

Załącznik 2

AUTOFEFERAT

Opis dorobku i osiągnięć naukowych

Dr Sylwia Terpiłowska

Pracownia Biologii Środowiska

Instytut Inżynierii Środowiska

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

Lublin 2019

1. Imię i nazwisko

Sylwia Terpiłowska

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

- 2000 dyplom ukończenia studiów wyższych, kierunku biologia, specjalność mikrobiologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, tytuł pracy magisterskiej: „*Spontaniczne i indukowane in vitro wytwarzanie cytokin w komórkach podścieliska szpiku kostnego osób chorych na ostrą białaczkę szpikową i szpiczaka mnogiego*”. Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Martynty Kandefer-Szerszeń
- 2007 dyplom ukończenia studiów podyplomowych „*Zarządzanie projektami społecznymi*” (finansowanymi z EFS) na Wydziale Nauk Społecznych Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II
- 2008 stopień naukowy doktora nauk weterynaryjnych z zakresu immunologii uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „*Wpływ chromu i żelaza na metabolizm fibroblastów i komórkowe mechanizmy obronne u myszy*” pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja K. Siwickiego na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Na wniosek recenzentów wyróżniona przez Radę Wydziału
- 2010 dyplom ukończenia studiów podyplomowych „*Podyplomowe Studia w Zakresie Audytu Wewnętrznego w Sektorze Finansów Publicznych*” na Wydziale Prawa, Prawa Kanonicznego i Administracji Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II
- 2011 dyplom ukończenia studiów podyplomowych „*Kształcenie kary akademickiej do roli wykładowców przedmiotu Ochrona własności intelektualnej*”, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej

2012 dyplom ukończenia studiów podyplomowych „*Diagnostyka molekularna*” na Wydziale Agrobioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Od 2000 roku do dziś na Katolickim Uniwersytecie Lubelskim Jana Pawła II na następujących stanowiskach:

2000 – 2005 asystent naukowo-dydaktyczny w Katedrze Biologii Komórki, Instytutu Ochrony Środowiska, Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego, Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II

2005 – 2010 samodzielny referent w Biurze Współpracy z Zagranicą KUL

2010–obecnie adiunkt w Pracowni Biologii Środowiska, Kierownik Pracowni Biologii Środowiska Instytutu Inżynierii Środowiska, Wydziału Zamiejscowego KUL w Stalowej Woli

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych 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.):

Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Badania *in vitro* nad efektami działania i interakcjami chromu(III), żelaza(III), molibdenu(III) oraz niklu(II).

Prace wchodzące w skład jednotematycznego cyklu publikacji

	Publikacja	IF	pkt. MNiSW
4.1	Terpilowska S.,* Siwicki A.K. (2018) Interactions between chromium(III) and iron(III), molybdenum(III) or nickel(II): cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity studies. <i>Chemosphere</i> , 201, 780-789.	4,427	35
4.2	Terpilowska S.,* Siwicki A.K. (2018) Cell cycle and transmembrane mitochondrial potential analysis after chromium(III), iron(III), molybdenum(III) or nickel(II) and their mixture treatment. <i>Toxicology Research</i> , DOI: 10.1039/c8tx00233a	1,890	35
4.3	Terpilowska S.,* Siwicki A.K. (2019) Pro- and antioxidant activity of chromium(III), iron(III), molybdenum(III) or nickel(II) and their mixtures, <i>Chemico-Biological Interactions</i> , 298, 43-51.	3,296	25
Razem		9,613	95

* - autor korespondencyjny

Wartości punktowe MNiSW (wg wykazu czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego) oraz wartości wskaźników IF (Impact Factor wg listy Journal Citation Reports - JCR) poszczególnych prac podano zgodnie z rokiem wydania publikacji. Wkład Wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w załączniku nr 4, natomiast oświadczenia współautora w załączniku nr 6.

Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Mikroelementy to pierwiastki, które w organizmach ludzi i zwierząt występują w stężeniu poniżej 1 $\mu\text{g/g}$ mokrej tkanki. Należą do nich m.in. żelazo, chrom, nikiel oraz molibden. Pomimo niskiego ich stężenia w płynach ustrojowych czy tkankach, są one niezbędne do regulacji wielu szlaków metabolicznych na poziomie komórkowym. Do organizmów zwierząt i ludzi dostają się drogą oddechową, poprzez skórę oraz w największym stopniu poprzez przewód pokarmowy. Przyjmowane są wraz z dietą, ale też w formie preparatów witaminowo-mineralnych, suplementów diety czy napoi energetycznych, których spożycie ostatnio znacznie wzrosło. W ostatnich latach coraz więcej pierwiastków przedostaje się do organizmów ludzi i zwierząt wraz ze stosowanymi na szeroką skalę biomateriałami. Są to materiały używane do konstruowania sztucznych organów, przyrządów rehabilitacyjnych lub implantów zastępujących całe organy lub ich części. Oficjalna ich definicja brzmi: jest to substancja inna niż lek, albo kombinacja substancji syntetycznych, lub naturalnych mająca na celu uzupełnienie lub zastąpienie narządu lub jego części w celu pełnienia funkcji fizjologicznych przez określony czas (Bauer i wsp., 2013; Patel i wsp., 2012). Biopierwiastki wchodzące w skład biomateriałów w środowisku płynów tkankowych mogą uwalniać się do organizmu wywołując efekty toksyczne. Należy zaznaczyć, że pomimo użycia ich w wielu gałęziach medycyny ich metabolizm nie został w pełni poznany.

Chrom jest pierwiastkiem powszechnie występującym w przyrodzie. Występuje na wielu stopniach utlenienia, tj. -2, 0, +2, +3, +4, +5 oraz +6. Najbardziej rozpowszechnione są związki chromu III oraz VI. Wykazano, że związki chromu VI są toksyczne, natomiast uważa się, że związki chromu III są nietoksyczne (Rudolf i Červinka, 2003). Związki chromu VI są 1000 razy bardziej toksyczne niż związki chromu(III) (Hininger i wsp., 2007). Związki chromu(VI) do komórek dostają się wykorzystując kanały błonowe dla jonów

siarczanowych (Figgitt i wsp., 2010). Wewnątrz komórki jony Cr^{6+} zredukowane są poprzez formy przejściowe: Cr^{5+} , Cr^{4+} do jonów Cr^{3+} (Valko i wsp., 2006). Te formy przejściowe i produkty pośrednie reakcji redukcji, tj. wolne rodniki tlenowe mogą oddziaływać na organella komórkowe. Natomiast jony Cr^{3+} dostają do komórki na drodze transportu biernego lub endocytozy (Eastmond i wsp., 2008). Związki chromu(III) negatywnie oddziałują na mitochondria, jądro komórkowe, mikrofilamenty oraz lizosomy. Wykazano, że jony Cr^{3+} mogą wiązać się bezpośrednio z DNA tworząc addukty Cr-DNA i połączenia krzyżowe pomiędzy niciami DNA (O'Brien i wsp., 2003). Ponadto wykazano, że Cr(III) może obniżać wierność polimerazy DNA (Galaris i Evangelou, 2002). Wiele badań wskazuje na udział chromu(III) w regulacji aktywności receptora insulinowego, w prawidłowym metabolizmie białek, tłuszczów oraz węglowodanów (Baghi i wsp., 2002).

Żelazo, to mikroelement niezbędny do prawidłowego przebiegu wielu procesów komórkowych (Srai i wsp., 2002). Jest on obecny w centrach aktywnych enzymów należących do grupy oksydaz, katalaz, peroksydaz, cytochromów, akonitazy, reduktazy rybonukleotydowej oraz syntetazy tlenu azotu. Są to enzymy zaangażowane w kluczowe szlaki metaboliczne, tj. syntezę DNA i RNA, transport elektronów podczas oddychania wewnątrzkomórkowego i proliferację komórek (Lieu i wsp., 2001). Jednak jak wykazano, żelazo może też być toksyczne. Głównie dlatego, iż jest zaangażowane w powstawanie wolnych rodników tlenowych (Hirsh i wsp., 2002a; Hirsh i wsp., 2002b). Mogą one powodować utlenianie zasad DNA, powstawanie wiązań krzyżowych w DNA lub pomiędzy DNA a białkami (Valko i wsp., 2006). Ponadto obserwowano obniżanie zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach, hamowanie aktywności enzymów komórkowych, obniżanie stężenia ATP, hamowanie aktywności kompleksów I-III łańcucha oddechowego oraz dehydrogenazy bursztynianowej (Hirsh i wsp., 2002a; Hirsh i wsp., 2002b)

Nikiel występuje na wielu stopniach utlenienia, tj. -1, +1, +2, +4 oraz +4. Jednak najczęściej spotykany jest na +2 stopniu utlenienia. Nikiel po przedostaniu się do komórki może wywoływać efekty toksyczne, prowadząc do apoptozy. Wywoływać też może aberracje chromosomowe, uszkodzenia

chromosomów i transformacje morfologiczne komórek. Opisany dotychczas mechanizm mutagennego działania niklu opiera się na modyfikacjach histonów. Obserwowano wzrost ilości histonu H3K4me3, a spadek H3K9me3 (Klein i M. Costa, 2015; Arita i wsp., 2012).

Molibden jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego metabolizmu komórek. Najczęściej występuje na następujących stopniach utlenienia: +2, +3, +4 and +6 (Tallkvist i Oskarsson, 2015). Występuje w centrach aktywnych wielu enzymów: oksydoreduktazy ksantynowej, oksydazy aldehydowej, mitochondrialnej reduktazy amidoksymowej, reduktazy azotynowej, oksydazy ksantynowej, dehydrogenazy ksantynowej, oksydazy siarczynowej (Mendel, 2013)

Cel

Celem badań było określenie wpływu chromu(III), żelaza(III), niklu(II) oraz molibdenu(III) na metabolizm komórek prawidłowych i nowotworowych oraz określenie rodzaju interakcji pomiędzy chromem(III) a żelazem(III), chromem(III) a niklem(II) oraz chromem(III) a molibdenem(III).

Materialy i metody

Badania prowadzono na dwóch linach komórkowych: mysich fibroblastach embrionalnych BALB/3T3 clone A31 cells (American Type Culture Collection CCL-163) oraz komórkach nowotworu wątroby HepG2 cells (American Type Culture Collection HB-8065). Komórki inkubowano z chlorkiem chromu, chlorkiem żelaza, chlorkiem niklu oraz trójtlenkiem molibdenu w zakresie stężeń 100-1400 μM . W celu określenia typu interakcji komórki inkubowano z mieszaninami pierwiastków: chlorek chromu w stężeniu 200 μM z chlorkiem żelaza, chlorkiem niklu lub trójtlenkiem molibdenu o stężeniu 1000 μM . W drugim przypadku stosowano mieszaninę chlorek chromu w stężeniu 1000 μM z chlorkiem żelaza, chlorkiem niklu lub trójtlenkiem molibdenu o stężeniu 200 μM . Po 24 godzinach inkubacji wykonywano następujące testy:

1. Cytotoksyczność- test redukcji MTT, test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej, test pochłaniania czerwieni obojętnej (NRU),

2. Genotoksyczność: test kometowy, test mikrojądrowy,
3. Analiza faz cyklu komórkowego,
4. Analiza błonowego potencjału mitochondrialnego,
5. Stężenie rodników tlenowych, stężenie dialdehydu malonowego (MDA)
6. Pomiar aktywności enzymów układu antyoksydacyjnego: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx).

Wykonywano również dla podanych stężeń pojedynczych pierwiastków i ich mieszanin test AMES'a, przy użyciu szczepów *Salmonella* Typhimurium TA98 oraz TA100.

Omówienie wyników i dyskusja

Wykorzystanie szerokiego wachlarza testów do badania metabolizmu komórek miało na celu określenie wpływu poszczególnych mikroelementów, jak i ich mieszanin na funkcje komórek prawidłowych i nowotworowych.

Linie komórkowe stanowią doskonałe narzędzie do badań skriningowych toksyczności różnych substancji aktywnych biologicznie. Są wykorzystywane w pierwszym etapie oceny aktywności biologicznej różnych związków oraz określenia ich potencjalnej toksyczności. Pozwalają na ograniczenie użycia do badań zwierząt laboratoryjnych w pierwszych etapach badań nad nowymi substancjami. Zgodnie z zasadą 3R (Reduction, Replacement, Refinement) linie komórkowe są stosowane do oceny toksyczności substancji, ale wiele z metod posiada walidację przeprowadzoną w European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animals Testing - EURL ECVAM, przez co zastępują testy na zwierzętach. Jedną z często używanych linii komórkowych jest linia mysich fibroblastów płodowych. Stosowana jest ona w zwalidowanej metodzie oznaczania ostrej toksyczności oraz fototoksyczności z użyciem czerwieni obojętnej. Ponadto linię BALB/3T3 zaproponowano jako model komórkowy do badania zmian morfologicznych i biochemicznych po zadziałaniu pierwiastków (Mazzotti i wsp., 2002). Inną linią często używaną w badaniach toksyczności jest linia HepG2. Jest to linia nowotworu wątrobo-komórkowego (Fang i Beland, 2009; Schoonen i wsp., 2005). Linia ta jest rekomendowana w protokole OECD do wykonania testu mikrojądrowego.

Wszystkie testy użyte w niniejszych badaniach wykonywane były zgodnie zaleceniami EURL ECVAM, protokołami OECD (Guideline no. 471, Guideline no. 487), czy Polskimi Normami (PN-EN ISO 10993-3:2008).

Do badań cytotoksyczności użyto następujących testów: redukcji MTT- określającego metabolizm mitochondriów, uwalniania dehydrogenazy mleczanowej- określającego integralność błony komórkowej oraz pochłaniania czerwieni obojętnej- określającej aktywność lizosomów. Użycie różnych testów pozwala określić wrażliwość organelli komórkowych na badane substancje (Chiba i wsp., 1998).

Do określenia genotoksyczności użyto testu kometowego oraz tworzenia mikrojąder. Test kometowy służy do wykrywania uszkodzeń w DNA, tj. jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć w DNA, modyfikacji chemicznych (miejsca purynowe, niestabilne addukty) i enzymatycznych (uszkodzenia oksydacyjne) (Czubaszek i wsp., 2014) Uszkodzone fragmenty DNA pod wpływem pola elektrycznego migrują i tworzą strukturę przypominającą kometę, którą obserwuje się pod mikroskopem (Pu i wsp., 2015). Test mikrojadrowy wykorzystywany jest do wykrywania pęknięć chromosomów i uszkodzeń wrzeczona kariokinetycznego. Mikrojądra tworzą się z acentrycznych chromatyd, fragmentów chromosomów lub z całych chromosomów, które w czasie anafazy nie przemieszczają się do biegunów komórki, a po zakończeniu telofazy nie są włączane do jąder potomnych (Fenech, 2008). W teście AMES'a określana jest zdolność do wywoływania mutacji powrotnej w genie odpowiedzialnym za syntezę histydy. Czynniki mutagenne wywołujące tą mutację powodują przywrócenie zdolności syntezy tego aminokwasu w szczepach *Salmonella* Typhimurium. Użycie różnych szczepów tych drobnoustrojów pozwala na określenia różnych typów mutacji. W opisywanych badaniach użyto szczepów TA98, który identyfikuje mutacje typu przesunięcie ramki odczytu, natomiast szczep TA100 mutacje typu zamiany pary zasad (Kozłowska i wsp., 2012).

Cykl komórkowy składa się z następujących faz: G0, G1, S, G2 oraz M. Przejście pomiędzy kolejnymi fazami zależy od aktywności cyklin i związanych z nimi kinaz zależnych od cyklin. Utworzenia kompleksu kinaza-cyklina zależna od kinazy i następująca reakcja fosforylacji uaktywnia

powstały kompleks. Kompleksy te są niezbędne do przechodzenia przez komórkę kolejnych punktów kontrolnych. Ochronę taką zapewniają punkty kontrolne G1 oraz G2 podczas cyklu komórkowego. Ich pokonanie przez komórkę umożliwia wejście w mitozę tylko komórek, których DNA jest wolny od mutacji lub innych uszkodzeń (Le i Richardson, 2002).

Analiza potencjału mitochondrialnego pozwala identyfikować substancje biologiczne o potencjale proapoptotycznym. Jednym z parametrów charakteryzowanych w komórkach apoptotycznych jest uwalnianie cytochromu C z mitochondrium, zaburzenie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym oraz utrata mitochondrialnego potencjału błonowego. Spowodowana jest ona działaniem wolnych rodników tlenowych.

Wiele substancji aktywnych biologicznie indukuje w komórce stres oksydacyjny, w wyniku, którego syntetyzowane są wolne rodniki tlenowe (ang. Reactive Oxygen Species, ROS). Jest to zjawisko fizjologiczne w komórce. Kiedy jednak stężenie ROS jest wysokie, a enzymy układu antyoksydacyjnego przestają sobie radzić z jego skutkami dochodzić może do uszkodzeń poszczególnych struktur komórkowych. Wolne rodniki tlenowe, to grupa zawierająca wiele różnych związków. W badaniach opisywanych poniżej zastosowano test wykrywający rodniki: hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy oraz inne rodniki występujące w komórce przy użyciu pochodnej fluoresceiny- dwuocianu 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCFDA). Drugi z użytych testów służył do wykrywania końcowego produktu procesu peroksydacji lipidów- dialdehydu malonowego. Proces ten składa się z trzech etapów: inicjacji, propagacji i terminacji. W pierwszym etapie pod wpływem ksenobiotyku lub rodników: hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$), nadtlenkowego ($\cdot\text{LOO}$), alkoksylowego ($\cdot\text{LO}$) lub alkilowego ($\cdot\text{L}$) atom wodoru zostaje oderwany od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego. W tym etapie powstaje z cząsteczki kwasu tłuszczowego rodnik alkilowy. W kolejnej fazie rodniki te reagują z tlenem tworząc wolne rodniki nadtlenkowe ($\cdot\text{LOO}$), które odrywają atomy wodoru od kolejnych cząsteczek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W wyniku tego procesu powstaje nadtlenek kwasu tłuszczowego i kolejny rodnik alkilowy. Reakcja ta powtarza się wielokrotnie,

w wyniku czego wzrasta stężenie nadtlenu kwasów tłuszczowych. Terminacja procesu peroksydacji rozpoczyna się w przypadku reakcji pomiędzy wolnymi rodnikami, która prowadzi do powstania produktu, który nie jest już wolnym rodnikiem. Produktami peroksydacji lipidów są dimery fosfolipidów, okso- i hydroksykwasów. Dalsze przemiany tych związków prowadzą do powstania m.in. dialdehydu malonowego, który jest wskaźnikiem procesu peroksydacji lipidów (Grosicka-Maciąg, 2011).

Komórki posiadają mechanizmy chroniące je przed negatywnym wpływem wolnych rodników tlenowych na struktury komórki. Należą do nich enzymy: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) oraz peroksydaza glutationowa (GPx). Dysmutaza ponadtlenkowa to enzym katalizujący reakcje rozkładu anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu. Tak powstały nadtlenek wodoru może być rozkładany przez katalazę lub peroksydazę glutationową do wody. Peroksydaza glutationowa ponadto redukuje nadtlenuki lipidów powstałe np. w procesie peroksydacji lipidów (Czajka, 2006). Tak, więc SOD, CAT oraz GPx razem stanowią barierę ochronną przed działaniem wolnych rodników tlenowych oraz produktów utleniania lipidów.

Chrom to pierwiastek rozpowszechniony w przyrodzie. Ponadto, bardzo popularne stały się suplementy diety zawierające chrom(III). Przeprowadzone badania wykazały, że chlorek chromu w stężeniach 100 i 200 μM stymulował proliferację komórek linii BALB/3T3 w teście redukcji MTT. W pozostałych dawkach (400-1400 μM) obserwowano istotny statystycznie zależny od dawki spadek żywotności komórek linii BALB/3T3 oraz HepG2 zauważalny w teście redukcji MTT, pochłaniania czerwieni obojętnej oraz uwalniania dehydrogenazy mleczanowej. W testach redukcji MTT i NRU znacznie wrażliwsza okazała się linia HepG2- spadki żywotności komórek były wyższe niż w przypadku linii BALB/3T3. Ponadto na podstawie wyznaczonych wartości IC_{50} można wywnioskować, że najbardziej wrażliwa na działanie chromu(III) jest błona komórkowa, kolejno mitochondria i lizosomy i to w obu liniach komórkowych (praca nr 4.1). Obserwacje poczynione w teście redukcji MTT potwierdziły badania przeprowadzone metodą cytometrii

przepływowej dotyczące błonowego potencjału mitochondrialnego. Inkubacja obu linii komórkowych z chlorkiem chromu w zakresie stężeń 100-1400 μM powodowała istotny statystycznie zależny od dawki spadek potencjału mitochondrialnego obserwowany w obu liniach komórkowych (praca nr 4.2). Wyniki te sugerują, iż główny mechanizm toksycznego działania chromu(III) opiera się na generacji wolnych rodników tlenowych.

Negatywny wpływ chlorku chromu obserwowano również w testach genotoksyczności i mutagenności. W teście kometowym wykazano istotny statystycznie, zależny od dawki wzrost liczby komet po inkubacji z chlorkiem chromu. Sugeruje to destrukcyjny wpływ chromu(III) na DNA. W dostępnej literaturze opisywano, iż chrom może wiązać się bezpośrednio do DNA tworząc addukty z DNA i połączenia krzyżowe pomiędzy niciami DNA (O'Brien i wsp., 2003). Główny mechanizm opiera się na reakcji jonów Cr^{3+} z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi lub bezpośrednio z guaniną (Snow i Xu, 1991). Pozytywny wynik testu kometowego prezentowany w pracy nr 4.1 świadczy też, o tym, że chlorek chromu wywołuje przerwy w dwuniciowym i jednoniciowym DNA oraz powstawanie miejsc AP-nieposiadających zasad purynowych ani pirymidynowych. Skutkuje to uszkodzeniem struktury DNA. Jeśli takie miejsca nie zostaną usunięte przez enzymy naprawcze mogą powodować mutacje. Uszkodzony DNA nie powinien być replikowany oraz wchodzić do mitozy. Ochronę taką zapewniają punkty kontrolne G1 oraz G2 podczas cyklu komórkowego. Genotoksyczne działanie chromu(III) potwierdzają analizy faz cyklu komórkowego. W pracy nr 4.2 opisano wpływ chlorku chromu na cykl komórkowy. Związek ten powodował wraz ze wzrostem stężeń spadek liczby komórek w fazie G0/G1, ale wzrost w fazie G2/M. Sugeruje to, iż chrom(III) zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G2/M w obu badanych liniach komórkowych. Oznacza to, DNA zawiera mutacje, które nie mogą być dalej powielane. Dai i wsp. (2009) wskazał, że chrom(III) może wywoływać mutacje typu substytucji, transwersji, delecji i insercji. Badania wykonane w pracy nr 4.1 wskazują, że chlorek chromu wywołuje częściej mutacje typu przesunięcia ramki odczytu, a rzadziej mutacje zamiany pary zasad. Ponadto analiza faz cyklu komórkowego pokazuje, iż po zadziałaniu chlorku chromu wzrasta procent komórek w fazie

subG1 (praca nr 4.2). Są to komórki, które wymknęły się spod mechanizmów kontrolnych komórki i replikują jądra komórkowe, bez podziału cytoplazmy. Efektem takiego procesu są obserwowane w obrazach mikroskopowych komórki wielojądrzaste lub olbrzymie. Ponadto proces ten może prowadzić do apoptozy, która również była obserwowana w preparatach mikroskopowych (praca nr 4.1). W teście mikrojądrowym określano zaburzenia procesu podziału komórki i uszkodzenia wrzeciona podziałowego. W teście tym wykazano istotny statystycznie, zależny od dawki wzrost liczby komórek zawierających jedno lub więcej mikrojąder w obu badanych liniach komórkowych (praca nr 4.1). Wyniki te potwierdzają obserwacje mikroskopowe komórek wielojądrzastych, w których dochodzi do zaburzeń funkcjonowania wrzeciona podziałowego.

Badania innych autorów sugerują, że uszkodzenia organelli komórkowych, tj. błony komórkowej, mitochondriów, lizosomów, jądra komórkowego, wrzeciona kariokinetycznego oraz zaburzenia metabolizmu komórki, tj. oddychania czy podziału wywoływane są przez wolne rodniki tlenowe powstające na skutek działania chromu(III). Dlatego w pracy nr 4.3 podjęto próbę oceny wpływu chlorku chromu na powstawanie wolnych rodników tlenowych, stężenie dialdehydu malonowego oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy oraz peroksydazy glutationowej. Po inkubacji obu linii komórkowych obserwowano zależny od dawki, powyżej stężenia 400 μM , wzrost stężenia wolnych rodników oraz dialdehydu malonowego. W przypadku dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy w stężeniach 100 oraz 200 μM ich aktywność rosła, natomiast powyżej stężenia 400 μM spadała. Natomiast aktywność peroksydazy glutationowej spadała wraz ze wzrostem stężenia chlorku chromu. Obserwacje te poczyniono dla obu linii komórkowych. Wyniki te zgodne są z obserwacjami innych autorów, którzy również w niskich stężeniach chromu(III) obserwowali wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy (Długosz i wsp., 2012; Chen i wsp., 2018). W wyższych stężeniach aktywność enzymów spadała, jak sugerują autorzy, najprawdopodobniej na skutek zniszczenia przez jony Cr(III) miejsc aktywnych enzymów (Chen i wsp., 2018). Ponadto jak wynika z badań

przedstawionych w pracy nr 4.3 spadek aktywności enzymów skorelowany jest ze wzrostem stężenia wolnych rodników tlenowych, których stężenia rośnie do stopnia, w którym enzymy antyoksydacyjne nie są w stanie ich neutralizować.

Kolejnym analizowanym pierwiastkiem było żelazo. Jest to pierwiastek pełniący ważną rolę w wielu procesach metabolicznych komórki (Srai i wsp., 2002). Bierze udział w syntezie DNA oraz RNA, proliferacji komórek oraz oddychaniu komórkowym, tj transporcie tlenu i elektronów (Lieu i wsp., 2001). Badania przeprowadzone w testach cytotoksyczności (praca nr 4.1) wykazały, że linia HepG2 jest bardziej wrażliwa na toksyczne działanie chlorku żelaza niż linia BALB/3T3. Zarówno w teście redukcji MTT, jak i NRU żelazo powodowało większe spadki żywotności komórek nowotworowych niż prawidłowych. Ponadto w obu testach spadek żywotności obserwowano dopiero od dawki 800 μM dla linii BALB/3T3, natomiast żywotność komórek linii HepG2 spadała już od dawki 100 μM . Sugeruje to, iż mitochondria komórek nowotworowych są bardziej wrażliwe na toksyczne działanie żelaza(III). Obserwacje te potwierdzają wyniki uzyskane w pracy nr 4.2, w których zaobserwowano zależny od dawki spadek mitochondrialnego potencjału błonowego po inkubacji obu linii komórkowych z chlorkiem żelaza w zakresie stężeń 400-1000 μM . Spadki wartości tego parametru były wyższe w przypadku linii HepG2. W teście uwalniania LDH, który określa wrażliwość błony komórkowej na działanie badanego związku, chlorek żelaza wykazywał podobną toksyczność w stosunku do obu linii. Nieznacznie bardziej wrażliwa była linia BALB/3T3. Wyniki otrzymane z testów cytotoksyczności i analizy mitochondrialnego potencjału błonowego oraz prace innych autorów sugerują, iż za efekt toksyczny żelaza odpowiedzialne są wytwarzane pod wpływem tego pierwiastka wolne rodniki tlenowe (Eid i wsp., 2016). Badania wykonane w pracy nr 4.3 sugerują, że chlorek żelaza w zakresie stężeń 100-1400 μM generuje nie tylko wolne rodniki tlenowe akumulowane wewnątrz komórki, ale też w porównaniu do innych badanych pierwiastków wysokie stężenie dialdehydu malonowego. Związek ten jest końcowym produktem peroksydacji lipidów błony komórkowej. Ponadto badania He i wsp. (2008) sugerują, że żelazo(III) reaguje z kwasem nitrylotrioctowym (w stosunku 1:1)

i oddziałuje negatywnie na stabilność błony komórkowej. Badania tych samych autorów wskazują, że żelazo obniża aktywność fosfatazy alkalicznej, dysmutazy ponadtlenkowej oraz peroksydazy glutationowej (He i wsp., 2008). W badaniach zawartych w pracy nr 4.3 obserwowano również spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy oraz peroksydazy glutationowej. Dwa pierwsze enzymy odpowiedzialne są za neutralizowanie anionorodnika ponadtlenkowego. Jednak stężenie rodnika jest na tyle wysokie, że uniemożliwia ten proces. Natomiast peroksydaza glutationowa odpowiedzialna jest m.in. za neutralizację nadlenków lipidów. Jednak jak zaobserwowano proces peroksydacji lipidów jest tak nasilony (wysokie stężenie MDA), że GPx nie może pełnić swojej funkcji.

Jak wykazano wolne rodniki tlenowe mają też negatywny wpływ na jądro komórkowe i procesy podziału komórki. W teście kometowym zaobserwowano wzrost liczby komet wraz ze wzrostem stężenia chlorku żelaza. Należy jednak zauważyć, że linia BALB/3T3 jest bardziej wrażliwa na genotoksyczne działanie chlorku żelaza. Oznacza to, że żelazo(III) powoduje powstawanie przerw w dwuniciowym i jednoniciowym DNA oraz miejsc AP. Ponadto zanotowano wzrost liczby mikrojąder. W teście mutagenności stwierdzono, że może wywoływać zarówno mutacje typu zamiany pary zasad, jak i przesunięcia ramki odczytu (praca nr 4.1). Genotoksyczność chlorku żelaza potwierdzają też badania faz cyklu komórkowego (praca nr 4.2). Obserwowano spadek odsetka komórek będących w fazie S oraz G2/M, ale wzrost komórek w fazie G0/G1 i subG1 wraz ze wzrostem stężenia chlorku żelaza (praca nr 4.2). Oznacza to zahamowanie syntezy DNA. Żelazo wpływa na aktywność enzymu reduktazy rybonukleotydowej oraz hamuje syntezę DNA. Ponadto aktywność kinazy cykliny A, E oraz D jest hamowana w obecności żelaza (Trodec i wsp., 2006). To wszystko wpływa na zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1. Ponadto pojawienie się komórek w fazie subG1 sugeruje zaburzenia podziału komórki, co było obserwowane w preparatach mikroskopowych. Zauważalne były komórki olbrzymie i wielojądrzaste. Ponadto obserwowano objawy apoptozy: wakuolizację cytoplazmy i paczkującą błonę komórkową (praca nr 4.1). Za te

efekty odpowiedzialne są wolne rodniki tlenowe oraz osłabiony układ antyoksydacyjny komórki (praca nr 4.3).

Nikiel i jego związki są powszechnie używane w przemyśle. Organizmy ludzi i zwierząt mają z nimi częsty kontakt. W dostępnej literaturze opisywano wpływ niklu na DNA różnych komórek. Rzadziej wykonywano badania cytotoksyczności tego pierwiastka. W badaniach prezentowanych w pracy nr 4.1 wykazano, że chlorek niklu obniża żywotność komórek obu badanych linii w teście redukcji MTT oraz NRU, ponadto wzrost uwalniania LDH. Jednak linia HepG2 była bardziej wrażliwa na działanie chlorku niklu w teście redukcji MTT i NRU. Badania przeprowadzone przez Jia i Chen (2008) wskazują, że toksyczność niklu wynika ze zdolności wytwarzania wolnych rodników tlenowych. Wzrost ich stężenia prowadzi do utraty transbłonowego potencjału mitochondrialnego, co z kolei może prowadzić do zaburzenia oddychania wewnątrzkomórkowego (praca nr 4.2). Wynika to również z tego, iż nikiel hamuje aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (Wang i wsp., 2012). W badaniach przedstawionych w pracy nr 4.3 wykazano, że chlorek niklu wraz ze wzrostem stężenia powoduje przede wszystkim wzrost syntezy wolnych rodników tlenowych, a w mniejszym stopniu dialdehydu malonowego. Wzrost stężenia ROS i MDA jest skorelowany ze spadkiem aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Świadczy to nie tylko o aktywności prooksydacyjnej, ale również oznacza, iż nikiel(II) osłabia mechanizmy obronne komórki. Potwierdzają to też badania innych autorów (Kalaivani i wsp., 2014; Salnikow i wsp., 2000; Chen i wsp., 2003).

Dane literaturowe jednoznacznie wskazują na genotoksyczne działanie niklu. Wykazano, że nikiel powoduje wzrost stężenia histonu H3K4me3, ale spadek H3K9me3, co może nasilać powstawanie mutacji i uszkodzenia w DNA (Chen i wsp., 2003; Arita i wsp., 2012; Hu i wsp.). W badaniach przeprowadzonych w pracy nr 4.1 wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia chlorku niklu wzrasta liczba komet w obu badanych liniach komórkowych. Jednak bardziej wrażliwa na działanie badanego związku była linia BALB/3T3. Również test mikrojadowy potwierdza genotoksyczne działanie chlorku niklu. W tym teście również linia BALB/3T3 okazała się bardziej

wrażliwa niż linia HepG2. Ponadto w preparatach mikroskopowych obserwowano komórki olbrzymie, ze zwakuolizowaną cytoplazmą, posiadające wygląd charakterystyczny dla apoptozy. W teście AMES'a nikiel(II) wywołuje mutacje przesunięcia ramki odczytu silniej niż zmiany par zasad (praca nr 4.1). Te zmiany w DNA nie pozostają bez wpływu na prawidłowość przebiegu cyklu komórkowego. Obserwowano spadek odsetka komórek znajdujących się w fazach G0/G1 i S, natomiast rośnie w fazie G2/M (praca nr 4.2). Ponadto pojawia się pik subG1, co potwierdzają obserwacje mikroskopowe. Podobne obserwacje poczynili inni autorzy (Lee i wsp., 2016; Chen i wsp., 2010; Shiao i wsp., 1998). Uzyskane wyniki ukazują, że chlorek niklu hamuje cykl komórkowy w fazie G2/M. Lee i wsp. (2016) sugeruje, iż zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M następowało na skutek zahamowania aktywności cdk1 poprzez stymulację ekspresji p53 and p21^{WAF1/CIP1}.

Ostatnim z analizowanych pierwiastków był molibden(III). Pierwiastek ten okazał się nietoksyczny w teście redukcji MTT w zakresie stężeń 100-1400 μM . Podobne obserwacje poczyniono w teście uwalniania dehydrogenazy mleczanowej. W obu liniach komórkowych nie udało się wyznaczyć wartości IC₅₀. Jedynie w teście NRU zaobserwowano większą toksyczność trójtlenku molibdenu w stosunku do linii BALB/3T3 (praca nr 4.1). Jednak trójtlenek molibdenu okazał się genotoksyczny i to w stosunku do obu linii komórkowych. W obu testach: kometowym oraz mikrojadrowym obserwowano wzrost odpowiednio liczby komet oraz komórek zawierających mikrojądra. Obserwacje mikroskopowe wskazują na indukcję przez badany związek apoptozy. Komórki posiadają charakterystyczny kształt, z ciałkami apoptotycznymi i skondensowaną chromatyną. Bardziej wrażliwa w obu testach była linia HepG2. W teście AMES'a wykazano, że trójtlenek molibdenu częściej wywołuje mutacje typu przesunięcia ramki odczytu niż zamiany pary zasad (praca nr 4.1). Oznacza to uszkodzenia w DNA, który nie może być powielany w procesie replikacji. W badaniach wykonanych w pracy nr 4.2 wykazano, że po inkubacji obu linii komórkowych z trójtlenkiem molibdenu w zakresie stężeń 100-1000 μM maleje odsetek komórek będących w fazie G0/G1 oraz S, a rośnie komórek w fazie G2/M. Oznacza to

zahamowanie cyklu komórkowego na etapie punktu kontrolnego G2/M, co zapobiega powielaniu zmutowanego materiału genetycznego. Podobne obserwacje poczynił Siddiqui i wsp. (2015). Badania tego autora sugerują, że za destrukcyjną aktywność molibdenu odpowiadają wolne rodniki tlenowe. Potwierdzają to wyniki uzyskane w pracy 4.3. Obserwowano wzrost stężenia ROS i MDA. Ponadto spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych, które nie pełnią swojej funkcji ochronnej. Potwierdzają to też wyniki uzyskane w pracy nr 4.2, w której obserwowano spadek transmembranowego potencjału mitochondrialnego, za który odpowiedzialny jest wzrost stężenia wolnych rodników tlenowych.

Substancje aktywne biologicznie mogą oddziaływać na siebie zmieniając wielkość lub rodzaj efektów toksycznych. Interakcje mogą zachodzić w fazie toksokinetycznej i/lub toksodynamicznej. Wyróżnia się następujące rodzaje interakcji: addytywność, synergizm lub antagonizm. Efekt antagonistyczny występuje, gdy efekt działania dwóch substancji jest mniejszy niż suma tych substancji użytych oddzielnie. Z efektem synergistycznym mamy do czynienia, gdy efekt działania substancji razem użytych jest wyższy niż suma efektów substancji użytych pojedynczo. Gdy suma efektów działania pojedynczych substancji równa jest efektowi użycia ich równocześnie mówimy o addytywności (Fødevare Rapport).

Do badań interakcji wybrano dawki pierwiastków na podstawie testów cytotoxycznosci z pierwszego etapu badań. W dawce 200 μM w przypadku wszystkich pierwiastków nie obserwowano zahamowania proliferacji komórek, a często jej stymulację. Natomiast w dawce 1000 μM obserwowano efekt toksyczny- znaczny spadek żywotności.

Przebadano następujące kombinacje:

chlerek chromu o stężeniu 200 μM plus chlerek żelaza o stężeniu 1000 μM ,
chlerek chromu o stężeniu 200 μM plus chlerek niklu o stężeniu 1000 μM ,
chlerek chromu o stężeniu 200 μM plus trójtlenek molibdenu o stężeniu 1000 μM ,
chlerek chromu o stężeniu 1000 μM plus chlerek żelaza o stężeniu 200 μM ,
chlerek chromu o stężeniu 1000 μM plus chlerek niklu o stężeniu 200 μM ,

chlerek chromu o stężeniu 1000 μM plus trójtlenek molibdenu o stężeniu 200 μM .

i wykonano wszystkie testy jak w przypadku pojedynczych pierwiastków.

W interakcji chlorku chromu o stężeniu 200 μM z chlorkiem niklu lub trójtlenkiem molibdenu o stężeniu 1000 μM obserwowano antagonizm- chlerek chromu użyty w stężeniu 200 μM wykazywał działanie ochronne przed skutkami toksycznego działania chlorku niklu lub trójtlenku molibdenu o stężeniu 1000 μM . Obserwacje takie poczyniono w testach cytotoksyczności, gdzie obserwowano wzrost żywotności komórek w porównaniu do komórek inkubowanych z ww. związkami w dawce 1000 μM (praca nr 4.1). Ponadto obserwowano spadek liczby komet i mikrojąder oraz liczby mutacji w komórkach w porównaniu do komórek inkubowanych z ww. związkami o stężeniu 1000 μM (praca nr 4.1). Tą samą obserwacje poczyniono w teście cytometrycznym- następował wzrost mitochondrialnego potencjału błonowego. W innym teście cytometrycznym- analizy faz cyklu komórkowego również obserwowano spadek odsetka komórek będących w fazie subG1, a ponadto odsetek komórek znajdujących się w fazach G0/G1, S oraz G2/M był porównywalny z komórkami kontrolnymi (praca nr 4.2). Obserwacje te potwierdziły badania poziomu wolnych rodników tlenowych i MDA- spadało ich stężenie w porównaniu do komórek inkubowanych z ww. związkami o stężeniu 1000 μM oraz następował wzrost aktywności SOD, CAT oraz GPx (praca nr 4.3). Mechanizm takiego działania chromu wyjaśniają badania przeprowadzone w pracy nr 4.3. Chlerek chromu w niskich dawkach, tj. 100 oraz 200 μM nie powodował stresu oksydacyjnego w komórce- poziom wolnych rodników tlenowych oraz MDA był porównywalny do komórek kontrolnych, ponadto stymulował aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy. Jednocześnie jak wykazano w pracy nr 4.3 chlerek niklu oraz trójtlenek molibdenu o stężeniu 1000 μM indukował stres oksydacyjny i obniżał aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Potwierdzają to obserwacje innych autorów. Badania przeprowadzone przez Długosza i wsp. (2012) oraz Chen'a i wsp. (2018) wykazały, że chrom(III) w niskich dawkach powoduje wzrost

aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy. Te obserwacje były zgodne z badaniami zawartymi w pracy nr 4.3. Prawdopodobnie ta aktywność leży u podstaw funkcji ochronnej chromu(III) wobec niklu(II) i molibdenu(III). Wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy powoduje spadek aktywności wolnych rodników wobec mitochondriów, błony komórkowej czy DNA. Zaobserwowany w pracy nr 4.3 spadek aktywności enzymatycznej katalazy w dawkach wyższych jest związany z niszczeniem miejsca aktywnego tego enzymu przez jony chromu(III) (Chen i wsp., 2018). Ponadto wykazano, że chrom(III) w niskich dawkach powoduje wzrost procesywności i aktywności polimerazy, ale spadek wierności replikacji (Galaris i Evangelou, 2001, Snow i Xu, 1989), dlatego w teście AMES'a obserwowano pojedyncze mutacje w obserwowanej interakcji.

Zniszczenie miejsca aktywnego katalazy przez jony chromu(III) powoduje, że w interakcji chlorek chromu o stężeniu 1000 μM plus chlorek niklu lub trójtlenek molibdenu o stężeniu 200 μM nie wykazywał właściwości ochronnych. Co więcej obserwowano wzrost syntezy wolnych rodników tlenowych oraz MDA, a spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy oraz peroksydazy glutationowej.

W interakcji chlorku chromu o stężeniu 200 μM plus chlorek żelaza o stężeniu 1000 μM zaobserwowano efekt synergistyczny. Zarówno w testach cytotoksyczności, genotoksyczności, jak i mutagenności obserwowano nasilenie toksyczności (praca nr 4.1). Obserwacje te potwierdzono też w teście cytometrycznym- następował spadek mitochondrialnego potencjału błonowego w porównaniu do komórek obu linii inkubowanych z chlorkiem chromu i chlorkiem żelaza samodzielnie. Ponadto w komórkach inkubowanych równocześnie z oboma pierwiastkami obserwowano wzrost odsetka komórek znajdujących się w fazie subG1 i G0/G1 (praca nr 4.2). Dane literaturowe wskazują, że zarówno chrom(III), jaki i żelazo(III) może generować w komórce wolne rodniki tlenowe. W badaniach przedstawionych pracy nr 4.3 wykazano, że chrom(III), jaki i żelazo(III) generują powstawanie wolnych rodników tlenowych, jak i osłabienie układu antyoksydacyjnego. Jednak w przypadku żelaza(III) dużo silniej zachodziła peroksydacja lipidów i powstawały produkty ich utlenienia, m. in. MDA. W interakcji chlorku

chromu w dawce 200 μM plus chlorek żelaza w dawce 1000 μM , nawet stymulacja aktywności, przez chrom(III) o stężeniu 200 μM , enzymów katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej, jest niewystarczająca, gdyż enzymy te nie neutralizują produktów peroksydacji lipidów. Ponadto aktywność peroksydazy glutationowej była bardzo niska i dlatego neutralizacja produktów utleniania lipidów jest niemożliwa. Produkty te silniej toksycznie oddziałują na organella komórkowe niż rodniki hydroksylowe (Kohgo i wsp., 2008). Efekt toksyczny po równoczesnej inkubacji komórek obu linii z chlorkiem żelaza i chlorkiem chromu może wynikać też ze zdolności oddziaływania na DNA. Chrom(III) oddziałuje bezpośrednio na zasady azotowe i reszty fosforanowe, natomiast żelazo(III) oddziałuje na zasady azotowe w DNA wywołując efekty toksyczne (Moriwaki i wsp., 2008). Te mechanizmy prowadzą do synergizmu w działaniu obu pierwiastków.

Wnioski

Analiza uzyskanych wyników badań pozwoliła na wyciągnięcie szeregu wniosków, z których najważniejsze przedstawiono poniżej.

1. Najbardziej wrażliwa na działanie chromu(III) jest błona komórkowa, kolejno mitochondria i lizosomy w komórkach prawidłowych i nowotworowych.
2. Mitochondria komórek nowotworowych są bardziej wrażliwe na toksyczne działanie żelaza(III) niż linii prawidłowej.
3. Komórki linii HepG2 są bardziej wrażliwe na toksyczne działanie niklu(II) niż BALB/3T3.
4. Chrom(III), żelazo(III), nikiel(II) oraz molibden(III) wywołują przerwy w dwuniciowym i jednoniciowym DNA oraz powstawanie miejsc AP-nieposiadających zasad purynowych ani pirymidynowych.
5. Chrom(III), molibden(III) oraz nikiel(II) wywołuje częściej mutacje typu przesunięcia ramki odczytu, a rzadziej mutacje zamiany pary zasad.
6. Żelazo(III) wywołuje mutacje typu zamiany pary zasad, jak i przesunięcia ramki odczytu

7. Chrom(III), żelazo(III), nikiel(II) oraz molibden(III) powodują zaburzenia funkcjonowania wrzeciona podziałowego prowadząc do replikacji jądra komórkowego, bez podziału cytoplazmy.
8. Chrom(III), żelazo(III), nikiel(II) oraz molibden(III) generuje syntezę wolnych rodników tlenowych.
9. Żelazo(III) wywołuje peroksydację lipidów.
10. Chrom(III) w niskich stężeniach stymuluje aktywność enzymów antyoksydacyjnych, a w wyższych hamuje ich aktywność.
11. Żelazo(III), nikiel(II) oraz molibden(III) hamują aktywność enzymów antyoksydacyjnych
12. Chrom(III), nikiel(II) oraz molibden(III) powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego na etapie punktu kontrolnego G2/M
13. Żelazo(III) powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego na etapie punktu kontrolnego G0/G1.
14. Chrom(III) oddziałuje synergistycznie z żelazem(III).
15. Chrom(III) oddziałuje antagonistycznie z niklem(II) i molibdenem(III)- pełni funkcje ochronne przed wysokimi dawkami niklu(II) i molibdenu(III).

Podsumowanie

Celem badań przedstawionych w niniejszym opracowaniu było poznanie metabolizmu chromu(III), a także żelaza(III), niklu(II) i molibdenu(III). Ponadto charakteru interakcji pomiędzy chromem(III) a pozostałymi pierwiastkami. Jest to bardzo istotny problem we współczesnej medycynie. W ostatnich latach notuje się wzrost przyjmowania preparatów witaminowo-mineralnych oraz suplementów diety. Również na szeroką skalę stosowane są biomateriały zawierające te mikroelementy. W organizmach ludzi i zwierząt może dochodzić do przekroczenia bezpiecznych stężeń pierwiastków oraz do nieznanych dotąd interakcji. Dlatego tak duże znaczenia mają otrzymane wyniki. Są one pierwszymi doniesieniami w literaturze dotyczącymi interakcji pomiędzy chromem(III), a żelazem(III) lub niklem(II) lub molibdenem(III), co utrudniało przeprowadzenie dyskusji z wynikami prac innych autorów.

Literatura

- Arita A., Shamy M.Y., Chervona Y., Clancy H.A., Sun H., Hall M.N., Qingshan Q., Gamble M.V., Costa M., 2012, The effect of exposure to carcinogenic metals on histone tail modifications and gene expression in human subjects. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 26: 174-178.
- Baghi D., Stohs S.J., Downs B.W., Bagchi M., Preuss H.G., 2002, Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 180: 5-22.
- Bauer S., Schmuki P., von den Mark K., Park J., 2013, Engineering biocompatible implant surfaces. Part I- Materials and surfaces, *Progr. Mater. Sci.*, 58: 261-326.
- Chen C.-Y., Wang Y.-F., Lin Y.-H., Yen S.-F., 2003, Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. *Arch. Toxicol.*, 77: 123-130.
- Chen C.Y., Lin T.K., Chang Y.C., Wang Y.F., Shyu H.W., Lin K.H., Chou M.C., 2010, Nickel(II)-induced oxidative stress, apoptosis, G2/M arrest, and genotoxicity in normal rat kidney cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 73: 529-539.
- Chen L., Zhang J., Zhu Y., Zhang Y., 2018, Interaction of chromium(III) or chromium(VI) with catalase and its effect on the structure and function of catalase: An in vitro study. *Food Chemistry*, 244: 378-385.
- Chiba K., Kawakami K., Tohyama, K., 1998, Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. in Vitro*, 12(3): 251-8.
- Czajka A., 2006, Reactive oxygen species and mechanisms of body protection. *Nowiny Lekarskie*, 75(6): 582-586.
- Czubaszek M., Szostek M., Wójcik E., Andraszek K., 2014, Test kometowy jako metoda identyfikacji niestabilności chromosomów. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 68: 695-700.
- Dai H., Liu J., Malkas L.H., Catalano J., Alagharu S., Hickey R.J., 2009, Chromium reduces the in vitro activity and fidelity of DNA replication mediated by the human cell DNA synthesome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236: 154-165.

- Długosz A., Rembacz K.P., Pruss A., Durlak M., Lembas-Bogaczyk J., 2012, Influence of chromium on the natural antioxidant barrier. *Pol. J. Environ. Stud.*, 21(2): 331-335.
- Eid R., Arab N.T.T., Greenwood M.T., 2017, Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1864: 399-430.
- Eastmond D. A., Macgregor J. T., Slesinski R. S., 2008, Trivalent chromium: assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Crit. Rev. Toxicol.*, 38(3): 173-90.
- Fang J.L., Beland F.A., 2009, Long-term exposure to zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis, and decreases telomerase activity in human hepatocytes. *Toxicol. Sci.*, 111: 120-130.
- Fenech M., 2008, The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods Mol. Biol.*, 410: 185-216.
- Figgitt M., Newson R., Leslie I. J., Fisher J., Ingham E., Case C. P., 2010, The genotoxicity of physiological concentrations of chromium (Cr(III) and Cr(VI)) and cobalt (Co(II)): An in vitro study. *Mut. Res.*, 688(1-2): 53-61.
- Fødevare Rapport, 2003:12. Combined Actions and Interactions of Chemicals in Mixtures.
- Galaris D., Evangelou A., 2002, The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 142: 93-103.
- Grosicka-Maciąg E., 2011, Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 65: 357-366
- He W., Feng Y., Li X., Wei Y., Yang X., 2008, Availability and toxicity of Fe(II) and Fe(III) in Caco-2 cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 9(9): 707-712.
- Hininger I., Rachida B., Osman M., Faure H., Roussel A.M., Anderson R.A., 2007, Safety of trivalent chromium complexes: No evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, 42: 1759-1765.
- Hirsh M., Konijn A.M., Iancu T.C., 2002, Acquisition storage and release of iron by cultured human hepatoma cells. *J. Hepatol.*, 36: 30-38.
- Hirsh M., Konijn A.M., Iancu T.C., 2002, Hpcidin the iron watcher. *Biochimie*, 91: 1223-1228.

- Hu W.Z., Feng Z., Tang M.S., 2004, Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for nickel (II) -induced carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 25(3): 455-462.
- Jia J., Chen J., 2008, Chronic nickel-induced DNA damage and cell death: the Protection role of ascorbic acid. *Environ. Toxicol.*, 23: 401–406.
- Kalaivani P., Saranya S., Poornima P., Prabhakaran R., Dallemerm F., Vijaya Padma V., Natarajan K., 2014, Biological evaluation of new nickel(II) metallates: Synthesis, DNA/protein binding and mitochondrial mediated apoptosis in human lung cancer cells (A549) via ROS hypergeneration and depletion of cellular antioxidant pool. *Eur. J. Med. Chem.*, 82: 584-599.
- Klein C., Costa M., 2015, Chapter 48 – Nickel, in: Nordberg G.F., Fowler B.A. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)*, Elsevier, pp. 1091–1089.
- Kohgo Y., Ikuta K., Ohtake T., Torimoto Y., Kato, J., 2008, Interaction of chromium(III) or chromium(VI) with catalase and its effect on the structure and function of catalase: An in vitro study. *Int. J. Hematol.*, 88: 7–15.
- Kozłowska A., Olewińska E., Pawlas N., 2012, Wykorzystanie mikropłytkowego testu Ames MPFTM do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza. *Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine*, 15(3): 55-65
- Le N.T.V., Richardson D.R., 2002, The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1603: 31–46.
- Lee Y.-J., Lim S.-S., Baek B.J An., J.-M., Nam H.-S., Woo K.-M., Cho M.-K., Kim S.-H., Lee S.-H., 2016, Nickel(II)-induced nasal epithelial toxicity and oxidative mitochondrial damage. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 42: 76–84.
- Lieu P.T., Heiskala M., Petersom P.A., Yang Y., 2001, The roles of iron in health and disease. *Mol. Aspect. Med.*, 22: 1-87.
- Mazzotti F., Sabbioni E., Ponti J., Ghiani M, Fortaner S., Rossi G.L., 2002, *In vitro* setting of dose- effect relationships of 32 metal compounds in the Balb/3T3 cell line, as a basis for predicting their carcinogenic potential. *ATLA*, 30: 209-21.

- Mendel R.R., 2013, Cell biology of molybdenum, in Banci, L., (Ed.), *Metallomics and the Cell*, 12: 503-528.
- Moriwaki H., Osborne M.R., Phillips D.H., 2008 Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicol. in Vitro*, 22(1): 36 - 44.
- O'Brien T.J., Ceryak S., Patierno S.R., 2003, Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat. Res.* 533: 3-36.
- Patel B, Favoro G, Inam F, Reece M. J, Angadij A, Bonfield W, Huang J, Edirisinghe., 2012, Cobalt-based orthopaedic alloys: Relationship between forming route, microstructure and tribological performance. *Mater. Sci. Eng. C*, 32: 1222-1229
- Pu X, Wang Z., Klaunig J.E., 2015, Alkaline comet assay for assessing DNA damage in individual cells. *Curr .Protoc. Toxicol.*, 6;65(3): 12.1-11
- Rudolf E., Červinka M., 2003, Chromium (III) produces distinct of cell death in cultured cells. *Acta Medica (Hradec Kralowe)*, 46(4): 139-146.
- Salnikow K., Su W., Blagosklonny M.V., Costa M., 2000, Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res.*, 60: 3375–3378.
- Schoonen W.G., de Roos J.A., Westerink W.M., Débiton E., 2005,, Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells. II mechanistic assays on NAD(P)H, ATP and DNA contents. *Toxicol. in Vitro*, 19: 491–503.
- Shiao Y.H., Lee S.H., Kasprzak K.S., 1998, Cell cycle arrest, apoptosis and p53 expression in nickel(II) acetate-treated Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, 19: 1203–1207.
- Siddiqui M.A., Saquiba Q., Ahamed M., Farshorid N.N., Ahmad J., Wahab R., Khan S.T., Alhadlaq H.A., Musarrat J., Abdulaziz Al-Khedhairy A., Pant A.B., 2015, Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress,G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 125: 73–81.

Snow E.T., Xu L., 1991, Chromium-III bound to DNA templates promotes increased polymerase processivity and decreased fidelity during replication in vitro. *Biochemistry*, 30: 11238–11245.

Srai S.K.S., Bomford A., McArdle H.J., 2002, Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, 15(2): 243-259.

Srai S.K.S., Bomford A., McArdle H.J., 2002, Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, 15(2): 243-259.

Tallkvist J., Oskarsson A., 2015, Chapter 47, Molybdenum, in: Nordberg G.F., Fowler B.A. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)*, Elsevier, pp. 1077–1089.

Troadec M.-B., Courselaud B., Detivaud L., Haziza-Pigeon Ch., Leroyer P., Brissot P., Loreal O., 2006, Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes. *J. Hepatol.*, 44:391–399.

Wang Y.-F., Shyu H.-W., Chang Y.-Ch., Tseng W.-Ch., Huang Y.-L., Lin K.-H., Chou M.-Ch., Liu H.-L., Chen Ch.-Y., 2012, Nickel (II)-induced cytotoxicity and apoptosis in human proximal tubule cells through a ROS- and mitochondria-mediated pathway, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 259(2): 177–186.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160: 1–40.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

Studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi ukończyłam w 2000 roku obroną pracy magisterskiej pt. *„Spontaniczne i indukowane in vitro wytwarzanie cytokin w komórkach podścieliska szpiku kostnego osób chorych na ostrą białaczkę szpikową i szpiczaka mnogiego”*. W tym samym roku zostałam zatrudniona, jako asystent naukowo-dydaktyczny w Katedrze Biologii Komórki, Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego. Od początku mojej pracy naukowej moje zainteresowania skupiały się wokół metabolizmu pierwiastków oraz

zastosowania metod alternatywnych w badaniu ich metabolizmu. Pierwiastkiem, który wzbudzał moje szczególne zainteresowanie był chrom(III). Był to pierwiastek, którego mechanizm nie był poznany, a w literaturze pojawiało się coraz więcej nowych doniesień na temat jego udziału w aktywacji receptora insulinowego, czy metabolizmie tłuszczu. Coraz więcej też mówiło się o jego roli w redukcji masy tkanki tłuszczowej. Oprócz chromu(III) drugim pierwiastkiem, który znalazł się w kręgu moich zainteresowań był wanad(V). Jego metabolizm był lepiej poznany. Bardzo interesowały mnie możliwości interakcji obu pierwiastków. Uczestniczyłam ponadto w określeniu interakcji selenu(IV) i cynku(II) z wanadem.

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że chlorek chromu powoduje przesunięcie krzywej oporności osmotycznej erytrocytów u szczurów, które otrzymywały w wodzie do picia chlorek chromu. Ponadto, obserwowano wzrost minimalnej, średniej oraz maksymalnej oporności osmotycznej erytrocytów pod wpływem Cr(III). Dodatkowo po zadziałaniu tego pierwiastka obserwowano w mikroskopie elektronowym zniszczenie błony erytrocytów- wypuklenia błony komórkowej. Świadczyć to może o aktywności prooksydacyjnej tego pierwiastka. Te obserwacje potwierdziły kolejne badania, w których chlorek chromu u szczurów powodował wzrost stężenia MDA.

Pierwsze badania nad wpływem chromu(III) oraz wanadu(V) stosowanych razem i osobno przeprowadziłam na linii komórkowej BALB. W tych badaniach stwierdzono, że zarówno chrom(III) jak i wanad(V) powoduje spadek żywotności komórek wykazany w teście redukcji MTT. Ponadto obserwacje mikroskopowe wykazały, że po zadziałaniu obu pierwiastków spadał odsetek komórek dzielących się. Ponadto po zadziałaniu wanadu(V) następował wzrost liczby komórek dwu- i wielojądrzastych, a spadek liczby komórek olbrzymich, natomiast po inkubacji fibroblastów z chromem(III) obserwowano spadek liczby komórek dwujądrzastych i olbrzymich, a wzrost liczby komórek wielojądrzastych. W kolejnych badaniach komórki inkubowano z chromem(III) i wanadem(V) równocześnie oraz wykonywano preinkubację z chromem(III), a następnie komórki inkubowano z

wanadem(V). Wykazano, że chrom pełni funkcje ochronne w stosunku do toksycznego działania wanadu(V).

Jak już wspomniałam uczestniczyłam też w badaniach nad wpływem selenu(IV) i cynku(II) na metabolizm fibroblastów. W badaniach tych wykazano, że selenin sodu hamuje proliferację mysich fibroblastów. Ponadto powoduje wzrost liczby komórek olbrzymich. Natomiast Cynk(II) pełnił funkcje ochronne przed toksycznym działaniem wanadu(V).

Wyniki badań zostały opublikowane w pracach i prezentowane na konferencjach naukowych: PD1, PD2, PD3, PD4, PD5, PD6, PD7, PD8, PD9, PD10.

Badanie interakcji chromu(III) i żelaza(III) *in vitro* i *in vivo* (wyniki badań zostały opublikowane w pracach i prezentowane na konferencjach naukowych: A1, A2, A3, A4, A6, A9, A10, S1, S2, S4, S5, R3, R5, P1, P2, P4, P5)

W roku 2006 rozpoczęłam współpracę z Katedrą Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, z prof. dr hab. Andrzejem K. Siwickim, pod kierunkiem, którego przygotowałam rozprawę doktorską. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych w roku 2010 zostałam zatrudniona w nowo utworzonym Instytucie Inżynierii Środowiska. W roku 2011 zostałam kierownikiem Pracowni Biologii Środowiska. W nowo utworzonym zespole badawczym kontynuowałam rozpoczęte w pracy doktorskiej badania nad interakcjami chromu(III) i żelaza(III). W badaniach tych wykazałam, że u myszy: chrom(III) oraz żelazo(III) powoduje spadek wydzielania IL-1, bez zmian w wydzielaniu IL-6, aktywności proliferacyjnej limfocytów, aktywności metabolicznej fagocytów, poziomu γ -globulin i aktywności lizozymu u myszy, którym dootrzewnowo podawano Cr(III) lub Fe(III). Równoczesne stosowanie obu pierwiastków powoduje synergizm ich działania *in vivo*. Ponadto chrom(III) oraz żelazo(III) podawane równocześnie powoduje przesunięcie krzywej oporności osmotycznej erytrocytów myszy, co oznacza synergizm w nasileniu aktywności hemolitycznej. Ponadto stężenie żelaza w surowicy krwi spada po podaniu chromu(III). Podobne obserwacje poczyniono dla całkowitej

zdolności wiązania żelaza (total iron-binding capacity, TIBC) oraz indeksu saturacji transferryny (index of transferrin saturation, ITS). Równoczesne podawanie zwierzętom żelaza(III) i chromu(III) powoduje spadek poziomu żelaza w surowicy krwi, TIBC oraz ITS.

Chrom(III) w zakresie stężeń 50–800 μM powodował spadek żywotności fibroblastów oraz indukcję apoptozy *in vitro*. Ponadto wzrost wydzielania IL-1, a spadek IL-6 *in vitro*. Żelazo(III) w zakresie stężeń 50–800 μM powodowało spadek żywotności fibroblastów oraz indukcję nekrozy *in vitro*. Ponadto wzrost wydzielania IL-1, a spadek IL-6 *in vitro*. Chrom(III) w dawce 50 μM pełni ponadto funkcje ochronne przed cytotoksycznością wywołaną przez żelazo(III) (w dawce 500 μM) w komórkach linii BALB/c 3T3, podczas równoczesnej inkubacji z oboma pierwiastkami.

Jednak preinkubacja komórek linii BALB/c 3T3 z Fe(III) o stężeniu 50 μM chroni przed toksycznością wywołaną Cr(III) w dawce 500 μM .

W prowadzonych badaniach stwierdzono ponadto, że preinkubacja komórek linii HepG2 (nowotworu wątrobo-komórkowego) w dawce 200 oraz 400 μM z Fe(III), a następnie z chromem (III) powodowała spadek odsetka komórek w fazie S oraz dzielących się.

Badanie interakcji żelaza(III) z nikiem(II) (wyniki badań zostały opublikowane w pracach: A11, A14)

Zarówno nikiel(II), jak i żelazo(III) wywoływało zależny od dawki spadek żywotności komórek: mysich fibroblastów oraz linii nowotworowej HepG2 w zakresie stężeń 400-1400 μM . Spadek żywotności obserwowany był w teście redukcji MTT, uwalniania dehydrogenazy mleczanowej oraz pochłaniania czerwieni obojętnej. W niskich stężeniach (100 i 200 μM) obserwowano wzrost żywotności. Ponadto w testach genotoksyczności obserwowano zależny od dawki wzrost liczby komet oraz mikrojąder po inkubacji z oboma pierwiastkami. Dodatkowo w preparatach mikroskopowych obserwowano komórki olbrzymie, wielojądrzaste lub apoptotyczne, tj. z „paczkującą” cytoplazmą oraz silnie zwakulizowane w obu liniach komórkowych. W teście mutagenności stwierdzono, że chlorek niklu wywołuje mutacje typu przesunięcia ramki odczytu częściej niż zamiany pary zasad. Natomiast

chlorek żelaza z podobną częstotliwością wywołuje oba typy mutacji. Równoczesna inkubacja obu linii komórkowych z chlorkiem żelaza w stężeniu 200 μM i chlorkiem niklu w stężeniu 1000 μM oraz chlorkiem żelaza w stężeniu 1000 μM i chlorkiem niklu w stężeniu 200 μM wywoływała efekt synergistyczny obserwowany w testach cytotoxycności. Jedynie w teście redukcji MTT zaobserwowano ochronne działanie niskich dawek żelaza(III)-200 μM w stosunku do toksycznych dawek niklu(II)- 1000 μM . U podstaw takiego działania żelaza(III) leży prawdopodobnie jego wpływ na prawidłowe działanie dehydrogenazy bursztynianowej. Podobne obserwacje poczyniono w testach genotoksycności oraz mutagenności. Żelazo(III) w stężeniu 200 μM pełni funkcje ochronne w stosunku do niklu(II) w stężeniu 1000 μM .

Badanie interakcji żelaza(III) z molibdenem(III) (wyniki badań zostały opublikowane w pracach: A15, A16)

Kolejną analizowaną interakcją była interakcja żelaza(III) i molibdenu(III). Tutaj też zaobserwowano zależny od dawki spadek żywotności komórek linii BALB/3T3 oraz HepG2 w teście redukcji MTT w zakresie stężeń 400-1400 μM . Natomiast w teście uwalniania LDH trójtlenek molibdenu nie wykazywał toksycności. Podobnie w teście pochłaniania czerwieni obojętnej w linii nowotworowej. Natomiast chlorek żelaza był toksyczny we wspomnianych powyżej testach w zakresie stężeń 400-1400 μM . Oznacza to, że trójtlenek molibdenu nie jest toksyczny wobec błony komórkowej w obu linach komórkowych oraz wobec lizosomów linii nowotworowej. W testach kometowym oraz mikrojądrowym stwierdzono wzrost liczby komet oraz mikrojąder odpowiednio. Ponadto w preparatach obserwowano komórki apoptotyczne. W teście mutagenności stwierdzono, że trójtlenek molibdenu wywołuje mutacje typu przesunięcia ramki odczytu częściej niż zamiany pary zasad. Natomiast chlorek żelaza z podobną częstotliwością wywołuje oba typy mutacji. Natomiast w badanych interakcjach: chlorek żelaza w stężeniu 200 μM plus trójtlenek molibdenu w stężeniu 1000 μM oraz chlorek żelaza w stężeniu 1000 μM plus trójtlenek molibdenu w stężeniu 200 μM wykazano działanie synergistyczne obu

pierwiastków w obu badanych liniach w testach cytotoksyczności, genotoksyczności oraz mutagenności.

Badania interakcji molibdenu(III)/(V) z chromem(III) lub niklem(II) lub kobaltem(II) lub żelazem(III) (wyniki badań zostały opublikowane w pracach i prezentowane na konferencjach naukowych: S9, R9)

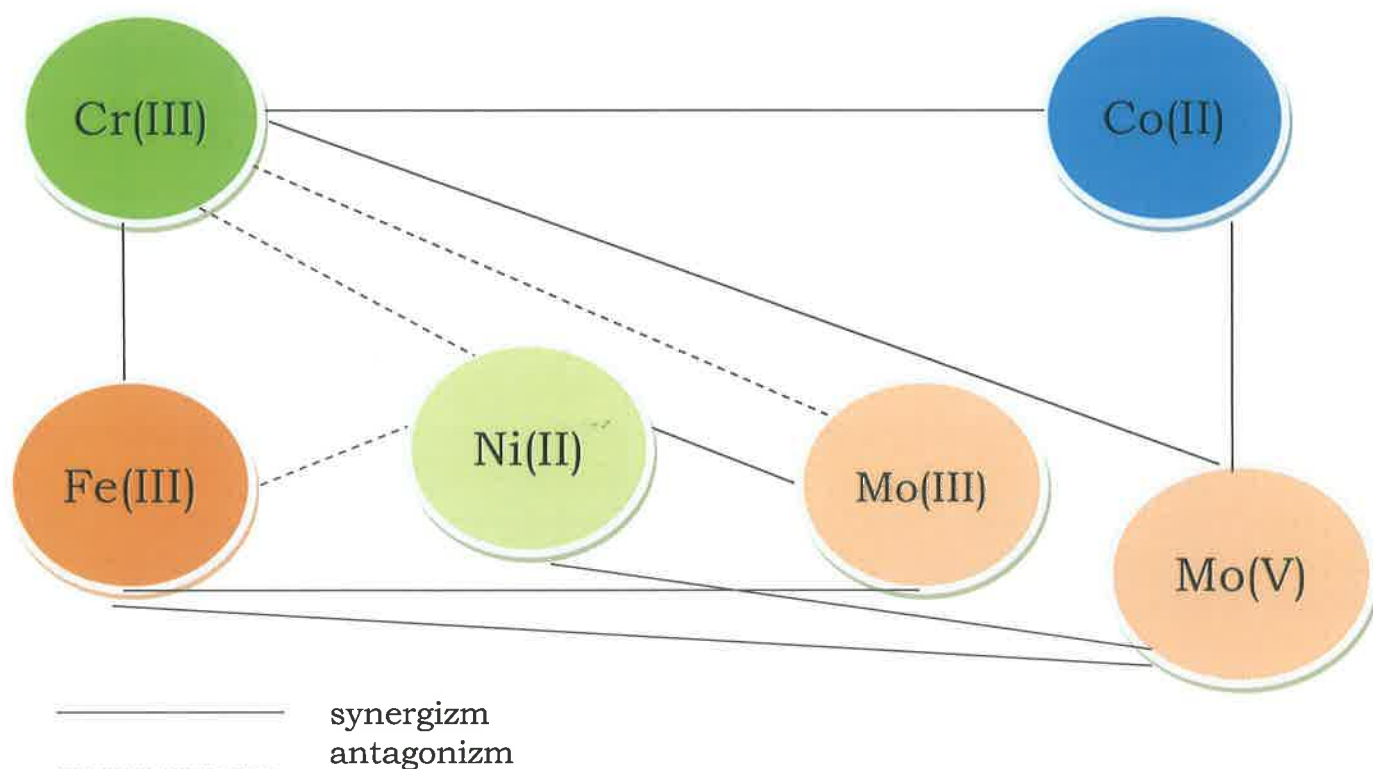
Podjęłam również badania nad interakcjami molibdenu(III)/(V) z chromem(III) lub niklem(II) lub kobaltem(II) lub żelazem(III). W testach genotoksyczności trójtlenek molibdenu i chlorek niklu a zakresie stężeń 100-1400 μM powodowały zależny od dawki wzrost liczby mikrojąder i komet. Ponadto w preparatach mikroskopowych obserwowano komórki olbrzymie, wielojądrzaste, ze zwakuolizowaną cytoplazmą i objawami apoptozy zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych. Równoczesna inkubacja komórek linii BALB/3T3 oraz HepG2 z trójtlenkiem molibdenu w stężeniu 200 lub 1000 μM i chlorkiem niklu w stężeniu 1000 lub 200 μM odpowiednio wywoływała efekt synergistyczny. Ten typ interakcji obserwowano również w testach cytotoksyczności w komórkach linii BALB/3T3 inkubowanych z molibdenem(V) z chromem(III) lub niklem(II) lub żelazem(III) lub kobaltem(II) w kombinacjach stężeń jak powyżej.

Badanie metabolizmu kobaltu(II) i jego interakcji z chromem(III) (wyniki badań zostały opublikowane w pracach i prezentowane na konferencjach naukowych: R7, R10)

Badalam również wpływ kobaltu na metabolizm komórek. Określano wpływ kobaltu(II) w zakresie stężeń 200-1400 μM na funkcję mitochondriów, błony komórkowej, lizosomów, DNA oraz możliwość wywoływania mutacji. Kobalt oddziałuje toksycznie na mitochondria, lizosomy oraz błonę komórkową, co oznaczano w teście redukcji MTT, pochłaniania czerwieni obojętnej oraz uwalniania dehydrogenazy mleczanowej odpowiednio. Ponadto powodował wzrost liczny komet i liczby mikrojąder prowadząc do apoptozy. Okazało się, że wywoływał też mutacje typu zmiany ramki odczytu i zamiany pary zasad. Określano również interakcje chlorku kobaltu o stężeniu 200 μM plus chlorku chromu o stężeniu 1000 μM lub chlorku kobaltu o stężeniu

1000 μM plus chlorku chromu o stężeniu 200 μM . W badanych interakcjach w preparatach mikroskopowych obserwowano komórki apoptotyczne. Ponadto w testach cytotoksyczności obserwowano synergizm w negatywnym oddziaływaniu na mitochondria i błonę komórkową.

Większość z zaprezentowanych badań prowadzona była w tych samych warunkach doświadczalnych: te same stężenia, linie komórkowe i testy, dlatego na podstawie prowadzonych przeze mnie badań nad interakcjami pierwiastków opracowano diagram:



Badanie aktywności przeciwwirusowej chromu(III), żelaza(III) i niklu(II) (wyniki badań zostały opublikowane w pracach i prezentowane na konferencjach naukowych: A8, S8, P10, R4)

Ciekawym aspektem badań nad interakcją chromu(III) i żelaza(III) było badanie ich aktywności antywirusowej. Wykazano, że chlorek chromu oraz chlorek żelaza w stężeniach 200, 400, 600, 800, 1000 μM pierwiastki użyte samodzielnie hamują namnażanie wirusa HSV-1 oraz BVDV. Natomiast użyte równocześnie w następujących interakcjach: 1) chlorek chromu w stężeniu 200 μM plus chlorek żelaza w stężeniu 1000 μM , 2) chlorek chromu w stężeniu 1000 μM plus chlorek żelaza w stężeniu 200 μM , 3) chlorek chromu w stężeniu 400 μM plus chlorek żelaza w stężeniu 800 μM oraz 4) chlorek chromu w stężeniu 800 μM plus chlorek żelaza w stężeniu 400 μM działają synergistycznie w spadku liczby kopii DNA obu zastosowanych wirusów.

Ponadto badano wpływ chromu(III) i niklu(II) na replikację wirusa BVDV. Wykazano, że chlorek chromu i chlorek niklu użyte samodzielnie w stężeniach 100-1400 μM hamują namnażanie wirusa BVDV. Natomiast użyte równocześnie w interakcjach chlorek chromu w stężeniu 200 μM plus chlorek niklu w stężeniu 1000 μM lub działają chlorek chromu w stężeniu 1000 μM plus chlorek niklu w stężeniu 200 μM wykazują synergizm w działaniu przeciwwirusowym.

Badania genotoksyczności i cytotoksyczności pranobexu inozyiny (wyniki badań zostały opublikowane w pracach i prezentowane na konferencjach naukowych: A12, A13)

Uczestniczyłam również w badaniach nad wpływem pranobexu inozyiny na żywotność komórek linii BALB/3T3 oraz HepG2. Pranobex inozyiny to mieszanina inozyiny z kwasem 4-acetamidobenzoesowym i 1-dimetyloamino 2-propanolem (w stosunku molowym 1:3). Stosowany jest w infekcjach wirusowych, jako lek hamujący namnażanie wirusów i jako preparat immunomodulujący. Badania wykonywane były w ramach projektu: *Badania nad innowacyjnym lekiem o działaniu immunostymulacyjnym u zwierząt* (POIG.01.03.01-28-108/12) finansowanego ze środków Narodowego

Centrum Badań i Rozwoju. Miały na celu określenie cytotoksyczności, genotoksyczności i mutagenności tego związku w stosunku do linii prawidłowych i nowotworowych. Wykazano w testach cytotoksyczności, że linia nowotworowa była wrażliwa na jego cytotoksyczne działanie. W testach genotoksyczności, również linia nowotworowa była bardziej wrażliwa na toksyczne działanie pranobexu inozyny.

Inne osiągnięcia (zostały opublikowane w A5, A7, RM1, RM2, RM3, RM4, RM5, RM6, RM7, RM8, RM9, RM10, RM11, RM12, RM13, RM14, RM15, S6, S7, R1, R2, P3, P6, P7, P8, P9, M1, M2).

Poza szeregiem ukierunkowanych badań nad interakcjami pierwiastków przygotowałam szereg opracowań dotyczących metabolizmu różnych pierwiastków, witamin, a także najnowszych osiągnięć medycyny i nowoczesnych substancji w niej stosowanych. Należą tu żywność funkcjonalna, nanozwiązki czy biomateriały.

Efektom mojej działalności są dwie monografie (M1, M2), w których zebrano obszernie informacje dotyczące podstaw biologii komórki czy mikrobiologii, ale także praktyczne aspekty pracy w laboratorium mikrobiologicznym.

Sylwia Terpiłowska