówkowej z zastosowaniem odpowiednich membran;
- wyznaczenie optymalnych warunków czasu przechowywania surowicy w celu oznaczania aktywności PON1;
- potwierdzenie hamującego działania CdCl_2 , EDTA i D-penicylaminy na aktywności PON1;
- wykazanie, że ekspozycja na jony kadmu oraz na D-penicylaminę powoduje największy spadek aktywności fosfotriesterazowej PON1.

Publikacja I.2

Anna Bizoń, Marta Kepinska, Krzysztof Snacki, Halina Milnerowicz.: *The impact of environmental and biological factors on paraoxonase 1 and γ -glutamyltranspeptidase activities in the blood of smelters.* *Int. J. Environ. Health Res.* 2016 Vol.26 no.2; s.222-238 (załącznik 3).

Cel naukowy pracy:

W pierwszej publikacji z cyklu (**Anna Bizoń**, Halina Milnerowicz: *The effect of divalent metal chelators and cadmium on serum phosphotriesterase, lactonase and arylesterase activities of paraoxonase 1.* *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018 Vol.58; s.77-83) w warunkach *in vitro* potwierdziłam hamujący wpływ jonów kadmu na aktywności PON1. W kolejnych badaniach głównym celem pracy była ocena wpływu narażenia zawodowego w hucie miedzi na aktywność fosfotriesterazową PON1 i aktywność GGT we krwi niepalących i palących hutników w celu zbadania przydatności ich oznaczeń w warunkach narażenia na metale ciężkie i dym tytoniowy. Analizowałam także wpływ czynników biologicznych takich jak: wiek, masa ciała (wyrażona wartością BMI), wartości pomiarów ciśnienia tętniczego krwi oraz stylu życia: konsumpcji alkoholu etylowego i długość lat pracy w hucie na aktywność wyżej wymienionych enzymów.

Syntetyczne omówienie wyników:

Nieodłącznym czynnikiem środowiskowym pracy w hucie jest ekspozycja na metale ciężkie takie jak: ołów (Pb), arsen (As) i Cd. Oznaczone stężenia Cd i Pb w pełnej krwi oraz As w moczu hutników jednoznacznie wykazały, że praca w hucie potęguje kumulację tych pierwiastków w organizmie człowieka. Kilkukrotny wzrost stężenia Pb we krwi i As w moczu hutników może negatywnie wpływać na aktywność wielu enzymów, co między innymi znalazło odzwierciedlenie w około 2-krotnym spadku aktywności fosfotriesterazowej PON1, zarówno w surowicy niepalących, jak i palących hutników w porównaniu do osób nienarażonych na metale ciężkie. Również negatywna korelacja między aktywnością fosfotriesterazową PON1 a stężeniem Pb i Cd we krwi oraz As w moczu palących hutników potwierdziła, że spadek aktywności PON1 wynika z narażenia na metale ciężkie.

Wcześniej prowadzone badania wykazały, że również palenie papierosów wpływa hamująco na aktywność PON1. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach również zaobserwowałam negatywną zależność między stężeniem kotyniny a aktywnością PON1. Obok oceny wpływu palenia papierosów na aktywność PON1, analizowałam także wpływ konsumpcji alkoholu etylowego, na aktywność tego enzymu w surowicy. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdziłam, że zmiany aktywności fosfotriesterazowej PON1 we krwi hutników wywołane spożyciem alkoholu etylowego były zależne od dawki dziennie wypitego alkoholu. Ujemną korelację między ilością spożytego w gramach alkoholu etylowego a aktywnością PON1 wykazałam tylko w przypadku konsumpcji ≥ 80 g alkoholu, podczas gdy codzienne spożycie < 40 g alkoholu nie wpływało na aktywność tego enzymu.

Oceniałam także związek między aktywnością PON1 a stężeniem kluczowych pierwiastków, takich jak: Ca i magnez (Mg). Jak wcześniej wspomniano, PON1 jest wapniowo-zależnym enzymem, posiadającym w centrum aktywnym 2 jony wapnia, które determinują jego stabilność strukturalną i aktywność katalityczną. Uzyskana w moich badaniach pozytywna korelacja między aktywnością PON1 a stężeniem jonów wapnia jednoznacznie potwierdza związek między tymi parametrami. Ze względu na udział jonów Mg w homeostazie Ca a także jego wpływ na stabilizację błony komórkowej oraz zaangażowanie w utrzymanie prawidłowej wartości ciśnienia tętniczego krwi i pracy serca, analizowałam również związek między aktywnością PON1 a stężeniem tego pierwiastka. Pozytywna korelacja między aktywnością PON1 a stężeniem Mg potwierdza ich wzajemny związek oraz ochronną funkcję w przeciwdziałaniu rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych i w utrzymaniu stabilności błon komórkowych.

W pracy oceniałam także wpływ narażenia na metale ciężkie i ksenobiotyki dymu tytoniowego na aktywność GGT w surowicy hutników. Zarówno w surowicy niepalących, jak i palących hutników wykazałam wzrost aktywności GGT w porównaniu do osób nienarażonych na metale ciężkie, a pozytywna korelacja między aktywnością enzymu a stężeniem Cd i Pb we krwi oraz As w moczu hutników potwierdziła, że ekspozycja zawodowa w hucie wpływa na wzrost aktywności GGT.

Dodatkowo, w obu grupach niepalących i palących hutników stwierdziłam silną pozytywną korelację między długością lat pracy w hucie a aktywnością GGT, co wskazuje, że nie tylko narażenie zawodowe, ale czas ekspozycji wpływa na dalszy

wzrost aktywności tego enzymu. Pozytywna korelacja między długością lat pracy w hucie a aktywnością GGT może wynikać także z wieku hutników, ponieważ aktywność GGT wzrasta wraz z biegiem lat, co również potwierdziła w moich badaniach pozytywna zależność między aktywnością tego enzymu i wiekiem hutników. W grupie palących hutników zaobserwowałam także, że wzrost masy ciała wpływał na podwyższoną aktywność GGT w surowicy. Natomiast w grupie niepalących hutników, u której stwierdziłam największe spożycie alkoholu, wykazałam pozytywną korelację między konsumpcją wysokoprocentowego alkoholu etylowego a wzrostem aktywności GGT w surowicy.

Warta podkreślenia jest również silna, ujemna korelacja między aktywnością GGT i PON1. Jak nadmieniałam we wstępie, wraz z wiekiem aktywność PON1 ulega obniżeniu, co zmniejsza zdolność enzymu do przeciwdziałania oksydacji cząsteczki LDL i potęguje wzrost oxLDL. Podwyższone stężenie oxLDL i wzrost aktywności GGT we krwi może indukować formowanie się blaszki miażdżycowej w naczyniach krwionośnych i zwiększać ryzyko wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych w przyszłości, szczególnie u osób starszych. Jednak mechanizm synergistycznego, aterogennego działania oxLDL i GGT nie został do końca wyjaśniony i wymaga dalszych badań.

Na podstawie przeprowadzonych badań do najważniejszych osiągnięć zaliczam wykazanie, że:

- zawodowa ekspozycja na metale ciężkie oraz palenie papierosów powoduje spadek aktywności fosfotriesterazowej PON1;
- metale ciężkie obecne w miejscu pracy wpływają na obniżone stężenie Ca, co bezpośrednio może wpływać na spadek aktywności PON1;
- podwyższona aktywność GGT w surowicy hutników jest związana zarówno z narażeniem zawodowym, jak i paleniem papierosów;
- zmiany w aktywnościach PON1 i GGT w surowicy hutników są również związane ze spożyciem alkoholu etylowego, jak i czasem pracy w hucie;
- czynniki biologiczne również modulują aktywność PON1 i GGT w surowicy.

Publikacja I.3

Anna Bizoń, Jolanta Antonowicz-Juchniewicz, Małgorzata Milnerowicz, Mariola Śliwińska-Mossoń, Halina Milnerowicz.: *The effect of occupational exposure on pro/antioxidant balance in the blood of non-smoking and smoking smelters with diabetes. Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2016 Vol.44; s.99-106 (**załącznik 3**).

Cel naukowy pracy:

Obserwując zaburzenia w aktywnościach PON1 i GGT w surowicy niepalących i palących hutników, w kolejnym etapie badań skoncentrowałam się na ocenie wpływu narażenia zawodowego na aktywność GGT, proces peroksydacji lipidów oraz wieloparametrową ocenę systemu antyoksydacyjnego we krwi niepalących i palących hutników chorujących na cukrzycę.

W ostatnich latach uwagę naukowców skupił potencjalny związek przyczynowo-skutkowy między narażeniem na As a ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2. Arsen zaburza działanie czynników transkrypcyjnych biorących udział w związanej z insuliną ekspresją genów. Wpływa stymulująco na czynnik IUF-1 (ang. *insulin upstream factor 1*) oraz na proces translokacji tego czynnika z cytoplazmy do jądra. Toksyczny wpływ As na metabolizm glukozy wynika również z faktu, że arseniany na +3 stopniu utlenienia są inhibitorami dehydrogenazy pirogronianowej i α -ketoglutarynowej, enzymów uczestniczących w procesach glukoneogenezy i glikolizy. Wykazano także, że podwyższona aktywność GGT, nawet w zakresie referencyjnym, może stanowić czynnik predykcyjny ryzyka rozwoju zaburzeń metabolicznych, w tym cukrzycy typu 2.

Jak wykazałam w drugiej z cyklu pracy (**Anna Bizoń**, Marta Kepinska, Krzysztof Snacki, Halina Milnerowicz.: *The impact of environmental and biological factors on paraoxonase 1 and γ -glutamyltranspeptidase activities in the blood of smelters. Int J Environ Health Res.* 2016 Vol.26 no.2; s.222-238) w moczu hutników stwierdziłam kilkakrotnie wyższe stężenie As w porównaniu do osób nienarażonych zawodowo na metale ciężkie, dlatego oznaczenie aktywności GGT oraz parametrów równowagi pro/antyoksydacyjnej u hutników z cukrzycą wydawało się wręcz koniecznością w świetle doniesień naukowych sugerujących związek między narażeniem na As a ryzykiem rozwoju cukrzycy typu II u ludzi, a także przydatnością oznaczania GGT w cukrzycy typu II.

Syntetyczne omówienie wyników:

Spośród wszystkich analizowanych w pracy grup, najwyższe stężenie As stwierdziłam w moczu palących hutników oraz palących hutników z cukrzycą. W grupie niepalących i palących hutników z cukrzycą oraz palących hutników zaobserwowałam także zaburzenia homeostazy kluczowych pierwiastków takich jak Zn i Cu, co manifestowało się obniżoną wartością współczynnika Zn/Cu względem zdrowych, nienarażonych osób. Cynk jest pierwiastkiem niezbędnym do produkcji insuliny przez komórki β -trzustki, a także powoduje wzrost ekspresji insulinozależnej glikoproteiny błonowej transportującej glukozę (GLUT 4, ang. *glucose transporter type 4*) w adipocytach, mięśniach szkieletowych i tkance serca, zatem zaburzenie w jego homeostazie może zwiększać ryzyko rozwoju cukrzycy. Skutkiem zmian w stężeniu insuliny są nie tylko zaburzenia w metabolizmie węglowodanów, ale także w gospodarce lipidowej. Potwierdziły to najwyższe stężenia markera peroksydacji lipidów (TBARS, ang. *thiobarbituric acid reactive substances*) w osoczu palących hutników oraz niepalących i palących hutników chorujących na cukrzycę.

Wykazałam także przydatność oznaczania aktywności GGT w surowicy hutników z cukrzycą, co potwierdza ponad 2-krotnie wyższa aktywność GGT w tej grupie badanej w stosunku do zdrowych osób z grupy kontrolnej. GGT jest pośrednio zaangażowany w generowanie wolnych rodników w obecności jonów metali przejściowych. Cysteinylglicyna, która powstaje w wyniku odłączenia reszty γ -glutamylowej z cząsteczki GSH w reakcji katalizowanej przez GGT, posiada silną zdolność redukcji metali przejściowych (w tym przypadku Cu^{2+} do Cu^{1+}), zwiększając w ten sposób stres oksydacyjny, który indukuje uszkodzenia komórek β trzustki oraz zmniejsza wrażliwość tkanek na insulinę. Komórki β trzustki, z powodu słabo rozwiniętego systemu antyoksydacyjnego, są bardzo podatne na uszkodzenia ze strony RFT, co w przypadku zdwojonej ekspozycji: zawodowej i na składniki dymu tytoniowego może skutkować zaburzeniem wydzielania insuliny.

Zwiększony stres oksydacyjny w organizmie palących hutników z cukrzycą skutkował także spadkiem stężenia GSH, kluczowego nieenzymatycznego antyoksydanta. Zarówno spadek stężenia GSH, jak i wzrost aktywności GGT w tej grupie wskazują na toczący się w organizmie stres oksydacyjny. W organizmie osób narażonych przewlekłe na zwiększony, wieloczynnikowy (narażenie na metale ciężkie i dym tytoniowy oraz cukrzyca) stres oksydacyjny dochodzi do wyczerpania zdolności

antyoksydacyjnej, stąd najprawdopodobniej obserwowany spadek stężenia GSH we krwi palących hutników chorych na cukrzycę.

Dalsza ocena zdolności obronnych ustroju hutników z cukrzycą przed skutkami nasilonych reakcji wolnorodnikowych wykazała obniżoną aktywność cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej (Cu/Zn SOD) oraz wzrost aktywności peroksydazy glutationowej (GPx). GPx katalizuje reakcję rozkładu H_2O_2 do H_2O i jest skuteczny w rozkładzie niższych stężeń H_2O_2 . W osoczu hutników zaobserwowałam spadek aktywności Cu/Zn SOD, co potencjalnie związane jest z obniżonym stężeniem H_2O_2 i wskazuje na główny udział GPx, a nie katalazy, w przekształceniu H_2O_2 w H_2O . Na wzrost aktywności GPx może również wpływać podwyższone stężenie Pb, co potwierdziła silna, dodatnia korelacja między stężeniem Pb i aktywnością tego enzymu ($r=0,86$, $p=0,014$). Wzrost aktywności GPx, może również wpływać na spadek stężenia GSH, ponieważ enzym ten katalizuje reakcję redukcji H_2O_2 oraz nadtlenków organicznych przy udziale GSH. Kolejny mechanizm tłumaczący spadek stężenia GSH może wynikać z podwyższonego stężenia As w organizmie hutników. Arsen na +5 stopniu utlenienia może być redukowany przy użyciu GSH do +3 stopnia utlenienia. Należy zaznaczyć, że związki arsenowe na +3 stopniu utlenienia są bardziej toksyczne niż na +5 i wiążą się silniej z białkami zawierającymi grupy tiolowe, takimi jak GSH, co również może tłumaczyć obniżone stężenie GSH u palących hutników z cukrzycą, u których stężenie As w moczu było najwyższe.

Obserwowany wzrost aktywności GGT oraz wielokierunkowe zaburzenia potencjału antyoksydacyjnego ustroju u niepalących i palących hutników z cukrzycą świadczą o złożonym wpływie narażenia na metale, palenia papierosów i cukrzycy, zarówno na generowanie stresu oksydacyjnego, jak i na obronę antyoksydacyjną.

Na podstawie przeprowadzonych badań do najważniejszych wniosków zaliczam wykazanie, że:

- praca w hucie, palenie papierosów a także cukrzyca wpływa na stężenie As w moczu i Pb we krwi hutników;
- wzrost aktywności GGT wynika zarówno z ekspozycji na metale ciężkie, jak i na składniki dymu tytoniowego a dodatkowo jest potęgowany przez cukrzycę oraz potwierdza przydatność jego oznaczania w warunkach ekspozycji na ksenobiotyki oraz u osób chorych na cukrzycę;

- ekspozycja na metale ciężkie i składniki dymu tytoniowego oraz cukrzyca indukują wielokierunkowe zaburzenia równowagi pro/antyoksydacyjnej, co potwierdza ich negatywne, synergistyczne oddziaływanie na organizm człowieka.

Publikacja I.4

Katarzyna Kowalska, Milena Ściskalska, **Anna Bizoń**, Mariola Śliwińska-Mossoń, Halina Milnerowicz. *Influence of oral contraceptives on lipid profile and paraoxonase and commonly hepatic enzymes activities. J. Clin Lab Anal.* 2018 Jan;32(1) (**załącznik 3**).

Cel naukowy pracy:

W dostępnym piśmiennictwie wykazano wpływ wielu farmakoterapii na aktywność PON1 we krwi ludzi, natomiast nie było żadnych informacji dotyczących oceny efektu stosowania doustnej, dwuskładnikowej antykoncepcji hormonalnej (COCP, ang. *combined oral contraceptive pill*) na aktywność fosfotriesterazową, aryloesterazową i laktonazową PON1. Doustne środki antykoncepcyjne są najpowszechniej stosowaną metodą antykoncepcji, a ich długoletnie przyjmowanie może zaburzać funkcje wątroby, powodując zmiany w aktywności enzymów wątrobowych oraz stężeń parametrów profilu lipidowego. Zmiany te mogą wynikać ze: zwiększonej funkcji wątroby uczestniczącej w metabolizmie egzogennych hormonów oraz wpływu egzogennych i endogennych estrogenów na receptory tego hormonu, które uczestniczą w regulacji apolipoprotein, głównych białek występujących w cząsteczce HDL, a także z negatywnego wpływu steroidów na parametry gospodarki lipidowej. Stąd celowa wydaje się ocena nie tylko aktywności PON1, ale także GGT oraz stężenia parametrów profilu lipidowego i markera peroksydacji lipidów we krwi kobiet stosujących COCP.

Syntetyczne omówienie wyników:

Przyjmowanie COCP przez młode kobiety było związane ze wzrostem aktywności aryloesterazowej i laktonazowej PON1 w surowicy w porównaniu do kobiet niestosujących antykoncepcji. Podwyższona aktywność aryloesterazowa oraz laktonazowa PON1 mogła wynikać z jej zdolności do hydrolizy leków zawierających

w swojej strukturze laktony lub związki cykliczne. Z kolei aktywność fosfotriesterazowa PON1 w surowicy kobiet przyjmujących COCP była obniżona w porównaniu do kobiet ich niestosujących. Molekularne badania dotyczące struktury PON1 wykazały, że inne centra katalityczne odpowiadają za aktywność laktonazową i aryloesterazową oraz fosfotriesterazową, co może tłumaczyć fakt, że pomimo wzrostu aktywności aryloesterazowej i laktonazowej, aktywność fosfotriesterazowa u kobiet z COCP była istotnie obniżona. Dodatkowo aktywność fosfotriesterazowa jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia zaburzenia wątroby: im większe obserwuje się zaburzenia funkcji wątroby, tym aktywność fosfotriesterazowa jest niższa. W celu potwierdzenia tej tezy, oznaczyłam aktywności GGT oraz aminotransterazy alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST), podstawowych wskaźników funkcji wątroby. Otrzymane wyniki wykazały istotny wzrost aktywności tych enzymów u kobiet przyjmujących COCP względem kobiet ich niestosujących. Co ciekawe, aktywność GGT w surowicy kobiet przyjmujących COCP przekraczała zakres wartości referencyjnych dla użytej metody (zakres referencyjny dla GGT wynosił <31 U/L a oznaczona średnia aktywność tego enzymu w grupie kobiet stosujących COCP wynosiła 39,2 U/L), mimo młodego wieku badanych kobiet. Zaobserwowałam także ujemną korelację między aktywnością fosfotriesterazową PON1 a aktywnością ALT oraz wartością współczynnika *de Ritis* (stosunek AST/ALT), co również potwierdza tezę, że zaburzenie funkcji wątroby może powodować obniżenie aktywności fosfotriesterazowej PON1. Spadek aktywności fosfotriesterazowej PON1 może również wynikać z podwyższonego stężenia malonodialdehydu. Aktywności laktonazowa oraz aryloesterazowa są najprawdopodobniej zależne od reszt histydyny w pozycji 115 i 134, podczas gdy aktywność fosfotriesterazowa wymaga wolnej grupy sulfhydrylowej w pozycji 284. Nadtlenki lipidowe, powstające podczas stresu oksydacyjnego, wiążą się kowalencyjnie z cysteiną w pozycji 284, w konsekwencji prowadząc do hamowania aktywności fosfotriesterazowej PON1.

Przyjmowanie egzogennych estrogenów korelowało z obniżonym stężeniem LDL, co najprawdopodobniej wynika z udziału tych hormonów w katabolizmie LDL oraz z ich indukującego wpływu na transkrypcję receptorów LDL w komórkach wątroby. Progesterony nowej generacji takie jak: drospirenon, 17-hydroksyprogesteron zostały opracowane tak, aby zredukować negatywny wpływ dwuskładnikowych tabletek antykoncepcyjnych na parametry profilu lipidowego, tj. by obniżały stężenie

LDL i triglicerydów w organizmie. Pomimo obniżonego stężenia LDL oznaczonego w surowicy kobiet stosujących COCP, stężenie triglicerydów było istotnie wyższe w porównaniu do kobiet niestosujących antykoncepcji. Nie zaobserwowałam natomiast istotnych statystycznie zmian w stężeniu całkowitego cholesterolu między badanymi grupami.

Warto również podkreślić ponad 2-krotny wzrost wartości współczynnika aterogenności (TC/HDL, stosunek stężenia całkowitego cholesterolu do frakcji HDL cholesterolu) u kobiet przyjmujących COCP (Castelli indeks 1: TC/HDL=2,9) w porównaniu do kobiet niestosujących tej terapii (TC/HDL=1,2). Zalecana wartość tego współczynnika dla osób obciążonych ryzykiem incydentów sercowo-naczyniowych wynosi <3 , natomiast oznaczona wartość mediany dla tego wskaźnika wynosząca 2,9 (i zakres 2,1-11,1) w grupie kobiet stosujących antykoncepcję wskazuje, iż mimo młodego wieku ryzyko rozwoju miażdżycy jest większe niż w przypadku kobiet niestosujących hormonalnej terapii.

Obserwowany wzrost aktywności ALT, AST i GGT, zmiany w parametrach profilu lipidowym i w aktywnościach PON1 jednoznacznie wskazują, że stosowanie COCP wpływa na status tych parametrów we krwi a monitoring funkcji wątroby oraz parametrów profilu lipidowego wydaje się być niezbędny w tej grupie badanej.

Na podstawie przeprowadzonych badań do najważniejszych wniosków zaliczam wykazanie, że stosowanie doustnej, dwuskładnikowej antykoncepcji hormonalnej:

- wskazuje na odmienny mechanizm działania tych leków na aktywności PON1, co manifestowało się obniżoną aktywnością fosfotriesterazową oraz wzrostem aktywności laktonazowej i aryloesterazowej;
- zaburza funkcję wątroby, co manifestowało się podwyższoną aktywnością AST, i ALT oraz aktywnością GGT przekraczającą zakres referencyjny dla tego enzymu w surowicy młodych kobiet;
- obniża stężenie LDL przy jednoczesnym wzroście stężenia triglicerydów i wartości współczynnika aterogenności (TC/HDL);

Stosowanie doustnej, dwuskładnikowej antykoncepcji hormonalnej powinno być monitorowane ze względu na jej wpływ na funkcję wątroby oraz parametry profilu lipidowego w tej grupie badanej.

Publikacja I.5

Anna Bizoń, Halina Milnerowicz: *Changes in lipid profile and paraoxonase activities in the blood of non smoking and smoking pregnant women in first trimester of pregnancy. Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2017 Vol.53; s.74-80 (**załącznik 3**).

Cel naukowy pracy:

Obserwując zaburzenia w aktywności PON1 i GGT oraz w stężeniu parametrów profilu lipidowego we krwi młodych kobiet stosujących antykoncepcję hormonalną w kolejnej pracy kontynuowałam ocenę wpływu zmiany gospodarki hormonalnej wywołanej ciążą na aktywności tych enzymów we krwi kobiet w pierwszym trymestrze ciąży, narażonych czynnie lub biernie na dym tytoniowy, które z tytułu wieku (≥ 35 lat) zostały skierowane do Pracowni Badań Prenatalnych.

Wcześniej prowadzone badania na Uniwersytecie w Buffalo wykazały, że aktywność PON1 chroni oocyt przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego a także, że aktywność PON1 oznaczona w surowicy i płynie owodniowym pozytywnie koreluje ze wczesnym rozwojem zarodków z zapłodnień *in vitro*.

W pierwszym trymestrze ciąży obserwuje się fizjologicznie podwyższone stężenie estrogenów i progesteronu. W przebiegu ciąży dochodzi również do nasilenia procesów oksydacyjnych i wzmożonego wytwarzania RFT w wyniku zwiększonego metabolizmu komórkowego a ekspozycja na dym tytoniowy dodatkowo nasila stres oksydacyjny. Szacuje się, że w Polsce około 25% kobiet pali papierosy, a połowa z nich kontynuuje nałóg podczas ciąży. Dodatkowo nawet do 50% ciężarnych jest biernie narażonych na dym tytoniowy w gospodarstwie domowym lub miejscu pracy. Ekspozycja na dym tytoniowy podczas ciąży może powodować liczne patologie położnicze (tj. poronienia płodu, przedwczesne odklejenie łożyska i jego nieprawidłową lokalizację, przedwczesne pęknięcie pęcherza płodowego i przedwczesne porody, itd.) i jest szczególnie niebezpieczne w I trymestrze ciąży, kiedy kształtują się narządy płodu i formuje łożysko. Ponadto w ciąży fizjologicznej następują zmiany w parametrach profilu lipidowego, tj. wzrasta stężenie triglicerydów i LDL przy jednoczesnym wzroście stężenia HDL, stąd efekt aterogeny jest zmniejszony. Natomiast ekspozycja na dym tytoniowy podczas ciąży powoduje dalsze, niekorzystne zmiany w gospodarce lipidowej u ciężarnych.

Uwzględniając wyżej wymienione czynniki, w kolejnym etapie badań oceniałam wpływ narażenia na dym tytoniowy na oznaczane w cyklu aktywności GGT i PON1 oraz parametry profilu lipidowego i stężenie markera peroksydacji lipidów we krwi kobiet ≥ 35 roku życia będących w I trymestrze ciąży.

Syntetyczne omówienie wyników:

Moje wyniki badań dowiodły, że zarówno bierne, jak i czynne narażenie na dym tytoniowy podczas I trymestru ciąży powodowało spadek stężenia HDL przy jednoczesnym wzroście stężenia LDL w porównaniu do niepalących ciężarnych. We krwi aktywnie palących kobiet stwierdziłam wyższe stężenie całkowitego cholesterolu i triglicerydów, a pozytywna korelacja między stężeniem kotyniny oraz całkowitego cholesterolu i LDL, jak również silna ujemna korelacja między stężeniem kotyniny i frakcji HDL potwierdziła, że narażenie na dym tytoniowy zaburza parametry profilu lipidowego u ciężarnych. Analogiczne zależności między stężeniem kotyniny oraz stężeniem cholesterolu całkowitego lub LDL, jak również ujemna korelacja między stężeniem kadmu i frakcji HDL w grupie ciężarnych biernie narażonych na dym tytoniowy potwierdza również niekorzystny wpływ tego typu narażenia na składniki dymu tytoniowego na gospodarkę lipidową ciężarnych.

W grupie kobiet palących przed ciążą, zaobserwowałam tylko podwyższone stężenie LDL, podczas gdy stężenie pozostałych parametrów profilu lipidowego nie różniło się od wartości obserwowanych w grupie niepalących ciężarnych, co sugeruje, że rezygnacja z palenia papierosów podczas ciąży zmniejsza zaburzenia występujące w gospodarce lipidowej w stosunku do ciężarnych aktywnie palących podczas ciąży. Nie wykazałam natomiast istotnych korelacji między pozostałymi parametrami profilu lipidowego a markerami ekspozycji na dym tytoniowy.

Oceniłam również wartość stosunku LDL/HDL we krwi ciężarnych i wykazałam we wszystkich grupach narażonych na dym tytoniowy (biernie oraz czynnie podczas ciąży) pozytywną korelację między stężeniem kotyniny a wartością współczynnika LDL/HDL. Najsilniejszą zależność zaobserwowałam w grupie czynnie palących ciężarnych ($r=0,90$), co potwierdza negatywny wpływ ekspozycji na dym tytoniowy podczas ciąży na wzrost stężenia frakcji LDL i spadek frakcji HDL. Obserwację tę potwierdziła również dodatnia korelacja między podwyższoną wartością współczynnika LDL/HDL

i wzrostem stężenia Cd w pełnej krwi w grupach ciężarnych palących przed i podczas ciąży.

Obniżone stężenie HDL we krwi narażonych na dym tytoniowy kobiet może wpływać na spadek aktywności fosfotriesterowej PON1, który zaobserwowałam zarówno we krwi kobiet aktywnie palących przed ciążą, jak i podczas jej trwania. W grupie palących ciężarnych wykazałam także spadek aktywności aryloesterazowej i laktonazowej PON1 w porównaniu do niepalących ciężarnych. Silne ujemne korelacje między aktywnościami PON1 a stężeniem Cd a także między stężeniem kotyniny a aktywnością fosfotriesterazową PON1 potwierdzają negatywny wpływ ksenobiotyków dymu tytoniowego na aktywności PON1. Wcześniej prowadzone badania wykazały, że zaprzestanie palenia na okres co najmniej 3 miesiące powoduje ponowny wzrost aktywności PON1 do wartości obserwowanych u osób niepalących. W moich badaniach u kobiet, które paliły przed zajściem w ciążę, zarówno aktywność laktonazowa jak i fosfotriesterazowa PON1 nie różniła się istotnie w porównaniu do wartości oznaczonych w grupie niepalących ciężarnych, a istotny spadek tylko aktywności aryloesterazowej PON1, potwierdza, że rezygnacja z nałogu palenia papierosów wpływa nie tylko korzystnie na parametry profilu lipidowego, ale także na aktywności PON1.

Z uwagi na fakt, że ksenobiotyki zawarte w dymie tytoniowym oraz zwiększony metabolizm podczas ciąży mogą indukować stres oksydacyjny analizowałam także stężenie malonyldialdehydu we krwi, jako głównego markera peroksydacji lipidów. Stwierdziłam istotny, w stosunku do niepalących ciężarnych, wzrost stężenia MDA we wszystkich grupach narażonych na dym tytoniowy, przy czym najwyższe stężenie tego markera zaobserwowałam we krwi ciężarnych palących podczas ciąży, następnie w grupie ciężarnych palących przed ciążą oraz biernie narażonych. Ponadto silna dodatnia korelacja ($r=0,80$) między stężeniem MDA a stężeniem kotyniny w grupie palących ciężarnych potwierdza, że stres oksydacyjny podczas ciąży jest potęgowany przez palenie tytoniu.

Również czynna, jak i bierna ekspozycja na dym tytoniowy wpływała na aktywność GGT we krwi ciężarnych. Wzrost aktywności GGT może wynikać ze zwiększonego zapotrzebowania komórek na stężenie GSH w warunkach stresu oksydacyjnego (analogicznie do obserwacji opisanych w pracy **Anna Bizoń**, Jolanta Antonowicz-Juchniewicz, Małgorzata Milnerowicz, Mariola Śliwińska-Mossoń, Halina

Milnerowicz.: *The effect of occupational exposure on pro/antioxidant balance in the blood of non-smoking and smoking smelters with diabetes. Environ Toxicol Pharmacol.* 2016 Vol.44; s.99-106), ale również wynikać z zaburzeń parametrów profilu lipidowego. Akumulacja triglicerydów i frakcji LDL może przyczyniać się do wzrostu aktywności GGT, co potwierdziła silna, pozytywna korelacja między aktywnością tego enzymu oraz stężeniem triglicerydów, frakcji LDL a także markerem peroksydacji lipidów. Co ciekawe, nie zaobserwowałam żadnych istotnych korelacji między markerami ekspozycji na dym tytoniowy (kotynina i kadm) a aktywnością GGT. Z kolei istotne korelacje między stężeniem MDA i markerami wielkości ekspozycji na dym tytoniowy (Cd, kotynina) oraz między aktywnością GGT i parametrami gospodarki lipidowej (wzrost stężenia: całkowitego cholesterolu, triglicerydów, LDL) wskazują na odmienny wpływ zaburzeń występujących w organizmie podczas ciąży i dodatkowo związanych z narażeniem na dym tytoniowy na te parametry.

Podsumowując uzyskane w pracy wyniki, wykazałam, że ekspozycja na ksenobiotyki dymu tytoniowego w I trymestrze ciąży w istotny sposób wpływa na zaburzenia gospodarki lipidowej, w tym na wielkość peroksydacji lipidów, co najprawdopodobniej przyczynia się do zaburzenia aktywności PON1 i GGT.

Na podstawie przeprowadzonych badań do najważniejszych wniosków zaliczam wykazanie, że palenie papierosów podczas ciąży:

- potęguje stres oksydacyjny manifestujący się podwyższoną aktywnością GGT i podwyższonym stężeniem MDA;
- zwiększa stężenie LDL przy jednoczesnym spadku stężenia HDL;
- obniża aktywność aryloesterazową, laktonazową i fosfotriesterazową PON1;
- analogicznie do młodych kobiet stosujących antykoncepcję hormonalną, parametry profilu lipidowego oraz aktywności enzymów wątrobowych powinny być monitorowane podczas ciąży, szczególnie w przypadku zwiększonego ryzyka powikłań podczas ciąż eksponowanej na ksenobiotyki dymu tytoniowego.

Publikacja I.6

Anna Bizoń, Monika Ołdakowska, Halina Milnerowicz. *The association among paraoxonase 1 L55M polymorphism and paraoxonase 1 status as well as lipid profile*

parameters in healthy subjects. Inhal Toxicol. Published online: 08 Jan 2019; doi.org/10.1080/08958378.2018.1554014 (załącznik 3).

Cel naukowy pracy:

Polimorfizmy genetyczne białek enzymatycznych mogą prowadzić do zmian fenotypowych związanych z zaburzeniem ich aktywności katalitycznej, co z kolei może mieć wpływ na przebieg różnych szlaków metabolicznych. Jak wspomniano we wstępie, polimorfizm L55M jest jednym z najczęściej występujących w rasie kaukaskiej polimorfizmów PON1. Alloenzymowi M55 przypisuje się obniżoną ekspresję mRNA, a co się z tym wiąże, niższe stężenie oraz obniżoną aktywność enzymu, przy równocześnie zwiększonej ochronie LDL przed oksydacją. Natomiast wariant L55 jest bardziej stabilny i odporny na proteolizę, co może wiązać się z wyższymi stężeniami tego enzymu w surowicy. Wykazano, że polimorfizm L55M w dużo większym stopniu moduluje status PON1 w organizmie niż czynniki środowiskowe.

Dotychczas nie oceniano wpływu polimorfizmu L55M na stężenie PON1 oraz jej trzy aktywności a także na stężenie parametrów profilu lipidowego u osób zdrowych, dlatego w ostatniej z cyklu pracy badałam wpływ występowania polimorfizmu L55M PON1 na wyżej wymienione parametry u zdrowych osób.

Syntetyczne omówienie wyników:

Zmiana stężenia i aktywności PON1 może wynikać z polimorfizmu genetycznego genu kodującego PON1. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdziły, że polimorfizm L55M wpływa na aktywność fosfotriesterazową i aryloesterazową PON1 a najniższe aktywności tego enzymu stwierdziłam w genotypie MM. Również w tej grupie wykazałam największy spadek stężenia PON1 oraz frakcji HDL, co potwierdza otrzymane w pierwszej pracy wyniki, że aktywność PON1 we krwi jest zależna od stężenia HDL. Zaobserwowałam także, że spadek aktywności PON1 i stężenia frakcji HDL korelował z obniżonym stężeniem PON1. Jak opublikowali wcześniej inni autorzy, niższe stężenie PON1 może nie tylko zaburzać aktywność PON1, ale także przyczyniać się do zwiększonego ryzyka rozwoju dyslipidemii, insulinooporności i nadciśnienia tętniczego oraz wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych. Dlatego sugeruje się, że oznaczanie statusu PON1 we krwi może być przydatne w ocenie

zaburzeń metabolicznych a występowanie polimorfizmu L55M może predysponować do ich rozwoju w przyszłości.

Występowanie nadwagi i otyłości, szczególnie typu wisceralnego, może również potęgować zaburzenia metaboliczne, co znalazło odzwierciedlenie w ujemnej korelacji między wartością WHR oraz aktywnością aryloesterazową i fosfotriesterazową PON1 w genotypie MM a także między wartością WHR i stężeniem PON1 w genotypie LM.

Zarówno u osób z genotypem MM, jak i z genotypem LM oraz z nadwagą i otyłością wykazałam około 2-krotnie wyższą aktywność fosfotriesterazową PON1 w porównaniu do osób z tym samym genotypem, ale z prawidłową masą ciała. Chociaż wzrost aktywności fosfotriesterazowej PON1 u osób z nadwagą lub otyłością wydaje się kontrowersyjny, to moje wyniki badań potwierdzają wcześniejsze obserwacje prowadzone w innych ośrodkach. Otyłość charakteryzuje się zwiększonym stresem oksydacyjnym w tkance tłuszczowej, co zwiększa zaburzenia pro/antyoksydacyjne w organizmie i może wpływać na wzrost aktywności fosfotriesterazowej PON1, która pełni również kluczową funkcję w neutralizacji wolnych rodników. Ten nurt badań wymaga jednak kontynuacji.

W przypadku aktywności laktonazowej PON1 żaden z analizowanych w pracy czynników (polimorfizm L55M, ekspozycja na dym tytoniowy, występowanie nadwagi i otyłości) nie wpływał istotnie na zmiany tej aktywności.

Oceniając wpływ palenia papierosów na aktywności PON1, wykazałam spadek aktywności fosfotriesterazowej PON1 u palących osób z genotypem LM. Co ciekawe, wcześniej prowadzone badania na populacji Polaków wykazały, że genotyp MM może być czynnikiem predysponującym nałóg palenia papierosów. Również w moich badaniach wykazałam, że w grupie osób z genotypem MM aż 88% stanowiły palące osoby (w grupie o genotypie LM osób palących było około 73% a w grupie LL osoby palące stanowiły połowę przypadków), co może potwierdzać, że genotyp MM częściej występuje u osób palących niż niepalących.

Obserwowane zmiany w stężeniu PON1 i frakcji HDL oraz aktywności PON1 wydają się odzwierciedlać odmienną wrażliwość wewnątrzsobniczą związaną z wariantami genetycznymi LM i MM polimorfizmu L55M, a ekspozycja na dym tytoniowy oraz występowanie nadwagi i otyłości dodatkowo wpływają na zmiany analizowanych parametrów. Uzyskane wyniki badań potwierdzają również ścisły związek między aktywnością PON1 oraz stężeniem tego enzymu, jak i frakcji HDL.

Na podstawie przeprowadzonych badań do najważniejszych wniosków zaliczam wykazanie, że:

- polimorfizm PON1 L55M wpływa na stężenie PON1 oraz aktywność fosfotriesterazową i aryloesterazową PON1 we krwi;
- ekspozycja na dym tytoniowy oraz występowanie nadwagi i otyłości w analizowanych genotypach nie wpływało na aktywność laktonazową PON1 we krwi;
- obniżona aktywność fosfotriesterazowa i aryloesterazowa PON1 we krwi może być związana z niższym stężeniem HDL;
- występowanie nadwagi i otyłości w grupie LM i MM wpływało na wzrost aktywności fosfotriesterazowej PON1;
- genotyp MM częściej występuje u osób palących niż niepalących.

Podsumowując, wyniki otrzymane w moim osiągnięciu naukowym przyczyniły się do uzyskania nowych informacji na temat przydatności oznaczania aktywności PON1 i GGT we krwi ludzi narażonych na ksenobiotyki. Dzięki opracowanym metodom wykazałam, że stężenie i aktywność PON1 we krwi zdrowych osób jest związana z cząsteczką HDL (**praca I.1 i I.6**; załącznik nr 3). Zarówno na podstawie pierwszej, jak i drugiej w cyklu pracy (**praca I.1 i I.2**; załącznik nr 3) potwierdziłam negatywny wpływ metali ciężkich występujących w środowisku (Cd, As i Pb) oraz chelatorów jonów dwuwartościowych (EDTA, D-penicylaminy) na aktywności PON1 w surowicy. Potwierdziłam przydatność oznaczania aktywności GGT nie tylko jako markera funkcji wątroby, ale także jako użytecznego parametru oceny wielkości stresu oksydacyjnego oraz zaburzeń metabolicznych występujących w organizmie człowieka, na co wskazują wysokie aktywności GGT w surowicy: palących i niepalących pracowników huty miedzi, hutników chorujących na cukrzycę, a także młodych kobiet stosujących antykoncepcję hormonalną oraz palących kobiet, będących w I trymestrze ciąży (**praca I.2, I.3, I.4, I.5**; załącznik nr 3). Z kolei analiza wpływu palenia papierosów w różnych grupach badanych potwierdziła negatywny wpływ tego nałogu nie tylko na aktywności analizowanych w cyklu enzymów, ale także na parametry profilu lipidowego oraz równowagi pro/antyoksydacyjnej (**praca I.2, I.3, I.5, I.6**; załącznik nr 3). Wyniki moich badań pozwoliły również rozszerzyć

informacje na temat wpływu stosowania leków antykoncepcyjnych na aktywności PON1 oraz GGT, a także sugerują zróżnicowany wpływ tej terapii na aktywności PON1 (**praca I.4**; załącznik nr 3). Wykazałam także przydatność oznaczenia stężenia parametrów profilu lipidowego, zarówno we krwi kobiet stosujących antykoncepcję hormonalną, jak i we krwi kobiet będących w ciąży, ze szczególnym uwzględnieniem ciężarnych eksponowanych na dym tytoniowy oraz w wieku powyżej 35 roku (**praca I.4, I.5**; załącznik nr 3).

Dodatkowo zmiany w stężeniu PON1 i HDL oraz aktywności aryloesterazowej i fosfotriesterazowej PON1 wynikające z polimorfizmu L55M genu kodującego PON1 wskazują na istotny wpływ czynników genetycznych determinujących wrażliwość wewnątrzsobniczą ludzi oraz sugerują potencjalne zaburzenia metaboliczne w przyszłości (**praca I.6**; załącznik nr 3).

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:

- ❖ **21 publikacje** o łącznej wartości **IF=29,577; MNiSW=359**, na które składają się 19 publikacji eksperymentalnych (3 opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz 2 prace przeglądowe.
- ❖ **29 komunikatów**, na które składa się 19 komunikatów prezentowanych na międzynarodowych konferencjach i zjazdach naukowych (przed uzyskaniem stopnia doktora – 4 komunikaty) oraz 10 komunikatów prezentowanych na krajowych konferencjach i zjazdach naukowych.
- ❖ współautorstwo **podręcznika, Pkt. MNiSW=20**.
- ❖ **pełnotekstowy referat** w materiałach zjazdowych: **Pkt. MNiSW=3**.

Łącznie jestem pierwszym autorem 14 prac i autorem korespondencyjnym 14 prac. 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* wynosi **42,049** oraz **527** punktów według punktacji MNiSW (w tym po uzyskaniu stopnia doktora **IF=38,082**; MNiSW=**481**).
- ❖ Analiza publikacji w bazie:
 - ✓ *Web of Science – Science Citation Index- Expanded* wykazała **146 cytowań** (bez autocytowań 114),
 - Indeks Hirscha 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 opracowania metody oznaczania stężenia izoformy 1 i 2 metalotioneiny (MT1/2), niskocząsteczkowego białka pełniącego wiele kluczowych funkcji w organizmie człowieka a następnie wykorzystania opracowanej metody do oznaczenia stężenia MT1/2 we krwi pacjentów ze stanami zapalnymi trzustki. Analizowałam także wpływ narażenia zawodowego na metale ciężkie oraz palenia papierosów na status antyoksydacyjny we krwi hutników oraz na funkcję nerek oceniając aktywność N-acetylo-β-D-glukozaminidazy i jej form w moczu hutników.

Mój dorobek naukowy, powstały przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych obejmuje następującą tematykę badawczą, dotyczącą:

- ❖ *opracowania immunoenzymatycznej metody oznaczania stężenia metalotioneiny w materiale biologicznym oraz oceny wpływu stanów zapalnych trzustki na stężenie MT i aktywność Cu/Zn SOD we krwi i w tkance trzustki objętej procesem zapalnym.*

Z powodu braku komercyjnie dostępnego testu umożliwiającego oznaczenie stężenia MT1/2 w materiale biologicznym opracowano immunoenzymatyczną metodę z wykorzystaniem standardu MT1/2 wyizolowanego z ludzkiej wątroby oraz komercyjnie dostępnych pierwszo- i drugorzędowych przeciwciał. Czystość

uzyskanego standardu została potwierdzona metodą elektroforezy żelowej w warunkach denaturujących (SDS/PAGE 15%) oraz techniką Western blot z wykorzystaniem błony z fluorku poliwinylidenu (PVDF) i monoklonalnych mysich, anty-ludzkich przeciwciał skierowanych przeciwko MT1/2 i kozich, anty-mysich biotynylowanych przeciwciał. Granica wykrywalności testu wynosi 140 pg/100 μ l.

Opracowaną metodą oznaczono stężenie MT1/2 we krwi pacjentów z przewlekłym (PZT), przewlekle nawracającym (PNZT) i ostrym stanem zapalnym trzustki (OZT). Oceniano także aktywność Cu/Zn SOD we krwi oraz ekspresję MT1/2 i Cu/Zn SOD immunohistochemiczną metodą w skrawkach tkanek trzustki.

Wzrost stężenia MT1/2 we krwi stwierdzono we wszystkich grupach pacjentów ze stanami zapalnymi trzustki w porównaniu do osób zdrowych. Najwyższe stężenie MT1/2 wykazano we krwi pacjentów z OZT, następnie z PNZT. Z kolei najwyższą aktywność Cu/Zn SOD zaobserwowano we krwi pacjentów z PNZT, następnie z PZT. W ostrym stanie zapalnym istotną rolę jako antyoksydant pełni MT1/2, natomiast w przewlekłym i przewlekle nawracającym stanie zapalnym trzustki kluczową funkcję pełni Cu/Zn SOD. Wzajemne uzupełnianie się tych antyoksydantów potwierdziły również wyniki ekspresji MT1/2 i Cu/Zn SOD w skrawkach tkanek trzustki. Na podstawie otrzymanych wyników wskazano istotny i zamienny udział tych antyoksydantów w zależności od rodzaju zapalenia trzustki, zatem oznaczanie stężenia MT1/2 i aktywności Cu/Zn SOD może być przydatne w różnicowaniu stanów zapalnych trzustki.

Powyższe wyniki badań naukowych zostały opublikowane jako dwie prace doświadczalne, zamieszczone na łamach *Acta Biochimica Polonica* oraz *Pancreas* [II.A.1 i II.A.2; załącznik nr 3].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF=3,967; MNiSW =42.**

❖ ***wpływ narażenia zawodowego na metale ciężkie i palenia papierosów na aktywność N-acetylo- β -D-glukozaminidazy w moczu oraz wpływ narażenia zawodowego na status antyoksydacyjny we krwi hutników***

Nerka jest narządem krytycznym w przypadku długotrwałego zawodowego lub środowiskowego narażenia na metale ciężkie i dym tytoniowy. W diagnostyce

uszkodzenia nerek przydatne jest oznaczenie aktywności N-acetylo- β -D-glukozaminidazy (NAG, ang. *N-acetyl- β -D-glucosaminidase*) w moczu. Aktywność NAG wzrasta już we wczesnych stadiach uszkodzenia nerek, jeszcze przed pojawieniem się zaburzeń funkcji wydalniczych. Wykazano, że narażenie zawodowe w hucie miedzi jest związane z podwyższonym stężeniem As i Cd w moczu oraz Pb w pełnej krwi. Zarówno w grupie niepalących, jak i palących hutników stwierdzono podwyższoną całkowitą aktywność NAG a także jej formy NAG-B, co jednoznacznie potwierdza nefrotoksyczny wpływ ekspozycji zawodowej na metale ciężkie.

Narażenie na Pb, As i Cd indukuje wolne rodniki w organizmie człowieka i skutkuje stresem oksydacyjnym. Dlatego analizowano także wpływ ekspozycji zawodowej na stężenie MT1/2 i GSH oraz na aktywność Cu/Zn SOD we krwi hutników, jako głównych antyoksydantów biorących udział w neutralizacji wolnych rodników. Zaobserwowano statystycznie wyższe stężenie MT i GSH oraz podwyższoną aktywność Cu/Zn SOD we krwi hutników, co potwierdza, że ekspozycja zawodowa w hucie zaburza status antyoksydacyjny w organizmie.

Powyższe wyniki badań naukowych zostały opublikowane jako jedna praca doświadczalna, zamieszczone na łamach *Przeglądu Lekarskiego* oraz jako pełnotekstowy materiał konferencyjny opublikowany w *Proceedings of the 2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences* [II.B.1 i Va.1].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **MNiSW=9**.

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 na badaniach dotyczących metalotioneiny, oceniałam wpływ czynników biologicznych i środowiskowych na stężenie tego białka we krwi ludzi, jak również dokonałam oceny wpływu palenia papierosów na równowagę pro/antyoksydacyjną u pracowników huty miedzi.

Rozpoczęłam także nowy nurt badań dotyczący oceny wpływu ksenobiotyków zawartych w dymie tytoniowym na: status pro/antyoksydacyjny we krwi kobiet ciężarnych, biometrię płodu i morfometrię pępowiny oraz na wartości

wewnątrzmacicznych przepływów naczyniowych w krążeniu maczyno-łożowym, ze szczególnym uwzględnieniem cięż powikłanych wewnątrzmacicznym zaburzeniem wzrostu łożdu (IUGR, ang. *intrauterine growth restriction*). Oceniałam także wielkość zaburzeń metabolicznych i hormonalnych we krwi kobiet z zespołem policystycznych jajników (PCOS, ang. *polycystic ovary syndrome*) poprzez oznaczanie parametrów gospodarki węglowodanowej i lipidowej oraz badania hormonalne przydatne w diagnozowaniu tego schorzenia.

Publikacje powstałe w tym czasie, poza osiągnięciem wskazanym jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, to 16 prac doświadczalnych i 2 prace przeglądowe, wśród których wyodrębnić można następujące grupy tematyczne:

❖ **Ocena biochemiczna metalotioneiny oraz wpływu czynników biologicznych, środowiskowych a także procesu nowotworzenia na stężenie metalotioneiny**

Czystość oraz właściwości biochemiczne uzyskanego standardu metalotioneiny wyizolowanego z ludzkiej wątroby oceniano przy użyciu aparatu do elektroforezy kapilarnej (PA800 Plus, *Beckman Coulter*, CA, USA) wykorzystując testy:

1. do analizy białek w kapilarach wypełnionych żelem poliakrylamidowym i dodecylosiarczanem sodu,
2. do opracowania optymalnych warunków rozdzału w elektroforezie natywnej,
3. wyznaczając punkt izoelektryczny metodą izoelektrycznego ogniskowania.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano przydatność trzech różnych technik elektroforezy kapilarnej do analizy biochemicznej standardu metalotioneiny. Przeprowadzenie w kapilarach elektroforezy w warunkach denaturujących potwierdziło masę cząsteczkową MT i czystość uzyskanego preparatu. Technika analizy białek z zastosowaniem trzech buforów umożliwiła identyfikację MT w warunkach natywnych oraz dobranie optymalnych warunków identyfikacji tego białka przy użyciu elektroforezy kapilarnej. Natomiast metodą ogniskowania izoelektrycznego wyznaczono punkt izoelektryczny MT. Potwierdzono przydatność techniki elektroforezy kapilarnej umożliwiającej charakterystykę biochemiczną uzyskanego standardu MT.

Analizowano także wpływ czynników biologicznych (wiek, płeć, ciąża) i środowiskowych (palenie papierosów, przyjmowanie doustnej antykoncepcji

hormonalnej) na stężenie MT w środowisku wewnątrzkomórkowym (w lizacie erytrocytarnym) i zewnątrzkomórkowym (w osoczu) w różnych grupach badanych: niepalących i palących kobiet niestosujących doustnej antykoncepcji hormonalnej; niepalących kobiet przyjmujących doustną antykoncepcję hormonalną; ciężarnych kobiet; niepalących młodych mężczyzn oraz niepalących i palących mężczyzn w średnim wieku. Potwierdzono wpływ czynników biologicznych oraz środowiskowych na stężenie MT we krwi ludzi. Modulatorami stężenia MT we krwi były płeć (wyższe stężenie MT stwierdzono we krwi kobiet niż u mężczyzn), wiek (wzrost stężenia MT w osoczu mężczyzn w wieku 36 lat w porównaniu do mężczyzn w wieku 36 lat), ciąża (obniżone stężenie MT we krwi ciężarnych względem kobiet nie będących w ciąży), a także stosowanie doustnej antykoncepcji hormonalnej oraz narażenie na dym tytoniowy.

Podsumowano także rolę MT w procesach nowotworzenia oraz radioterapii i chemioterapii. Potwierdzono ambiwalentną rolę ekspresji MT w procesie karcynogenezy. Białko to może być uznawane za czynnik sprzyjający rozwojowi nowotworu, z drugiej jednak strony może być odpowiedzialne za wywołanie efektu supresyjnego względem guza. W zależności od rodzaju nowotworu oraz typu tkanki objętej procesem nowotworzenia zaobserwowano zależność między ekspresją MT a indukcją nowotworzenia, tempem wzrostu guza oraz opornością na zastosowaną terapię. W leczeniu cytostatykami, MT może wiązać związki cisplatyny i usuwać je poza obręb komórki, co skutkuje opornością guza na podjętą chemioterapię. Ten sam mechanizm może jednak chronić zdrowe komórki przed negatywnymi skutkami tej terapii. Również zwiększona ekspresja MT może zmniejszać efektywność radioterapii. Analiza ekspresji MT może być przydatna w podjęciu decyzji o wyborze metody terapeutycznej. Wstępne badanie ekspresji MT w komórkach guza może wskazywać na rezygnację z radioterapii jako metody pierwszego wyboru. Jednak nie można jednoznacznie stwierdzić, czy wzmożona ekspresja MT pełni wyłącznie rolę czynnika stymulującego powstanie i rozwój procesu nowotworzenia, czy też jest czynnikiem hamującym rozwój nowotworu lub jego stopniem złośliwości.

Powyższe wyniki badań naukowych stały się przedmiotem dwóch prac doświadczalnych, zamieszczonych na łamach *Journal of Separation Science* i *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* oraz jednej pracy przeglądowej

opublikowanej w Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej [II.A.3; II.A.9; III.A.1; załącznik nr 3].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF: 5,973, MNiSW = 67.**

❖ **Ocena wpływu ekspozycji na ksenobiotyki zawarte w dymie tytoniowym na zdrowie matki i płodu**

Palenie papierosów należy do najszerzej rozpowszechnionych nałogów na świecie. Szacuje się, że pali około 20-30% kobiet, a blisko połowa z nich kontynuuje palenie podczas ciąży. Powszechny problem stanowi także bierne narażenie na dym tytoniowy w gospodarstwie domowym i miejscu pracy. Ekspozycja na dym tytoniowy wywiera nie tylko szkodliwy efekt na zdrowie ciężarnej, ale także na komórki płciowe, organogenezę, rozwój płodu, przebieg ciąży i stan pourodzeniowy dziecka. Jedną z najbardziej znanych konsekwencji narażenia na dym tytoniowy w ciąży jest niska masa urodzeniowa płodów i IUGR.

Ekspozycja na dym tytoniowy indukuje powstawanie wolnych rodników powodując zaburzenia w równowadze pro/antyoksydacyjnej we krwi, zarówno matki, jak i płodu. W pierwszej pracy wykazano, że ekspozycja na składniki dymu tytoniowego ciężarnych, których ciążę były powikłane IUGR skutkowało podwyższonym stężeniem kotyniny oraz Cd i Pb a obniżonym stężeniem Zn we krwi matki i dziecka. Stwierdzono podwyższone stężenie markerów stresu oksydacyjnego: malonyldialdehydu i 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny oraz zaburzenie stężenia i aktywności markerów antyoksydacyjnych. Stężenie MT, zarówno we krwi ciężarnych, jak i we krwi pępowinowej palących ciężarnych z IUGR, osiągało najwyższe wartości a pozytywna korelacja między stężeniem kotyniny i MT potwierdza indukujący wpływ ksenobiotyków zawartych w dymie tytoniowym na status tego antyoksydanta. Odwrotnie kształtowało się stężenie glutationu, którego najniższe stężenie stwierdzono w grupie palących kobiet z IUGR. Zaobserwowano także zaburzenia w aktywności Cu/Zn SOD, peroksydazy glutationu, reduktazy glutationu i S-transferazy glutationu we krwi palących kobiet, których ciążę były powikłane IUGR. Zmiany w stężeniach parametrów stresu oksydacyjnego oraz nieenzymatycznych i enzymatycznych antyoksydantów jednoznacznie wskazują, że ekspozycja na dym tytoniowy oraz IUGR zaburzą równowagę pro/antyoksydacyjną w ciąży.

Oceniano także wpływ palenia papierosów na biometrię płodu oraz parametry morfologiczne pępowiny. Palenie papierosów podczas ciąży powikłanej IUGR było związane ze zwiększonym obszarem galarety Whartona w sznurze pępowinowym, co wpływało na obniżoną średnicę naczyń krwionośnych w pępowinie w porównaniu do ciężarnych nie narażonych na dym tytoniowy, których ciąży nie były powikłane IUGR. Zaobserwowano także krótszy odcinek bezskrętny pępowiny w obu grupach ciąży powikłanych IUGR, co może bezpośrednio wpływać na przepływy maczyno-płodowe i ostatecznie biometrię płodu. Największe zaburzenia stwierdzono w średnich wartościach obwodu główki i brzuszka oraz długości kości udowej u płodów palących ciężarnych z IUGR. Dodatkowo wzrost stężenia markerów ekspozycji na dym tytoniowy (stężenie kotyniny i Cd) negatywnie korelował z percentylem masy ciała noworodków w dniu porodu.

Kolejny etap dotyczył oceny wpływu palenia papierosów na wartości wewnątrzmacicznych przepływów naczyniowych w tętnicy środkowej mózgu, tętnicy pępowinowej oraz przewodzie żylnym płodu w ciążach powikłanych IUGR. Wykazano, że długotrwałe narażenie na dym tytoniowy pogarsza przepływy w pępowinie, mózgu oraz przewodzie żylnym, a istotne statystycznie korelacje między markerami narażenia na dym tytoniowy a zmierzonymi wartościami przepływów potwierdzają negatywny wpływ ekspozycji na dym tytoniowy na oceniane przepływy.

Analizowano także wpływ palenia papierosów w I trymestrze ciąży na pojemność jaja płodowego, trofoblastu i pęcherzyka ciążowego. Podwyższone stężenie markerów ekspozycji na dym tytoniowy ujemnie korelowało z pojemnością trofoblastu oraz było związane ze zwiększoną dysproporcją między trofoblastem a zarodkiem, co może wpływać na upośledzoną funkcję łożyska w II i III trymestrze ciąży.

W ostatnim etapie tego cyklu badań analizowano wpływ ekspozycji na dym tytoniowy w ciążach powikłanych IUGR na gospodarkę żelaza i sialację transferyny, białka regulującego homeostazę żelaza oraz uczestniczącego w transporcie tego pierwiastka do łożyska. W wyniku przeprowadzonych badań nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu żelaza, całkowitej zdolności żelaza oraz w utajonej zdolności wiązania żelaza między palącymi i niepalącymi ciężarnymi z IUGR a niepalącymi ciężarnymi, których ciąża przebiegała bez powikłań. Także stężenie transferyny w surowicy we wszystkich badanych grupach było na podobnym poziomie.

Stwierdzono jedynie zmiany w sialacji transferyny we krwi palących ciężarnych z IUGR w porównaniu do grupy kontrolnej.

Powyższe wyniki badań naukowych stały się przedmiotem pięciu prac doświadczalnych opublikowanych po uzyskaniu tytułu doktora zamieszczonych na łamach *Reproductive Toxicology*, *Reproductive Science* oraz *Fetal and Pediatric Pathology* [II.A.4; II.A.7; II.A.8; II.A.10; II.A.12; załącznik nr 3].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF=12,260; MNiSW=132.**

❖ **Ocena wpływu ekspozycji zawodowej na metale ciężkie na równowagę pro/antyoksydacyjną we krwi niepalących i palących hutników**

Metale ciężkie obecne w środowisku i miejscu pracy mogą oddziaływać synergistycznie na organizm człowieka i powodować wzrost stężenia wolnych rodników w organizmie, co skutkuje zaburzeniem równowagi pro/antyoksydacyjnej. Dodatkowym czynnikiem potęgującym stres oksydacyjny jest palenie papierosów. Celem pracy kolejnego nurtu badań było określenie udziału MT oraz innych nieenzymatycznych oraz enzymatycznych antyoksydantów (GSH, Cu/Zn SOD, GPx, GST) w utrzymaniu równowagi pro/antyoksydacyjnej we krwi hutników narażonych na metale ciężkie i palących papierosy.

Zarówno narażenie na metale ciężkie, jak i palenie papierosów są uznanymi induktorami wolnych rodników, co znalazło odzwierciedlenie w podwyższonym stężeniu malonylodialdehydu w osoczu hutników. Stwierdzono istotny wzrost stężenia zarówno MT jak i GSH we krwi hutników w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. Ekspozycja zawodowa w hucie wpływała także na zmiany aktywności Cu/Zn SOD, GPx, GST. Lata pracy w hucie oraz intensywność palenia papierosów potęgowały dalsze zaburzenia równowagi pro/antyoksydacyjnej u hutników. Także ekspozycja zdrowych osób na dym tytoniowy skutkowałą zaburzoną stężeniem GSH oraz aktywnościami Cu/Zn SOD we krwi palących osób.

Jak już wcześniej wspomniano, narażenie na metale ciężkie działa nie tylko nefrotoksycznie, ale także hepatotoksycznie, dlatego w grupie hutników oceniano wpływ ekspozycji zawodowej oraz palenia papierosów na funkcje wątroby i nerek poprzez oznaczanie aktywności alanyloaminopeptydazy (AAP, ang. *alanine*

aminopeptidase) i GGT we krwi jako przydatnych markerów funkcji wątroby oraz aktywność β -glukuronidazy, AAP i stężenie mikroalbumin w moczu.

Uzyskane wyniki zaburzeń aktywności enzymów przydatnych w oznaczaniu funkcji nerek i wątroby oraz podwyższone stężenie mikroalbumin w moczu jednoznacznie potwierdziły, że narażenie zawodowe na ołów, kadm i arsen działa nefrotoksycznie i hepatotoksycznie, a palenie papierosów potęguje ten stan.

Powyższe wyniki badań naukowych stały się przedmiotem siedmiu prac doświadczalnych zamieszczonych na łamach *Toxicology and Industrial Health*, *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, *Przeglądu Lekarskiego* oraz jednej pracy przeglądowej opublikowanej na łamach *Medycyny Środowiskowej* [II.A.5; II.A.6; II.B.2; II.B.3; II.B.4; II.B.5; II.B.6; III.B.2; załącznik nr 3].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF=2,405; MNiSW=74.**

❖ **Ocena zaburzeń metabolicznych występujących u kobiet z zespołem policystycznych jajników**

W zespole policystycznych jajników obserwuje się wiele zaburzeń metabolicznych, które mogą być potęgowane przez nadwagę i otyłość, dlatego oceniano wpływ otyłości brzusznej (wyrażonej wartością WHR, ang. *waist-hip ratio*) na wybrane parametry metaboliczne w tym zespole chorobowym. Podwyższona wartość WHR ($\text{WHR} \geq 0,8$) korelowała z wyższym stężeniem glukozy i insuliny (zarówno na czczo, jak i po przeprowadzeniu doustnego testu obciążenia glukozą) względem pacjentek z prawidłową wartością $\text{WHR} < 0,8$. Otyłość brzuszna wpływała również na wyższą wartość wskaźnika wolnych androgenów (FAI, ang. *free androgen index*) oraz obniżone stężenie globuliny wiążącej hormony płciowe (SHBG) i siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEA-S) w porównaniu do pacjentek z wartością $\text{WHR} < 0,8$. Stężenia folikulotropiny, lutropiny, androstenodionu i 17- β -estradiolu nie różniły się statystycznie w obu badanych grupach. Natomiast wykazano istotne statystycznie różnice w parametrach profilu lipidowego: podwyższone stężenie triglicerydów, cholesterolu całkowitego i LDL a obniżone stężenie HDL między pacjentkami

z wartością WHR>0,8 oraz <0,8. Uzyskane wyniki wskazują, że występowanie otyłości brzusznej u pacjentek z PCOS powoduje dalsze zaburzenia zarówno metaboliczne, jak i hormonalne.

Oceniano także wpływ zaburzeń hormonalnych i metabolicznych na występowanie trądziku pospolitego oraz jego intensywność zgodnie z 5-stopniową globalną skalą nasilenia trądziku u pacjentek z PCOS. Pacjentki z PCOS podzielono na podstawie stężenia androstendionu. Do pierwszej grupy zakwalifikowano kobiety ze stężeniem hormonu w zakresie referencyjnym (0,5-3,3 ng/ml), do drugiej grupy ze stężeniem powyżej zakresu referencyjnego.

Większy odsetek pacjentek z ciężkim przebiegiem trądziku obserwowano w grupie pacjentek, u których średnie stężenie androstendionu było w zakresie referencyjnym względem pacjentek z wyższym stężeniem tego hormonu. Natomiast w grupie pacjentek z podwyższonym stężeniem androstendionu nasilenie trądziku korelowało z podwyższonym stężeniem testosteronu, siarczanu dehydroepiandrosteronu i kortyzolu. Podwyższone stężenie glukozy było również proporcjonalne do skali nasilenia trądziku. Nasilenie trądziku w obu grupach pacjentek z PCOS korelowało z podwyższonym stężeniem siarczanu dehydroepiandrosteronu; inne androgeny nie miały wpływu na jego nasilenie. Podsumowując, podwyższone stężenia androstendionu nie wpływały na nasilenie trądziku. Natomiast podwyższone stężenie całkowitego i wolnego testosteronu i siarczanu dehydroepiandrosteronu oraz podwyższony współczynnik wolnych androgenów korelowały z nasileniem trądziku u pacjentek z PCOS.

Powyższe wyniki badań naukowych stały się przedmiotem dwóch prac doświadczalnych zamieszczonych na łamach *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* [II.A.11; II.A.13; załącznik nr 3].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: **IF=4,774; Pkt. MNiSW=40.**

5.4. Udział w projektach badawczych

Badania realizowane w zakresie mojej pracy doktorskiej były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu promotorskiego zatytułowanego:

- ❖ „Udział metalotioneiny w równowadze pro/antyoksydacyjnej osób narażonych na ksenobiotyki środowiskowe”. Decyzja nr 0552/B/P01/2009/36. Numer ewidencji wewnętrznej Uczelni GR-718/2009. Wykonawca grantu promotorskiego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach: 2009-2010, **wykonawca grantu**.

Badania naukowe realizowałam również w ramach 6 projektów finansowanych ze środków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, w tym jako kierownik 2 projekty zatytułowane:

- ❖ „Zaburzenie równowagi pro/antyoksydacyjnej u osób narażonych na ksenobiotyki środowiskowe” (w latach: 2009-2010). Charakter udziału w projekcie: **kierownik** projektu badawczego dla młodych naukowców, numer: GU -1834.
- ❖ „Badanie wpływu czynników środowiskowych na ekspresję izoform metalotioneiny we krwi” (w latach: 2013-2015). Charakter udziału w projekcie: **kierownik** projektu badawczego dla młodych naukowców, numer: Pbm 129.

oraz jako współwykonawca 4 projekty zatytułowane:

- ❖ „Udział metalotioneiny i Zn/Cu dysmutazy ponadtlenkowej w utrzymaniu równowagi pro/antyoksydacyjnej trzustki u pacjentów ze schorzeniami tego narządu” (w latach: 2005-2007).
Projekt w ramach działalności statutowej. Charakter udziału w projekcie: **współwykonawca** projektu.
- ❖ „Rozdział izoform metalotioneiny w materiale biologicznym” (w latach: 2009-2012).
Projekt w ramach działalności statutowej numer ST-424. Charakter udziału w projekcie: **współwykonawca** projektu.
- ❖ „Wpływ ksenobiotyków środowiskowych na aktywność paraoksonazy i innych antyoksydantów” (w latach: 2014-2016).
Projekt w ramach działalności statutowej numer ST-852. Charakter udziału w projekcie: **współwykonawca** projektu.

- ❖ „Markery zaburzeń metabolicznych i stresu oksydacyjnego wynikających z narażenia środowiskowego” (w latach: 2018-2020).

Projekt w ramach działalności statutowej numer ST.D170.18.002. Charakter udziału w projekcie: **współwykonawca** projektu.

W ramach współpracy międzynarodowej brałam udział w 6-miesięcznym międzynarodowym grantie wyszehradzkim *Visegrad Fund* w zakresie współpracy między Polską, Czechami, Węgrami i Słowacją dotyczącą utworzenia „Sieci Naukowej w Metalomice” (*„Metallomic Scientific Network”*), No: 11440027, (02.2015-07.2015). Charakter udziału w projekcie: **współwykonawca** projektu.

5.5. Międzynarodowe i krajowe wyróżnienia i nagrody za działalność naukową

Razem z Pracownikami naukowo-dydaktycznymi Katedry i Zakładu Biomedycznych Analiz Środowiskowych zostałam wyróżniona **zespołową Nagrodą Ministra Zdrowia** za cykl 7 publikacji dotyczących stresu oksydacyjnego, antyoksydantów i zaburzeń funkcji trzustki w **2010 r.**

Ponadto otrzymałam następujące nagrody **JM Rektora Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich** we Wrocławiu za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowo-badawczej:

- ❖ **zespołowa nagroda** za cykl prac dotyczących interakcji ksenobiotyków: metali ciężkich i leków zawierających grupy tiolowe oraz udziału metalotioneiny w stresie oksydacyjnym, **2012 r.**
- ❖ **zespołowa nagroda** za cykl prac dotyczących zaburzeń metabolizmu wywołanych narażeniem ludzi na ksenobiotyki środowiskowe, **2014 r.**
- ❖ **zespołowa nagroda** za cykl prac dotyczących zaburzeń molekularnych spowodowanych narażeniem na dym tytoniowy, **2015 r.**
- ❖ **zespołowa nagroda** za cykl publikacji nt. wybranych parametrów równowagi pro/antyoksydacyjnej u osób narażonych na ksenobiotyki środowiskowe, **2017 r.**
- ❖ **indywidualna nagroda I stopnia** za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej, **2018 r.**

Inne nagrody i wyróżnienia w pracy naukowo-badawczej:

- ❖ **Nagroda naukowa w kategorii BEST ABSTRACT** na 14th *United European Gastroenterology Week* w Berlinie jako współautor komunikatu pt. „*Expression of metallothionein and p53 in pancreatic tumours in relation to prognosis*” w **2006** r.
- ❖ **Nagroda naukowa I°** za pracę pt. „Aktywność alanyloaminopeptydazy we krwi i moczu palących hutników” podczas XI Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej: „Tytoń a zdrowie – tytoń – skutki zdrowotne i społeczne” w **2010** r.
- ❖ **Indywidualne podziękowanie** od Prorektora ds. Studiów i Studentów prof. dr hab. n. med. Joanny Lewin-Kowalik za owocną współpracę z Pracownikami Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach za współautorstwo w cyklu prac dotyczących badań nad patogenezą zespołu policystycznych jajników.

5.6. Staże naukowe

- ❖ Dwa dwumiesięczne staże w laboratorium biotechnologicznym w firmie Sigma-ARK, które umożliwiły mi rozszerzenie umiejętności praktycznych związanych z syntezą określonych fragmentów nukleotydów, ich modyfikacji, oczyszczania produktu (na NAP kolumnach oraz na wysokosprawnej chromatografii cieczowej) oraz ich elektroforetycznej kontroli jakości w żelu agarozowym z wykorzystaniem Nimbus 4-Probe, Hamilton, (1.07-31.08.2001 r. oraz 01.07-31.08.2002 r. Darmstadt, Niemcy).
- ❖ Tygodniowy staż w ramach programu Erasmusa rozwijający umiejętności w zakresie hodowli komórkowej keratynocytów i fibroblastów w Katedrze Dermatologii i Wenerologii, Uniwersytetu w Debrecenie, pod kierunkiem *dr Gabrielli Emri*, Węgry, 2017 r.

5.7. Recenzje do czasopism zagranicznych

Pełnię funkcję recenzenta w następujących czasopismach:

- ❖ *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (IF=1,372), jeden manuskrypt w 2013 r.
- ❖ *International Journal of Biology and Biological Sciences*, jeden manuskrypt w 2014 r.

- ❖ *Reproductive Toxicology* (IF=2,580), jeden manuskrypt w 2014 r.
- ❖ *Biological Trace Element Research* (IF=2,361), jeden manuskrypt w 2015 r.
- ❖ *International Journal of Environmental Health Research* (IF=1,433), jeden manuskrypt w 2015 r.
- ❖ *Biomarkers* (IF=1,976), jeden manuskrypt w 2015 r.
- ❖ *Current Biotechnology*, jeden manuskrypt w 2016 r.
- ❖ *The Open Ophthalmology Journal*, jeden manuskrypt w 2016 r.
- ❖ *Journal of Education in Perioperative Medicine*, jeden manuskrypt w 2016 r.
- ❖ *Folia Biologica* (IF=0,581), jeden manuskrypt w 2016 r.
- ❖ *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (IF=1,262), jeden manuskrypt w 2019 r.

5.8. Wygłoszone referaty i wykłady na naukowych konferencjach i szkoleniach

- ❖ Referat pt.: „Wpływ palenia papierosów na stężenie albumin i aktywność β -glukuronidazy w moczu hutników” wygłoszony podczas XV Ogólnopolskiej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej "Tytoń a zdrowie - 15 lat doświadczeń w badaniach nad uzależnieniami od tytoniu, alkoholu, narkotyków i leków". Poznań, Polska, 2014 r.
- ❖ Referat pt. „*Capillary electrophoresis of metallothionein*” wygłoszony podczas konferencji *Metallomics Technology Conference 2015: Recent Advanced and Strategies*, Brno, Czechy, 2015 r.
- ❖ Referat pt.: „Parakosonaza markerem zmian wywołanych narażeniem na dym tytoniowy” wygłoszony podczas Konferencji Szkoleniowo-Naukowej Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego "Różne oblicza toksykologii". Puławy, Polska, 2017 r.

5.9. Kursy, szkolenia i seminaria doszkalające

- ❖ Kurs kwalifikacji pedagogicznych w ramach studiów trzeciego stopnia (535 godzin) na Wydziale Lekarskim Kształcenia Podyplomowego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (01.10.2005-30.06.2008 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 (09.2009 r.).
- ❖ Tygodniowe szkolenie w zakresie elektroforezy kapilarnej, „*Hands-on small molecules*” oraz „*P/ACE MDQ/32 Karat Software*” w firmie *Analisis*, Namur, Belgia (7.12-11.12.2009 r.).
- ❖ Trzymiesięczny kurs języka angielskiego w medycynie (*Online English for Medical Purposes*) (01.07-01.10.2009 r.).
- ❖ Szkolenie i uzyskanie tytułu: „Auditor wewnętrzny Systemu Zarządzania Jakością zgodnego z wymaganiami ISO 9001:2008” (2014 r.).
- ❖ Kurs doskonalący kompetencje dydaktyczne pracowników Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu prowadzony przez Katedrę Pedagogiki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (23.06.2014-03.07.2014 r.).
- ❖ Szkolenie „*Summer school on metallothionein*” w Zakładzie Chemii i Biochemii na Wydziale Rolniczym Uniwersytetu Mendla; Brno, Czechy, 15-17.06.2015.
- ❖ 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.).
- ❖ Szkolenie z zakresu „Wdrożenia ogólnego rozporządzenia o ochronie danych osobowych (RODO) w Uczelni”, prowadzone przez Zespół ds. Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Agencji Szkolenia i Promocji Kadr, Wrocław (2018 r.).

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. *Przynależność do towarzystw naukowych i organizacji*

Jestem członkiem towarzystw naukowych:

- ❖ Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego oraz od 2017 roku członkiem zarządu Oddziału Wrocławskiego Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego;
- ❖ Polskiego Towarzystwa Biochemicznego od 2010 r.

11.01.2019

Anne Bizon