

### **Załącznik Nr 3**

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

## **Autoreferat**

**1. Imię i nazwisko:** Elżbieta Bruchajzer

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

1986-1991 studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej (od 2002 roku Uniwersytetu Medycznego) w Łodzi

19.08.1991 uzyskanie stopnia magistra farmacji w kierunku farmacji klinicznej  
Tytuł pracy magisterskiej wykonanej w Zakładzie Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi:  
*„Wpływ propranololu na parametry hemodynamiczne królików w znieczuleniu ogólnym”*

10.12.1999 uzyskanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych  
**Tytuł rozprawy doktorskiej wykonanej w Zakładzie Toksykologii, Katedry Toksykologii i Bromatologii, Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi:**  
*„Porównawcza ocena nefrotoksyczności bromobenzenu, heksabromobenzenu i ich wybranych metabolitów”.*

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

Przebieg pracy zawodowej:

04.11.1991-28.02.1992 asystent w Zakładzie Amin Biogennych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

01.03.1992-28.02.1993 asystent stażysta w Zakładzie Chemii Toksykologicznej (obecnie Zakład Toksykologii) Akademii Medycznej (obecnie Uniwersytet Medyczny) w Łodzi

01.03.1993-30.06.2000 asystent w Zakładzie Chemii Toksykologicznej Akademii Medycznej w Łodzi

01.07.2000- 30.09.2012 adiunkt w Zakładzie Toksykologii, Katedry Toksykologii i Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

od 01.10.2012 starszy wykładowca w Zakładzie Toksykologii, Katedry Toksykologii i Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

**4. Wskazane osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zmianami)**

a) Wykaz cyklu monotematycznych publikacji dotyczących *oceny toksycznego działania wybranych polibromowanych difenyloeterów na organizm szczura*.

Doświadczenia nad toksycznością polibromowanych difenyloeterów (PBDEs), które stały się tematem badań wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej zostały opublikowane w latach 2007-2012 w cyklu monotematycznych artykułów (pięć oryginalnych publikacji w pełnej wersji i jedna, która została opublikowana w materiałach konferencyjnych jako zrecenzowany krótki artykuł). Ich wykaz zamieszczono poniżej. W tekście zostały zacytowane przy użyciu cyfr rzymskich. W spisie publikacji podano współczynniki oddziaływania czasopisma (Impact Factor IF - ISI Journal Citation Report) oraz punktację KBN/MN i SW według Ujednoliconego Wykazu Czasopism Naukowych prowadzonego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego i zamieszczonego na stronie internetowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (stan na rok opublikowania).

**Wykaz publikacji:**

Lp.	Publikacja	Punktacja	
		IF	KBN/MN i SW
I	<u>Elżbieta Bruchajzer, Jadwiga A. Szymańska, Barbara Frydrych</u> : The disposition and excretion of pentabromodiphenyl ether after single administration in rat. <b>Organohalogen Comp.</b> 70, 1277-1280, 2008.		2
II	<u>Elżbieta Bruchajzer, Jadwiga A. Szymańska</u> : Toksyczność eteru dekabromodifenylowego w warunkach ekspozycji jednorazowej szczurów. <b>Bromat. Chem. Toksykol.</b> XL, 397-402, 2007.		4
III	<u>Elżbieta Bruchajzer, Barbara Frydrych, Stanisław Sporny, Jadwiga A. Szymańska</u> : Toxicity of penta- and decabromodiphenyl ethers after repeated administration to rats: a comparative study. <b>Arch. Toxicol.</b> 84, 287-299, 2010.	4,041	27
IV	<u>Elżbieta Bruchajzer, Barbara Frydrych, Stanisław Sporny, Jadwiga A. Szymańska</u> : The effect of short-term intoxication of rats with pentabromodiphenyl ether (in mimic commercial products). <b>Hum. Exp. Toxicol.</b> 30(5), 363-378, 2011.	1,722	20



V	Elżbieta Bruchajzer: Porphyrigenic effect of pentabromodiphenyl ether after repeated administration to rats. <b>Arch. Toxicol.</b> 85: 965-974, 2011	4,674	30
VI	Elżbieta Bruchajzer, Barbara Frydrych, Jadwiga A. Szymańska: Octabromodiphenyl ether – porphyrogenicity after repeated administration to rats. <b>Int. J. Occup. Med. Environ. Health</b> 25(4): 1-12, 2012	1,227	20
	<b>Łącznie</b>	11,714	103

Doświadczenia, których wynikiem jest ocena toksyczności trzech polibromowanych difenyloeterów była subsydiowana przez grant KBN Nr 6 PO5F 006 30 (którego byłam kierownikiem: *Toksykokinetyka i działanie toksyczne eteru pentabromodifenyloowego u szczura* (24.05.2006 - 23.11.2008 r.)) oraz dwie prace własne finansowane przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (Nr 502-13-166: *Badanie receptorowych mechanizmów działania toksycznego związków o znaczeniu środowiskowym* (2003-2005 r.) i Nr 502-13-482: *Toksyczność wybranych eterów polibromodifenyloowych na wątrobę szczurów* (2006-2008r.)).

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

W 2004 roku rozpoczęłam wstępne doświadczenia nad toksycznością polibromowanych difenyloeterów (PBDEs), które stały się tematem moich badań wchodzących w skład pracy habilitacyjnej pt.: „*Ocena toksycznego działania wybranych polibromowanych difenyloeterów na organizm szczura*”. Do podjęcia tych badań przyczyniło się kilka przesłanek. Wśród nich niebagatelną rolę odgrywał fakt, że związki te stanowią coraz większe zagrożenie dla środowiska naturalnego. Spowodowane to jest obecnością praktycznie nierozkładających się komercyjnych mieszanin polibromowanych difenyloeterów, używanych powszechnie od 1965 roku. Związki te zaliczono do trwałych zanieczyszczeń organicznych (ang. POPs – *Persistent Organic Pollutants*), które ze względu na globalną kontaminację środowiska mogą stać się w przyszłości znacznym problemem nie tylko środowiskowym. Wieloletnie stosowanie technicznych preparatów PBDEs jako środków zmniejszających palność oraz ich znaczna trwałość fizykochemiczna we wszystkich ekosystemach spowodowała m.in. zanieczyszczenie żywności (głównie pochodzenia zwierzęcego). Stwarza to realne zagrożenie dla zdrowia ludzi.

O narastających problemach spowodowanych przez polibromowane difenyletery świadczy także fakt, że Unia Europejska umieściła je na liście związków o priorytetowym znaczeniu dla szacowania ryzyka zdrowotnego ogólnej populacji, z zaleceniem przeprowadzenia dokładnych badań toksykologicznych. Informacje o PBDEs koncentrowały się dotychczas głównie na rozpoznaniu zagrożeń środowiskowych i ocenie poziomów tych związków w różnych elementach środowiska. Po stwierdzeniu, że związki te mogą gromadzić się w tkance tłuszczowej i z mlekiem ssaków dostawać się do młodych organizmów, prowadzono m.in. eksperymenty nad wpływem PBDEs na rozwój płodowy i neurobehawioralny młodych zwierząt. Istotnym elementem badań nad toksycznością PBDEs były także informacje o wpływie tych związków na funkcjonowanie tarczycy. Substancje te, podobnie jak inne POPs, zostały zaliczone do tzw. „*endocrine disruptors*” – związków zaburzających czynności endokrynne organizmu. Oksydacyjny metabolizm polibromowanych difenyleterów (poznany bliżej dla eterów o niższym stopniu ubromowania, np. dla eteru tetrabromodifenylowego) może wskazywać na możliwość indukcji szeregu enzymów wątrobowych. Problem ten w ostatnich latach coraz bardziej interesuje badaczy.

Powyższe przesłanki dały podstawę do sformułowania głównych celów badawczych, którymi były:

- 1) określenie kinetyki narastania i zaniku [<sup>3</sup>H] w tkankach i wydalinach szczura po jednorazowym podaniu [<sup>3</sup>H]-PentaBDE;
- 2) ocena charakteru działania toksycznego na wątrobę wybranych PBDEs na podstawie analiz poziomów cytochromów CYP 1A, CYP 2B i CYP 4A w wątrobie oraz sprawdzenie, czy badane związki mogą spowodować martwicze uszkodzenie wątroby (na podstawie wyników oznaczania aktywności enzymów wskaźnikowych ALAT i AspAT oraz oceny histopatologicznej);
- 3) sprawdzenie czy (i na ile) badane związki mogą zaburzać równowagę red-ox w organizmie szczura poprzez ocenę stężeń glutationu i MDA, aktywności GPx, GR, GST oraz poziomu całkowitej puli antyoksydacyjnej (TAS);
- 4) ocena porfirogennego działania wybranych eterów na podstawie oznaczeń poziomów porfiryn w moczu i wątrobie, zbadaniu ich wzajemnych proporcji, a także pomiaru aktywności ALA-D i ALA-S.

Główne cele badawcze miały posłużyć do zrealizowania nadrzędnego założenia, tj. wyznaczenia parametrów, takich jak: NOAEL, LOAEL, które byłyby przydatne do



wyznaczenia i/lub weryfikacji obowiązujących normatywów higienicznych (NDS, NDSCh, DSB).

Stosowane komercyjne preparaty PentaBDE i OktaBDE nie były czystymi substancjami, lecz mieszaninami polibromowanych difenylesterów. Od 2004 roku wprowadzono zakaz ich produkcji i stosowania, dlatego też do badań użyłam związków zsyntetyzowanych na zamówienie w Zakładzie Chemii Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej. Wykorzystywany w badaniach PentaBDE był zbliżony składem do stosowanych komercyjnych preparatów, znanych pod nazwami handlowymi Bromkal 70, DE-71, Saytex 115, Tardex 50. Stosowana przeze mnie mieszanina zawierała 63,2% eteru pentabromodifenyloвого. Do oceny toksyczności OktaBDE zsyntetyzowana mieszanina zawierała 65,7% eteru oktabromodifenyloвого. Skład ten różnił się od preparatów komercyjnych, znanych pod nazwami Bromkal 79-8DE, DE-79, Saytex 111, Tardex 80, które w swym składzie zawierały zazwyczaj tylko 25-36% eteru oktabromodifenyloвого, a znacznie więcej (ok. 42-62%) eteru heptabromodifenyloвого. Wykorzystane przeze mnie do badań mieszaniny PentaBDE i OktaBDE miały zbliżony udział odpowiednio: eteru pentabromodifenyloвого i oktabromodifenyloвого. Stanowiły one w przybliżeniu 2/3 składu badanych mieszanin.

#### Ad. 1.

Zaliczenie PBDEs do trwałych zanieczyszczeń organicznych wskazuje, że wśród wielu cech przypisanych tym związkom (bardzo słaba rozpuszczalność w wodzie, bardzo niska prężność par, duża trwałość fizykochemiczna) jest także wysoki współczynnik podziału oktanol-woda ( $\text{Log } K_{o/w}$ ). Sugeruje to możliwą kumulację ustrojową, co jest nierozdzielnie związane z charakterem przemian ustrojowych. W przypadku narażenia środowiskowej populacji generalnej, z jaką mamy do czynienia z PBDEs przyjmowanymi głównie z zanieczyszczoną żywnością, kinetyka wchłaniania i wydalania oraz efekty kumulacyjne są szczególnie istotne.

Dzięki uzyskanemu grantowi MNiSW (Nr 6PO5F 006 30), badania eteru pentabromodifenyloвого mogły być rozszerzone o eksperyment, w którym oceniana była toksykokinetyka tego związku. Rozmieszczenie [ $^3\text{H}$ ]-PentaBDE w organizmie wykazało, że po jednorazowym, dootrzewnym podaniu związku szczurom najwyższy poziom [ $^3\text{H}$ ] w osoczu osiągnięty został szybko – po 1-2 godzinach. Badanie rozmieszczenia narządowego [ $^3\text{H}$ ]-PentaBDE w ustroju szczura pozwoliło ustalić, że po 12 godz. najwyższe poziomy

znacznika były w tkance tłuszczowej, wątrobie, śledzionie, nerkach i płucach. Zanik znacznika izotopowego z osocza przebiegał dwufazowo, a wyliczone okresy połowicznego zaniku dla I i II fazy wynosiły odpowiednio: 12,6 i 346,6 godz. Najwyższe stężenie izotopu zanotowano w tkance tłuszczowej (ponad 30% podanej dawki po 5 dniach). Utrzymywało się ono jeszcze w 20. dniu po podaniu (ok. 15% dawki). PentaBDE wydalał się głównie z kałem (po 5 dniach prawie 45% podanej dawki), znacznie słabiej z moczem (ok. 7% dawki) (**publ. I** – recenzowany krótki artykuł).

Wyznaczone w doświadczeniu okresy połowicznego zaniku [<sup>3</sup>H] z osocza oraz długo utrzymujące się wysokie poziomy znacznika w tkance tłuszczowej wskazują na powolny obrót ustrojowy i możliwość biokumulacji PentaBDE u szczura.

## **Ad. 2.**

Ocena toksycznego działania trzech powszechnie stosowanych do niedawna polibromowanych difenylesterów na wątrobę prowadzona była przede mnie po jednorazowym (toksyczność ostra) i wielokrotnym (toksyczność podostra) podawaniu związków szczurom drogą dożołądkową, odpowiadającą narażeniu środowiskowemu ludzi. Zarówno po jednorazowym, jak i wielokrotnym podawaniu badanych związków nie stwierdziłam martwicy wątroby (aktywności AlAT i AspAT w surowicy nie odbiegały od wartości kontrolnych) (**publ. II, III, IV**). Badania histopatologiczne wskazywały na możliwość jej stłuszczenia po podaniu PentaBDE w najwyższych ze stosowanych dawek (2000 mg/kg m.c. po podaniu jednorazowym oraz 200 mg/kg/dzień po ekspozycji wielokrotnej) (**publ. III, IV**).

Działanie toksyczne ksenobiotyków może być związane z zaburzeniami w układzie monooksygenaz związanych z cytochromem P-450. Najczęściej dotyczą one selektywnej indukcji określonej formy molekularnej CYP-450. Zjawisko indukcji enzymatycznej najczęściej spowodowane jest wzrostem transkrypcji genów *CYP-450*. Szczególnie niebezpieczna z toksykologicznego punktu widzenia może być indukcja podrodziny genów *CYP 1A*, *CYP 2B* i *CYP 4A*. Nasilenie ekspresji genów *CYP 1A* powoduje indukcję enzymów mikrosomalnych CYP 1A i CYP 1A1, co może prowadzić – m.in. poprzez tworzenie epoksydów – do powstawania związków mutagennych i/lub kancerogennych. Zwiększona ekspresja genów *CYP 2B* i *CYP 4A* powoduje wzrosty aktywności CYP 2B i CYP 4A (wywołane działaniem niegenotoksycznych ksenobiotyków i/lub ich metabolitów). Może to zapoczątkować procesy proliferacji komórek, prowadzące do inicjacji procesów



nowotworowych. Z proliferacją komórek związany jest także wzrost względnej masy wątroby.

Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że PentaBDE jest silnym induktorem enzymów mikrosomalnych (**publ. III, IV**). Zarówno po jednorazowym, jak i wielokrotnym podawaniu tego związku zaobserwowałam znaczny wzrost względnej masy wątroby (dochodzący do 150% wartości kontrolnych) oraz zwiększenie stężenia sumy cytochromów P-450 w wątrobie. Analizy wykonane metodami spektrofluorymetrycznymi wykazały znaczne podwyższenie aktywności CYP 1A i CYP 2B w wątrobie szczura (wyrażone jako aktywności odpowiednio: O-dealkilazy 7-etoksyrezorufiny (EROD) i O-dealkilazy 7-pentoksyrezorufiny (PROD)). Analizy wykonane metodą Western-blot wykazały także, że PentaBDE jest silnym induktorem CYP 1A1. Związek ten indukował także CYP 4A. Przeprowadzone badania mogą sugerować, że PentaBDE jest induktorem mieszanego typu. Zwiększona aktywność CYP 1A i CYP 1A1 prawdopodobnie związana była z aktywnością receptora węglowodorów aromatycznych (AhR). Pozostałe dwa mechanizmy, związane z konstytutywnym receptorem androstanu (CAR, constitutive androstane receptor) i receptorem proliferacji peroksysomów (PPAR, peroxisome proliferator activated receptor) wydają się odgrywać decydującą rolę w indukcji odpowiednio: CYP 2B i CYP 4A. Indukcja CYP 1A/1A1 przez PentaBDE może wpływać na przemiany metaboliczne, prowadzące do powstania potencjalnych związków mutagennych i/lub kancerogennych (m.in. epoksydów). Indukcja CYP 2B i CYP 4A może pobudzać procesy proliferacji komórek, prowadzące do zainicjowania procesów kancerogennych.

Z przebadanych trzech polibromowanych difenyleterów najmniej toksyczny jest DekabDE – związek stosowany do tej pory jako substancja zmniejszająca palność. W przeciwieństwie do pozostałych dwóch eterów, nie powodował on wyraźnej, zależnej od dawki indukcji enzymów mikrosomalnych (**publ. II, III**).

Przeprowadzone przeze mnie analizy pozwoliły rozszerzyć ograniczoną do tej pory wiedzę o indukcyjnym działaniu PBDEs na wybrane izoformy cytochromu P-450 w wątrobie szczura. Dotychczasowy stan wiedzy na ten temat pochodził z badań prowadzonych przez niewielu autorów (Fowles, von Meyerinck, Zhou, Öberg).

### **Ad. 3.**

Wątroba spełnia szczególnie ważną rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu i w detoksykacji ksenobiotyków. Procesy te są uzależnione od intensywności

metabolizmu tlenowego. Zaobserwowana indukcja enzymów mikrosomalnych, mogąca powodować powstawanie przejściowych związków epoksydowych i pochodnych hydroksylowych, skłoniła mnie do przebadania PBDEs pod kątem wywoływania przez nie stresu oksydacyjnego. Wątroba – poprzez wiele różnych mechanizmów – jest zdolna do generacji reaktywnych form tlenu (RFT; ang. ROS – reactive oxygen species). Z drugiej strony posiada także wiele efektywnych systemów antyoksydacyjnych. W prawidłowych warunkach istnieje równowaga pomiędzy powstawaniem wolnych rodników a ich usuwaniem. Jednak jej zachwianie (np. w wyniku nasilenia wytwarzania reaktywnych form tlenu i/lub zmniejszenia aktywności antyoksydacyjnej) w kierunku reakcji utlenienia, prowadzi do stresu oksydacyjnego. W jego wyniku dochodzi do nasilenia peroksydacji lipidów, których głównym produktem jest MDA (dialdehyd malonowy). Stężenie MDA w organizmie wzrasta w warunkach zwiększonego wytwarzania wolnych rodników tlenowych. Powoduje to zmianę przepuszczalności błony komórkowej i w efekcie może spowodować śmierć komórki.

Dla oceny równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w organizmie szczura po podaniu wybranych polibromowanych difenyleterów, wykonałam oznaczenia szeregu wskaźników. W tym celu przeprowadziłam m.in. analizy stężeń zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG) glutationu w wątrobie oraz oznaczałam aktywności enzymów związanych z ich przemianami, takich jak: peroksydaza (GPx), reduktaza (GR) i transferaza glutationowa (GST).

W zatruciu ostrym eterem pentabromodifenyłowym zaobserwowałam przejściowe obniżenie stężenia zredukowanego glutationu, zwiększone stężenie utlenionego glutationu w wątrobie i zwiększoną aktywność peroksydazy glutationowej (enzymu związanego z przemianą GSH do GSSG) oraz – następującą nieco później – reakcję obronną organizmu, przejawiającą się niewielkim wzrostem aktywności reduktazy glutationowej (**publ. IV**).

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że zarówno jednorazowe, jak i wielokrotne podawanie PentaBDE wpłynęły na nasilenie stresu oksydacyjnego, o czym świadczyło m.in. zwiększenie stężenia MDA w wątrobie, występujące po najwyższych z podawanych dawek. Efekt ten może wtórnie prowadzić do działania hepatotoksycznego o typie stłuszczenia, które obserwowano w badaniach histopatologicznych. O zaburzeniach równowagi oksydacyjno-redukcyjnej świadczyło także obniżenie poziomu TAS (Total Antioxidant Status) w surowicy, które było zależne od dawki i czasu narażenia (**publ. III, IV**). Spośród przebadanych PBDEs tylko DekabDE nie nasilał stresu oksydacyjnego (**publ. II, III**).



Dostępne w literaturze dane, które potwierdziłyby wpływ PentaBDE na równowagę oksydacyjno-redukcyjną są bardzo ograniczone i pochodzą z lat 2009-2012. Nie jest wykluczone, że stres oksydacyjny może być także związany z toksycznością neurobehawioralną.

#### **Ad. 4.**

Indukcja cytochromów skłoniła mnie do przebadania wybranych PBDEs w kierunku ewentualnego niekorzystnego ich wpływu na syntezę porfiryn, podstawowego składnika hemu. Należy pamiętać, że hem związany z białkami tworzy hemoproteiny. Hemoproteinami są m.in. cytochromy i inne enzymy biorące udział w wielu przemianach komórkowych. W transporcie elektronów w łańcuchu oddychania wewnątrzkomórkowego uczestniczą m.in. cytochromy c i b, w aktywacji tlenu cząsteczkowego – cytochromy P-450, w aktywacji nadtlenu wodoru – peroksydazy.

Związki lipofilne w I fazie metabolizmu mogą ulegać przemianom oksydacyjnym, które najczęściej zachodzą przy udziale cytochromów P-450. Pociąga to za sobą zwiększone wykorzystanie hemu przez cytochromy P-450. Powoduje to zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia hemu. W wyniku sprzężenia zwrotnego przy obniżonym stężeniu hemu (końcowego produktu w szlaku syntezy), następuje przyspieszenie jego syntezy. Zostaje ono zapoczątkowane przez zwiększenie aktywności syntazy kwasu deltaaminolewulinowego – ALA-S (wątrobowego ALAS1). Indukcja cytochromów, związanych przede wszystkim z receptorami CAR, PXP (pregane xenobiotic receptor) i PPAR, prowadzi zatem do aktywacji transkrypcji ALAS1. Może to prowadzić do zaburzeń w syntezie porfiryn, które są niezbędne zarówno do powstawania cytochromów, jak i hemu.

Informacji na temat porfirogenego działania PBDEs dotychczas brakowało. Dane o wynikach badań PentaBDE, wykonanych przez Great Lake Chemical Corporation – jednego z producentów polibromowanych difenylesterów – były nieodstępne, a porfirogenne działanie OktaBDE nie było dotąd badane. W wieloetapowej biosyntezie hemu zasadniczą rolę odgrywają m.in. syntaza (ALA-S) i dehydrataza (ALA-D) kwasu delta-aminolewulinowego. Pomiar aktywności tych enzymów po wielokrotnym podawaniu PentaBDE i OktaBDE wskazywał na zaburzenia biosyntezy hemu przez te związki. Za porfirogennym działaniem przemawiały także wyraźnie zwiększone stężenia porfiryn w wątrobie i moczu oraz nasilone dobowe wydalanie porfiryn z moczem szczurów. Efekty te były zależne od

podawanych dawek i czasu narażenia na związki. Najniższą dawką, jaka powodowała niekorzystne zmiany była dawka 2 mg/kg/dzień (**publ. V, VI**).

Nasilenie stresu oksydacyjnego, będące wynikiem zaburzeń równowagi red-ox oraz indukcja cytochromów P-450 (**publ. III, IV**) mogą być ściśle związane z zaburzeniami syntezy hemu, a co za tym idzie mogą mieć wpływ na występowanie przewlekłej porfirii wątrobowej spowodowanej przez PentaBDE i OktaBDE. Jej efektem było m.in. zwiększenie stężenia porfiryn w moczu i nasilenie ich wydalania z moczem oraz gromadzenie się porfiryn (głównie wysokoukarboksylowanych) w wątrobie (**publ. V, VI**).

### *Podsumowanie*

Doświadczenia będące podstawą badań wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pozwoliły zwrócić uwagę na kilka problemów, które dotychczas nie były dokładnie wyjaśnione i poznane.

1. Zaobserwowany dwufazowy przebieg zaniku izotopu z osocza (o długim półokresie II fazy - 347 h) oraz wysokie i długo utrzymujące się poziomy znacznika w tkance tłuszczowej wskazują na powolny obrót ustrojowy i możliwość biokumulacji PentaBDE w organizmie szczura.
2. Wykonane eksperymenty wykazały, że PentaBDE i OktaBDE, które podawano szczurom przez miesiąc, są związkami zaburzającymi biosyntezę hemu. Silniejszą aktywność w tym względzie wykazywał PentaBDE.
3. Narażenie na PentaBDE spowodowało wystąpienie stresu oksydacyjnego, będącego efektem zaburzenia równowagi red-ox w organizmie.
4. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły także na poszerzenie aktualnej wiedzy na temat indukcyjnego działania PBDEs na wybrane cytochromy P-450. Wielokrotne podawanie PentaBDE wykazało, że związek ten można uznać za induktor enzymatyczny mieszanego typu, który działa prawdopodobnie poprzez receptory: AhR, CAR i PPAR. Świadczyły o tym podniesione poziomy CYP 1A, CYP 1A1, CYP 2B i CYP 4A. Po podawaniu szczurom PentaBDE zanotowano także objawy, które mogą wskazywać na proliferację peroksyosomów w wątrobie. Efekt ten jest zwykle charakterystyczny dla niegenotoksycznych ksenobiotyków i/lub ich metabolitów, które mogą zapoczątkować procesy proliferacji komórek.
5. Przebadane PBDEs nie spowodowały martwicy wątroby. Po wielokrotnym podawaniu PentaBDE stwierdzono zmiany stłuszczeniowe.



6. DekabDE nie działał toksycznie na szczury: nie powodował zaburzeń w równowadze red-ox i nie indukował cytochromów P-450.
7. Najniższą dawką, która powodowała efekty toksyczne była dawka 2 mg/kg/dzień, którą można przyjąć za LOAEL. Po wielokrotnym podaniu PentaBDE obserwowano wtedy: efekty świadczące o stresie oksydacyjnym (obniżenie TAS w surowicy), indukcję enzymów mikrosomalnych wątroby (wzrost aktywności CYP 1A i CYP 2B w wątrobie), działanie porfirogenne (wzrost aktywności ALA-S w wątrobie, zwiększenie stężenia porfiryn w moczu i nasilenie ich dobowego wydalania z moczem). Wielokrotne podawanie OktaBDE w dawce 2 mg/kg/dzień spowodowało działanie porfirogenne (wzrost stężenia porfiryn w wątrobie i moczu).
8. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń mogą być przydatne dla szacowania ryzyka zdrowotnego dla populacji generalnej. Dane te posłużyć mogą również do wyznaczenia i/lub weryfikacji normatywów higienicznych, takich jak: NDS, NDSCh, DSB, obowiązujących w warunkach narażenia zawodowego, które związane jest obecnie najczęściej z demontażem sprzętu elektrycznego i elektronicznego.

W ostatnim czasie byłam współautorką dwóch dokumentacji, na podstawie których Zespół Ekspertów Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy wyznaczył wartości NDS dla eteru pentabromodifenyloвого i oktabromodifenyloвого. Dokumentacje te i przyjęte wartości NDS opublikowano w 2012 roku (*Załącznik Nr 5: II.E.11 i II.E.12*).

Za cykl prac, w których opublikowałam wyniki badań dotyczących toksyczności PentaBDE i DekabDE na organizm szczura otrzymałam w 2011 roku Zespołową Nagrodę Naukową Rektora, a w roku 2012 Nagrodę Rektorską Indywidualną za pracę *Porphyrogenic effect of pentabromodiphenyl ether after repeated administration to rats*.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Poza przedstawionym powyżej cyklem sześciu publikacji (pięć oryginalnych publikacji w pełnej wersji i jedna, która została opublikowana w materiałach konferencyjnych jako zrecenzowany krótki artykuł), wybranych jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (ich łączna wartość **IF 11,714 i 103 punkty KBN/MN i SW**), w skład mojego dorobku naukowego wchodzi 29 innych publikacji. Wśród nich jest 16 prac oryginalnych i 13 poglądowych. Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam łącznie 25 prac naukowych, w tym 14 prac oryginalnych oraz 12 poglądowych o łącznym IF 17,37 i 174

punktach KBM/MN i SW. W dziewięciu pracach opublikowanych po doktoracie byłam pierwszym autorem (IF 13,956, 119 pkt. KBN/MN i SW).

Jestem także autorem lub współautorem 31 doniesień naukowych (z czego 23 po doktoracie) prezentowanych na polskich i międzynarodowych konferencjach i sympozjach naukowych (*Załącznik Nr 5: II.K.1 i III.B.1-30*).

Ponadto jestem autorem dwóch rozdziałów: „*Toksykometria*” i „*Wybrane związki aromatyczne*” w monografii „*Podstawy toksykologii. Kompendium dla studentów szkół wyższych*” pod redakcją Jerzego K. Piotrowskiego (wydanie I, 2006; wydanie II poprawione, 2008; Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa).

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

W czasie pracy w Zakładzie Amin Biogennych PAN w Łodzi, w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Wiesławę A. Fogel zapoznałam się m. in. z radioizotopowymi metodami analitycznymi, które wykorzystywano przy ocenie wpływu wybranych związków na poziomy MAO (monoaminooksydazy) i DAO (diaminooksydazy) w różnych tkankach.

Początki mojej pracy w Zakładzie Toksykologii związane były z badaniami dotyczącymi oceny toksyczności chlorowanych związków alifatycznych i bromopochodnych benzenu. Doświadczenia wykonane wtedy na myszach wskazywały na wpływ rytmu dobowego na hepatotoksyczność chloroformu (*Załącznik Nr 5, II.A.1*). Badania oceniające działanie bromobenzenu i jego polibromowanych pochodnych, w których brałam udział w latach 1994-1998, finansowane były przez dwa granty KBN (Nr 4 PO5D 068 08 i 4POF 018 12). Wyniki tych doświadczeń wykazały, że silnie martwicze działanie na wątrobę myszy wykazują bromobenzen oraz o- i m-dibromobenzeny. Po wyżej bromowanych benzenach siła działania nekrotycznego zmniejszała się, a wydłużenie czasu ekspozycji zmieniało kierunek działania toksycznego (zaburzenia syntezy porfiryn) (*Załącznik Nr 5: II.A.3 i II.A.4*). Martwica hepatocytów u szczurów po bromopochodnych benzenu była słabiej zaznaczona niż u myszy (*Załącznik Nr 5: II.A.3 i II.D.5*). Prowadzone w początkowych latach doświadczenia umożliwiły mi zapoznanie się z szeregiem biochemicznych metod analitycznych, w których wykorzystywano głównie analizy spektrofotometryczne oraz HPLC.

W późniejszych latach pracy zajęłam się badaniami dotyczącymi wpływu bromopochodnych aromatycznych na funkcję nerek. Porównawcza ocena nefrotoksyczności bromobenzenu, heksabromobenzenu i ich wybranych metabolitów (pentabromofenolu i 2-bromofenolu) po ekspozycji jednorazowej i wielokrotnej u szczurów była tematem mojej



rozprawy doktorskiej. Obserwacje biologiczne i wykonane analizy biochemiczne pozwoliły mi określić siłę działania toksycznego badanych związków na nerki. Dzięki przeprowadzonym eksperymentom mogłam zdobyć doświadczenie w prowadzeniu badań toksykometrycznych u zwierząt laboratoryjnych (m.in. z wykorzystaniem klatek metabolicznych dla pozyskiwania wydalanego materiału biologicznego). Badania, które prowadziłam w ramach pracy doktorskiej były częściowo finansowane przez KBN (grant promotorski Nr 4PO5F 029 16). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów opublikowałam w 5 pracach oryginalnych (*Załącznik Nr 5: II.A.2, II.D.2, II.D.3, II.D.4 i II.A.5*).

Rozprawę doktorską obroniłam 10 grudnia 1999 roku. Promotorem pracy była prof. dr hab. Jadwiga Szymańska, zaś recenzentami prof. dr hab. Jadwiga Jodynis-Liebert z Zakładu Toksykologii Akademii Medycznej w Poznaniu oraz prof. dr hab. Jerzy Brzeziński z Zakładu Toksykologii Akademii Medycznej w Warszawie. Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi, a w 2000 roku otrzymałam za nią Nagrodę Rektorską drugiego stopnia za działalność naukową.

**b) Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora (niezwiązana z habilitacją)**

W czasie mojej pracy zawodowej brałam także udział w doświadczeniach niezwiązanych z badaniami wchodzącymi w zakres habilitacji. W latach 2001-2003 w ramach grantu KBN (Nr 6 PO5A 081 21) uczestniczyłam w eksperymentach, oceniających wpływ wybranych halogenopochodnych benzenu na proliferację komórkową w wątrobie szczura. Efektem tych prac była m.in. publikacja, w której przedstawiono wpływ jednorazowego oraz wielokrotnego podawania heksabromobenzenu (HBB) i 1,2,4,5-tetrabromobenzenu (TetraBB) na indeksy inkorporacji [<sup>3</sup>H]-tymidyny i 5-bromo-deoksyurydyny (BrdU) w wątrobie szczurów (*Załącznik Nr 5: II.D.7*), co może być rozpatrywane jako wczesne wskaźniki indukcji nowotworów przez niegenotoksyczne substancje chemiczne. Podanie TetraBDE i HBB wywoływało nieznaczny wzrost inkorporacji jedynie po krótkim okresie narażenia (7-14 dni).

W późniejszym czasie brałam także udział w doświadczeniach badających wpływ wybranych halogenowych pochodnych benzenu (heksabromobenzenu i jego wybranych metabolitów: 1,2,4,5-tetrabromobenzenu, 1,2,4-tribromobenzenu i 1,3,5-tribromobenzenu) na równowagę oksydacyjno-redukcyjną, ocenianą m.in. poprzez poziom glutationu i enzymów związanych z jego przemianami (GPx i GST) (*Załącznik Nr 5: II.D.12 i II.A.7*).

W latach 2003-2005 w ramach pracy własnej finansowanej przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, dotyczącej receptorowych mechanizmów działania toksycznego związków o znaczeniu środowiskowym (Nr 502-13-166) prowadziłam badania nad wpływem wielokrotnego podawania HBB i 1,2,4,5-TetraBB na poziomy wybranych cytochromów w wątrobie szczurów. Przeprowadzony eksperyment wykazał wzrost poziomu sumy cytochromów P-450 (większy po TetraBB) oraz aktywności CYP 1A (większy po HBB) w wątrobie szczurów (*Załącznik Nr 5: II.A.6*).

W ramach współpracy z Zakładem Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi zaadaptowałam metodę oznaczania diterpenoidów (m.in. ferruginolu, salwipisonu, etiopinonu) z wykorzystaniem techniki HPLC. Metody ta posłużyła do oznaczania tych związków w kulturach korzeni transformowanych szalwii muszkatolowej (*Salvia sclarea*) (*Załącznik Nr 5: II.A.8 i II.A.9*).

#### **c) Prace pogładowe**

W latach 1999-2010 byłam współautorem 13 prac pogładowych. Miały one charakter ekspertyz dokumentacji naukowych i dotyczyły toksyczności 13 różnych związków chemicznych, a ich wynikiem są obowiązujące obecnie wartości normatywów higienicznych (takich, jak: NDS, NDSCh, DSB) (spis publikacji pogładowych: *Załącznik Nr 5: II.E.1-13*). Dwa z tych opracowań dotyczyły eterów: pentabromodifenyloвого (*Załącznik Nr 5: II.E.11*) i oktabromodifenyloвого (*Załącznik Nr 5: II.E.12*).

Ponadto jestem współautorem 5 dokumentacji dotyczących propozycji najwyższych dopuszczalnych stężeń (NDS) dla różnych substancji chemicznych. Opracowane one były dla Zespołu Ekspertów Międzyresortowej Komisji do spraw Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy.

#### **d) Uzyskane nagrody naukowe:**

1. Indywidualna Nagroda Naukowa Rektora drugiego stopnia – 2000 r.
2. Nagroda Rektora – Nagroda Dydaktyczna Zespołowa stopnia pierwszego - 2007 r.
3. Zespołowa Nagroda Naukowa Rektora drugiego stopnia za cykl publikacji dotyczących toksyczności wybranych polibromowanych difenyloeterów – 2011 r.
4. Indywidualna Nagroda Naukowa Rektora drugiego stopnia za publikację *Porphyrogenic effect of pentabromodiphenyl ether after repeated administration to rats* – 2012 r.

*Elżbieta Bruchajper*