
Autoreferat

Dr inż. Katarzyna Jolanta Dziendzikowska

Katedra Dietetyki

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2022

1. Imię i nazwisko

Katarzyna Jolanta Dziendzikowska

Nr ORCID: 0000-0002-8069-6356

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 2014 **doktor nauk rolniczych** 22.10.2014 – uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Podmiot nadający: Rada Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie.
Rozprawa doktorska *”Wpływ nanocząstek srebra na metabolizm steroidów w gonadach”*; promotor prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska,
recenzenci: prof. dr hab. Barbara Bilińska, prof. dr hab. Ewa Sawosz-Chwalibóg.
- 2009-2014 Studia doktoranckie na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie
- 2008-2009 Studia magisterskie na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie, kierunek technologia żywności i żywienia, Temat pracy magisterskiej: *„Rola czerwonego wina w regulacji metabolizmu hormonów steroidowych”* wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej. Data obrony pracy magisterskiej 13 lipca 2009.
- 2003-2008 Studia inżynierskie na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie, kierunek technologia żywności i żywienia, Temat pracy inżynierskiej: *„Rola błędów żywieniowych w etiologii nowotworów hormonozależnych u mężczyzn”* wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej. Data obrony pracy inżynierskiej 29 lutego 2008.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- 01-01-2015 – obecnie Adiunkt w Zakładzie Fizjologii Żywienia Katedry Dietetyki Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka (wcześniej Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji) SGGW w Warszawie

01-01-2015 – 31-12-2016 Asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Fizjologii Żywienia Katedry Dietetyki Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1 Tytuł osiągnięcia

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu, powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports o łącznym IF = 21.528 (na rok wydania) i punktacji MNiSW: 385 pkt. (105 pkt. według listy MNiSW z 2017 r. i 280 pkt. według listy MNiSW z 2021 r.) pod tytułem:

„Ocena wpływu wykorzystywanych w przemyśle spożywczym nanocząstek srebra na układ nerwowy, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów ich działania w hipokampie”.

4.2 Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

| Lp. | Autorzy publikacji, tytuł publikacji | Dane bibliograficzne | IF | Punkty MNiSW |
|--|---|--|---|---|
| P1. | <p>Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J., Lankoff A., Oczkowski M., Krawczyńska A., Chwastowska J., Sadowska-Bratek M., Chajduk E., Wojewódzka M., Dusinska M., Kruszewski M.</p> <p><i>Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats</i></p> | <p>Journal of Applied Toxicology, 2012. 32: 920–928; doi: 10.1002/jat.2758</p> | <p>na rok wydania (2012): 2.597</p> <p>aktualny (2021): 3.628</p> | <p>30 pkt.</p> <p>wg. części A wykazu czasopism naukowych MNiSW z dn. 25.01.2017 r.</p> |
| <p>Mój wkład w powstanie tej publikacji, której jestem autorem korespondencyjnym, polegał na udziale w modelowym badaniu <i>in vivo</i>, tworzeniu koncepcji analizy statystycznej oraz analizie statystycznej wyników, tworzeniu koncepcji manuskryptu i przygotowaniu wykresów i tabel</p> | | | | |

| | | | | |
|------------|---|--|---|---|
| | oraz tekstu manuskryptu do druku, jak również korespondencji z redakcją czasopisma. Mój udział w publikacji szacuję na 62% | | | |
| P2. | <p>Krawczyńska A., Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J., Lankoff A., Herman A.P., Oczkowski M., Królikowski T., Wilczak J., Wojewódzka M., Kruszewski M.</p> <p><i>Silver and titanium dioxide nanoparticles alter oxidative/inflammatory response and renin–angiotensin system in brain</i></p> | <p>Food and Chemical Toxicology, 2015, 85: 96–105; doi:10.1016/j.fct.2015.08.005</p> | <p>na rok wydania (2015): 3.584</p> <p>aktualny (2021): 5.572</p> | <p>40 pkt.</p> <p>wg. części A wykazu czasopism naukowych MNiSW z dn. 25.01.2017 r.</p> |
| | <p>Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w badaniu modelowym, tworzeniu koncepcji przeprowadzonych badań laboratoryjnych oraz koncepcji artykułu, analizie parametrów obrony antyoksydacyjnej, analizie statystycznej wyników, współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu do druku oraz w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.</p> <p>Mój udział w publikacji szacuję na 30%</p> | | | |
| P3. | <p>Węsierska M., Dziendzikowska K., Gromadzka-Ostrowska J., Dudek J., Polkowska-Motrenko H., Audinot J.N., Gutleb A.C., Lankoff A., Kruszewski M.</p> <p><i>Silver ions are responsible for memory impairment induced by oral administration of silver nanoparticles</i></p> | <p>Toxicology Letters, 2018, 290:133–144; doi:10.1016/j.toxlet.2018.03.019</p> | <p>na rok wydania (2018): 3.499</p> <p>aktualny (2021): 4.271</p> | <p>35 pkt.</p> <p>wg. części A wykazu czasopism naukowych MNiSW z dn. 25.01.2017 r.</p> |
| | <p>Mój wkład w powstanie tej publikacji, której jestem autorem korespondencyjnym, polegał na tworzeniu koncepcji przeprowadzonych badań, przeprowadzeniu badania modelowego <i>in vivo</i>, współudziale w przeprowadzeniu badań behawioralnych, wykonaniu analiz</p> | | | |

| | | | | |
|-----|--|---|--|--|
| | laboratoryjnych, analizie statystycznej wyników, współudziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu do druku i korespondencji z redakcją czasopisma. Mój udział w publikacji szacuję na 30% | | | |
| P4. | Dziendzikowska K. , Węsierska M., Gromadzka-Ostrowska J., Wilczak J., Oczkowski M., Męczyńska-Wielgosz S., Kruszewski M. <i>Silver Nanoparticles Impair Cognitive Functions and Modify the Hippocampal Level of Neurotransmitters in a Coating-Dependent Manner</i> | International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23), 12706; doi:10.3390/ijms222312706 | na rok wydania (2021): 6.208 aktualny (2021): 6.208 | 140 pkt. wg. części A wykazu czasopism naukowych MEiN z dn. 01.12.2021 r. |
| | Mój wkład w powstanie tej publikacji, której jestem autorem korespondencyjnym, obejmował tworzenie koncepcji przeprowadzonych badań <i>in vivo</i> , przeprowadzenie badania modelowego <i>in vivo</i> i współudział w przeprowadzeniu badań behawioralnych. Jednocześnie mój wkład w powstanie tej publikacji obejmował zaprojektowanie koncepcji badań biochemicznych i uzyskanie środków na ich realizację w ramach zadania badawczego MINIATURA I finansowanego przez NCN, wykonanie analiz biochemicznych i analizy statystycznej uzyskanych wyników, przygotowanie wykresów i tabel, przygotowanie tekstu manuskryptu do druku i korespondencję z redakcją czasopisma. Mój udział w publikacji szacuję na 70% | | | |
| P5. | Dziendzikowska K. , Wilczak J., Grodzicki W., Gromadzka-Ostrowska J., Węsierska M., Kruszewski M. <i>Coating-Dependent Neurotoxicity of Silver Nanoparticles—An In Vivo Study on Hippocampal Oxidative Stress and Neurosteroids</i> | International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3), 1365; doi:10.3390/ijms23031365 | na rok wydania (2021): 6.208 aktualny (2021): 6.208 | 140 pkt. wg. części A wykazu czasopism naukowych MEiN z dn. 01.12.2021 r. |

| | |
|--|---|
| | <p>Mój wkład w powstanie tej publikacji, której jestem autorem korespondencyjnym, obejmował tworzenie koncepcji przeprowadzonych badań <i>in vivo</i>, przeprowadzenie badania modelowego <i>in vivo</i>. Jednocześnie mój wkład w powstanie tej publikacji obejmował zaprojektowanie koncepcji badań biochemicznych i uzyskanie środków realizację w ramach zadania badawczego MINIATURA I finansowanego przez NCN, współudział w przeprowadzeniu badań biochemicznych, w tym wykonanie badań ekspresji genów oraz analizy statystycznej uzyskanych wyników, przygotowaniu wykresów i tabel, przygotowaniu tekstu manuskryptu do druku i korespondencji z redakcją czasopisma.</p> <p>Mój udział w publikacji szacuję na 75%</p> |
| | <p>Poniżej przedstawiono podsumowanie wybranych wskaźników bibliometrycznych artykułów wchodzących w skład cyklu:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sumaryczny Impact Factor (IF)* czasopism, w których ukazały się artykuły stanowiące osiągnięcie naukowe: na rok wydania artykułu – 21.528, aktualny – 25.887. * dane na podstawie bazy Journal Citation Reports (https://jcr.clarivate.com/jcr/browse-journals), dostęp dn. 03.08.2022 • Suma punktów według punktacji MNiSW/MNiE wynosi 385 (wg listy MNiSW z dn. 25.01.2017 r. dla artykułów wydanych przed 2019 r, lub listy MEiN z dn. 01.12.2021 r. dla artykułów wydanych po 2019 r.). • Łączna liczba cytowań artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe w bazie : <ul style="list-style-type: none"> - Web of Science (dostęp dn. 03.11.2022 r.): 228 - Scopus (dostęp dn. 03.11.2022 r.): 250 |

Oświadczenia współautorów zawierające opis wkładu oraz procentowy udział w powstanie publikacji znajdują się w Załączniku 6.

4.3 Omówienie problematyki, celu i uzyskanych wyników prac stanowiących osiągnięcie naukowe.

4.3.1 Uzasadnienie tematyki badań

Nanotechnologia należy do najintensywniej rozwijających się dziedzin nauki i techniki, której postęp możliwy jest dzięki osiągnięciom technologicznym wprowadzonym w ubiegłym stuleciu. Dzięki wielkiemu potencjałowi aplikacyjnemu nanotechnologia okazuje się obiecującym rozwiązaniem wkraczającym

z produktami o istotnej wartości użytkowej w niemalże każdy aspekt ludzkiego życia. Małe rozmiary nanocząstek nadają nanostrukturom szereg unikalnych właściwości, dzięki którym wachlarz ich zastosowań jest niezwykle szeroki (Sarkar i wsp., 2022). Najpowszechniej wykorzystywanym w produktach konsumenckich rodzajem nanomateriałów jest srebro, które charakteryzuje się silnym i skutecznym potencjałem przeciwdrobnoustrojowym oraz korzystnymi właściwościami elektrycznymi i optycznymi (Khan i wsp., 2019). Ze względu na te pożądane cechy fizykochemiczne nanosrebro stosowane jest w produktach higienicznych, kosmetykach, tekstyliach, zabawkach oraz w przemyśle spożywczym (Yaqoob i wsp., 2020).

W ciągu ostatniej dekady systemy wykorzystujące nanocząstki srebra znajdują szczególnie szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu i przetwórstwa żywności, w tym przy produkcji powłok sprzętów i narzędzi, opakowań do żywności i oczyszczaniu wody. Jednocześnie intensywny rozwój i powszechne użytkowanie produktów zawierających srebro w formie nanocząstek w licznych aplikacjach biomedycznych i konsumenckich zwiększa akumulację tego nanomateriału w środowisku, skutkując przy tym niezamierzoną i niekontrolowaną ekspozycją na nanosrebro, głównie drogą pokarmową (Deshmukh i wsp., 2019). Budzi to poważne obawy o wpływ tego nanomateriału na organizm człowieka. Wyniki badań wskazują, że wpływ ten może być szkodliwy szczególnie w stosunku do kluczowego dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Zróżnicowane struktury OUN nie tylko koordynują funkcje życiowe, ale także odpowiadają za zdolność do uczenia się czy formowania i funkcjonowania różnych rodzajów pamięci. Wśród potencjalnych mechanizmów neurotoksycznego działania nanocząstek srebra na OUN, które wiąże się z akumulacją tego pierwiastka w mózgu, wskazuje się na uwalnianie jonów srebra, w wyniku czego może dochodzić do indukcji stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. Aktywacja tych procesów ma potencjalnie bezpośredni wpływ na plastyczność neuronalną, która odpowiada za pamięć i procesy poznawcze.

4.3.2 Wprowadzenie i cel naukowy

Pomimo znacznej poprawy higieny i świadomości zdrowotnej współczesnych społeczeństw, którą obserwuje się w wielu dziedzinach działalności człowieka, w tym w przemyśle spożywczym i rolnictwie, choroby infekcyjne są nadal istotnym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. Mikroorganizmy, głównie bakterie i grzyby, są ważnymi czynnikami decydującymi o bezpieczeństwie żywności powodując jej psucie, a więc stanowiąc poważne zagrożenie dla zdrowia konsumentów (Panghal i wsp., 2018). Jednocześnie w związku z intensywnymi zmianami socjo-ekonomicznymi w krajach wysokorozwiniętych odnotowuje się zmiany preferencji rynkowych. Przejawem tego jest znaczny wzrost zainteresowania żywnością o cechach prozdrowotnych, wysokiej jakości, nisko przetworzoną, łatwą w przygotowaniu

i jednocześnie charakteryzującą się wydłużoną przydatnością do spożycia (Deshmukh i wsp., 2019). Zapewnienie odpowiedniej jakości zdrowotnej, atrakcyjności i innowacyjności produktów spożywczych jest więc wyzwaniem dla współczesnych producentów żywności i artykułów przeznaczonych do kontaktu z żywnością zarówno wykorzystywanych w przedsiębiorstwach sektora rolno-spożywczego, jak i w gospodarstwach domowych. W odpowiedzi na te oczekiwania wysiłki producentów koncentrują się na poszukiwaniu metod i materiałów pozwalających na wydłużenie okresu świeżości żywności i jej przydatności do spożycia, między innymi na skutek zahamowania rozwoju bakterii oraz zapobiegania lub opóźniania przebiegu procesów psucia się żywności, które są konsekwencją zmian zachodzących w trakcie jej przetwarzania i przechowywania. Dlatego wraz z pojawieniem się wyników coraz liczniejszych badań naukowych dedykowanych powyższym zagadnieniom i obserwowaną w ciągu ostatniej dekady transformacją obszaru rolno-spożywczego nastąpił ogromny postęp w rozwoju różnych materiałów o działaniu bakteriobójczym, wśród których znaczącą rolę odgrywają nanomateriały (Ali i wsp., 2020).

Występujący w terminach związanych z nanotechnologią przedrostek nano- pochodzi od greckiego słowa *nanos* (pol. karzeł) i odnosi się do jednostki długości – nanometra, który w układzie SI opisuje miliardową część metra. Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ISO) definiuje nanomateriał jako „materiał o dowolnym wymiarze zewnętrznym w nanoskali lub posiadający strukturę wewnętrzną lub strukturę powierzchni w nanoskali”, czyli zbudowaną z cząstek o rozmiarach mieszczących się w granicach 1-100 nanometrów (nm) (Gottardo i wsp., 2021). Materiały o takich rozmiarach cząstek mają zwiększony stosunek pola powierzchni do objętości oraz zwiększoną gęstość elektronową, co skutkuje wyższą reaktywnością atomów powierzchniowych w porównaniu z mikrometrowymi odpowiednikami o tej samej masie (Xu i wsp., 2018). Spośród takich materiałów najpowszechniej stosowane w przemyśle spożywczym jest nanosrebro, które cechuje się właściwościami bójczymi w stosunku do różnych mikroorganizmów, takich jak bakterie, grzyby i wirusy, a także wysoką stabilnością w warunkach przetwarzania żywności (Deshmukh i wsp., 2019).

Nanocząstki srebra (AgNPs), dzięki rozmiarom mieszczącym się w nanoskali, charakteryzują się unikalnymi właściwościami, w tym głównie aktywnością drobnoustrojobójczą, wysokim przewodnictwem elektrycznym i cieplnym, stabilnością termiczną, a także wysoką rozpuszczalnością w roztworach wodnych, co czyni z nich materiał niezwykle atrakcyjny (Akter i wsp., 2018). Kierunki wykorzystania AgNPs w przemyśle spożywczym obejmują produkcję opakowań, żywności funkcjonalnej i suplementów diety, a także zastosowania w rolnictwie oraz oczyszczaniu wody, które bazują głównie na silnej aktywności przeciwbakteryjnej wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich (Flores-López i wsp., 2018; He i wsp., 2019). Produkty i kompozyty zawierające AgNPs stosowane są również w urządzeniach medycznych, farmakologii, biotechnologii, elektronice, inżynierii, energetyce, a także zyskały popularność

w innych sektorach przemysłowych, w tym produkcji tekstyliów, zabawek, artykułów higienicznych, kosmetyków, farb, powłok urządzeń AGD oraz odzieży (Akter i wsp., 2018).

Intensywne zastosowanie AgNPs w różnych produktach przemysłowych i konsumenckich skutkuje wzrostem ich uwalniania i akumulacji tego nanomateriału w środowisku naturalnym, prowadząc do wzrostu bezpośredniej i pośredniej ekspozycji na AgNPs ludzi i zwierząt, m.in. zwierząt gospodarskich. Drogi narażenia organizmów na AgNPs to głównie droga pokarmowa i oddechowa. Z tego powodu intensywne wykorzystanie nanosrebra rodzi konieczność dokładnej oceny jego bezpieczeństwa dla organizmów i środowiska naturalnego. Wyniki licznych badań wskazują, że ze względu na zwiększone wykorzystanie AgNPs w wielu gałęziach przemysłu stężenie srebra wzrasta w glebie i w wodzie, gdzie wynosi odpowiednio 22,7 ppm i 0,76 ppm (Akter i wsp., 2018). Doustna droga ekspozycji uważana jest za jedną z najbardziej krytycznych dróg oddziaływania nanocząstek obecnych w środowisku, a także jest drogą odpowiadającą narażeniu wynikającemu z zastosowania nanosrebra w przemyśle spożywczym i rolnictwie (Lamas i wsp., 2020). Pomimo trudności w szacowaniu rzeczywistego poziomu narażenia człowieka na nanosrebro dane literaturowe wskazują, że poziom ten może wynosić 1,3–2,7 µg/kg masy ciała/dzień dla osób dorosłych i 1,6–3,5 µg/kg masy ciała /dzień w przypadku dzieci (Ghebretatios i wsp., 2021). Li i wsp. (2019) podaje natomiast, że dzienne sumaryczne pobranie srebra u ludzi waha się od 0,4 do nawet 90 µg w zależności od wielkości bezpośredniej konsumpcji produktów zawierających AgNPs i pośredniego narażenia wynikającego ze spożycia żywności i wody skażonych srebrem uwalnianym przez produkty i kompozyty je zawierające. Autorzy ci podkreślają, że konsekwencją tego procesu jest znaczna podaż AgNPs do przewodu pokarmowego, co rodzi konieczność odpowiedniego zbadania potencjalnej toksyczności tego nanomateriału. Jednocześnie dane Światowej Organizacji Zdrowia wskazują, że dawka srebra niewywołująca możliwych do zauważenia negatywnych skutków zdrowotnych (NOAEL) wynosi 10 g w ciągu całego życia, co szacunkowo odpowiada ilości 5 µg/kg masy ciała/dzień (WHO, 2003). Według danych naukowych wartość tolerowanego dziennego spożycia (TDI) dla ludzi ma wartość znacznie wyższą, wynoszącą 2,5 mg/kg m.c. (Hadrup i Lam, 2014). W badaniach modelowych na zwierzętach dawkę NOAEL dla AgNPs w ekspozycji *per os* wyznaczono na 30 mg/kg m.c. (Kim i wsp., 2008; Jeong i wsp., 2010; Kim i in., 2010). Dawka ta u ludzi została potwierdzona przez Mungera i wsp. (2014). Badacze ci u zdrowych ochotników nie stwierdzili istotnych klinicznie zmian parametrów metabolicznych i hematologicznych oraz markerów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego po dwutygodniowym, codziennym przyjmowaniu suplementu zawierającego nanosrebro w dawce 32 mg/kg masy ciała.

Niepokój dotyczący skutków zdrowotnych ekspozycji na AgNPs znajduje uzasadnienie w wynikach badań toksykologicznych. Wysoki stosunek powierzchni do objętości, który korzystnie zmienia właściwości powierzchniowe i antybakteryjne AgNPs, zwiększa również zdolność tych nanocząstek do

interakcji z płynami ustrojowymi, w tym z osoczem krwi, śliną i śluzem, a także z komórkami ludzkiego organizmu (Akter i wsp., 2018). Doświadczenia *in vitro* wskazują, że AgNPs mogą indukować geno- i cytotoksyczność, wywoływać odpowiedź immunologiczną i apoptozę w komórkach wątroby, płuc, krwi oraz układu immunologicznego i nerwowego (Rezvani i wsp., 2019). Wyniki badań *in vitro* znajdują potwierdzenie w badaniach modelowych na zwierzętach, które to badania wykazały, że ekspozycja na AgNPs indukuje dysfunkcje narządów wewnętrznych, w tym wątroby, nerek, śledziony oraz przewodu pokarmowego, ulegając akumulacji w tych narządach, co skutkuje działaniem toksycznym (Ivlieva i wsp., 2022). Szczególny niepokój budzą doniesienia o neurotoksycznym działaniu AgNPs. Dane literaturowe wskazują, że nanocząstki dzięki swoim rozmiarom zbliżonym do wielkości organelli komórkowych mają zdolność przekraczania barier biologicznych, w tym także bariery krew-mózg, poprzez transcytozę z komórek śródbłonna naczyń włosowatych do mózgu, gdzie mogą ulegać akumulacji (Akter i wsp., 2018). Skutkami deponowania AgNPs w mózgu jest neurotoksyczność, która związana jest z indukcją apoptozy neuronów, nasileniem stresu oksydacyjnego i odpowiedzią prozapalną. W konsekwencji narażenia na nanosrebro mogą pojawić się zaburzenia funkcji mózgu, w tym zdolności poznawczych i pamięci (Strużyńska i Skalska, 2018; Ge i wsp., 2019; Janzadeh i wsp., 2021).

Zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego, przede wszystkim w postaci schorzeń neurorozwojowych i neurodegeneracyjnych, stanowią niezwykle poważny problem współczesnej medycyny. Światowa Organizacja Zdrowia alarmuje wskazując, że wynikająca z neurodegeneracji demencja jest przyczyną co piątego zgonu na całym świecie. Biorąc pod uwagę postępujące starzenie się populacji krajów rozwiniętych można oczekiwać, że skala tych zjawisk będzie w najbliższym czasie coraz większa. Opisane w literaturze mechanizmy toksyczności AgNPs obejmują uwalnianie jonów srebra i zwiększone wytwarzanie wolnych rodników, syntezę i wydzielanie cytokin prozapalnych oraz apoptozę neuronów. Zjawiska te są jednocześnie wymieniane wśród mechanizmów leżących u podłoża chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona oraz choroba Alzheimera (Salim, 2017). Z tego powodu konieczne jest dokładne zbadanie czynników środowiskowych przyczyniających się do rozwoju zmian neurodegeneracyjnych, a wiele wskazuje na to, że jednym z nich jest ekspozycja na nanosrebro.

Dane literaturowe sugerują, że właściwości fizykochemiczne nanocząstek są jednym z kluczowych czynników determinujących ich losy w organizmie (Akter i wsp., 2018; Chen i wsp., 2021). Do cech wpływających na reaktywność i toksyczność nanomateriałów zaliczyć można wielkość cząstek, ich skład pierwiastkowy, ładunek powierzchniowy, tendencję do agregacji i zastosowany w celu stabilizacji tzw. materiał opłaszczający, czyli pokrywający powierzchnię nanocząstek. Wszystkie wspomniane czynniki determinują biodystrybucję narządową i tkankową nanocząstek i ich wychwyt przez komórki (Chen i wsp., 2021; Cunningham i wsp., 2021; Wang i wsp., 2021).

Ponieważ zastosowanie AgNPs w produkcji żywności i innych gałęziach przemysłu, a tym samym w produktach konsumenckich jest znaczne i ma tendencję zwyżkową, istnieje konieczność dokładnej oceny ryzyka narażenia na jego działanie organizmów i środowiska naturalnego, a więc bezpieczeństwa tak powszechnego stosowania nanosrebra. Szczególną uwagę należy zwrócić na ryzyko szkodliwego działania na skutek narażenia na AgNPs dostające się do organizmu przez przewód pokarmowy z żywnością i/lub wodą pitną. Takie założenie stanowiło podstawę hipotez badawczych, które postanowiłam zweryfikować badaniami prowadzonymi na modelu zwierzęcym.

Hipotezy jakie postawiłam, a które wpisują się w zakres wiedzy dyscypliny naukowej „technologia żywności i żywienia”, są następujące:

1. **AgNPs, niezależnie od drogi podania, skutkują nagromadzeniem srebra w mózgu, szczególnie w jednej ze struktur tego narządu – hipokampie;**
2. **Niewielkie dawki AgNPs podawane przez przewód pokarmowy upośledzają funkcje poznawcze;**
3. **Mechanizmy neurotoksycznego działania AgNPs w hipokampie polegają na zaburzeniu równowagi redoks oraz zmianach syntezy i metabolizmu neurotransmiterów i neurosteroidów, co jest spowodowane uwalnianiem z powierzchni tych nanocząstek jonów srebra;**
4. **Rodzaj materiału zastosowanego do stabilizacji powierzchni AgNPs moduluje neurotoksyczność tych nanocząstek w hipokampie.**

Dane dotyczące toksycznego wpływu nanocząstek na funkcje ośrodkowego układu nerwowego w momencie rozpoczynania badań wchodzących w zakres mojego osiągnięcia habilitacyjnego były bardzo ograniczone, a mechanizmy odpowiedzialne za neurotoksyczność nanocząsteczek bardzo słabo poznane, co skłoniło mnie do zajęcia się tą tematyką. Na podstawie przeglądu literatury wskazującej na toksyczność nanocząstek srebra w różnych narządach realizowałam badania, których **celem była weryfikacja postawionych hipotez badawczych, w tym określenie neurotoksycznego potencjału nanocząstek srebra w badaniach modelowych, w których nanocząstki podawano drogą dożylną (AgNPs o różnej średnicy cząstek i w różnych dawkach - badania wstępne) oraz drogą pokarmową (AgNPs w różnych dawkach i o różnej funkcjonalizacji powierzchni - badania właściwe) oraz ich wpływu na zdolności poznawcze zwierząt modelowych. Dodatkowym celem badań była próba wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za toksyczność nanosrebra w układzie nerwowym.**

Cele szczegółowe badań:

1. Wskazanie potencjalnych narządów docelowych akumulacji srebra po dożylnym podaniu cząstek srebra (20 nm i 200 nm) oraz określenie zdolności nanosrebra (20 nm), podawanego drogą pokarmową, do akumulacji w wybranych strukturach mózgu zwierząt modelowych.
2. Ewaluacja, w badaniu modelowym, potencjalnych neurotoksycznych skutków systemowego (podanego do krążenia krwi) narażenia na działanie cząstek srebra o różnej wielkości (20 nm i 200 nm), ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na indukcję stresu oksydacyjnego, odpowiedzi zapalnej i elementy układu renina-angiotensyna w mózgu szczurów.
3. Ocena wpływu ekspozycji na różne dawki nanosrebra, w tym wybranej dawki nanocząstek o różnej funkcjonalizacji powierzchni, na aktywną allotetyczną (wzrokową) pamięć przestrzenną, wymagającą koordynacji poznawczej u zwierząt modelowych, którym nanosrebro podawano do przewodu pokarmowego.
4. Ocena mechanizmów działania nanocząstek srebra, w szczególności zbadanie wpływu nanosrebra o różnej funkcjonalizacji powierzchni zastosowanej w celu jego stabilizacji, na stężenie neuroprzekazników, indukcję stresu oksydacyjnego i metabolizm neurosteroidów w hipokampie, który jest strukturą mózgu odpowiedzialną za pamięć przestrzenną i procesy poznawcze.

4.3.3 Materiały i metody

Nanocząstki srebra

W badaniach oceny neurotoksyczności nanocząstek srebra wykorzystano sferyczne cząstki srebra o różnej wielkości i różnej funkcjonalizacji powierzchni. Cząstki srebra o średnicy nominalnej 20 nm (nanocząstki srebra (AgNPs)) oraz 200 nm (submikronowe cząstki srebra (AgSMPs)), które opłaszczono albuminą surowicy bydlęcej (BSA) zostały zakupione w firmie PalsmaChem GmbH (PalsmaChem GmbH, Berlin, Niemcy). Opłaszczony cytrynianem sodu AgNPs o średnicy 20 nm zakupiono w NanoComposix (San Diego, CA, USA). Nanocząstki wyprodukowane przez firmę NanoComposix wykorzystano także do wytworzenia AgNPs opłaszczonych przez glikol polietylenowy (PEG). Przygotowanie oraz charakterystyka cząstek srebra została wykonana przez Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie.

Podstawowe dane dotyczące właściwości fizykochemicznych wykorzystywanych cząstek srebra zamieszczono w tabeli nr 1.

Tabela 1. Porównanie właściwości fizykochemicznych cząstek srebra zastosowanych w badaniach *in vivo*.

| | BSA-AgSMPs | BSA- AgNPs | PEG- AgNPs | Cit- AgNPs |
|---------------------------------|-------------|------------|--------------|--------------|
| Nominalna wielkość (nm) | 200 ± 50 | 20 ± 5 | 25 ± 5 | 25 ± 5 |
| Średnica hydrodynamiczna (nm) | 422,4 ± 6,3 | 84.4 ± 3.7 | 58.3 ± 6.5 | 27.5 ± 5.6 |
| Indeks polidispersyjności (PDI) | 0,328 | 0.295 | 0.144 ± 0.06 | 0.308 ± 0.05 |
| Potencjał Zeta (mV) | -37,5 | -33.6 | -30.2 | -32.5 |

BSA - albumina surowicy bydłej; PEG - glikol polietylenowy; Cit - cytrynian sodu
AgNPs – nanocząstki srebra; AgSMPs – submikronowe cząstki srebra

Badania modelowe *in vivo*:

Eksperymenty *in vivo* wykonano na dorosłych samcach szczurów Wistar (Wistar Cmd: WI(WU), którym podawano AgNPs.

W eksperymencie I podawano jednorazowo dożylnie AgNPs 20 nm w dawce 5 lub 10 mg/kg m.c. lub submikronowe cząstki srebra (AgSMPs) o średnicy 200 nm w dawce 5 mg/kg m.c. Ekspozycja na działanie AgNPs trwała 24. godziny lub 7 lub 28 dni. Materiałem biologicznym były różne narządy, w tym wątroba, śledziona, nerki, płuca i mózg.

W eksperymencie II przez 5 dni w tygodniu w ciągu 4. kolejnych tygodni podawano szczurom sondą dożołądkową dawkę 30 lub 1 mg/kg m.c. AgNPs o średnicy 20 nm. Eksperyment składał się z 5 faz: (1) okres adaptacyjny; (2) okres podawania AgNPs (28 dni); (3) okres przyzwyczajania zwierząt do procedury testu unikania miejsca; (4) trening nabywania pamięci przestrzennej w teście unikania miejsca (5 dni); (5) test przywoływania pamięci wykonywany 4 dni po zakończeniu treningu w teście unikania miejsca. Po zakończeniu testów behawioralnych pobrano przednią i boczną część kory mózgowej, hipokamp i mózdzek.

W eksperymencie III szczurom przez 5 dni w tygodniu w ciągu 4. kolejnych tygodni podawano sondą dożołądkową dawkę 0,5 mg/kg m.c. AgNPs 20 nm o różnym opłaszczeniu powierzchni: BSA, cytrynian, PEG lub jony srebra. Po zakończeniu testów behawioralnych pobrano hipokamp, w którym wykonano analizy molekularne i biochemiczne.

Na wszystkie procedury wykonywane w eksperymentach uzyskano zgodę odpowiednio III i I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (Uchwała nr 9/2008 i 788/2015).

Test Aktywnego Unikania Miejsca (TAUM) – badanie zdolności uczenia się, nabywania i funkcjonowania pamięci przestrzennej

W celu zbadania zdolności uczenia się i funkcjonowania allotetycznej pamięci przestrzennej u zwierząt modelowych podczas doświadczenia II i III przeprowadzono trening aktywnego unikania miejsca. Do treningu służyła gładka, aluminiowa, okrągła arena o średnicy 82 cm. Arena obracała się z prędkością 1 obr/min. Wejściu na określony 60° obszar areny, którego położenie było określone komputerowo względem odległych bodźców z pokoju, towarzyszyło podanie słabego impulsu elektrycznego (szoku) na łapy szczura. Impuls ten o intensywności 0,2 mA trwał 0,5 sekundy (s) i był powtarzany co 3 s., jeżeli zwierzę wcześniej nie opuściło tego obszaru. W związku z aranżacją miejsca podawania szoków względem bodźców z pokoju bodźce z areny były mylące, gdyż nieustannie zmieniało się ich położenie względem bodźców z pokoju.

Podczas treningu aktywnego unikania miejsca zadaniem szczura było zapamiętanie, a następnie unikanie tego miejsca areny, którego lokalizacja w danym momencie znajdowała się w określonej konfiguracji względem pokoju gdzie podawany był impuls elektryczny. Miejsce to pozostawało w stałej lokalizacji w odniesieniu do stałych, odległych, użytecznych bodźców z pokoju, natomiast w zmiennej lokalizacji w odniesieniu do bodźców z areny (Pokój+, Arena-) (arena znajdowała się w oświetlonym pomieszczeniu i obracała się z prędkością 1 obrót/min). Poprawne wykonanie tego zadania wymagało od szczura wykorzystania użytecznych bodźców z pokoju (Pokój+) przy równoczesnym aktywnym odrzucaniu mylących bodźców z areny (Arena-). W trakcie kolejnych dni treningu zachodził proces tworzenia reprezentacji przestrzennej obszaru, którego należy unikać. W czasie każdej sesji treningowej poprawne wykonanie zadania, czyli unikanie miejsca z szokiem, wymagało bieżącej segregacji przydatnych informacji z pokoju od wprowadzających w błąd informacji z areny. Angażowało to pamięć przestrzenną i towarzyszące jej procesy koordynacji poznawczej.

Nabywanie pamięci przestrzennej odbywało się przez 5 dni podczas 20-minutowych treningów unikania miejsca, podczas których mierzono liczbę wejść na obszar, którego należało unikać (ENTR) oraz liczbę impulsów elektrycznych otrzymanych przez szczura (SH). Ponadto, w każdym dniu treningu funkcjonowanie pamięci krótkotrwałej oceniano pomiędzy kolejnymi dniami treningu mierząc maksymalny czas unikania miejsca z szokiem (Tmax). Pamięć długotrwałą oceniano porównując czas do pierwszego wejścia na obszar, którego należało unikać pomiędzy kolejnymi dniami treningu. Umiejętność uczenia się oceniano obliczając wskaźnik: liczba szoków na wejście (SHs/ENTR). Ponadto podczas każdego dnia treningu oceniano także aktywność lokomotoryczną szczurów, którą wyrażano przez całkowitą długość drogi pokonanej przez zwierzę. Swobodne poruszanie się szczurów w TAUM było miarą zachowania wynikającego z pamięci niedeklaratywnej, dzięki czemu TAUM jest jedyną dostępną metodą

równoczesnej analizy pamięci deklaratywnej – przestrzennej i niedeklaratywnej, co świadczy o jego unikalności i potencjale.

Cztery dni po zakończeniu treningu w teście unikania miejsca przeprowadzono test przywoływania pamięci w takich samych warunkach, jednak przy wyłączonym drażnieniu elektrycznym. Test ten przeprowadzono w celu oceny pamięci długotrwałej zależnej od plastyczności neuronalnej. Zbieranie i analizę danych przeprowadzono przy użyciu komercyjnego oprogramowania (Biosignal® Group, Acton, MA, USA).

Metody analityczne

- Stężenie srebra w narządach wewnętrznych i strukturach mózgu przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS) (aparat Multiwave 3000; Anton Paar GmbH, Ostfildern, Germany; Freeze-dryer system Christ Loc-1 m; Alpha 1–4 LD Plus, Christ, Osterode am Harz, Germany).
- Ultrastruktura narządów wewnętrznych została oceniona na podstawie zdjęć z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) JEOL 1200 EXII (JEOL, Tokio, Japonia).
- Obecność AgNPs w hipokampie oceniano na skrawkach za pomocą spektrometrii mas jonów wtórnych w nanoskali (NanoSIMS).
- Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz całkowity potencjał antyoksydacyjny oznaczono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem zestawów Randox Laboratories (Londyn, Wielka Brytania) w spektrofotometrze Biochrom Anthos Zenyth 200 (Cambridge, Wielka Brytania).
- Poziom peroksydacji lipidów oznaczono metodą wg Ohkawa (1979) przy użyciu spektrofotometru Biochrom Anthos Zenyth 200 (Cambridge, Wielka Brytania).
- Poziom neurotransmiterów i neurosteroidów w hipokampie analizowano przy użyciu spektrometru mas SCIEX TripleTOF 5600+ DuoSpray Source dla SCIEX TripleTOF 5600+ (TurbolonSpray i APCI) (Framingham, MA, USA) z analizą ilościową oraz walidacją metody wykonaną przy użyciu oprogramowania firmy Sciex (Analyst, MasterView, PeakView).
- Ekspresja mRNA była analizowana z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) przy użyciu termocyklera Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Dusseldorf, Germany) (badania, których wyniki opisano w artykule P2) lub Stratagene Mx3005P qPCR (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (badania, których wyniki opisano w artykule P5).
- Analizę ekspresji białek przeprowadzono z zastosowaniem metody Western blot używając półsuchego systemu transferu - SD Trans-Blot® Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

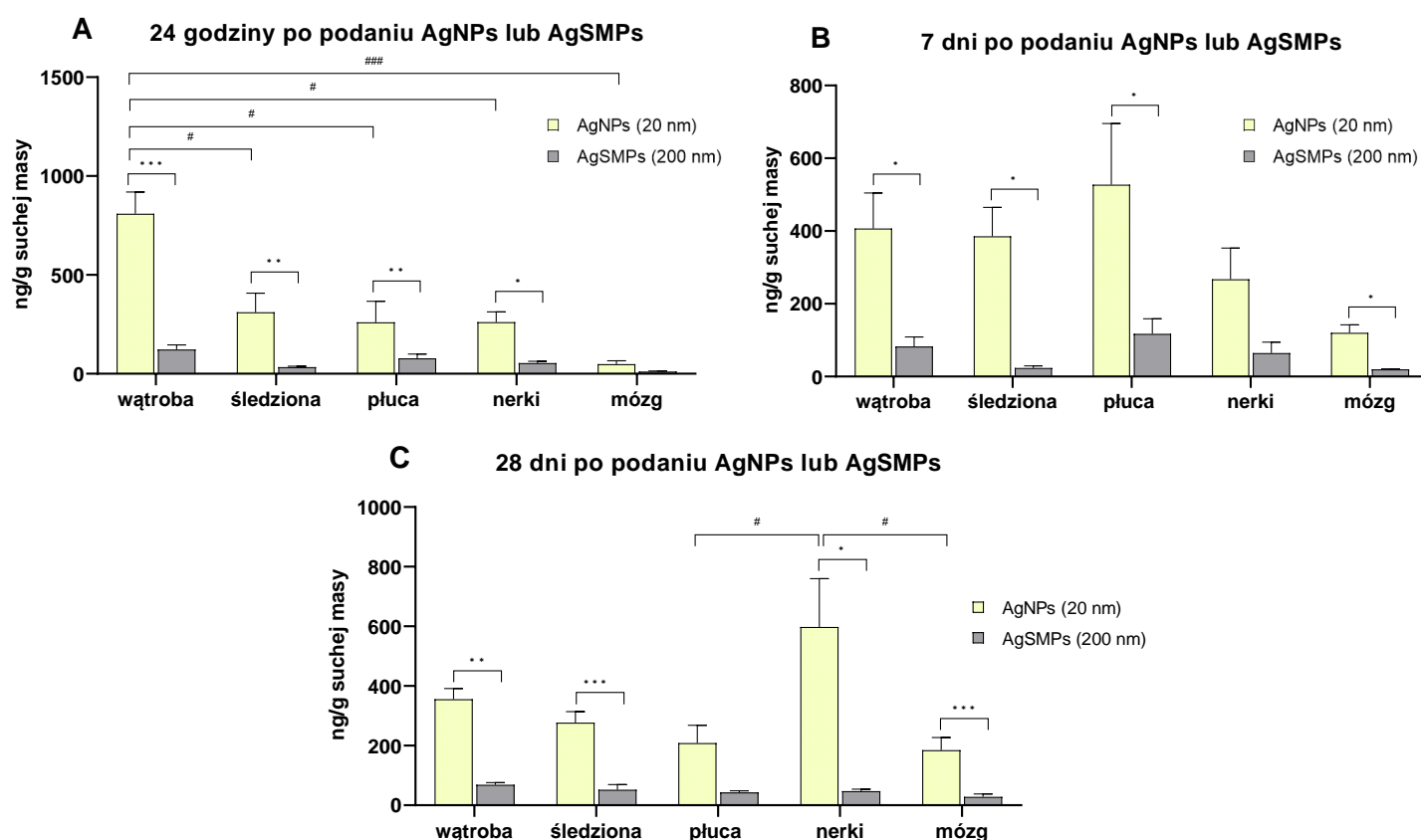
- Analiza statystyczna wykonana została przy użyciu programów Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA) wykorzystanego w celu wykonania analizy wariancji (ANOVA) i oprogramowania statystycznego R (www.rproject.org/) (R: The R Project for Statistical Computing) do przeprowadzenia liniowej analizy dyskryminacyjnej Fishera (LDA). Program GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) został wykorzystany do tworzenia wykresów.

4.3.4 Przedstawianie wybranych wyników

Ocena biodystrybucji cząstek srebra w organizmie

Analiza toksyczności nanomateriałów jest niezwykle istotnym kierunkiem badań, który pozwala na weryfikację bezpieczeństwa ich zastosowania oraz na ocenę ich przydatności w licznych aplikacjach, w tym także w przemyśle spożywczym i produktach konsumenckich. Ocenę toksyczności AgNPs oraz analizę mechanizmów działania tych nanocząstek opisano w publikacjach **P1-P5**. W pierwszym chronologicznie opublikowanym artykule wchodzącym w skład osiągnięcia (**P1**) podjęto próbę analizy dystrybucji cząstek srebra w organizmie, jako jednego z istotnych elementów oceny ich potencjalnie toksycznego działania. Na podstawie wyników badań analitycznych wykazałam, że po jednorazowym podaniu dożylnym w mózgu dochodzi do akumulacji cząstek srebra zależnej od wielkości i dawki nanocząstek oraz od czasu ekspozycji. W celu kompleksowej i dokładnej oceny kinetyki biodystrybucji tkankowej i wydalania srebra (Ag) w warunkach 100% biodostępności preparatu tego pierwiastka podawanego w formie nanocząstek oraz cząstek o wielkości submikronowej wybrano iniekcję dożylną. Wybór drogi podania do realizacji badań wstępnych, których wyniki opisano w artykułach **P1** i **P2**, oparto na założeniu, że ekspozycja na nanosrebro skutkuje jego ogólnoustrojową dostępnością. Potwierdzają to wyniki badań innych autorów dowodzące, że AgNPs, niezależnie od drogi podania, wchłaniane są do krwi, co umożliwia ich transport do wszystkich narządów. Droga dożylnego podania, wykorzystana w badaniach wstępnych, umożliwiła ocenę kinetyki i skutków akumulacji cząstek srebra, które mogą dostać się do organizmu wszystkimi możliwymi drogami ekspozycji, w tym doustną, inhalacyjną, transdermalną i dożylną z produktów konsumenckich, artykułów przemysłu spożywczego i wody, a także w trakcie postępowań diagnostycznych. Zastosowanie takiego schematu badań na początkowych etapach oceny toksyczności umożliwiło uniknięcie indywidualnej zmienności we wchłanianiu i absorpcji nanosrebra w przewodzie pokarmowym oraz pozwoliło na bezpośrednie podanie jednakowej i ściśle określonej dla poszczególnych grup zwierząt dawki. W publikacji **P1** opisałam zależne od długości okresu jaki upłynął od ekspozycji na cząstki srebra zmiany stężenia srebra w wątrobie, śledzionie, nerkach,

płucach i mózgu szczurów, które, jak wykazała analiza statystyczna, były istotnie wyższe u zwierząt, które otrzymały 20 nm AgNPs, w porównaniu do szczurów, którym podano 200 nm cząstki submikronowe. Wykazano ponadto, zależne od długości okresu ekspozycji, istotne różnice w stężeniu Ag w narządach zwierząt, które otrzymały 20 nm AgNPs. Dwadzieścia cztery godziny po podaniu nanocząstek najwyższe stężenie srebra stwierdzono w wątrobie, a najniższe w mózgu tych zwierząt. Po 7 dniach od podania nanocząstek najwyższe stężenie srebra odnotowano w płucach, wątrobie i śledzionie, a najniższe, podobnie jak po 24 godzinach, w mózgu. Najwyższe stężenie srebra po 28 dniach od podania 20 nm AgNPs stwierdzono w nerkach (Rycina 1).



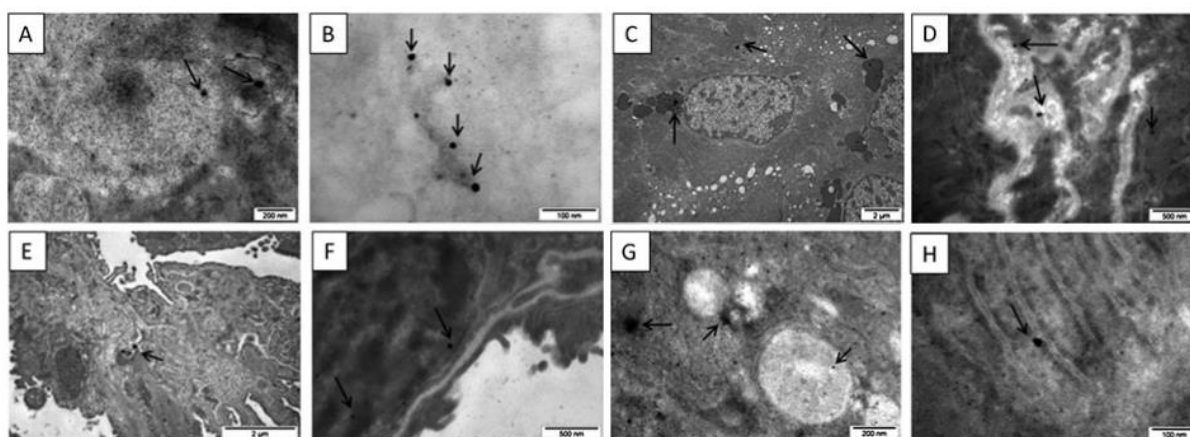
Rycina 1. Zawartość srebra w narządach wewnętrznych 24 godziny (A), 7 dni (B) i 28 dni (C) po jednorazowym dożylnym podaniu nanocząstek srebra w dawce 5 mg/kg m.c (średnia \pm SE).

*, **, *** różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs v AgSMPs (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$); #, ### różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs w różnych punktach czasowych (# $p < 0.05$ i ### $p < 0.001$).

Co interesujące, badania wykazały, że stężenie srebra w wątrobie było najwyższe po 24 godzinach od podania AgNPs, a następnie wraz z upływem czasu obniżało się. Natomiast poziom srebra w nerkach i mózgu był najniższy po 24 godzinach od dożylnego podania nanosrebra, a następnie

wzrastał by osiągnąć maksymalne wartości 28 dni po iniekcji, co wskazuje, że AgNPs ulegają redystrybucji w organizmie zależnej od czasu, jaki upłynął od ekspozycji na te nanocząstki.

Wyniki badań opublikowanych w artykule **P1** wskazują, że AgNPs przemieszczają się z krwi do narządów, takich jak nerki, śledziona, wątroba, płuca i mózg. Analiza zdjęć wykonanych przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) wykazała, że nanocząstki kumulowały się w różnych strukturach komórkowych i subkomórkowych narządów w postaci pojedynczych nanocząstek lub ich klastrow (Rycina 2).

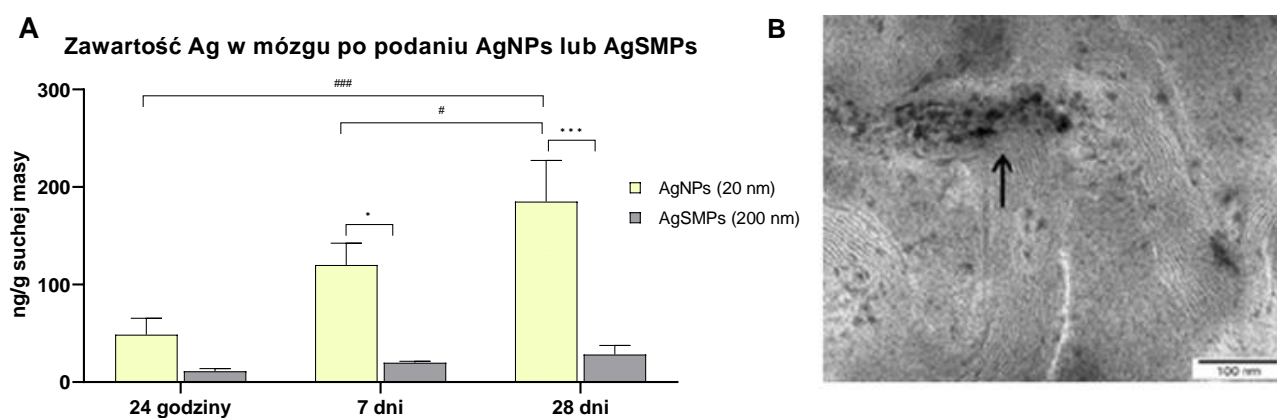


Rycina 2. Zdjęcia narządów wykonane przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) przedstawiające nanocząstki srebra (AgNPs) w różnych narządach. **(A, B)** – śledziona; **(C, D)** – nerka; **(E, F)** – płuca; **(G, H)** – wątroba.

Na podstawie zdjęć TEM nie stwierdzono różnic w wewnątrznarządowej dystrybucji AgNPs zależnych od długości okresu jaki upłynął od ich dożylnego podania, jednak ilość nagromadzonych nanocząstek w nerkach i mózgu wydawała się wyższa po dłuższym okresie od wstrzyknięcia. Uwidocznione na zdjęciach TEM pojedyncze nanocząstki zlokalizowane w analizowanych narządach mają rozmiar około 20 nm, co potwierdza wyniki uzyskane metodą spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-MS). W mózgu nanocząstki były widoczne jako pojedyncze cząstki, a także aglomeraty zlokalizowane głównie w cytoplazmie neuronów i komórek glejowych.

Uzyskane wyniki wskazują na długotrwałe odkładanie się srebra w mózgu (Rycina 3A). Pod koniec eksperymentu (po 28 dniach) zaobserwowano znaczący, czterokrotny wzrost zawartości srebra w mózgu, który nastąpił prawdopodobnie w wyniku zwiększonej absorpcji nanocząstek przez komórki śródbłonna naczyń krwionośnych i w konsekwencji łatwiejszego wychwytu i translokacji poprzez transcytozę przez ścianę naczyń krwionośnych. Zdjęcia TEM wskazują dodatkowo, że AgNPs są w stanie przekroczyć barierę krew-mózg (Rycina 3B). Odkładanie się srebra w mózgu może zaburzać jego

funkcjonowanie, w szczególności neuroprzewodność, i może mieć niekorzystne, długotrwałe skutki, dlatego aspekty te były objęte oceną w kolejnych etapach badań.



Rycina 3. (A) – Stężenie srebra w mózgu [ng/g suchej masy]. **(B)** – Zdjęcie z TEM przedstawiające lokalizację AgNPs w mózgu.

*,*** różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs vs AgSMPs (* $p < 0.05$ i *** $p < 0.001$): #, ### różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs w różnych punktach czasowych (# $p < 0.05$ i ### $p < 0.001$).

Badania wstępne opisane w artykule **P1** prowadziłam równolegle z pracą nad rozprawą doktorską, której tematyka dotyczyła wpływu narażenia na działanie cząstek srebra na procesy regulujące funkcje reprodukcyjne, w szczególności na metabolizm steroidów oraz wybrane parametry stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej w gonadach męskich. Tematyka ta znacznie odbiegała od obszaru badań, którymi zajęłam się po doktoracie. Wyniki badań opisanych w publikacji **P1** stanowiły istotny wkład w wiedzę o dystrybucji AgNPs w organizmie i skierowały moje zainteresowania naukowe na oddziaływanie nanocząstek srebra w odniesieniu do układu nerwowego. Niezwykle ciekawe i niepokojące dane, które wykazały, że mózg, mimo że nie jest głównym narządem docelowym dla akumulacji srebra podanego w formie nanocząstek, jest organem, w którym z czasem poziom srebra wzrasta, skłoniły mnie do dogłębnej analizy skutków ekspozycji układu nerwowego na nanosrebro. Jednocześnie wyniki te rozbudziły moją ciekawość naukową dotyczącą mechanizmów odpowiedzialnych za działanie AgNPs na ośrodkowy układ nerwowy ze szczególnym uwzględnieniem jednej ze struktur mózgu – hipokampu.

Ocena wpływu nanocząstek srebra na równowagę redoks w mózgu oraz elementy układu renina-angiotensyna-aldosteron

Wzrost wytwarzania wolnych rodników i indukcja stresu oksydacyjnego są obecnie uważane za główny mechanizm przeciwbakteryjnej aktywności AgNPs. Jednocześnie jest to również jeden z postulowanych mechanizmów molekularnych odgrywających kluczową rolę w patogenezie schorzeń neurodegeneracyjnych, jak też mechanizm odpowiedzialny za neurotoksyczność ksenobiotyków. Materiał biologiczny uzyskany z doświadczenia, którego wyniki opisano w artykule **P1**, został wykorzystany do weryfikacji hipotezy, że akumulacja srebra w mózgu będzie skutkowała zmianami równowagi redoks w tym narządzie. W wyniku analiz laboratoryjnych otrzymano wstępne informacje o działaniu nanosrebra w mózgu, co zostało opisane w publikacji **P2**. W artykule tym wykazano, że 20 nm AgNPs podawane dożylnie w dawce 10 mg/kg m.c. nie mają wpływu na masę ciała i pobranie paszy przez zwierzęta laboratoryjne, jednak powodują zaburzenie równowagi oksydoredukcyjnej w mózgu, wywołując zmiany ekspresji genów i/lub aktywności enzymów układu obrony antyoksydacyjnej, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (*Sod1*, SOD) i reduktaza glutationowa (*Gsr*, GSR). Narażenie na 20 nm AgNPs spowodowało redukcję ekspresji genów *Sod1* i *Gsr*, wzrost aktywności obu enzymów (GSR i SOD) oraz podwyższenie stężenia zredukowanej formy glutationu (GSH) w homogenatach mózgu (Tabela 2). Prooksydacyjny charakter działania AgNPs potwierdził również odnotowany w mózgach zwierząt wzrost ekspresji genu oksygenazy hemowej 1 (*Hmox1*), uważanej za czuły marker stresu oksydacyjnego, do którego aktywacji dochodzi w odpowiedzi na wysoki poziom wolnych rodników (Tabela 2).

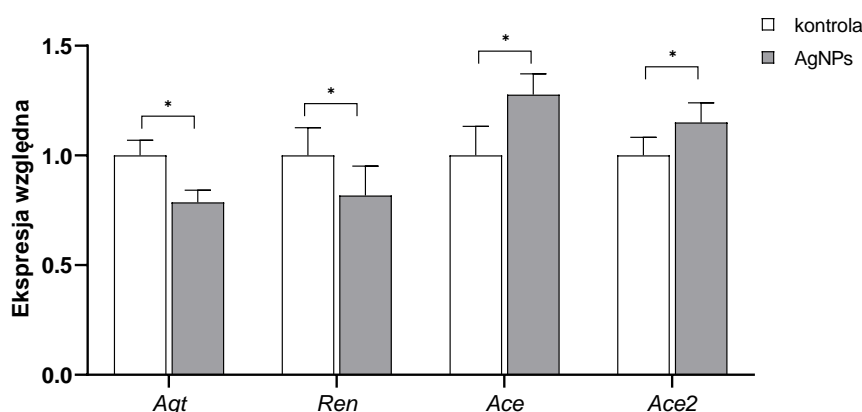
Tabela 2. Wpływ jednorazowego dożylnego podania AgNPs (20nm, 10 mg/kg m.c.) na parametry obrony antyoksydacyjnej w mózgu (średnia \pm SD dla SOD, GSR i GSH; % grupy kontrolnej \pm SD dla *Sod1* i *Gsr*).

| | Kontrola | AgNPs |
|-------------------|-------------------|---------------------|
| SOD [U/g tkanki] | 0,213 \pm 0,033 | 0,298 \pm 0,071 * |
| <i>Sod1</i> | 1,000 \pm 0,095 | 0,748 \pm 0,097 * |
| GSR [U/g tkanki] | 0,625 \pm 0,191 | 1,713 \pm 0,227 * |
| <i>Gsr</i> | 1,000 \pm 0,094 | 0,701 \pm 0,099 * |
| GSH [ng/g tkanki] | 2,281 \pm 0,380 | 3,003 \pm 0,423 * |

SOD – aktywność dysmutazy ponadtlenkowej; *Sod1* – ekspresja genu dysmutazy ponadtlenkowej 1; GSR – aktywność reduktazy glutationowej; *Gsr* – ekspresja genu reduktazy glutationowej; GSH – stężenie zredukowanej formy glutationu

* różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs vs kontrola (* $p < 0.05$).

Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w patogenezie zaburzeń neurodegeneracyjnych i schorzeń naczyń mózgowych, a także związany jest z procesami starzenia się mózgu. Widoczne starzenie się populacji europejskiej oraz zwiększone ryzyko rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i układu krążenia wśród osób starszych nasuwa pytanie o wpływ czynników środowiskowych, w tym nanomateriałów, na przebieg tych procesów. W związku z tym artykuł **P2** koncentruje się również na wpływie AgNPs na układ renina-angiotensyna (RAS) jako możliwym mechanizmie neurotoksycznego działania AgNPs związanym ze stresem oksydacyjnym. Układ renina-angiotensyna jest ogólnoustrojową osią regulacyjną zaangażowaną w kontrolę ciśnienia krwi i homeostazy objętości płynów ustrojowych, której kluczowym elementem jest renina (REN), enzym syntetyzowany i wydzielany przez nerki, katalizujący przemianę angiotensynogenu (AGT) do angiotensyny I (ANG1), przekształcanej następnie przez enzym konwertujący angiotensynę 1 (ACE1) do angiotensyny 2 (ANG2). Ponadto enzym konwertujący angiotensynę 2 (ACE2) promuje alternatywną konwersję ANG1 do ANG-(1e7) lub ANG1 do ANG-(1e9). Niezależnie od roli RAS w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego układ ten działa na poziomie tkankowym w sposób specyficzny dla narządu. W mózgu RAS odgrywa istotną rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania naczyń krwionośnych i równowagi wodno-elektrolitowej, wpływając na przebieg procesów starzenia się. W badaniach, których wyniki opisano w publikacji **P2** zweryfikowano hipotezę, że stres oksydacyjny wywołany przez dożylną iniekcję nanosrebra prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy poszczególnymi składnikami układu RAS w mózgu. Wykazano, że jednorazowe podanie AgNPs spowodowało obniżenie ekspresji genów *Agt* i *Ren* oraz wzrost ekspresji genów *Ace* i *Ace2* (Rycina 4), co sugeruje prawdopodobieństwo wzrostu stężenia angiotensyny 2 w mózgu, która jest regulatorem hamującym ekspresję genu reniny, a jednocześnie wyjaśnia obserwowane obniżenie ekspresji *Ren* pod wpływem AgNPs.



Rycina 4. Wpływ jednorazowego dożylnego podania AgNPs (20 nm, 10 mg/kg m.c.) na względną ekspresję genów układu renina-angiotensyna (*Agt*, *Ren*, *Ace*, *Ace2*). *Agt* – angiotensynogen; *Ren* – renina; *Ace*, *Ace2* – enzymy konwertujące angiotensynę. Wyniki przedstawiono jako ekspresję względną (grupa kontrolna obliczona jako 1); * różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs vs kontrola (* $p < 0.05$).

Angiotensyna II zwiększa również wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach śródbłónka i pośrednio przyczynia się do upośledzenia ich funkcji i zaburzeń sprzężenia nerwowo-naczyniowego, wywołując zwiększoną przepuszczalność bariery krew-mózg, a także indukując odpowiedź immunologiczną o charakterze zapalnym oraz sprzyjając rozwojowi zmian miażdżycowych naczyń mózgowych. Powoduje to obniżenie przepływu krwi w tym narządzie i zwiększoną podatność na udary.

Ocena wpływu nanocząstek srebra na wyższe funkcje mózgu w teście na pamięć przestrzenną

Wyniki opublikowane w artykułach **P1** i **P2** pozwoliły mi udokumentować obecność srebra w mózgu po jednorazowej iniekcji dożylniej i wykazać, że mózg może być kluczowym narządem docelowym dla odkładania AgNPs, jak również dostarczyły dowodów na zdolność AgNPs do wywoływania zmian ekspresji genów zaangażowanych w regulację równowagi redoks i układ RAS w mózgu. Dlatego w kolejnych etapach badań interesującym mnie aspektem działania nanosrebra było sprawdzenie, jak te nanocząstki wpływają na wyższe funkcje ośrodkowego układu nerwowego, w tym zdolności poznawcze odpowiadające za funkcjonowanie pamięci deklaratywnej, reprezentowanej między innymi przez pamięć przestrzenną, której działanie jest ściśle związane z hipokampem. Badania opublikowane w artykule **P3** miały więc na celu weryfikację hipotezy, że ekspozycja na AgNPs podawane do przewodu pokarmowego może zaburzać formowanie, funkcjonowanie i utrzymanie allotetycznej pamięci przestrzennej. Na uwagę zasługuje fakt, iż do badań pamięci przestrzennej zastosowałam unikalną metodę behawioralną – Test Aktywnego Unikania Miejsca. Metoda ta umożliwiała badanie pamięci przestrzennej zależnej od procesów koordynacji poznawczej podczas swobodnego poruszania się zwierząt.

W badaniach opublikowanych w artykule **P3** zastosowano dożołądkową drogę narażenia na nanosrebro. Ekspozycja drogą przewodu pokarmowego jest jedną z istotnych dróg narażenia ludzi na działanie AgNPs ze względu na ich zastosowanie w przetwórstwie i pakowaniu żywności, filtracji wody, jak również w suplementach diety. Jednocześnie wstępne dane uzyskane w trakcie badań opublikowanych w artykułach **P1** i **P2** potwierdziły, że nanocząstki wykazują potencjał neurotoksyczny po podaniu dożylnym. Dlatego w kolejnych etapach badań moją intencją było sprawdzenie, czy podobnie działa nanosrebro podane do przewodu pokarmowego z wykorzystaniem sondy dożołądkowej. Jest to droga najbardziej zbliżona i adekwatna do narażenia człowieka na AgNPs stosowane w przemyśle spożywczym oraz przyjmowane w wyniku akumulacji AgNPs w środowisku naturalnym, m.in. w wodzie. Badanie zostało zaprojektowane zgodnie z wytycznymi Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) nr 407, dotyczącymi badań toksyczności przy narażeniu *per os* u gryzoni. W zrealizowanych

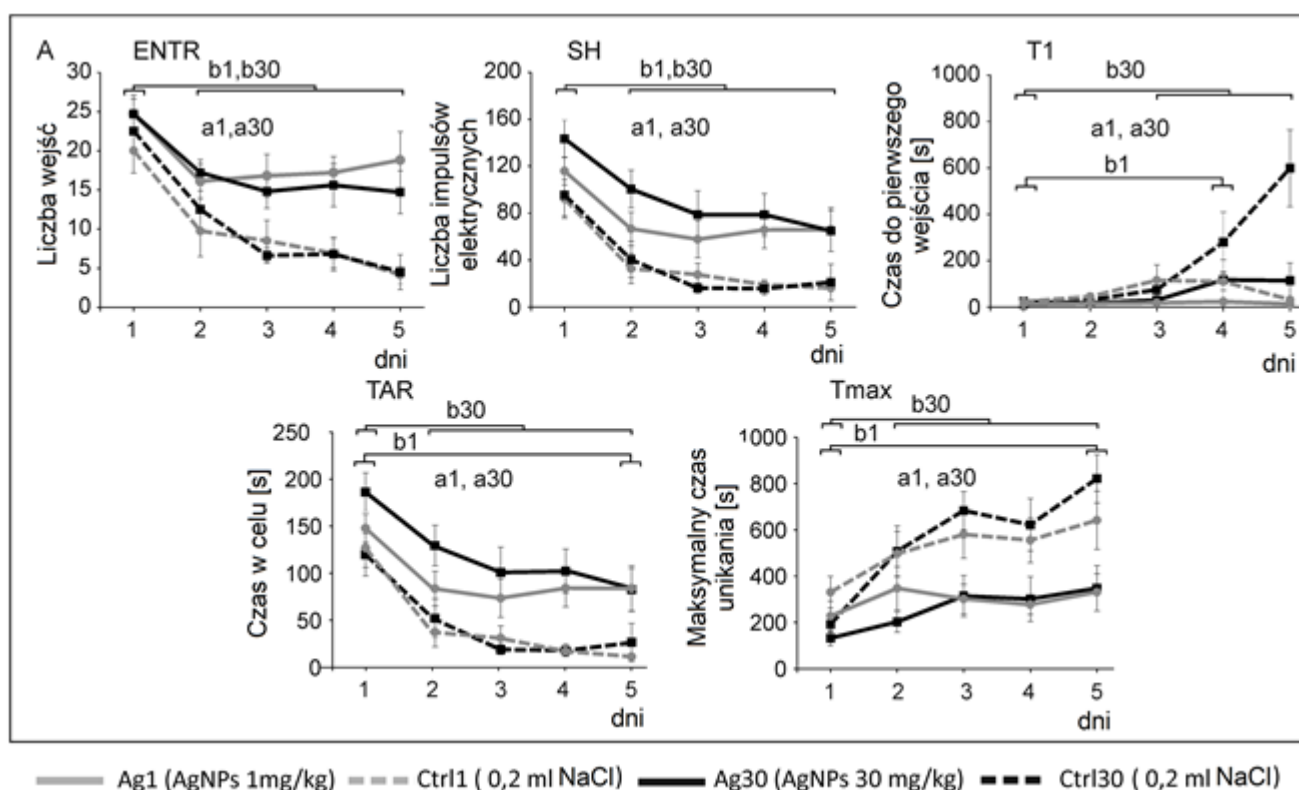
badaniach zastosowano dwie dawki: 30 i 1 mg/kg. m.c. Większa dawka (30 mg/kg m.c.) to opisana w literaturze dawka NOAEL dla AgNPs po ekspozycji przez przewód pokarmowy. W drugiej serii testów dawkę zmniejszono do 1 mg/kg m.c., jako wartości korespondującej z TDI dla ludzi, uwzględniając przeliczenie dawki z człowieka na szczura. W założeniu miało to służyć sprawdzeniu, czy dawka ta również wywoła zaburzenia procesów pamięciowych. Do oceny funkcjonowania mózgu po podawaniu AgNPs użyto Testu Aktywnego Unikania Miejsca, który pozwala na analizę allotetycznej pamięci przestrzennej. Test ten pozwala na analizę nabywania, utrzymywania, przywoływania i trwałości pamięci przestrzennej. Zadaniem szczura w tym teście jest unikanie określonego obszaru (miejsca) na obracającej się arenie, w obrębie którego, z przerwami, prezentowane jest krótkotrwałe, słabe drażnienie elektryczne (szoki). Zejście szczura z tego miejsca kończy podawanie szoków. Poprawne wykonanie reakcji unikania wymaga uformowania reprezentacji przestrzennej obszaru kojarzonego z szokiem. Reprezentacja ta powstaje w oparciu o odległe, widzialne bodźce z pokoju, które pozostają w stałych odległościach względem siebie i względem obszaru z impulsami elektrycznymi. Uformowanie takiej reprezentacji w mózgu angażuje przestrzenną pamięć allotetyczną. Z uwagi na to, że w Teście Aktywnego Unikania Miejsca arena obraca się, miejsce podawania szoków nie jest przypisane do powierzchni areny, lecz do przestrzeni opisanej przez odległe bodźce z pomieszczenia, w którym znajduje się arena. W związku z tym tworzenie reprezentacji miejsca wymaga aktywnej, ciągłej segregacji bodźców istotnych (z pokoju), od mylących (z areny), co angażuje procesy koordynacji poznawczej.

W czasie treningu efektywność reakcji unikania oceniano na podstawie następujących parametrów: liczby wejść na obszar z szokiem (ENTR), liczby szoków (SH), czasu spędzonego na obszarze z szokami (TAR), maksymalnego czasu pomiędzy kolejnymi wejściami na obszar z szokiem (Tmax) oraz czasu do pierwszego wejścia (T1) na obszar z szokiem. Malejąca liczba wejść i szoków oraz krótki czas przebywania na miejscu z impulsami elektrycznymi świadczył o nabywaniu reakcji unikania, czyli formowaniu pamięci długotrwałej. Wydłużony czas unikania wejścia na obszar z szokiem podczas danego dnia treningu wskazywał na wzrost efektywności pamięci krótkotrwałej, natomiast wydłużony czas do pierwszego wejścia na obszar z szokiem w kolejnych dniach treningu wskazywał na utrzymywanie się śladów pamięci długotrwałej. Po czterech dniach od zakończenia treningu nabywania, któremu towarzyszyło podawanie szoków, przeprowadzono test na trwałość pamięci długotrwałej, podczas którego szoki były wyłączone.

W publikacji **P3** wykazano, że szczury narażone na AgNPs, niezależnie od zastosowanej dawki, charakteryzowały się znacznie słabszą pamięcią długotrwałą i krótkotrwałą niż zwierzęta z grup kontrolnych. U zwierząt narażonych na działanie AgNPs, niezależnie od dawki, stwierdzono większą liczbę wejść na obszar, którego miały unikać (ENTR) czemu towarzyszyła większa liczba otrzymanych przez nie impulsów elektrycznych (SH). Ponadto u szczurów tych odnotowano krótki czas do pierwszego

wejścia (T1) w kolejnych dniach treningu, co świadczyło o deficycie funkcjonowania pamięci długotrwałej. Dodatkowo zwierzęta narażone na działanie AgNPs wykazywały krótszy maksymalny czas unikania miejsca (Tmax) i dłuższy czas w miejscu z szokami (TAR), co wskazuje na upośledzenie pamięci krótkotrwałej (Rycina 5).

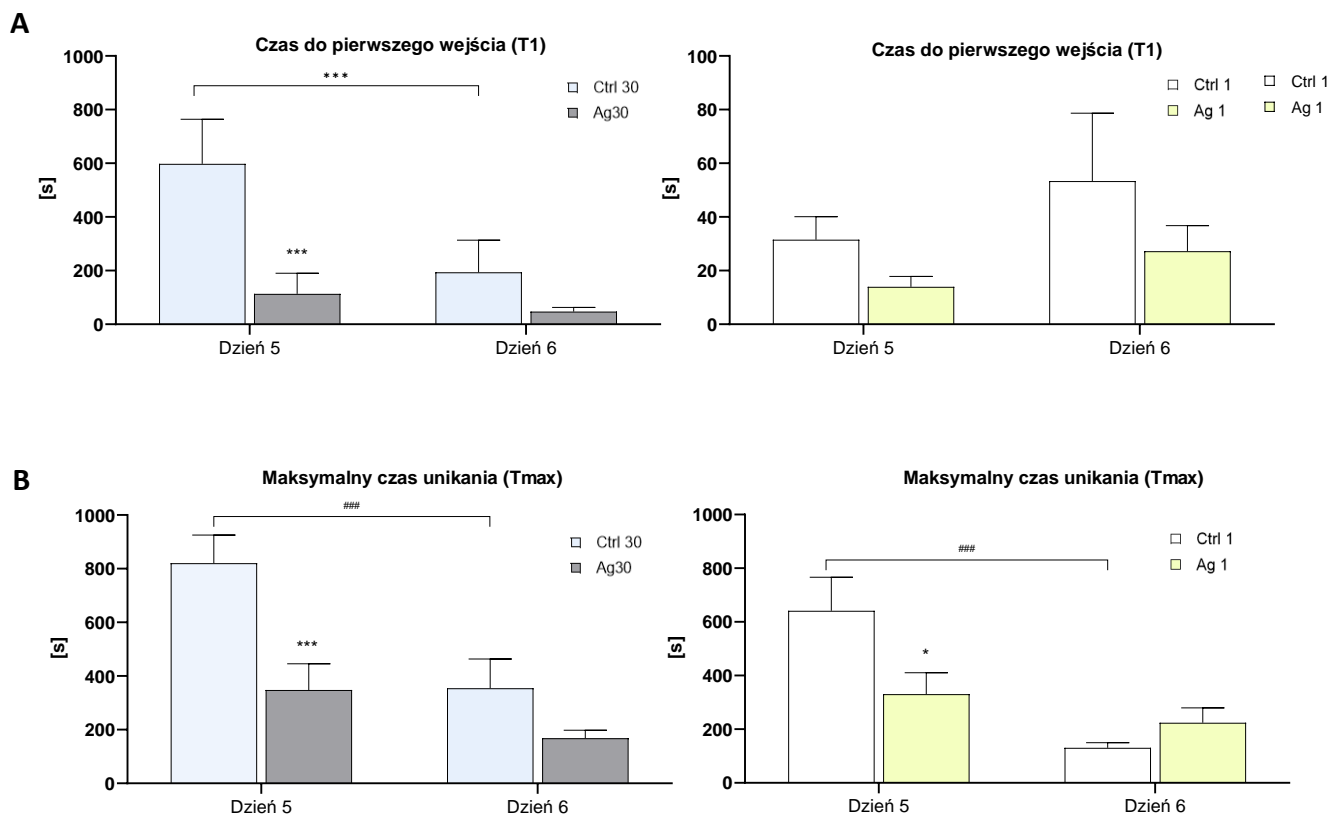
Wartości parametrów opisujących nabywanie pamięci zmieniały się nieznacznie w trakcie treningu u zwierząt narażonych na AgNPs, co mogło świadczyć o zaburzeniu procesów odpowiedzialnych za uczenie się. W przeciwieństwie do szczurów narażonych na AgNPs, u szczurów kontrolnych obserwowano postępującą poprawę mierzonych parametrów już od drugiego dnia treningu, co świadczyło o prawidłowym zachodzeniu procesów odpowiedzialnych za nabywanie pamięci (Rycina 5).



Rycina 5. Wartości parametrów opisujących efektywność alotetycznej pamięci przestrzennej analizowane w Teście Aktywnego Unikania Miejsca (średnia \pm SE). ENTR – liczba wejść na obszar, którego należy unikać; SH – liczba otrzymanych impulsów elektrycznych; T1 – czas do pierwszego wejścia; TAR – czas w miejscu z impulsami elektrycznymi; Tmax – maksymalny czas unikania miejsca. a, b – różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami ($p < 0.05$);

Również wyniki testu na trwałość pamięci długotrwałej wykazały jej upośledzone działanie u szczurów narażonych na AgNPs. W przeciwieństwie do szczurów kontrolnych prezentowały one krótki

maksymalny czas unikania zarówno podczas treningu, któremu towarzyszyło podawanie szoków, jak i podczas testu kiedy szoki były wyłączone (Rycina 6). Wskazuje to na utratę plastyczności neuronalnej u szczurów narażonych na działanie AgNPs.



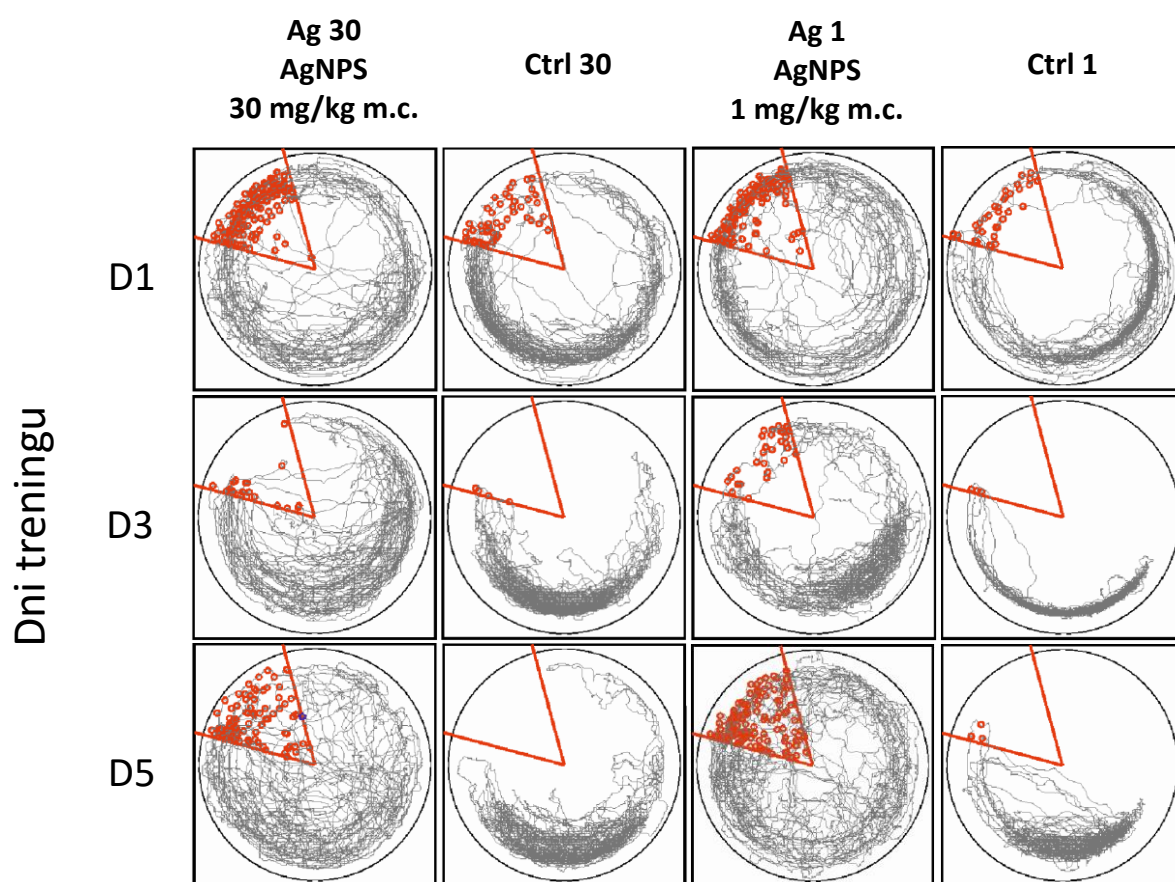
Rycina 6. Wartości parametrów opisujące efektywność allotetycznej pamięci przestrzennej analizowane podczas ostatniego dnia Testu Aktywnego Unikania Miejsca (D5) i podczas testu przywoływania pamięci (D6) (średnia \pm SE). **(A)** – czas do pierwszego wejścia (T1); **(B)** – maksymalny czas unikania miejsca (Tmax).

* i *** różnice istotne statystycznie w odniesieniu do grupy Ctrl w tym samym punkcie czasowym (* $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$); ### różnice istotne statystycznie w obrębie tej samej grupy w różnych punktach czasowych (### $p < 0,001$). ANOVA: T1 – istotny wpływ podawania AgNPs ($p < 0,008$) oraz czasu ($p < 0,01$); Tmax – istotny wpływ podawania AgNPs ($p < 0,01$) oraz czasu ($p < 0,0001$).

Co ciekawe, u zwierząt, którym podano AgNPs zaobserwowano inną strategię unikania miejsca na arenie niż u szczurów z grupy kontrolnej. Chociaż wszystkie szczury pokonywały podobny dystans, zwierzęta z grup narażonych na działanie AgNPs chodziły po całej arenie przez wszystkie dni treningowe. W przeciwieństwie do tego, szczury kontrolne chodziły po całej arenie tylko na początku treningu, a

następnie zmieniły strategię chodzenia i chodziły po części areny, blisko jej krawędzi (Rycina 7). Wskazuje to, iż tylko u szczurów kontrolnych doszło do uformowania reprezentacji miejsca z szokami podczas treningu.

Uzyskane wyniki, opisane w publikacji **P3** wskazują, że szczury, którym dożołądkowo podawano AgNPs, niezależnie od ich dawki, miały poważnie upośledzoną pamięć przestrzenną allotetyczną, w tym zarówno pamięć długotrwałą, jak i krótkotrwałą, których funkcjonowanie wymaga procesów koordynacji poznawczej i jest zależne od prawidłowych funkcji hipokampu. Wyniki badania opisane w artykule **P3** wykazały, że zdolności poznawcze u szczurów poddanych działaniu AgNPs nie uległy poprawie w trakcie treningu, co sugeruje trwałą zmianę – pogorszenie funkcji mózgu na poziomie hipokampa.



Rycina 7. Reprezentatywne trajektorie poruszania się zwierząt na arenie w czasie wykonania zadania w Teście Aktywnego Unikania Miejsca w 1, 3 i 5 dniu treningu. Zdjęcia pokazują trajektorię w odniesieniu do położenia miejsca z szokami. Trójkąt przedstawia miejsce z szokami; szoki przedstawione są jako czerwone kropki.

Ocena biodystrybucji nanocząstek srebra w wybranych strukturach mózgu

Badania wstępne opisane w artykule **P1** potwierdziły zdolność AgNPs do akumulacji w mózgu po podaniu dożylnym. W badanych przedstawionych w publikacji **P3** zastosowano inną drogę podania AgNPs, dlatego podjęto próbę oceny zawartości srebra zarówno w homogenacie mózgu jak i w wybranych jego częściach, w tym w hipokampie, korze okolicy czołowej oraz tylnej części kory i mózdzku. Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników stwierdziłam, że podawanie AgNPs spowodowało istotny, zależny od dawki wzrost zawartości srebra w mózgu, w tym w szczególności w bocznej części kory mózgowej i w hipokampie. Co ciekawe, u zwierząt, które otrzymywały AgNPs w dawce 1 mg/kg m.c., nie wykazano obecności srebra w mózdzku i korze okolicy czołowej (Tabela 3).

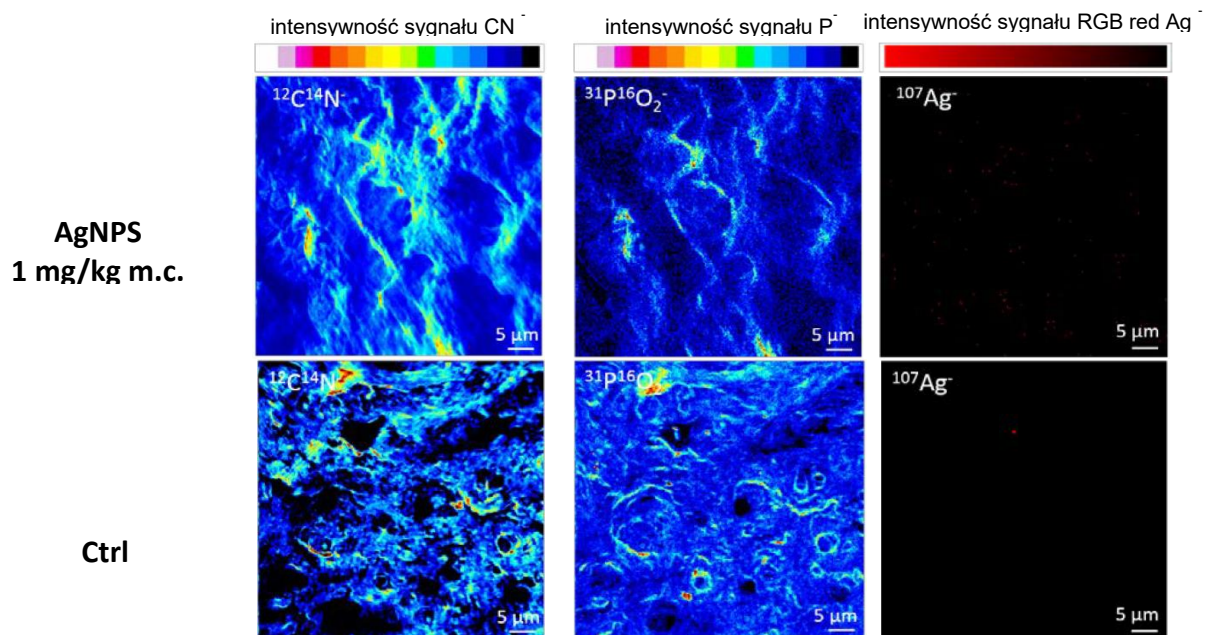
Tabela 3. Zawartość srebra w mózgu (mg Ag/kg mokrej masy; średnia \pm SD)

| | Zawartość srebra | | | |
|------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|------------------------------|
| | Ctrl 1 | Ag 1 AgNPs 1mg/kg m.c. | Ctrl 30 | Ag 30 AgNPs 30 mg/kg m.c. |
| Mózg (homogenat) | ND | ND | 0,026 \pm 0,046 | 0,210 \pm 0,068 * |
| Kora czołowa | UDL | UDL | 0,030 \pm 0,026 | 0,191 \pm 0,081 * |
| Kora boczna | 0,036 \pm 0,042 | 0,068 \pm 0,049 | ND | ND |
| Hipokamp | 0,016 \pm 0,025 | 0,070 \pm 0,057 *,# | 0,011 \pm 0,011 | 0,268 \pm 0,018 *,# |
| Mózdzek | UDL | UDL | ND | ND |

ND – niewykrywalny; UDL – poniżej limitu detekcji (10 ng/g).

* – różnice istotne statystycznie w porównaniu z kontrolą ($p < 0.05$); # – różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs 1 mg/kg m.c. vs AgNPs 30 mg/kg m.c. ($p < 0.05$).

W celu weryfikacji jaka forma srebra występuje w obszarze hipokampu, wykonano analizę obecności AgNPs w skrawkach tej części mózgu zwierząt narażonych na działanie AgNPs w dawce 1 mg/kg masy ciała. Analizę wykonano posługując się metodą spektrometrii mas jonów wtórnych w nanoskali (NanoSIMS) (Rycina 8). Analiza ta wykazała jedynie słabe, a nie oczekiwane silne, skupione sygnały charakterystyczne dla AgNPs, co wskazuje na obecność rozproszonych jonów/atomów srebra, a nie srebra w formie nanocząstek.



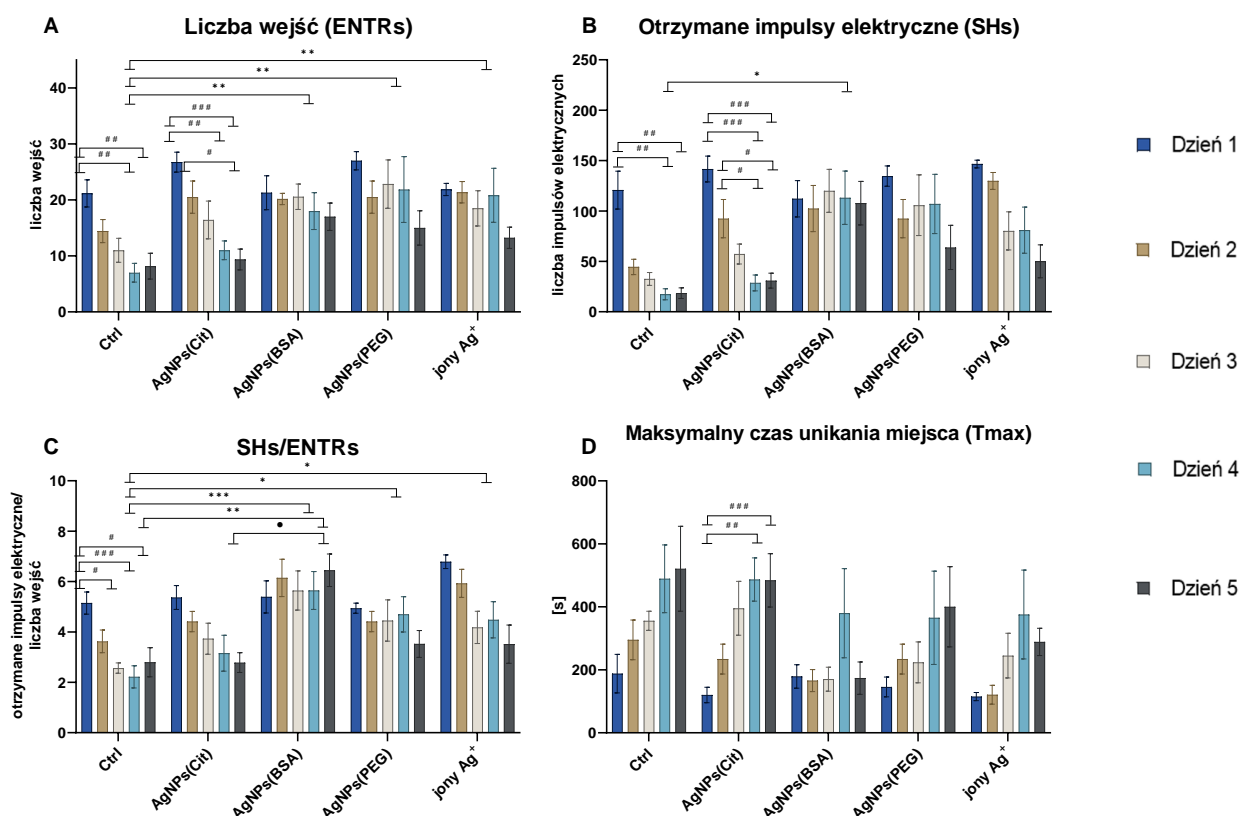
Rycina 8. Analiza nanoSIMS strefy CA3 hipokampu.

Ocena wpływu zastosowanej funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek srebra na jego neurotoksyczność

Badania toksykologiczne *in vitro* i *in vivo* wykazują, że toksyczność nanocząstek związana jest z wieloma czynnikami, takimi jak droga i czas trwania ekspozycji, wielkość nanocząstek, dawka oraz materiał zastosowany do opłaszczania powierzchni nanocząstek mający na celu ich stabilizację i ochronę przed agregacją. Spośród wymienionych czynników najistotniejszy wpływ na układ immunologiczny ma modyfikacja powierzchni, która może determinować toksyczność nanocząstek. W badaniach opisanych w artykułach **P1-P3** dokonano oceny wpływu wybranych czynników, w tym ich dawki, średnicy cząstek AgNPs oraz czasu trwania ekspozycji, jak i drogi podania nanosrebra. AgNPs użyte w doświadczeniach I i II to nanocząstki, które stabilizowano roztworem albuminy bydlęcej (BSA). Dodatnio naładowane BSA szybko tworzą na powierzchni nanocząsteczek powłokę, zwaną koroną białkową, która uniemożliwia ich agregację. Po wnikięciu lub celowym wprowadzeniu nanocząstek do organizmu korona białkowa może ulegać modyfikacjom w wyniku adsorpcji na powierzchni nanocząsteczek białek ustrojowych, co jednocześnie wpływa na losy AgNPs w organizmie i co nasuwa pytanie, na ile obserwowana i opisana w publikacjach **P1-P3** neurotoksyczność AgNPs wynikała za zastosowanej funkcjonalizacji powierzchni nanosrebra. W literaturze brak było danych dotyczących wpływu zastosowanego związku stabilizującego na toksyczność AgNPs pochodzących z badań, w których analizowane były AgNPs o różnym opłaszczeniu w porównywalnych warunkach eksperymentalnych.

Dlatego celem w doświadczenia III była analiza wpływu zastosowanej substancji stabilizującej AgNPs oraz formy srebra (nanocząstki vs forma jonowa) na nabywanie i utrzymywanie allotetycznej pamięci przestrzennej oraz na wybrane mechanizmy potencjalnie odpowiedzialne za toksyczność AgNPs. W doświadczeniu tym zastosowano jeszcze mniejszą niż w poprzednich eksperymentach dawkę AgNPs – 0.5 mg/kg masy ciała, zbliżoną do przewidywanego rzeczywistego poziomu narażenia człowieka na nanosrebro. Zwierzętom przez 28 dni dożołądkowo podawano AgNPs opłaszczane BSA (AgNPs(BSA)), glikolem polietylenowym (AgNPs(PEG)) lub cytrynianem (AgNPs(Cit)) lub jony srebra (Ag^+). Narażenie na srebro w formie jonowej miało na celu weryfikację hipotezy opartej na wynikach badań opublikowanych w publikacji **P3**, które wskazywały, że za toksyczność AgNPs(BSA) odpowiadały w większym stopniu niż nanocząstki jony Ag^+ obecne w hipokampie szczurów.

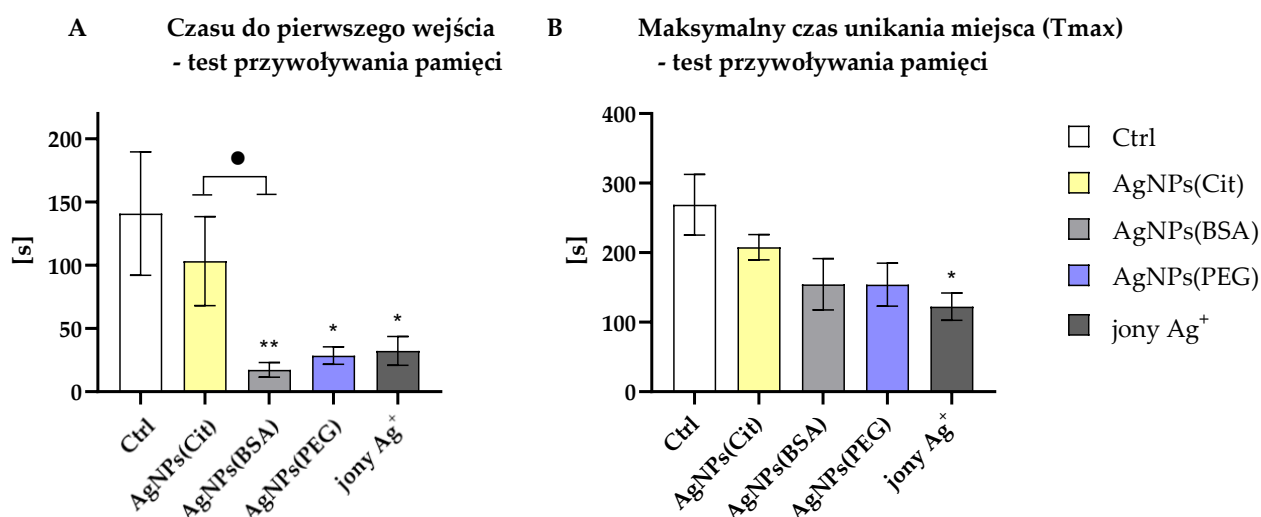
Po 28 dniach podawania różnych form srebra analizowano nabywanie pamięci przestrzennej w ciągu pięciu dni treningu z wykorzystaniem testu unikania miejsca, który użyto już we wcześniejszych badaniach opisanych w artykule **P3**. Wyniki testów behawioralnych, opisane w publikacji **P4**, wykazały wpływ związków stosowanych do stabilizacji AgNPs na proces nabywania pamięci, umiejętność uczenia się oraz pamięć krótkotrwałą i długotrwałą u szczurów. Narażenie na działanie AgNPs opłaszczonych przez BSA spowodowało osłabienie funkcji poznawczych, co przejawiało się pogorszeniem pamięci krótko- i długotrwałej. Zastosowanie AgNPs opłaszczonych przez PEG miało wpływ głównie na pamięć krótkotrwałą, podczas gdy AgNPs stabilizowane cytrynianem nie wywołało zmian pamięci przestrzennej. Podawanie jonów Ag^+ prowadziło natomiast do nieefektywnego uczenia się, powodując podobnie jak AgNPs(BSA) osłabienie pamięci krótko- i długotrwałej. Stwierdzone zaburzenia nabywania pamięci u zwierząt z grup narażonych na AgNPs(BSA), AgNPs(PEG) i jony Ag^+ , było widoczne jako większa liczba wejść – ENTR oraz większa liczba otrzymanych impulsów elektrycznych (SH) w porównaniu z grupą kontrolną (Rycina 9A i 9B). Właściwe wykonanie zadania unikania miejsca ze stymulacją elektryczną nieprzyjemną dla zwierzęcia wymaga od szczurów zdolności wykonawczych, które odpowiadają za umiejętność uczenia się i którą to umiejętność w teście unikania opisuje stosunek SHs/ENTR. Niski stosunek SHs/ENTR wskazuje na efektywne uczenie się. Wśród badanych grup zwierząt stosunek ten był istotnie wyższy u szczurów narażonych na ekspozycję na AgNPs(BSA), co wskazuje na upośledzenie umiejętności uczenia się u zwierząt z tej grupy (Rycina 9C). Wyniki badań opisane w publikacji **P4** wskazują także na nieefektywną pamięć krótkotrwałą u szczurów ze wszystkich grup narażonych na działanie srebra, zarówno tych, którym podawano AgNPs, jak i tych, które otrzymywały jony Ag^+ . Pamięć tą oceniano na podstawie wartości Tmax mierzonej w każdym dniu treningu unikania miejsca (Rycina 9D).



Rycina 9. Wartości parametrów opisujące efektywność allotetycznej pamięci przestrzennej analizowane w Teście Aktywnego Unikania Miejsca (średnia \pm SE) w czasie 5 dni treningu nabywania pamięci u szczurów poddanych ekspozycji na AgNPs z różną funkcjonalizacją powierzchni (cytrynian, BSA i PEG) lub Ag⁺. **(A)** — liczba wejść (ENTR); **(B)** — liczba otrzymanych impulsów elektrycznych (SH); **(C)** — stosunek SHs/ENTR; **(D)** — maksymalny czas unikania miejsca (Tmax).

*, ** i *** różnice istotne statystycznie w odniesieniu do grupy Ctrl w tym samym punkcie czasowym (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ i *** $p < 0,001$); #, ## i ### różnice istotne statystycznie w obrębie tej samej grupy w różnych punktach czasowych (# $p < 0,05$, ## $p < 0,001$ i ### $p < 0,001$). ● różnica istotna statystycznie między grupami AgNPs(Cit) i AgNPs(BSA) (● $p < 0,05$).

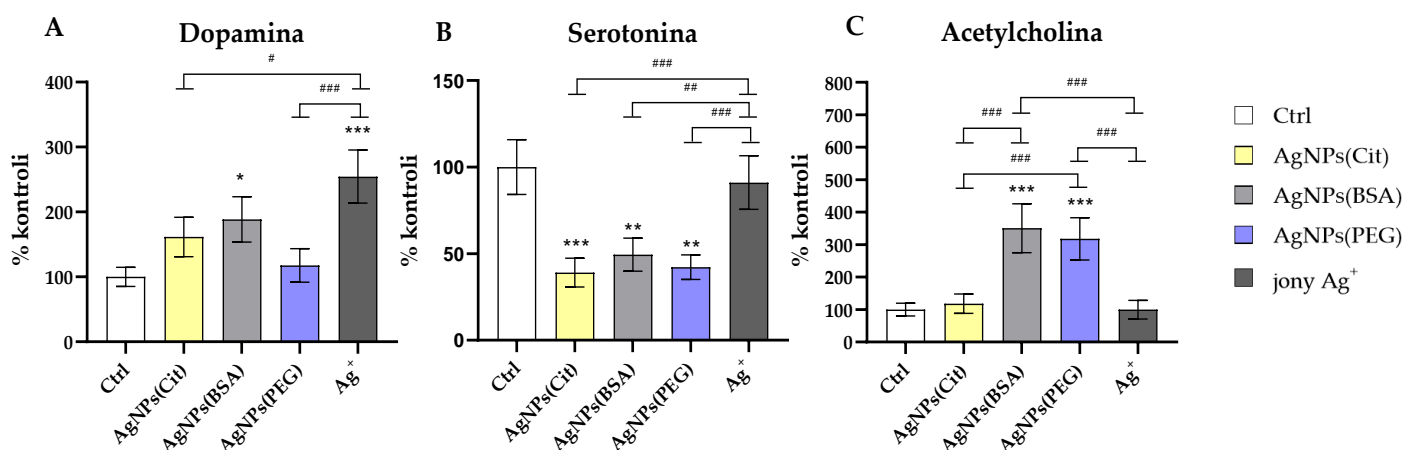
Wykazano także osłabienie pamięci długotrwałej u szczurów z grup AgNPs(BSA), AgNPs(PEG) i Ag⁺, analizowanej w próbie testowej na trwałość pamięci długotrwałej. Zwierzęta z tych grup dokonały pierwszych wejść z krótszym czasem T1 niż szczury kontrolne, podczas gdy szczury otrzymujące AgNPs(Cit) miały podobną do kontroli wartość T1 (Rycina 10A). Ponadto szczury z grupy, której podawano jony Ag⁺ wykazywały znacznie krótszy czas Tmax (Rycina 10B). Wyniki sugerują, że AgNPs opłaszczane BSA lub PEG mogą modyfikować funkcjonalną integralność hipokampu, a przez to wpływać na relacje z innymi strukturami mózgu, które to struktury są niezbędne dla tworzenia pamięci długotrwałej.



Rycina 10. Wartości parametrów dla próby testowej przywoływania pamięci na pamięć długotrwałą (średnia ± SE). **(A)** – czas do pierwszego wejścia (T1); **(B)** – maksymalny czas unikania miejsca (Tmax). * i ** różnice istotne statystycznie w odniesieniu do grupy Ctrl (* p < 0,05 i ** p < 0,01); • różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs(Cit) i AgNPs(BSA) (• p < 0,05).

Ocena mechanizmów neurotoksyczności nanocząstek srebra w hipokampie

W badaniach wykorzystujących metody biologii molekularnej, których wyniki opublikowano w artykułach **P4** i **P5**, zdecydowałam, że ocena mechanizmów neurotoksyczności AgNPs zostanie wykonana w hipokampie – strukturze mózgu kluczowej dla prawidłowego funkcjonowania pamięci przestrzennej, której upośledzenie potwierdziły wyniki badań opisanych w publikacjach **P3** i **P4**. Neurony hipokampu są zaangażowane w procesy segregacji informacji, które oparte są na aktywacji podregionów tej struktury mózgu odpowiedzialnych za tworzenie i utrzymywanie trwałych reprezentacji przestrzennych. Hipokamp ma więc fundamentalne znaczenie dla pamięci i zdolności poznawczych, a jak wskazują wyniki badań opisanych w publikacji **P3**, wydaje się on być także szczególnie podatny na akumulację srebra po podawaniu do przewodu pokarmowego AgNPs opłaszczonych przez BSA. Jednym z potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzające pamięć przestrzenną działanie AgNPs oceniane w ramach moich badań i opisane w publikacji **P4** jest wpływ nanosrebra lub jonów Ag⁺ na stężenia wybranych neurotransmiterów w hipokampie. Neuroprzekaźniki biorą udział w regulacji funkcji mózgu, a zmiany w ich poziomach mogą wpływać na funkcje poznawcze i pamięć. Moje badania wykazały, że stężenie dopaminy, serotoniny i acetylocholiny w hipokampie było silnie zależne od rodzaju zastosowanego opłaszczenia AgNPs. Stwierdzono, że jony Ag⁺ i AgNPs(BSA) wywołują w hipokampie wzrost stężenia dopaminy, natomiast AgNPs(BSA) i AgNPs(PEG) – acetylocholiny (Rycina 11A i 11B).



Rycina 11. Stężenie neuroprzekaźników w hipokampie szczurów poddanych ekspozycji na AgNPs z różną funkcjonalizacją powierzchni (cytrynian, BSA i PEG). **(A)** – dopamina; **(B)** — serotonina; **(C)** – acetylcholina (% Ctrl \pm SEM).

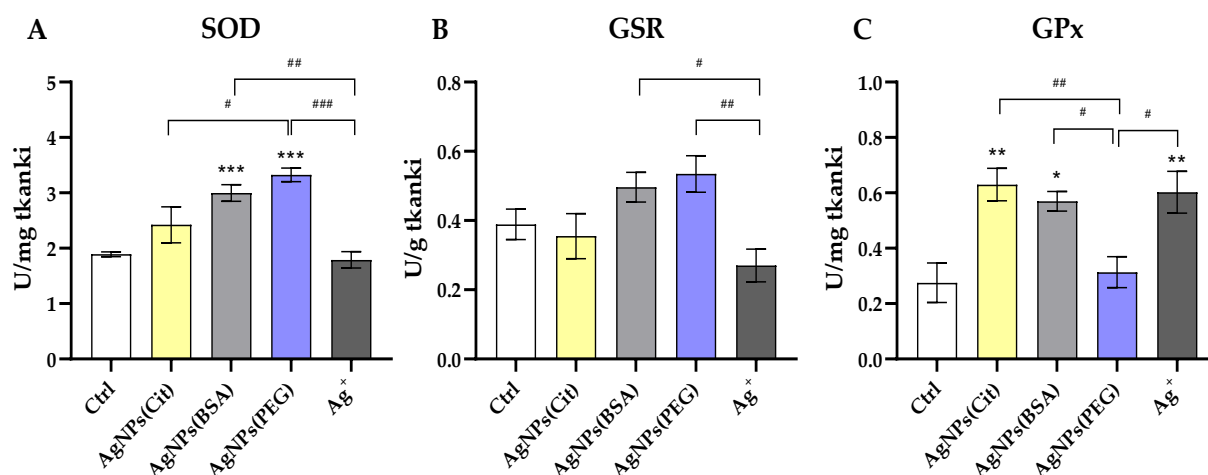
*, ** i *** różnice istotne statystycznie w odniesieniu do grupy Ctrl (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ i *** $p < 0,001$).

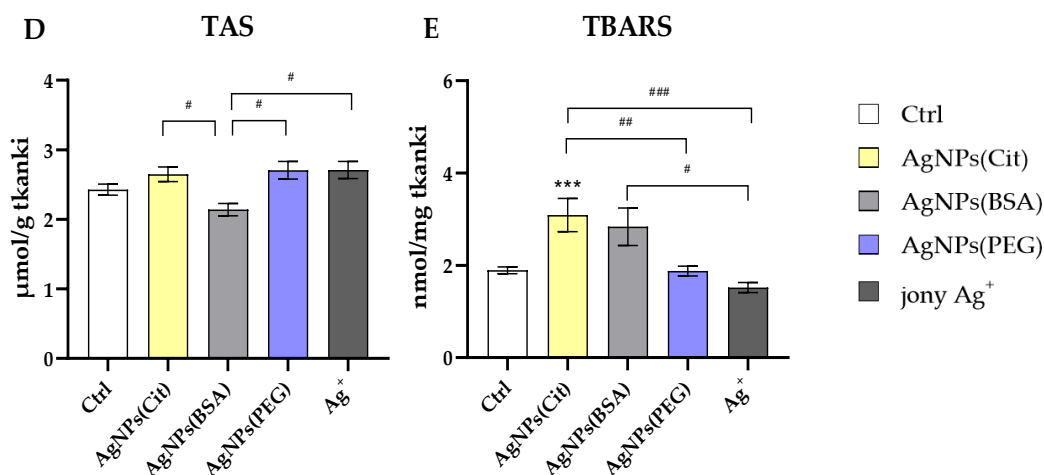
#, ## i ### różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami eksperymentalnymi AgNPs lub Ag⁺ (# $p < 0,05$, ## $p < 0,001$ i ### $p < 0,001$).

Wyniki, które uzyskałam korelują z obserwowanymi zaburzeniami pamięci przestrzennej, które mogą wynikać z nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu dopaminergicznego. Zbyt wysokie poziomy dopaminy wywołują zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, co może prowadzić do śmierci neuronów w hipokampie i sugeruje, że apoptoza jest kolejnym wartym zbadania mechanizmem neurotoksyczności indukowanej przez AgNPs. Badania stężeń neurotransmiterów wykazały również, że stężenie serotoniny w hipokampie było niższe we wszystkich grupach, którym dożołądkowo podawano AgNPs, niezależnie od zastosowanego środka stabilizującego ich powierzchnię (Rycina 11C). Dysfunkcja układu dopaminergicznego i serotonergicznego u ludzi wiąże się z objawami depresji. U zwierząt, którym podawano AgNPs opłaszczane BSA, obok podwyższonego poziomu dopaminy i obniżonego stężenia serotoniny, stwierdzono również upośledzenie umiejętności uczenia się. Chociaż parametry behawioralne mierzone w Teście Aktywnego Unikania Miejsca nie pozwalają na ocenę lęku i objawów depresyjnych, można przypuszczać, że upośledzenie umiejętności uczenia się u szczurów otrzymujących opłaszczane przez BSA AgNPs może wiązać się z lękiem odczuwanym przez zwierzęta w sytuacji, kiedy nie mogą rozwiązać zadania w Teście Aktywnego Unikania Miejsca.

Jednym z głównych mechanizmów toksyczności nanomateriałów opisywanych w piśmiennictwie, który na poziomie homogenatu mózgu analizowano w publikacji **P2** jest stres oksydacyjny. Nanosrebro zwiększa powstawanie ROS, a tym samym przyczynia się do zmniejszenia zdolności do obrony antyoksydacyjnej, co z kolei prowadzi do zaburzenia funkcji mitochondriów, uszkodzenia DNA, indukcji

stanów zapalnych i ostatecznie do śmierci neuronów. Stres oksydacyjny jest znanym czynnikiem patogenezы chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera i Parkinsona, jak również moduluje funkcje neuronalnych kanałów jonowych, przyczyniając się do dysfunkcji pamięci długotrwałej. W publikacji **P2** opisano zdolność podawanych dożylnie AgNPs opłaszczonych przez BSA do indukowania zaburzeń równowagi redoks w mózgu, natomiast w artykułach **P3** i **P4** – zaburzenia pamięci wywołane przez dożołądkową ekspozycję na działanie AgNPs. W celu weryfikacji roli tego mechanizmu w neurotoksyczności AgNPs markery stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej analizowano w hipokampach zwierząt narażonych na działanie tych nanocząstek o różnej funkcjonalizacji powierzchni oraz jonów Ag^+ podawanych drogą przez przewód pokarmowy. Wyniki tych badań przedstawiono w publikacji **P5**. Ekspozycja na działanie AgNPs opłaszczonych przez BSA lub PEG skutkowała wzrostem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (Rycina 12A), natomiast narażenie na wpływ AgNPs stabilizowanych przez cytrynian lub BSA oraz jonów Ag^+ – aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) (Rycina 12C) w hipokampie. Analiza stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (Rycina 12E), będących markerem peroksydacji lipidów, wykazała w hipokampie silne prooksydacyjne działanie AgNPs opłaszczonych przez cytrynian. Stwierdzono ponadto, że wartości całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) (Rycina 12D) w hipokampie zwierząt narażonych na działanie AgNPs stabilizowane przez BSA były istotnie niższe od wartości TAS w grupach szczurów, którym podano AgNPs z innym opłaszczeniem lub jony Ag^+ . Wyniki te potwierdzają wpływ AgNPs na równowagę redoks mózgu, który jest szczególnie podatny na uszkodzenia oksydacyjne ze względu na wysokie zużycie tlenu, słabo rozwinięty układ obrony antyoksydacyjnej oraz wysoką zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych podatnych na utlenianie.





Rycina 12. Potencjał przeciwutleniający i markery stresu oksydacyjnego w hipokampie szczurów po podaniu do przewodu pokarmowego AgNPs o różnej funkcjonalizacji powierzchni (cytrynian, albumina surowicy bydlęcej (BSA) i glikol polietylenowy (PEG)) lub jonów Ag⁺ (średnia ± SE).

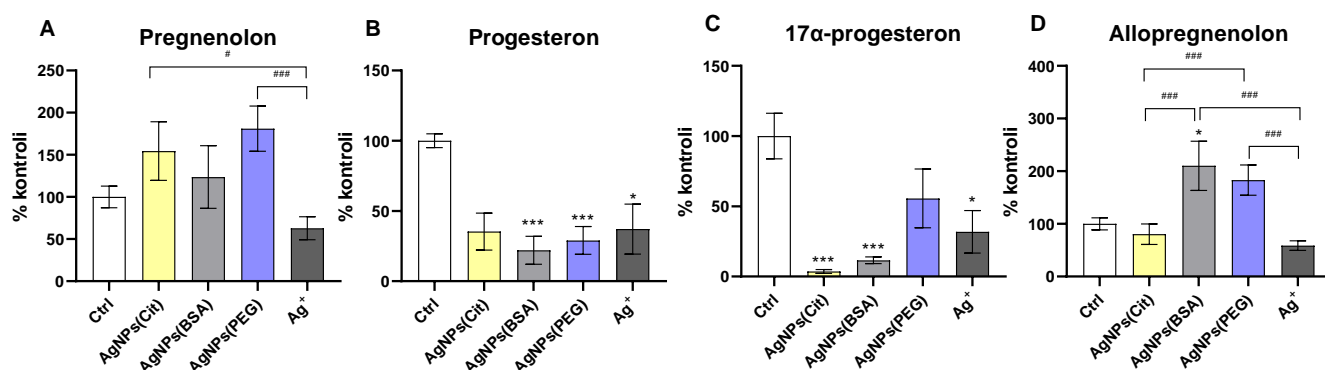
*, **, *** różnice istotne statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001); #, ##, ### różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami eksperymentalnymi AgNPs lub Ag⁺ (# p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001).

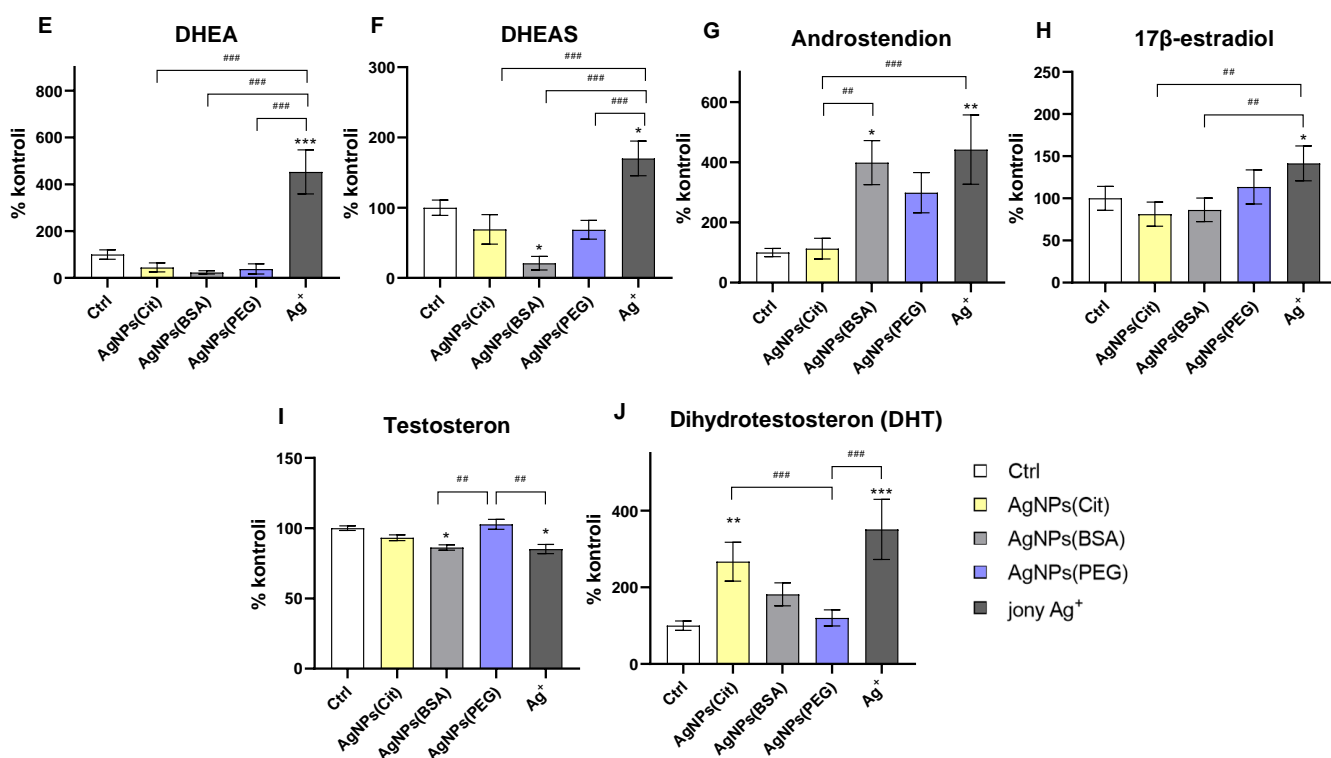
Wyniki analizy ekspresji genów enzymów obrony antyoksydacyjnej opisane w publikacji **P5** potwierdzają, że podawanie AgNPs z różnymi rodzajami opłaszczenia wywołuje zmiany funkcjonowania enzymatycznych elementów obrony antyoksydacyjnej. Opłaszczone przez PEG AgNPs oraz jony Ag⁺ spowodowały redukcję ekspresji katalazy (Cat), natomiast jony Ag⁺ – również genu reduktazy glutationowej (Gsr).

Dane literaturowe wskazują, że stres oksydacyjny w mózgu wywołany przez AgNPs zaburza funkcje mitochondriów, których jedną z kluczowych funkcji jest steroidogeneza. Dlatego ważną częścią badań opisanych w publikacji **P5** było sprawdzenie, czy AgNPs indukują zmiany w metabolizmie neuroaktywnych steroidów w hipokampie. Neurosteroidy to hormony steroidowe syntetyzowane w mózgu lub neuronach obwodowych. Powstają *de novo* z cholesterolu lub pochodzą z tkanek obwodowych, takich jak gruczoły dokrewne, w tym gonady i nadnercze. W badaniach będących podstawą mojej pracy doktorskiej wykazałam, że nasilony stres oksydacyjny wywołany przez dożylną podanie AgNPs może zaburzać syntezę steroidów w gonadach samców szczurów, co kilka lat później skłoniło mnie do badań tego aspektu toksyczności AgNPs w mózgu.

Wpływ AgNPs na poziom neurosteroidów oraz ekspresję genów zaangażowanych w syntezę i metabolizm tych związków został opisany w publikacji **P5**, w której wykazano, że stężenia tych neuroaktywnych pochodnych cholesterolu w hipokampie ulegały zmianom pod wpływem AgNPs oraz

zależały od rodzaju opłaszczenia zastosowanego w celu stabilizacji tych nanocząstek (Rycina 13). Stwierdzono, że poziom pregnenolonu był istotnie niższy u szczurów z grupy otrzymującej jony Ag^+ w porównaniu z grupami narażonymi na AgNPs opłaszczone przez PEG i cytrynian (Rycina 13A). Stężenie progesteronu w hipokampie było istotnie niższe w grupach szczurów narażonych na działanie AgNPs opłaszczonych przez BSA, PEG oraz jonów Ag^+ (Rycina 13B). Podobną zależność stwierdzono w przypadku 17α -progesteronu (Rycina 13C), którego stężenie w hipokampie było niższe w grupach zwierząt poddanych ekspozycji na AgNPs opłaszczone przez cytrynian, BSA i na jony Ag^+ . Wykazano także, że stężenie allopregnanolonu w hipokampie było podwyższone u szczurów z grupy AgNPs(BSA), podobnie jak stężenia dwóch metabolitów pregnenolonu – dehydroepiandrosteronu (DHEA), który w wysokich stężeniach może wykazywać działanie neurotoksyczne, oraz siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEAS) w grupie otrzymującej jony Ag^+ (Rycina 13D, 13E i 13F). U zwierząt poddanych działaniu jonów Ag^+ stwierdzono również wyższe stężenia dwóch metabolitów progesteronu – androstendionu i 17β -estradiolu (Rycina 13G i 13H). Ponadto stężenie androstendionu było znacznie wyższe u zwierząt poddanych ekspozycji na AgNPs opłaszczone przez BSA. Wykazano także, że stężenie dwóch neurosteroidów należących do grupy androgenów – testosteronu i dihydrotestosteronu (DHT) – różniło się w zależności od rodzaju powłoki nanosrebra. Obniżone stężenie testosteronu w hipokampie stwierdzono w grupie zwierząt, której podawano jony Ag^+ , natomiast co ciekawe poziom DHT w hipokampie był wyższy u szczurów z grup poddanych działaniu jonów Ag^+ i AgNPs stabilizowanych cytrynianem (Rycina 13I i 13J). Uzyskane wyniki wyjaśniają częściowo obserwowane u zwierząt narażonych na działanie AgNPs opłaszczone przez BSA zaburzenia wyższych funkcji mózgu opisanych w artykułach **P3** i **P4**, które polegały na upośledzeniu tworzenia i konsolidacji śladów pamięciowych u szczurów z grupy AgNPs(BSA).



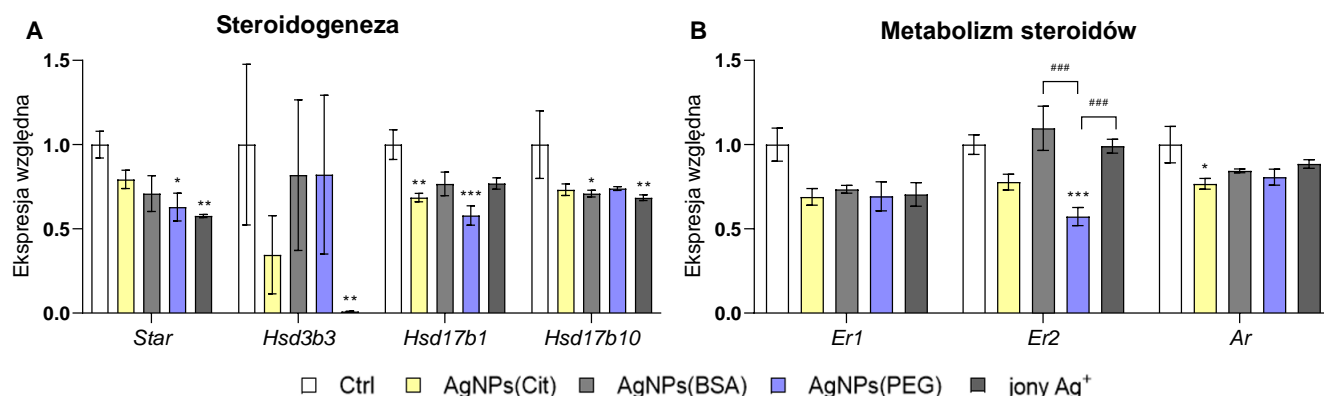


Rycina 13. Poziomy neurosteroidów w hipokampie szczurów po podaniu AgNPs z o różnej funkcjonalizacji powierzchni (cytrynian, BSA i PEG) lub jonów Ag⁺ (średnia ± SE).

*, **, *** różnice istotne statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001); #, ##, ### różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami eksperymentalnymi AgNPs lub Ag⁺ (# p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001).

Neurosteroidy wpływają na funkcjonowanie mózgu, działając jako modulatory allosteryczne receptorów neurotransmiterów, w tym kwasu gamma-aminomasłowego A, N-metylo-D-asparagianu i receptorów serotoninowych, a zatem regulują funkcje mózgu, takie jak funkcje poznawcze, lokomotoryczne oraz reakcje stresowe i lękowe. W zakresie zdolności poznawczych neurosteroidy pełnią funkcję modulatorów aktywności i plastyczności neuronów, procesów przewodzenia synaptycznego, neurogenezy i uczenia się oraz procesów konsolidacji pamięci, które zachodzą w hipokampie w czasie nabywania pamięci.

W publikacji **P5** przedstawiono wyniki, które wykazały również, że AgNPs mają wpływ na ekspresję genów biorących udział w neurosteroidogenezie w hipokampie, zmniejszając ekspresję kluczowych genów kodujących enzymy biorące udział w neurosteroidogenezie i metabolizmie neurosteroidów (Rycina 14).



Rycina 14. Wpływ narażenia na działanie AgNPs o różnej funkcjonalizacji powierzchni (cytrynian, BSA i PEG) lub jonów Ag⁺ na względną ekspresję genów zaangażowanych w syntezę i metabolizm neurosteroidów w hipokampie. **(A)** – geny steroidogenezy: *Star* – białkowy regulator steroidogenezy, *Hsd3b3* – dehydrogenaza hydroksysteroidowa (3), *Hsd17b1* – dehydrogenaza hydroksysteroidowa (17b1), *Hsd17b10* – dehydrogenaza hydroksysteroidowa (17b10); **(B)** – geny metabolizmu steroidów: *Er1* – receptor estrogenowy 1, *Er2* – receptor estrogenowy 2, *Ar* – receptor androgenowy. Wyniki przedstawiono jako ekspresję względną (grupa kontrolna obliczona jako 1).

*, **, *** różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami AgNPs vs kontrola (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); ### różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na AgNPs lub Ag⁺ (### $p < 0,001$).

Zmiany w ekspresji były najbardziej wyraźne w grupach traktowanych AgNPs pokrytymi PEG i cytrynianem. Stwierdzono obniżenie ekspresji genów kodujących kluczowe enzymy biorące udział w steroidogenezie, w tym białkowego regulatora steroidogenezy (*Star*), dehydrogenazy hydroksysteroidowej 3 β typu 3 (*Hsd3b3*) i dehydrogenazy hydroksysteroidowej (17 β) typu 1 (*Hsd17b1*) (Rycina 14A). Obniżenie ekspresji genu *Star*, kodującego białko StAR, którego dostępność stanowi ograniczający etap syntezy steroidów, sugeruje, że AgNPs zaburzają steroidogenezę *de novo* w badanej strukturze mózgu. Obniżeniu ekspresji uległy także geny kodujące białka biorące udział w metabolizmie steroidów, w tym gen receptora estrogenowego 2 (*Er2*) u szczurów poddanych działaniu AgNPs opłaszczonych przez PEG oraz genu receptora androgenowego (*Ar*) w grupie zwierząt narażonych na stabilizowane przez cytrynian AgNPs (Rycina 14B).

Co ciekawe, wyniki badań opisane w artykułach **P4** i **P5** wykazały, że funkcjonalizacja powierzchni jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na biologiczne efekty ekspozycji na nanocząstki. Najistotniejsze zmiany obserwowane we wspomnianych badaniach dotyczyły markerów obrony antyoksydacyjnej oraz syntezy neurosteroidów. Zmiany te były głównie spowodowane przez AgNPs opłaszczane BSA. Ponadto tylko AgNPs(BSA) zmniejszały ekspresję genu *Hsd17b10*, który

koduje białko enzymu dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej typu 10 (17 β -HSD10). Co ciekawe, 17 β -HSD10 jest wielofunkcyjnym enzymem mitochondrialnym, który odgrywa kluczową rolę w metabolizmie i procesie starzenia się ośrodkowego układu nerwowego. W mózgu enzym ten bierze udział w konwersji androgenów do estrogenów oraz uczestniczy w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, m.in. poprzez wpływ na mechanizmy związane z pamięcią i kontrolą nastroju. Zmniejszoną ekspresję genu *Hsd17b10* odnotowano w grupach zwierząt, którym podawano AgNPs opłaszczane przez BSA lub jony Ag⁺. Testy behawioralne, których wyniki opisano w publikacji **P4** potwierdziły, że zwierzęta z tych dwóch grup (grupy AgNPs(BSA) i Ag⁺) wykazywały zaburzenia pamięci krótkotrwałej i konsolidacji pamięci, które są charakterystycznymi objawami chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera. Enzym 17 β -HSD10 uczestniczy również w procesach utrzymania integralności mitochondriów oraz bierze udział w utlenianiu kwasów tłuszczowych i steroidów, a obniżenie jego ekspresji związane jest z nasileniem stresu oksydacyjnego, co wskazuje na spójność uzyskanych wyników. Na podstawie wyników eksperymentalnych badań opublikowanych w artykułach **P3**, **P4** i **P5** można stwierdzić, że toksyczne działanie AgNPs opłaszczonych przez BSA spowodowane jest prawdopodobnie mechanizmem uwalniania jonów Ag⁺. Ważnym bowiem celem badań opisanych w publikacjach **P4** i **P5** była identyfikacja mechanizmów leżących u podstaw upośledzenia pamięci długotrwałej i krótkotrwałej opisanych w artykułach **P3** i **P4**.

AgNPs stosowane w opakowaniach żywności ograniczają rozwój drobnoustrojów powodujących jej psucie się na drodze uwalnianie jonów Ag⁺ i generowania ROS, które niszczą ściany bakterii, a tym samym hamują wzrost drobnoustrojów. Chociaż te właściwości funkcjonalne nanocząstek są korzystne dla przemysłu spożywczego, są one niepożądane w przypadku kontaktu nanocząstek z komórkami organizmu. Ponieważ uwalnianie jonów Ag⁺ z powierzchni nanocząstek jest proponowane jako jeden z głównych mechanizmów toksyczności AgNPs, w doświadczeniu III jednej grupie szczurów podano roztwór azotanu srebra jako źródła srebra w formie jonowej, a działanie nanocząstek porównano z działaniem jonów Ag⁺. Był to szczególnie istotny element badań, ze względu na opisane w artykule **P3** wyniki, które wykazały, że dożołądkowa ekspozycja na opłaszczane przez BSA AgNPs skutkowałą znaczną akumulacją srebra w hipokampie. Jednak analiza nanoSIMS wykazała słaby sygnał dla srebra w hipokampie zwierząt poddanych działaniu AgNPs, co zinterpretowano jako obecność srebra w formie jonowej. W publikacjach **P4** i **P5** opisano wyniki wykonanej dla danych eksperymentalnych liniowej analizy dyskryminacyjnej Fishera – LDA. Analizę tą przeprowadzono w celu podsumowania wyników i uzyskania liniowych kombinacji analizowanych parametrów, które w najlepszym stopniu różnicują grupy eksperymentalne uwzględnione w badaniu *in vivo*. Wyniki analizy LDA, w której odseparowano grupy poddane działaniu AgNPs zarówno od grupy otrzymującej jony Ag⁺, jak i grupy kontrolnej, wskazują na odmienne działanie jonów Ag⁺ i AgNPs. Grupa, której podawano jony Ag⁺ została oddzielona

jednocześnie od grupy kontrolnej, jak i grup, które otrzymywały srebro w formie nanocząstek, co sugeruje inny mechanizm działania jonów srebra. Analiza LDA wykazała także, że jednym z czynników modulujących neurotoksyczność AgNPs jest funkcjonalizacja ich powierzchni. Przeprowadzona przeze mnie analiza wykazała ponadto, że działanie srebra podawanego w formie jonowej różni się od działania jonów Ag^+ uwalnianych z powierzchni AgNPs. Dodatkowo wyniki wskazują, że sposób działania AgNPs z różnymi rodzajami funkcjonalizacji powierzchni nie różni się zasadniczo, ale jest inny niż działanie samych jonów Ag^+ . Wydaje się zatem, że toksyczność AgNPs nie może być wyjaśniona wyłącznie uwalnianiem jonów Ag^+ . Możliwą przyczyną różnic w działaniu AgNPs pokrytych różnymi rodzajami materiałów stabilizujących mogą być procesy, którym nanocząstki ulegają w przewodzie pokarmowym. Procesy te obejmują również uwalnianie jonów Ag^+ , prawdopodobnie w różnych ilościach, w zależności od użytego materiału opłaszczającego. BSA nie tworzy trwałej powłoki na powierzchni AgNPs, ponieważ jest podatna na hydrolizę przez enzymy proteolityczne w przewodzie pokarmowym. Po strawieniu BSA, AgNPs są otaczane koroną białkową utworzoną przez inne dostępne związki, głównie białka pokarmowe. Tłumaczy to wyższą obserwowaną toksyczność tych nanocząstek, opisaną w publikacjach **P4** i **P5**.

Podsumowanie

Dzięki niewielkim rozmiarom nanocząstki charakteryzują się wyjątkowymi, całkowicie odmiennymi od posiadanych przez większe materiały, właściwościami fizykochemicznymi. Nanosrebro jest jednym z najczęściej stosowanych w przemyśle spożywczym nanomateriałów, ze względu na skuteczność w zwalczaniu różnych mikroorganizmów, takich jak: bakterie, grzyby i wirusy, jak również z uwagi na wysoką stabilność w warunkach przetwarzania żywności. Zmiana skali molekuł na nanometrową związana jest jednak również ze zmianą właściwości biologicznych nowych materiałów. Dlatego intensywne wykorzystanie nanosrebra w przemyśle spożywczym wymaga dokładnej oceny jego bezpieczeństwa w badaniach modelowych. W doświadczeniach będących podstawą prowadzonych przeze mnie badań podjęłam tematykę oceny wpływu nanocząstek srebra na funkcje i procesy zachodzące w mózgu, który będąc centralnym narządem układu nerwowego koordynuje pracę całego organizmu. Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników można wysnuć następujące wnioski:

1. Ekspozycja szczurów na cząstki srebra, wykorzystywane w przemyśle spożywczym, wywołuje zależną od czasu i wielkości cząstek akumulację tego pierwiastka w różnych narządach, w tym w wątrobie, płucach, nerkach, śledzionie i mózgu.
2. Pomimo że głównym narządem docelowym, w którym dochodzi do kumulowania cząstek srebra, wydaje się być wątroba, zależne od czasu zmiany zawartości srebra w innych narządach, w tym przede wszystkim w mózgu, mogą sugerować redystrybucję AgNPs w organizmie i wskazują na mózg jako narząd szczególnie zagrożony skutkami długotrwałej ekspozycji na AgNPs.

3. Jednorazowe podanie AgNPs wywołuje zmiany potencjału antyoksydacyjnego mózgu na poziomie zarówno ekspresji genów, jak i aktywności białek enzymów antyoksydacyjnych, w tym SOD i GSR, co może prowadzić do zaobserwowanych zmian w ekspresji genów układu RAS.
4. Przewlekłe podawanie niskich dawek AgNPs do przewodu pokarmowego ma szkodliwy wpływ na funkcje poznawcze, w tym pamięć krótko- i długotrwałą.
5. Do głównych struktur mózgu podatnych na akumulację srebra po podaniu dożołądkowym należy hipokamp i tylne obszary kory mózgowej.
6. Pomimo obecności srebra w hipokampie, po podaniu niewielkich ilości AgNPs opłaszczonych BSA, technika NanoSIMS wykazała, że występuje ono w formie jonowej, a nie nanocząstkowej, co wskazuje na kluczową rolę jonów srebra w indukcji zaburzeń pamięci przestrzennej zależnej od procesów koordynacji poznawczej,
7. AgNPs w sposób zależny od opłaszczenia modulują stężenia neurotransmiterów oraz neurosteroidów w mózgu.
8. AgNPs mogą wpływać na system obrony antyoksydacyjnej w hipokampie w sposób zależny od zastosowanej funkcjonalizacji powierzchni oraz inny niż działanie samych jonów srebra. Stabilizowane przez cytrynian AgNPs indukowały wyższy poziom stresu oksydacyjnego, o czym świadczą podwyższone poziomy GPx i TBARS.
9. Wszystkie wymienione zmiany mogą przyczyniać się do silnych efektów neurotoksycznych prowadzących do różnych schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym.

Wnioski końcowe

Przeprowadzone przeze mnie badania, których wyniki przedstawione zostały w artykułach **P1-P5** potwierdziły postawione przeze mnie hipotezy o toksycznym wpływie stosowanych w przemyśle spożywczym nanocząstek srebra na układ nerwowy. Ekspozycja na nanosrebro niezależnie od drogi podania spowodowała akumulację srebra w mózgu, w tym w szczególności w hipokampie oraz zaburzenia równowagi redoks. Niewielkie dawki AgNPs podawane drogą przewodu pokarmowego upośledzały funkcje poznawcze i wywoływały zmiany stężeń neurosteroidów i neurotransmiterów w hipokampie. Potencjalne mechanizmy toksyczności nanosrebra w tej strukturze mózgu to indukcja stresu oksydacyjnego, zmiany potencjału antyoksydacyjnego i modulacja syntezy i metabolizmu neurosteroidów wywoływane prawdopodobnie na skutek uwalniania z powierzchni AgNPs jonów Ag^+ . Toksyczność nanocząstek srebra podawanego drogą pokarmową została potwierdzona już przy narażeniu na niewielkie dawki tego nanomateriału. Ze względu na to, że doustna droga ekspozycji uważana jest za jedną z najbardziej krytycznych dróg oddziaływania nanocząstek oraz jest drogą odpowiadającą narażeniu wynikającemu z zastosowania nanosrebra w przemyśle spożywczym i

rolnictwie uzyskane wyniki wskazują na istotne ryzyko związane ze wzrostem wykorzystania nanosrebra w przemyśle spożywczym. Co interesujące, prowadzone przeze mnie badania wykazały, że efekty toksyczne można minimalizować poprzez modyfikację właściwości fizykochemicznych nanocząstek, w tym odpowiedni dobór rodzaju materiału użytego do stabilizacji powierzchni nanocząstek.

Uzyskane wyniki stanowią nowy i istotny wkład w dziedzinę technologii żywności i żywienia w zakresie poznania mechanizmów i neurotoksyczności szeroko stosowanego w przemyśle spożywczym nanosrebra, w tym w narażeniu na ekspozycję drogą pokarmową.

Bibliografia:

1. Akter, M.; Sikder, M.T.; Rahman, M.M.; Ullah, A.K.M.A.; Hossain, K.F.B.; Banik, S.; Hosokawa, T.; Saito, T.; Kurasaki, M. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J. Adv. Res.* 2018, 9, 1–16.
2. Ali, A., Ovais, M., Cui, X., Rui, Y., Chen, C. Safety assessment of nanomaterials for antimicrobial applications. *Chemical Research in Toxicology*, 2020, 33(5), 1082-1109.
3. Chen, R.J.; Huang, C.C.; Pranata, R.; Lee, Y.H.; Chen, Y.Y.; Wu, Y.H.; Wang, Y.J. Modulation of innate immune toxicity by silver nanoparticle exposure and the preventive effects of pterostilbene. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2536.
4. Cunningham, B.; Engstrom, A.E.; Harper, B.J.; Harper, S.L.; Mackiewicz, M.R. Silver nanoparticles stable to oxidation and silver ion release show size-dependent toxicity in vivo. *Nanomaterials* 2021, 11, 1516.
5. Deshmukh, S.P.; Patil, S.M.; Mullani, S.B.; Delekar, S.D. Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 97, 954–965.
6. Flores-López, L.Z., Espinoza-Gómez, H., Somanathan, R.. Silver nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review. *Journal of Applied Toxicology*, 2019, 39(1), 16-26.
7. Ghebretatios, M., Schaly, S., Prakash, S. Nanoparticles in the Food Industry and Their Impact on Human Gut Microbiome and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 4, 1942.
8. Gottardo, S., Mech, A., Drbohlavova, J., Małyska, A., Bowadt, S., Sintes, J.R. i Rauscher, H. Towards safe and sustainable innovation in nanotechnology: State-of-play for smart nanomaterials. *NanoImpact*, 2021, 100297
9. He, X., Deng, H., Hwang, H. M. The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of food and drug analysis*, 2019, 27(1), 1-21.

10. Ivlieva, A., Petritskaya, E., Rogatkin, D., Yushin, N., Grozdov, D., Vergel, K., Zinicovscaia, I. Does Nanosilver Have a Pronounced Toxic Effect on Humans?. *Applied Sciences*, 2022, 12(7), 3476.
11. Janzadeh, A., Behroozi, Z., Janzadeh, N., Arzani, H., Tanha, K. Neurotoxicity of silver nanoparticles in the animal brain: A systematic review and meta-analysis. *Forensic Toxicol.* 2021, 0123456789.
12. Khan, A.M., Korzeniowska, B., Gorshkov, V., Tahir, M., Schröder, H., Skytte, L., Rasmussen, K.L., Khandige, S., Møller-Jensen, J., Kjeldsen, F. Silver nanoparticle-induced expression of proteins related to oxidative stress and neurodegeneration in an in vitro human blood-brain barrier model. *Nanotoxicology* 2019, 13, 221–239.
13. Li, J., Tang, M., Xue, Y.. Review of the effects of silver nanoparticle exposure on gut bacteria. *Journal of Applied Toxicology*, 2019, 39(1), 27-37.
14. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351e358.
15. Panghal, A., Chhikara, N., Sindhu, N., Jaglan, S. Role of Food Safety Management Systems in safe food production: A review. *Journal of food safety*, 2018, 38(4), e12464.
16. Rezvani, E., Rafferty, A., McGuinness, C., Kennedy, J. Adverse effects of nanosilver on human health and the environment. *Acta Biomater.* 2019, 94, 145–159.
17. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2017, 360: 201-205.
18. Sarkar, B., Mahanty, A., Gupta, S. K., Choudhury, A. R., Daware, A., Bhattacharjee, S. Nanotechnology: A next-generation tool for sustainable aquaculture. *Aquaculture*, 2022, 546, 737330.
19. Strużyńska, L.; Skalska, J. Mechanisms Underlying Neurotoxicity of Silver Nanoparticles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018, 1048, 227–250.
20. Wang, M.; Li, S.; Chen, Z.; Zhu, J.; Hao, W.; Jia, G.; Chen, W.; Zheng, Y.; Qu, W.; Liu, Y. Safety assessment of nanoparticles in food: Current status and prospective. *Nano Today* 2021, 39, 101169.
21. WHO (World Health Organization): Silver in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva 2003, (WHO/SDE/WSH/03.04/14).
22. Yaqoob, A.A., Umar, K., Ibrahim, M.N.M. Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Applied Nanoscience*, 2020, 10(5), 1369-1378.
23. Xu, L., Liang, H. W., Yang, Y., Yu, S. H. Stability and reactivity: positive and negative aspects for nanoparticle processing. *Chemical reviews*, 2018, 118(7), 3209-3250.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Poniżej przedstawiono informacje o aktywności naukowej Wnioskodawczynie realizowanej poza jednostką macierzystą w więcej niż jednej instytucji naukowej, z podziałem na współpracę przed uzyskaniem stopnia doktora i po uzyskaniu tego stopnia.

W okresie **przed uzyskaniem stopnia doktora** moim pierwszym doświadczeniem w zakresie aktywności naukowej realizowanej we współpracy z innymi jednostkami był czynny udział w realizacji międzynarodowego projektu badawczego pt. „*Impact of Nanomaterials on Human Health: Lessons from in vitro and animal models*”, nr PNRF-122-AI-1/07, finansowanego w ramach Polsko-Norweskiego Funduszu Badań Naukowych. W zespole projektowym zaangażowane były dwie jednostki z Polski, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej (ICHTJ, lider projektu) i SGGW (partner), jak również dwa instytuty norweskie: Norwegian Institute for Air Research i Norwegian Institute of Public Health (partnerzy). W 2010 roku w ramach projektu odbyłam staż naukowy (5-20.11.2010) w Norwegian Institute of Public Health, którego zakres merytoryczny obejmował zastosowanie testów kometowych w badaniach genotoksyczności nanomateriałów.

Mój udział w badaniach dotyczył analiz toksyczności *in vivo* nanocząstek srebra i ditlenku tytanu, głównie ich szkodliwego działania na męski układ rozrodczy. Część uzyskanych wyników stanowiło podstawę mojej rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ nanocząstek srebra na metabolizm steroidów w gonadach”. W swojej rozprawie doktorskiej wykazałam, że u zwierząt narażonych na działanie nanocząstek srebra w gonadach samców dochodzi do zaburzenia przebiegu procesów regulujących funkcje reprodukcyjne, w szczególności metabolizmu steroidów, a także indukcji stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego. Uzyskane wyniki są istotnym wkładem w zrozumienie mechanizmów toksycznego działania nanocząstek i, co szczególnie istotne, umożliwiają między innymi poznanie patogenyzy schorzeń skutkujących obniżeniem płodności w odpowiedzi na działanie czynników środowiskowych. Jest to bardzo ważne ze względu na fakt, że w społeczeństwach krajów wysoko uprzemysłowionych obserwuje się postępujące obniżanie wskaźników rozrodczości. Wyniki badań wchodzących w zakres mojej rozprawy doktorskiej opublikowane zostały w dwóch artykułach naukowych wymienionych poniżej. Należy dodać, że oba artykuły cieszą się znaczną poczytnością w międzynarodowym środowisku naukowych, o czym świadczy liczba cytowań.

1. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, Gajowik A, Radzikowska J, Wojewódzka M, Kruszewski M. Silver nanoparticles

effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters*, 2012, 214 (3), 251-258. doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.028.

Liczba cytowań według bazy Scopus: 118; według bazy Web of Science: 104

2. Dziendzikowska K, Krawczyńska A, Oczkowski M, Królikowski T, Brzóska K, Lankoff A, Dziendzikowski M, Stępkowski T, Kruszewski M, Gromadzka-Ostrowska J. Progressive effects of silver nanoparticles on hormonal regulation of reproduction in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2016, 313: 35-46. doi:10.1016/j.taap.2016.10.013.

Liczba cytowań według bazy Scopus: 24; według bazy Web of Science: 24

Efektom mojej współpracy z IChTJ w ramach realizacji projektu pt. „*Impact of Nanomaterials on Human Health: Lessons from in vitro and animal models*”, nr PNRF-122-AI-1/07 było także opublikowanie kolejnego artykułu wymienionego poniżej:

1. Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Lankoff A, Oczkowski M, Krawczyńska A, Chwastowska J, Sadowska-Bratek M, Chajduk E, Wojewódzka M, Dusinska M, Kruszewski M. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 2012, 32: 920–928. doi: 10.1002/jat.275830.

Oprócz tematyki badawczej dotyczącej przygotowywanej rozprawy doktorskiej realizowanej we współpracy z IChTJ, w okresie studiów doktoranckich współpracowałam także z dr inż. Agatą Krawczyńską z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk (IFZZ) w badaniach dotyczących oceny potencjalnej neurotoksyczności nanocząstek srebra i ditlenku tytanu. Materiał biologiczny uzyskany z zakończonego projektu „*Impact of Nanomaterials on Human Health: Lessons from in vitro and animal models*” został wykorzystany do sprawdzenia czy akumulacja srebra w mózgu skutkuje zmianami równowagi redoks i/lub aktywności układu renina-angiotensyna w tym narządzie. Część badań realizowałam w Zakładzie Inżynierii Genetycznej IFZZ, a uzyskane wyniki, ilustrujące działanie nanosrebra oraz nanocząstek ditlenku tytanu w mózgu zostały opublikowane w poniższym artykule:

1. Krawczyńska A, Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Lankoff A, Herman AP, Oczkowski M, Królikowski T, Wilczak J, Wojewódzka M, Kruszewski M. Silver and titanium dioxide nanoparticles alter oxidative/inflammatory response and renin-angiotensin system in brain. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 85: 96–105; doi:10.1016/j.fct.2015.08.005.

Współpraca ze wszystkimi wymienionymi powyżej jednostkami naukowymi, jaka miała miejsce w okresie studiów doktoranckich, nie tylko w istotny sposób poszerzyła zakres moich kompetencji naukowych i umiejętności praktycznych, ale także umożliwiła niezwykle cenne kontakty naukowe, w tym

międzynarodowe, które zaowocowały dalszą współpracą już po uzyskaniu stopnia doktora. Nie bez znaczenia jest także fakt, że w realizacji rozprawy doktorskiej wykorzystałam materiał biologiczny zebrany w doświadczeniu *in vivo*, wykonanym w ramach projektu polsko-norweskiego nr PNRF-122-AI-1/07.

W okresie **po uzyskaniu stopnia doktora** kontynuowałam współpracę z wspomnianymi już jednostkami naukowymi zarówno krajowymi, jak i norweskimi, poszerzając ją o inne jednostki polskie i norweskie.

W ramach wieloletniej trwającej do dziś współpracy z Instytutem Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie (ICHTJ), szczególnie z prof. dr hab. Marcinem Kruszewskim, uznanym światowym autorytetem i ekspertem z zakresu nanotechnologii, nanomateriałów i nanotoksykologii, kierownikiem Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej, realizowałam wspólnie badania dotyczące efektów zdrowotnych ekspozycji na nanomateriały obejmujące ich dokładną charakterystykę fizykochemiczną i ocenę mechanizmów komórkowych w badaniach *in vitro*, a także badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, w które zaangażowany jest zespół naukowców z Zakładu Fizjologii Żywienia Katedry Dietetyki SGGW, w którym pracuję. Współpraca to umożliwia prowadzenie kompleksowych badań z wykorzystaniem umiejętności, wiedzy i możliwości aparaturowych obu jednostek naukowych, jak również doskonalenie mojego warsztatu badawczego oraz transfer wiedzy pomiędzy obu jednostkami. W Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej IChTJ w 2018 roku odbyłam miesięczny staż naukowy (15.01-14.02.2018), w trakcie którego realizowałam analizy pomiaru poziomu wolnych rodników metodą cytometrii przepływowej, a także uszkodzeń DNA przy użyciu testu kometowego i uszkodzeń chromosomalnego DNA testem mikrojądrowym w komórkach poddanych działaniu nanomateriałów. Pozwoliło mi to na poszerzenie mojej wiedzy i zdobycie nowych umiejętności praktycznych przydatnych w badaniach toksykologicznych. Wymiernym efektem tej współpracy jest także wspólnie realizowany projekt naukowy nr 2019/35/B/NZ7/04133, finansowany w ramach konkursu OPUS 18 przez Narodowe Centrum Nauki, pt. „Toksyczność nanoplastiku: wpływ na oś jelito-mózg”, koordynowany przez prof. dr hab. Marcina Kruszewskiego, a realizowany w konsorcjum – IChTJ jako lider i SGGW jako partner. W projekcie tym pełnię funkcję kierownika w SGGW, koordynując zadania zespołu naukowców w SGGW oraz aktywnie uczestniczę w zaplanowanych badaniach. Głównym celem realizowanych badań projektu OPUS 18 jest ocena różnych aspektów toksyczności nanoplastiku lub jego mieszaniny z nanocząstkami srebra, w szczególności w obrębie układu nerwowego i pokarmowego. W ramach projektu prowadzone są eksperymenty na hodowlach *in vitro* 2D/3D (ICHTJ) oraz badania na modelu szczurzym *in vivo* (SGGW). Ponieważ główną drogą narażenia człowieka na nanoplastik jest ekspozycja przez przewód pokarmowy, projekt koncentruje się na osi jelito-mózg, a więc łączy moje doświadczenie z wynikające z

badan neurotoksyczności nanocząstek srebra z doświadczeniem zdobytym w czasie realizacji badań w zespole prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej, dotyczących immunomodulacyjnych właściwości beta-glukanów owsa w różnych stanach patologicznych przewodu pokarmowego. Znaczny poziom narażenia na nanoplastik drogą pokarmową rodzi uzasadnione pytania o jego oddziaływanie na przewód pokarmowy, szczególnie jelito i zasiedlające je mikroorganizmy oraz, zważywszy na możliwość jego kumulacji w mózgu, wpływ na szlaki komunikacji pomiędzy układem pokarmowym a ośrodkowym układem nerwowym, czyli funkcjonowanie osi jelito-mózg. Realizowane we współpracy z IChTJ badania mają istotne znaczenie dla zdrowia publicznego ponieważ, mając na uwadze wysoki potencjał neurotoksyczny cząstek o rozmiarach nanometrowych oraz niewielką liczbę prac naukowych dotyczących oddziaływania nanoplastku na organizmy zwierząt lądowych i człowieka, poszerzenie wiedzy opartej na wynikach kompleksowych badań modelowych w tym zakresie jest obecnie koniecznością.

W ramach obecnej współpracy z IChTJ w powyższym projekcie opublikowany został artykuł przeglądowy, którego byłam pomysłodawczynią. Pierwszym autorem artykułu jest doktorant, realizujący doktorat w ramach projektu OPUS 18, którym opiekuję się jako promotor pomocniczy:

1. Grodzicki W, Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Kruszewski M. Nanoplastic impact on the gut-brain axis: current knowledge and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23), 12795; doi:10.3390/ijms222312795.

Uniwersytet im. Jana Kochanowskiego w Kielcach – prof. dr hab. Anna Lankoff oraz Norwegian Institute of Public Health, Oslo – prof. Johan Øvreik i dr Oddvar Myhre

W latach 2014-2017, jako jeden z wykonawców po stronie SGGW, brałam czynny udział w realizacji projektu międzynarodowego nr Pol-Nor/201040/72/2013 pt. "*Green fuels and human health - toxicity of engine emissions from 1st and 2nd generation biodiesel fuels (FuelHealth)*" finansowanego przez Program Polsko-Norweska Współpraca Badawcza ze środków Norweskiego Mechanizmu Finansowego. Głównym celem badań realizowanych we współpracy z Uniwersytetem im. Jana Kochanowskiego w Kielcach oraz *Norwegian Institute of Public Health* w Oslo była ocena wpływu narażenia zwierząt modelowych na spaliny silników diesla zasilanych biopaliwami pierwszej i drugiej generacji, ze szczególnym uwzględnieniem działania prozapalnego i uszkadzającego DNA oraz genotoksyczności, a także określenie wpływu stosowania filtrów cząstek stałych na te działania. ramach udziału w realizacji projektu wykonałam szereg analiz biochemicznych i molekularnych, a także byłam odpowiedzialna za analizę statystyczną wyników badań *in vivo*, jak również uczestniczyłam w pisaniu publikacji i prezentowałam wyniki na naukowych konferencjach krajowych i zagranicznych. W projekcie FuelHealth

zajmowałam się również zagadnieniami administracyjnymi i organizacyjnymi, co pozwoliło mi na zdobycie praktycznych umiejętności dotyczących realizacji projektów w konsorcjach naukowych, wymagało ścisłej współpracy z koordynator projektu, naukowcami i pracownikami administracji innych jednostek zaangażowanych w realizację projektu. Rezultatem naukowej współpracy są również poniższe artykuły:

1. Magnusson P, Oczkowski M, Øvrevik J, Gajewska M, Wilczak J, Biedrzycki J, Dziendzikowska K, Kamola D, Królikowski T, Kruszewski M, Lankoff A, Mruk R, Brunborg G, Instanes C, Gromadzka-Ostrowska J, Myhre O. No adverse lung effects of 7- and 28-day inhalation exposure of rats to emissions from petrodiesel fuel containing 20% rapeseed methyl esters (B20) with and without particulate filter - the FuelHealth project. *Inhalation Toxicology*, 2017, 29, 5: 206-218; doi: 10.1080/08958378.2017.1339149.
2. Dziendzikowska K, Gajewska M, Wilczak J, Mruk R, Oczkowski M, Żyła E, Królikowski T, Stachoń M, Øvrevik J, Myhre O, Kruszewski M, Wojewódzka M, Lankoff A, Gromadzka-Ostrowska J. The effects of 1st and 2nd generation biodiesel exhaust exposure on hematological and biochemical blood indices of Fisher344 male rats – the FuelHealth project. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2018, 63: 34-47; doi: 10.1016/j.etap.2018.08.001
3. Valand R, Magnusson P, Dziendzikowska K, Øvrevik J, Gajewska M, Wilczak J, Oczkowski M, Kamola D, Królikowski T, Kruszewski M, Lankoff A, Mruk R, Eide DM, Sapierzyński R, Gromadzka-Ostrowska J, Duale N, Myhre O. Gene expression changes in rat brain regions after 7- and 28 days inhalation exposure to exhaust emissions from 1st and 2nd generation biodiesel fuels - The FuelHealth project. *Inhalation Toxicology*, 2018, 30, 7-8: 299-312; doi: 10.1080/08958378.2018.1520370.
4. Magnusson P, Dziendzikowska K, Oczkowski M, Øvrevik J, Eide DM, Brunborg G, Gutzkow KB, Instanes K, Gajewska M, Wilczak J, Sapierzynski R, Kamola D, Królikowski T, Kruszewski M, Lankoff A, Mruk R, Duale N, Gromadzka-Ostrowska J, Myhre O. *Lung effects of 7- and 28-day inhalation exposure of rats to emissions from 1st and 2nd generation biodiesel fuels with and without particle filter – The FuelHealth project*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2019, 67: 8-20, doi:10.1016/j.etap.2019.01.005.
5. Oczkowski M, Wilczak J, Dziendzikowska K, Øvrevik J, Myhre O, Lankoff A, Kruszewski M, Gromadzka-Ostrowska J. *Dietary intervention with blackcurrant pomace protects rats from testicular oxidative stress induced by exposition to biodiesel exhaust*. *Antioxidants*, 2022, 11, 1562; doi:10.3390/antiox11081562.

Efektem współpracy w ramach projektu FuelHealth z profesorem Johanem Øvrevik i doktorem Oddvarem Myhre z *Norwegian Institute of Public Health* w Oslo było także złożenie do *Research Council of Norway* dwóch wspólnych wniosków o finansowanie badań naukowych. W tworzeniu tych wniosków aktywnie uczestniczyłam. Jeden z wniosków (nr 260381/H10, pt.: "*Preventive measures to reduce the adverse health impact of traffic-related air pollution*"; PrevenTAP) uzyskał finansowanie, a celem zakończonego w czerwcu 2022 roku wspólnie realizowanego projektu było znalezienie skutecznych strategii zmniejszania negatywnego wpływu zanieczyszczeń powietrza na zdrowie człowieka. W projekcie, jako jeden z wykonawców, uczestniczyłam w badaniach toksyczności spalin silników diesla i silników benzynowych zasilanych różnymi rodzajami paliw (badanie *in vivo* na szczurach laboratoryjnych) oraz toksycznego działania cząstek pochodzących z materiałów ściernalnych powstających w ruchu drogowym (opon samochodowych i nawierzchni dróg, badanie *in vivo* na myszach). Moje zaangażowanie w projekcie polegało na udziale w wykonaniu eksperymentów *in vivo* oraz analiz biochemicznych, molekularnych i statystycznych oraz podobnie jak w projekcie FuelHealth w obsłudze administracyjnej projektu w SGGW. Wyniki badań uzyskanych w ramach realizacji projektu PrevenTAP są obecnie przygotowywane do publikacji.

W ramach tej współpracy, dzięki środkom Własnego Funduszu Stypendialnego SGGW, odbyłam trzymiesięczny staż w *University of Oslo* oraz *Norwegian Institute of Public Health* w Oslo (04.03.-15.06.2019), którego celem było wykonanie badań na modelach *in vitro* nad toksycznością cząstek powstających w czasie spalania biopaliw.

W ramach tego stażu współpracowałam także z profesorem Ragnhild Paulsen oraz jej zespołem z *Department of Pharmacy, Section for Pharmacology and Pharmaceutical Biosciences, University of Oslo*, zajmującym się badaniami z zakresu neurobiologii. Jednym z elementów mojego pobytu w *University of Oslo* było zaprojektowanie i przeprowadzenie badań na modelu *in vivo* na embrionach kurzych. Dodatkowo, zgromadziłam cenną wiedzę dotyczącą wdrażania nowych metod oceny neurotoksyczności zanieczyszczeń powietrza, w tym metod opartych na analizie sygnalizacji zależnej od jonów wapnia w komórkach neuronalnych oraz zastosowania modelu zarodka kury w badaniach toksyczności neurorozwojowej. Druga część stażu, zaplanowana na kolejny rok, niestety z powodu pandemii SARS COVID-19 nie została zrealizowana.

Efektem współpracy z profesorem Ragnhild Paulsen z *University of Oslo* oraz profesorem Johanem Øvrevik i doktorem Oddvarem Myhre z *Norwegian Institute of Public Health* było również złożenie w konkursie GRIEG Narodowego Centrum Nauki wspólnego wniosku projektowego pt.: „Early-life air pollution exposure: impact on brain, mechanisms, and perspectives of dietary prevention”, który niestety nie uzyskał finansowania.

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie – dr hab. Małgorzata Węsierska, profesor Instytutu

Od 2015 roku współpracuję również z dr hab. Małgorzatą Węsierską, profesorem Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie (IBD), wybitną specjalistką w zakresie badania wyższych funkcji nerwowych na modelach zwierzęcych. W Zakładzie Neurofizjologii Pracowni Neuropsychologii IBD odbyłam staż naukowy (07.09-08.10.2015), w ramach którego prowadziłam pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Węsierskiej badania nad pamięcią angażującą procesy poznawcze na szczurzym modelu pamięci przestrzennej z zastosowaniem Testu Aktywnego Unikania Miejsca. Test ten to jedyna jak dotąd uznana na świecie metoda, która pozwala analizować funkcjonowanie pamięci przestrzennej (rodzaju pamięci deklaratywnej) w sytuacji wymagającej bieżącej analizy informacji i aktywnego odrzucania informacji mylących od użytecznych. Pierwotna wersja paradygmatu, na którym opiera się Testu Aktywnego Unikania Miejsca była wynaleziona przez André A. Fentona, pracującego w grupie profesora Jana Buresa w Instytucie Fizjologii Czeskiej Akademii Nauk w Pradze i po raz pierwszy opublikowana w 1997 roku.

Badania nad funkcjonowaniem pamięci z stosowaniem tej unikalnej w skali światowej metody prowadzone są tylko w trzech ośrodkach naukowych na świecie: przez profesora Alesia Suchlika w *Institute of Physiology* (Praga, Czechy), profesora Andre A. Fentona w *Centre of Neural Sciences (New York University, USA)* oraz przez profesor Małgorzatę Węsierską w Zakładzie Neurofizjologii IBD.

Dzięki współpracy z profesor Małgorzatą Węsierską miałam szansę zapoznać się z różnymi aspektami tej metody, a następnie wybrać i zastosować jeden z nich do wspólnie prowadzonych badań. Badania te łączyły wyniki zachowania zwierząt w Teście Aktywnego Unikania Miejsca otrzymane przeze mnie w Zakładzie Neurofizjologii IBD z wynikami badań biochemicznych i molekularnych prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Żywienia SGGW. Uzyskane wyniki wykazały istotne upośledzenie pamięci krótko- i długotrwałej u zwierząt poddanych działaniu nanocząstek srebra oraz pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmu działania tych nanocząstek na hipokamp, który jest kluczową dla funkcjonowania pamięci i procesów poznawczych strukturą mózgu. W analizach molekularnych zaplanowanych tak aby wyjaśniły mechanizmy zaburzeń pamięci obserwowane w badaniach behawioralnych, szczególną uwagę poświęcałam działaniu nanocząstek srebra na metabolizm neurosteroidów, które odgrywają zasadniczą rolę w regulacji aktywności i plastyczności neuronów, przez co mogą istotnie wpływać na procesy uczenia się i konsolidację pamięci. Wyniki wspólnych badań zostały opublikowane w poniższych artykułach naukowych:

1. Węsierska M, Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Dudek J, Polkowska-Motrenko H, Audinot JN, Gutleb AC, Lankoff A, Kruszewski M. *Silver ions are responsible for memory*

impairment induced by oral administration of silver nanoparticles. Toxicology Letters, 2018, 290:133–144; doi:10.1016/j.toxlet.2018.03.019.

2. Dziendzikowska K, Węsierska M, Gromadzka-Ostrowska J, Wilczak J, Oczkowski M, Męczyńska-Wielgosz S, Kruszewski M. *Silver nanoparticles impact cognitive functions and modify the hippocampal level of neurotransmitters in a coating-dependent manner*. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23), 12706; doi:10.3390/ijms222312706.
3. Dziendzikowska K, Wilczak J, Grodzicki W, Gromadzka-Ostrowska J, Węsierska M, Kruszewski M. *Coating-dependent neurotoxicity of silver nanoparticles - in vivo study on hippocampal oxidative stress and neurosteroids*. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3), 1365; doi:10.3390/ijms23031365.

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu – dr hab inż., Joanna Paulina Harasym, prof. UEW

Od początku mojej pracy naukowej na SGGW współpracuję z prof. dr hab. Joanną Gromadzką-Ostrowską, aktywnie uczestnicząc w realizacji kierowanych przez nią projektów finansowanych przez NCN, dotyczących prozdrowotnego działania spożycia beta-glukanów z owsa w różnych schorzeniach przewodu pokarmowego. Byłam i jestem wykonawcą w poniższych projektach badawczych:

1. „*Wpływ beta-glukanów owsa na proces zapalny w przewodzie pokarmowym*”; projekt nr NN 312 427440 finansowany przez MNiSW; okres realizacji 2011-2014.
2. „*Wpływ rozpuszczalnej frakcji beta-glukanów owsa na nieswoiste stany zapalne jelita grubego*”, projekt nr 2015/17/B/NZ9/01740, finansowany przez NCN w ramach konkursu OPUS 9, okres realizacji 2016-2020.
3. „*Mechanizmy działania 1-3,1-4-beta-D-glukanu z owsa we wczesnych stadiach kancerogenezy okrężnicy*”, projekt nr 2018/29/B/NZ9/01060, finansowany przez NCN w ramach konkursu OPUS 15, okres realizacji 2019-2023.

Wszystkie te projekty były realizowane we współpracy z dr hab. inż. Joanną Harasym, prof. UEW Katedry Biotechnologii i Analizy Żywności. Profesor Joanna Harasym jest wybitnym specjalistą z zakresu technologii beta-glukanów zbożowych i w jej Katedrze wykonywane były badania dotyczące izolacji z ziaren owsa oraz właściwości fizyko-chemicznych tych polisacharydów.

W wyniku współpracy opublikowane zostały poniższe artykuły naukowe:

1. Harasym J, Żyła E, Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J. *Proteinaceous residue removal from oat β -glucan extracts obtained by alkaline water extraction*. Molecules, 2019, 24(9), 1729; doi:10.3390/molecules24091729.

2. Żyła E, Dziendzikowska K, Gajewska M, Wilczak J, Harasym J, Gromadzka-Ostrowska J. *Beneficial effects of oat beta-glucan dietary supplementation in colitis depend on its molecular weight*. *Molecules*, 2019, 24(19), 3591; doi:10.3390/molecules24193591.
3. Kopiasz Ł, Dziendzikowska K, Gajewska M, Wilczak J, Harasym J, Żyła E, Kamola D, Oczkowski M, Królikowski T, Gromadzka-Ostrowska J. *Time-dependent indirect antioxidative effects of oat beta-glucans on peripheral blood parameters in the animal model of colon inflammation*. *Antioxidants*, 2020, 9(5): 375; doi:10.3390/antiox9050375.
4. Żyła E, Dziendzikowska K, Kamola D, Wilczak J, Sapieryński R, Harasym J, Gromadzka-Ostrowska J. *Anti-inflammatory activity of oat beta-glucans in a Crohn's disease model: time- and molar mass-dependent effects*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4485; doi:10.3390/ijms22094485.
5. Gudej S, Filip R, Harasym J, Wilczak J, Dziendzikowska K, Oczkowski M, Jałosińska M, Juszcak M, Lange E, Gromadzka-Ostrowska J. *Clinical outcomes after oat beta-glucans dietary treatment in gastritis patients*. *Nutrients*, 2021, 13(8), 2791; doi:10.3390/nu13082791.

W aktualnie realizowanym projekcie pt. „*Mechanizmy działania 1-3,1-4-beta-D-glukanu z owsa we wczesnych stadiach kancerogenezy okrężnicy*”, mającym na celu określenie zdolności beta-glukanów owsa o małej masie molowej do zahamowania rozwoju zmian nowotworowych w okrężnicy na wczesnym etapie kancerogenezy, ściśle współpracuję również z naukowcami z Katedry Nauk Fizjologicznych Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW – dr hab. Małgorzatą Gajewską, prof. SGGW, dr Jackiem Wilczakiem i dr Alicją Majewską, a także z prof. dr hab. Rafałem Sapieryńskim z Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej IMW. W ramach tej współpracy część badań zaplanowanych we wspomnianym projekcie (analizy epigenetyczne, mtabolomiczne, histologiczne oraz markerów stanu zapalnego okrężnicy i profilu mikrobioty jelitowej metodą NGS) realizuję we wspomnianych powyżej Katedrach IMW.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Osiągnięcia dydaktyczne

6.1.1 Opracowanie oraz realizacja zajęć dydaktycznych

Od czasu studiów doktoranckich w 2009 roku realizowałem zajęcia dydaktyczne prowadząc zajęcia na pięciu kierunkach studiów, w tym głównie na kierunku Dietetyka, Żywnienie człowieka i ocena żywności, Gastronomia i hotelarstwo. Od czasu zatrudnienia na stanowisku naukowo-dydaktycznym w 2015 roku

zrealizowałam ponad dwa tysiące godzin dydaktycznych prowadząc zajęcia zarówno z przedmiotów obligatoryjnych jak i fakultatywnych, realizowanych na I i II stopniu studiów.

1. Zajęcia realizowane na kierunku Dietetyka, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie do 2019 roku lub Wydział Żywienia Człowieka po 2019 roku:
 - Anatomia człowieka – wykłady i ćwiczenia
 - Fizjologia człowieka – ćwiczenia
 - Dietetyka w wieku prokreacyjnym i rozwojowym – wykłady i ćwiczenia, koordynator przedmiotu
 - Patofizjologia kliniczna – wykłady i ćwiczenia
 - Kliniczny zarys chorób I – wykłady i ćwiczenia
 - Regulacja metabolizmu – ćwiczenia
 - Metabolizm białka i energii – ćwiczenia
 - Ochrona zdrowia – wykłady (zajęcia fakultatywne)
 - Środowiskowe zagrożenia zdrowia – wykłady (zajęcia fakultatywne)
 - Etnodietetyka – wykłady (zajęcia fakultatywne)
2. Zajęcia realizowane na kierunku Żywność człowieka i ocena żywności, Wydział Nauk Żywienia Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie do 2019 roku lub Wydział Żywienia Człowieka po 2019 roku:
 - Anatomia człowieka – wykłady i ćwiczenia
 - Fizjologia człowieka – ćwiczenia
 - Żywność w wieku rozwojowym – ćwiczenia
 - Dietoprofilaktyka – wykłady (zajęcia fakultatywne)
 - Żywność a odporność organizmu – wykłady (zajęcia fakultatywne)
 - Środowiskowe zagrożenia zdrowia – wykłady (zajęcia fakultatywne)
3. Zajęcia realizowane na kierunku Gastronomia i hotelarstwo, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie do 2019 roku lub Wydział Żywienia Człowieka po 2019 roku:
 - Żywność a odporność organizmu – wykłady (zajęcia fakultatywne)
 - Środowiskowe zagrożenia zdrowia – wykłady (zajęcia fakultatywne)
4. Zajęcia realizowane na kierunku Biologia, Wydział Biologii i Biotechnologii:
 - Anatomia człowieka – wykłady i ćwiczenia
5. Zajęcia realizowane na kierunku Food Science - Technology and Nutrition w języku angielskim:
 - Biology – wykłady

6. Zajęcia realizowane dla Studentów w ramach programu Erasmus+ w języku angielskim:

- Nutrition and Immunity – wykłady

6.1.2 Opieka naukowa nad doktorantami:

Pełnienie funkcji promotora pomocniczego trzech prac doktorskich:

1. Żyła Ewa; Temat rozprawy doktorskiej: *„Wpływ beta-glukanów owsa na przebieg stanu zapalnego jelita grubego”*; Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, data obrony: 15-10-2021.
2. Łukasz Kopiasz; Temat rozprawy doktorskiej: *„Mechanizmy działania β -D-glukanu owsa na przebieg choroby Crohna i wczesnych stadiów kancerogenezy okrężnicy – badania modelowe in vivo”*; Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, doktorant V roku.
3. Wojciech Grodzicki; Temat rozprawy doktorskiej: *„Wpływ nanoplastiku na funkcjonowanie osi jelito-mózg”*; Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, doktorant III roku Szkoły Doktorskiej SGGW w Warszawie.
4. Alicja Zalecińska; Temat rozprawy doktorskiej: *„Wpływ nanoplastiku na metabolizm jelita grubego i profil mikrobioty jelitowej ; Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, doktorant I roku Szkoły Doktorskiej SGGW w Warszawie.*

6.1.3 Opieka naukowa nad studentami:

Pełnienie funkcji promotora 4 prac magisterskich oraz 7 prac inżynierskich/licencjackich na kierunkach studiów Dietetyka, Żywnienie Człowieka i Ocena Żywności oraz Biologia.

1. Praca magisterska; Wydział Żywnienia Człowieka, kierunek: dietetyka. Tytuł pracy: *„Analiza wpływu wytlóków z czarnej porzeczki na parametry stresu oksydacyjnego w wątrobie szczurów”*; data egzaminu dyplomowego: 19.09.2019
2. Praca magisterska; Wydział Żywnienia Człowieka, kierunek: żywienie człowieka i ocena żywności. Tytuł pracy: *„Analiza mechanizmów neurotoksycznego działania nanocząstek srebra w badaniu modelowym in vivo”*; data egzaminu dyplomowego: 21.07.2020
3. Praca magisterska; Wydział Żywnienia Człowieka, kierunek: dietetyka. Tytuł pracy: *„Ocena przeciwnowotworowego działania beta-glukanów owsa - badanie modelowe”*; data egzaminu dyplomowego: 23.11.2021
4. Praca magisterska; Wydział Żywnienia Człowieka, kierunek: dietetyka. Tytuł pracy: *„Ocena wpływu beta-glukanów owsa na proces apoptozy - badania na modelu nowotworu jelita grubego”*; data egzaminu dyplomowego: 19.01.2022
5. Praca inżynierska; Wydział Żywnienia Człowieka, kierunek: żywienie człowieka i ocena żywności. Tytuł pracy: *„Opracowanie materiałów edukacyjnych dotyczących wybranych składników*

biologicznie czynnych w prewencji nowotworów przewodu pokarmowego”; data egzaminu dyplomowego: 19-01-2022

6. Praca inżynierska; Wydział Żywienia Człowieka, kierunek: żywienie człowieka i ocena żywności. Tytuł pracy: „Projekt materiałów informacyjnych dotyczących wpływu wybranych składników pokarmowych na funkcjonowanie osi jelito-mózg”; data egzaminu dyplomowego: 08.02.2022
7. Praca licencjacka; Wydział Rolnictwa i Biologii, kierunek: biologia. Tytuł pracy: „Ocena wpływu beta-glukanów owsa na szlak zewnątrzpochodny apoptozy w jelicie”; data egzaminu dyplomowego: 06.07.2021
8. Praca licencjacka; Wydział Żywienia Człowieka, kierunek: dietetyka. Tytuł pracy: „Projekt materiałów informacyjnych dotyczących wpływu wybranych składników biologicznie czynnych w prewencji depresji”; data egzaminu dyplomowego: 16.07.2021.
9. Praca licencjacka; Wydział Żywienia Człowieka, kierunek: dietetyka. Tytuł pracy: „Projekt materiałów informacyjnych dotyczących wpływu sposobu żywienia na przebieg wrzodziejącego zapalenia jelita grubego”; data egzaminu dyplomowego: 27.10.2020.
10. Praca inżynierska; Wydział Żywienia Człowieka, kierunek: żywienie człowieka i ocena żywności. Tytuł pracy: „Projekt materiałów informacyjnych dotyczących wpływu substancji biologicznie czynnych na nastrój i przebieg procesów poznawczych u osób dorosłych”; data egzaminu dyplomowego: 07.02.2020.
11. Praca inżynierska; Wydział Żywienia Człowieka, kierunek: żywienie człowieka i ocena żywności. Tytuł pracy: „Projekt materiałów informacyjnych dotyczących roli wybranych substancji bioaktywnych w profilaktyce chorób neurodegeneracyjnych”; data egzaminu dyplomowego: 06.02.2019

6.1.4 Inne aktywności dydaktyczne:

1. Opiekun roku Studentów na kierunku Dietetyka dla studentów przyjętych w roku akademickim 2018/2019
2. Opiekun roku Studentów na kierunku Dietetyka dla studentów przyjętych w roku akademickim 2021/2022.
3. Udział w pracach Zespołu ds. Jakości Kształcenia Wydziału Żywienia Człowieka w kadencji 01.12.2020 - 31.08.2024

6.2 Osiągnięcia organizacyjne

6.2.1 Członkostwo w Radach i Komisjach

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Udział w pracach komisji okręgowego etapu XXXIV edycji Olimpiady Widzy i Umiejętności Rolniczych, Warszawa, 09.04.2010.
2. Udział w pracach komisji okręgowego etapu XXXV edycji Olimpiady Widzy i Umiejętności Rolniczych, Warszawa, 15.04.2011.
3. Rada Doktorantów SGGW w Warszawie. Przedstawiciel doktorantów Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji w roku akademickim 2011/2012; Funkcja: Komisja Regulaminowa - Przewodnicząca, Komisja Rewizyjna – członek.
4. Rada Doktorantów SGGW w Warszawie. Przedstawiciel doktorantów Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji w roku akademickim 2012/2012; Funkcja: Sąd koleżeński i sekcja stypendialna.
5. Członek Rektorskiej Komisji d.s. Stypendium Projakościowego w roku akademickim 2011/2012.
6. Członek Senackiej Komisji ds. Statutu i Struktury SGGW w Warszawie w roku akademickim 2012/2013 oraz 2013/2014

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Udział w pracach komisji XXXIX edycji Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych, 17 kwietnia 2015 r.
2. Udział w pracach komisji oceniającej blok tematycznego „Gastronomia” w etapie okręgowym XLI edycji Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych, 21 kwietnia 2017 r.
3. Udział w pracach Zespołu ds. Promocji Wydziału Żywnienia Człowieka od 01.10.2019 do 31.08.2020
4. Udział w pracach Zespołu ds. Promocji Wydziału Żywnienia Człowieka w okresie od 01.10.2019 do 31.08.2020
5. Udział w pracach Zespołu ds. Promocji w Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka w kadencji 01.12.2020 - 31.08.2024

6.2.2 Udział w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. IV Konferencja Naukowa „Fizjologiczne uwarunkowania postępowania dietetycznego”, Rogów, 3 – 5.11.2010 – komitet organizacyjny
2. V Konferencja Naukowa „Fizjologiczne uwarunkowania postępowania dietetycznego”, Rogów, 7- 9.11.2012 – komitet organizacyjny

3. Międzynarodowa Konferencja Jubileuszowa - "Nauka o Żywieniu Człowieka - osiągnięcia i wyzwania", Warszawa, 28-29.06.2013 – komitet organizacyjny
4. VI Konferencja Naukowa „Fizjologiczne uwarunkowania postępowania dietetycznego Rogów, Rogów, 5 – 7.11.2014 – komitet organizacyjny

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. VII Konferencja Naukowa „Fizjologiczne uwarunkowania postępowania dietetycznego”, Rogów, 8-10.11.2016 – komitet organizacyjny
2. VIII Konferencja Naukowa „Fizjologiczne uwarunkowania postępowania dietetycznego”, Warszawa, 8-9 listopada 2018 – komitet organizacyjny
3. IX Konferencja Naukowa „Fizjologiczne uwarunkowania postępowania dietetycznego” organizowana przez Katedrę Dietetyki Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW, Warszawa, 17-18 listopada 2022 – komitet organizacyjny

6.3 Osiągnięcia popularyzujące naukę

1. Aktywny udział w realizacji pokazu „*Ruch to wyzwanie – ruszajmy się i spalajmy kalorie*” w ramach 22.PIKNIKU NAUKOWEGO Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik 2018.
2. Aktywny udział w prowadzeniu lekcji pt: "O *ruchu w brzuchu*" na Wydziale Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW oraz warsztatów „ *O ruchu w brzuchu*” w trakcie Naukowego weekendu z kampusem Ochota organizowanego w ramach Festiwalu Nauki Młodego Człowieka 2019.
3. Aktywny udział w realizacji warsztatów „*O ruchu w brzuchu*” dla uczniów Publicznej Katolickiej Szkoły Podstawowej im. ks. Jana Twardowskiego w Ząbkach, 26.02.2020
4. Aktywny udział w prowadzeniu warsztatów pt: "O *ruchu w brzuchu*" w ramach 24. Festiwalu Nauki w Warszawie, 2020.
5. Przygotowanie i wygłoszenie prelekcji pt.: „*Nanocząstki – szansa czy zagrożenie*” w ramach Wszechnicy Żywieniowej SGGW, czerwiec 2020
6. Aktywny udział w prowadzeniu lekcji pt: "O *ruchu w brzuchu*" w Szkole Podstawowej nr 209; Al. Reymonta 25 w Warszawie oraz Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW w Warszawie w ramach Festiwalu Nauki w Warszawie, 2021
7. Aktywny udział w prowadzeniu lekcji pt: "O *ruchu w brzuchu*" w Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW w Warszawie dla klasy ze Szkoły Podstawowej w Jazgarzewie im. Księdza Kardynała Stefana Wyszyńskiego w ramach Festiwalu Nauki w Warszawie, 2021

8. Zadanie realizowane na podstawie umowy z Ministerstwem Edukacji i Nauki nr MEiN/2022/DPI/96 z dnia 7 marca 2022 r. „Przeprowadzenie badań naukowych z zakresu żywienia dzieci i młodzieży oraz opracowanie i wdrożenie programu edukacji żywieniowej uczniów klas I-VI szkół podstawowych. Akronim: Junior – Edu-Żywnienie (JEŻ)”; wykonawca.

7 Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Nagrody i wyróżnienia

1. Nagroda Europejskiego Patofizjologicznego przyznana na konferencji 8th International Congress of Pathophysiology, Bratysława, Słowacja 05 - 08 .09.2018.
2. Dyplom za zajęcie II miejsca w konkursie na najlepszy poster multimedialny na XXV Ogólnopolskim Sympozjum Bromatologicznym, Warszawa-Józefów, 12-13.09.2016. Tytuł prezentacji: „*Wpływ nanocząstek srebra na wybrane parametry stanu zapalnego w jelicie grubym w badaniach modelowych in vivo*”.
3. Nagroda Towarzystwa Biologii Rozrodu przyznana na konferencji The 4th Winter Workshop of the Society for Biology of Reproduction "Central and Local Regulations of Reproductive Processes" Zakopane, 3 - 4.02.2016. Tytuł prezentacji: “*The effect of diesel exhaust from combustion of 1st generation biodiesel fuels (B7) on sex steroid hormones concentration and sperm count in male Fischer 344 rats*”
4. Wyróżnienie rozprawy doktorskiej i obrony pracy doktorskiej przez Radę Wydziału Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji SGGW w Warszawie, 22.10.2014.
5. Dyplom uznania Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie za osiągnięcia naukowe. 1.10.2013.
6. Nagroda za II miejsce w konkursie na najlepszy poster, na konferencji: Nanoved & Nanotech & Nanotransfer 2010, Bratysława, 16-19.05.2010. Tytuł prezentacji: The influence of silver nanoparticles on male rat gonads
7. Nagroda za najlepszą prezentację ustną na VII Konferencja Młodych Badaczy "Fizjologia i Biochemia w Żywieniu Zwierząt", Kraków, 20-21.09.2010. Tytuł prezentacji: The influence of titanium dioxide nanoparticles on sex steroid hormones levels in male Wistar rats

Zestawienie dorobku publikacyjnego

Sumaryczne zestawienie całkowitego dorobku publikacyjnego

| Lp. | Rodzaj publikacji | Liczba prac | Punkty MNiSW/MEN* | Sumaryczny IF* |
|---------|--|-------------|-------------------|----------------|
| 1. | Publikacje naukowe z listy A MNiSW/MEN | 25 | 2 225 | 116.067 |
| 2. | Publikacje naukowe z listy B MNiSW/MEN | 4 | 36 | - |
| Łącznie | | 29 | 2 261 | 116.067 |

* Punktację MNiSW/MNiE liczono wg listy MNiSW z dn. 25.01.2017 r. dla artykułów wydanych przed 2019 r, lub wg listy MEiN z dn. 01.12.2021 r. dla artykułów wydanych po 2019 r.; Sumaryczny IF liczono zgodnie z datą publikacji.

Porównanie dorobku publikacyjnego przed i po uzyskaniu stopnia doktora

| Lp. | Rodzaj publikacji | Dorobek publikacyjny przed uzyskaniem stopnia doktora | | | Dorobek publikacyjny po uzyskaniu stopnia doktora | | | SUMA | | |
|---------|---|---|--------------------|-------|---|--------------------|---------|-------------|--------------------|---------|
| | | Liczba prac | Punkty MNiSW/MEiN* | IF* | Liczba prac | Punkty MNiSW/MEiN* | IF* | Liczba prac | Punkty MNiSW/MEiN* | IF* |
| 1. | Publikacje naukowe z listy A MNiSW/MEiN | 2 | 65 | 5,742 | 23 | 2 160 | 110.325 | 25 | 2 225 | 116.067 |
| 2. | Publikacje naukowe z listy B MNiSW/MEiN | 2 | 26 | - | 2 | 10 | - | 4 | 36 | - |
| Łącznie | | 4 | 91 | 5,742 | 25 | 2 170 | 110.325 | 29 | 2 261 | 116.067 |

* Punktację MNiSW/MNiE liczono wg listy MNiSW z dn. 25.01.2017 r. dla artykułów wydanych przed 2019 r, lub wg listy MEiN z dn. 01.12.2021 r. dla artykułów wydanych po 2019 r.; Sumaryczny IF liczono zgodnie z datą publikacji.

Informacje naukometryczne (stan na dzień 03.11.2022)

| | wg Web of Science | wg bazy Scopus |
|--------------------------------|-------------------|----------------|
| Liczba cytowań | 496 | 550 |
| Liczba cytowań bez autocytowań | 460 | 499 |
| Indeks H | 10 | 10 |

Kataryna Dziendziowska
.....
(podpis wnioskodawcy)