

AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM

**Mechanizmy szkodliwego działania pestycydów
na czynność macicy i jajnika krowy *in vitro***

dr Michał Hubert Wróbel

**Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie**

Olsztyn 2019

M. Wróbel

SPIS TREŚCI

I.	DANE OSOBOWE	3
II.	POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE	3
III.	INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH	3
IV.	OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE	4
	A. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
	B. PUBLIKACJE WCHODZACE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
	C. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	5
	C.1 – Wprowadzenie	5
	C.2 – Cel publikacji wchodzących w skład osiągnięcia	9
	C.3. – Materiały i metody	10
	C.4. – Omówienie wyników prac eksperymentalnych	12
	C. 5. – Podsumowanie	16
	C.6. – Wnioski	19
	C.7. – Literatura	20
V.	OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH	23
VI.	PODSUMOWANIE DZIAŁALNOŚCI NAUKOWO BADAWCZEJ	30

I. Dane osobowe

Imiona i nazwisko **Michał Hubert Wróbel**
Nr ORCID 0000-0002-7812-2070

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

Z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- **Dyplom doktora nauk biologicznych (2008.09.09)** w zakresie biologii, fizjologii zwierząt. Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Mechanizm działania polichlorowanych bifenyli na motorykę miometrium oraz czynność sekrecyjną endometrium krowy.” Promotor *prof. dr hab. Jan Kotwica*. Praca została zrealizowana w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (2008) oraz przez Dyrektora Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie (2009).
- **First Certificate In English (2005).**
- **Dyplom magistra biologii (2002)** Wydział Biologii, kierunek biologia, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Tytuł pracy magisterskiej: „Aktywność motoryczna jajowodu u krów – badanie wpływu oksytocyny, acetylocholino i noradrenaliny na skurcze mięśniówki jajowodu”. Promotor *dr hab. Genowefa Kotwica, prof. UWM*. Praca została zrealizowana w Katedrze Fizjologii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.
- **Kwalifikacje do zajmowania stanowiska nauczyciela biologii (2002)** Międzywydziałowe Studium Pedagogiczne, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.
- **Dyplom technika informatyki (2001)** Warmińsko - Mazurski Zakład Doskonalenia Zawodowego w Olsztynie.

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

11.2008 - obecnie – Adiunkt, Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

06.2002 – 10.2008 - Asystent, Zakład Endokrynologii Rozrodu Bydła, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

IV. Osiągnięcie naukowe

Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

Mechanizmy szkodliwego działania pestycydów na czynność macicy i jajnika krowy *in vitro*.

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Cykl 5 oryginalnych prac eksperymentalnych powiązanych tematycznie:

P.1.Wrobel MH.*, Mlynarczuk J. Secretory function of ovarian cells and myometrial contractions in cow are affected by chlorinated insecticides (chlordane, heptachlor, mirex) *in vitro*. (2017a) **Toxicology and Applied Pharmacology** 314, 63-71 (IF: 3,616^a; MSWiN: 40^b)

P.2.Wrobel MH.*, Mlynarczuk J. The inhibition of myometrial contractions by chlorinated herbicides (atrazine and linuron), and their disruptive effect on the secretory functions of uterine and ovarian cells in cow, *in vitro*. (2017b) **Pesticide Biochemistry and Physiology** 142, 44-52 (IF: 3,440^a; MSWiN: 30^b)

P.3.Wrobel MH.*, Mlynarczuk J. Chlorinated insecticides (toxaphene and endrin) affect oxytocin, testosterone, oestradiol and prostaglandin secretion from ovarian and uterine cells as well as myometrial contractions in cow *in vitro*. (2018) **Chemosphere** 198, 432-441 (IF: 4,427^a; MSWiN: 35^b)

P.4.Wrobel MH.* Glyphosate affects the secretion of regulators of uterine contractions in cows, while it does not directly impair the motoric function of myometrium *in vitro*. (2018a) **Toxicology and Applied Pharmacology** 349, 55–61 (IF: 3,616^a; MSWiN: 40^b)

P.5.Wrobel MH.* Do chlorinated insecticides (aldrin and DDT) or products of their transformations (dieldrin and DDE) impair signal transfer from regulators (oxytocin and relaxin) of bovine myometrium motility *in vitro*? (2018b) **Environmental Research** 167, 234–239 (IF: 4,732^a; MSWiN: 45^b)

* Oznaczono autora korespondencyjnego.

☐ **Sumaryczny *impact factor* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg listy Journal Citation Reports (JCR): 19,831^a**

☐ **Suma punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego wg wykazu czasopism naukowych MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania: 190^b**

☐ **Suma cytowań w/w publikacji (na dzień 25.03.2019): 2^c.**

^a Impact factor (IF) podano według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania (aktualnie obowiązuje IF z 2017).

^b Punkty MNiSW podano według Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 25 stycznia 2017 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach.

^c Cytowania w/w publikacji wg Bazy Web of Science (bez autocytowań).

Wkład Wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w Załączniku 5. Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład zamieszczono w Załączniku 6.

C. Omówienie osiągnięcia naukowego¹

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

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowi powiązany tematycznie cykl 5 publikacji, poświęconych wyjaśnieniu wielopoziomowych mechanizmów szkodliwego działania pestycydów na kurczliwość miometrium krwi poprzez zakłócenia czynności wydzielniczej macicy i jajnika oraz zmian przekazu sygnału do skurczu, *in vitro*.

C.1. Wprowadzenie

Związki zakłócające funkcjonowanie układu endokrynnego (tzw. „*endocrine disruptors*”), takie jak fito- i ksenoestrogeny, powodują zaburzenia w rozrodzie zwierząt. Nieliczne dane epidemiologiczne wskazują, że ksenoestrogeny pochodzące z dwóch odrębnych grup ksenobiotyków, tj. polichlorowanych bifenyli (PCBs) oraz pestycydów, mogą być odpowiedzialne za poronienia lub przedwczesne porody. Mechanizm działania PCBs

¹ Wykaz skrótów: CAV-kaweolin, DAG-diacylglicerol, DDE-dichlorodifenylidichloroetylen, DDT – dichlorodifenyltrichloroetan, GAP-gap junction proteins, E2-estradiol, IP3-trifosforan-inozytolu, LIF-leukemia inhibitory factor, MLCK-kinaza lekkich łańcuchów miozyny, NP-I/OT-Neurophysin-I/oxytocin, OT-oksytocyna, P4-progesteron, PCBs–polichlorowane bifenyle, PG(s)-prostaglandyna(y), PGA-peptidyl glycine-amidating monooxygenase, PKC-kinaza białkowa C, RLY-relaksyna, RRLX-receptor relaksyny, ROT-receptor oksytocyny, T-testosteron

zakłócający aktywność motoryczną mięśniówki gładkiej macicy krowy wiąże się z wydzielaniem prostaglandyn (PGs) z macicy oraz zmianą wewnątrzkomórkowej mobilizacji jonów wapnia w miometrium, co zostało wykazane w moich wcześniejszych badaniach (Wróbel, 2008 – praca doktorska; Załącznik 5: II.A.2, II.A.3, II.A.4, II.A.6, II.B.3). Wciąż niejasny jest jednak mechanizm działania pestycydów na kurczliwość miometrium.

Pestycydy jako skażenie środowiska i „endocrine disruptors”

Pestycydy są używane przeciwko organizmom szkodliwym lub niepożądanym. Stosowane są głównie dla ochrony upraw rolnych, ale także ludzi, zwierząt i miejsc ich przebywania oraz miejsc przechowywania produktów żywnościowych i płodów rolnych. Według ich zastosowania do bezpośredniego zwalczania organizmów, wyróżnia się przede wszystkim zoocydy (w tym insektycydy – środki owadobójcze, które ze względu na różnorodność i ilość gatunków owadów stanowią najliczniejszą grupę wśród środków przeciwko szkodnikom zwierzęcym), herbicydy (środki chwastobójcze) i fungicydy (środki grzybobójcze). Do pestycydów należą także związki działające pośrednio: odstrasżające, wabiące oraz regulatory wzrostu (Malinowska i wsp., 2015).

Opierając się na chemicznej budowie, do najważniejszych grup pestycydów zalicza się: chloroorganiczne (m.in. dichlorodifenyiltrichloroetan tj. DDT, aldryna, dieldryna, endryna, chlordan, heptachlor, mireks, toksafen), triazyny (m.in. atrazyna), pochodne mocznika (linuron), organofosforany (m.in. glifosat, malation), karbamaty (m.in. karbaryl, thiram), pyretroidy (m.in. cypermethrin, fenwalerat) (Rider i wsp., 2010; Rattan i wsp., 2017)².

Chloroorganiczne insektycydy zaczęto stosować od lat 40'tych XX wieku. DDT, który w środowisku ulega przekształceniu do dichlorodifenyldichloroetyleny (DDE), był początkowo używany jedynie do zwalczania owadów rozprzestrzeniających malarię i tyfus (Rogan i Chen, 2005). Masowa produkcja i powszechne użycie DDT, ale także chlordanu, heptachloru i mireksu, jako środka ochrony roślin rozpoczęły się dopiero po zakończeniu II wojny światowej. Wkrótce na rynku pojawiły się aldryna, dieldryna i endryna, które od lat 60'tych XX wieku razem z polichloroorganiczną pochodną kamfenu (toxafen) zaczęły stopniowo zastępować DDT (WHO, 1989; Bonefeld-Jorgensen, 1997).

² W nawiasach wymieniono najbardziej powszechnych przedstawicieli danych grup pestycydów. Podkreślono pestycydy, których mechanizm działania jest przedmiotem badań zgłoszonego osiągnięcia naukowego. Natomiast wpływ pozostałych pestycydów (niepodkreślonych), na czynność układu rodny krowy, stanowi przedmiot aktualnie prowadzonych badań habilitanta.

Wszystkie wymienione insektycydy są związkami bardzo stabilnymi i odpornymi na degradację, które szybko rozprzestrzeniły się w środowisku i stąd wkrótce uznano je za trwałe zanieczyszczenie organiczne (POPs: *persistent organic pollutants*). Do dziś są oznaczane w glebie (Barron i wsp., 2017; Sruthi i wsp., 2017), w wodzie (Wu i wsp., 2014; Wang i wsp., 2017) i w powietrzu (Shunthirasingham i wsp., 2016), na terenach rolniczych, ale także daleko od źródeł ich emisji (Bravo i wsp., 2019).

Ze względu na właściwości lipofilne, wymienione pestycydy kumulują się w kolejnych ogniwach łańcucha pokarmowego. Wciąż oznacza się je m.in. we krwi (Byrne i wsp., 2015) i w płynie pęcherzykowym (Zhu i wsp., 2015) ludzi. Są oznaczane także w próbkach mięsa (Jiang i wsp., 2016; Mahmoud i wsp., 2016), mleka (Deti i wsp., 2014) i w płynie pęcherzykowym (Kamarianos i wsp., 2003) krów.

Po przeniknięciu do organizmu, pestycydy jako „*endocrine disruptors*” wykazują właściwości substancji biologicznie czynnych i mogą działać m.in. jako ligandy (aktywatory / blokery) receptorów estrogenowych, androgenowych, węglowodorów aromatycznych i in. (Lee i wsp., 2013; Załącznik 5: II.B.12).

Z uwagi na ich toksyczny lub kancerogeny wpływ na zwierzęta i ludzi, produkcja i użycie badanych chloroorganicznych insektycydów zostały zakazane w Szwecji (1970), a wkrótce potem w USA, Chinach, Japonii i w krajach europejskich (Bonfeld-Jorgensen, 1997; Jorgenson, 2001; Li i wsp., 2006). W 2001 roku aldryna, chlordan, DDT, dieldryna, endryna, heptachlor, mireks i toksafen, obok PCBs i dioksyn, trafiły na listę 12 niebezpiecznych substancji (tzw. „Dirty dozen” wg Konwencji Sztokholmskiej), których produkcja i użycie zostały powszechnie zakazane (Stockholm Convention, 2001; Tsai, 2010). Pomimo to DDT, aldryna i dieldryna wciąż są używane w rolnictwie i medycynie w niektórych krajach afrykańskich i w Indiach (Antonio-Nkondjio i wsp., 2017; Sharma i wsp., 2017).

Obecnie to herbicydy dominują w strukturze sprzedaży spośród wszystkich pestycydów (Malinowska i wsp., 2015; Lushchak i wsp., 2018). Wśród nich glifosat (występujący przede wszystkim w ostatecznej, komercyjnej formie jako Roundup®), atrazyna i linuron należą do najczęściej używanych pestycydów/herbicydów w skali globalnej (Shipitalo i Owens, 2011; Ackerman i wsp., 2014; Cai i wsp., 2017), głównie w USA i w Indiach. Coraz częściej zwraca się jednak uwagę, że również one stanowią zanieczyszczenie środowiska (Shipitalo i Owens, 2011; Bento i wsp., 2017; Almberg i wsp., 2018). Ich użycie w Europie jest obwarowane ograniczeniami prawnymi, które stają się coraz bardziej

restrykcyjne. Przykładowo w Polsce, użycie pestycydów zawierających linuron było możliwe do czerwca ubiegłego roku.

Wykazano, że pestycydy mogą wielokierunkowo oraz niespecyficycznie zakłócać rozród ssaków (Sifakis i wsp., 2017). Jednak ich działanie, naśladujące któregoś z regulatorów prawidłowego funkcjonowania układu rodnego przez długi czas może być utajone i trudne do wykrycia (Krieg i wsp., 2016; Rattan i wsp., 2017; Toichuev i wsp., 2018). Epidemiologiczne badania sugerują, że zwiększona ilość poronień i/lub wcześniejszych porodów u ludzi, może być skorelowana z podwyższoną ilością m.in.: DDT, DDE, aldryny, dieldryny i atrazyny we krwi (Saxena i wsp., 1981; Petrelli i wsp., 2003; Tyagi i wsp., 2015).

Regulacja kurczliwości miometrium

Niczym niezakłócona kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy jest ważnym elementem regulującym zarówno transport komórek rozrodczych do miejsca zapłodnienia w jajowodzie, implantację zarodka w macicy, jak i dalszy przebieg ciąży zakończonej porodem. Stąd wzrost kurczliwości macicy jest obserwowany podczas owulacji i porodu. Przeciwnie, obniża się ona podczas fazy lutealnej cyklu rujowego oraz wraz z trwaniem ciąży. Natomiast zakłócona kurczliwość macicy prowadzi m.in. do ciąż pozamacicznych, poronień lub przedwczesnych porodów (Bulletti i de Ziegler, 2006; Salleh i wsp., 2015).

Estradiol (E2), produkt przekształcenia testosteronu (T) w komórkach ziarnistych pęcherzyka u krowy (Henderson i Swatson, 1978), bezpośrednio wzmacnia maciczną kurczliwość *in vivo* (Hawk i wsp., 1983) i siłę skurczu skrawków miometrium *in vitro* (Załącznik 5: II.A.2) u krowy. Może on jednak wykazać również pośredni wpływ, poprzez regulację szeregu procesów związanych z zapoczątkowaniem skurczu. E2 stymuluje syntezę receptorów oksytocyny (ROT) w mięśniówce gładkiej układu rozrodczego (Richter i wsp., 2004). Natomiast oksytocyna (OT) jest uważana za jeden z głównych czynników, które wywołują kurczliwość miometrium (Arrowshmit i Wray, 2014). *Neurophysin-I/oxytocin* (NP-I/OT), jako prekursor OT oraz *peptidyl glycine-amidating monooxygenase* (PGA), jako enzym odpowiedzialny za potranslacyjne przemiany jej prohormonu, są kluczowymi elementami syntezy OT w komórkach lutealnych (Sheldrick i Flint, 1989). OTR należą do nadrodziny receptorów rodopsynowych, powiązanych z białkami G. Po aktywacji receptora w macicy, białko G łączy się z fosfolipazą C, która kontroluje hydrolizę fosfatydyloinozytolu (PIP2) do diacyloglicerolu (DAG) i trifosforanu-inozytolu (IP3). Te wtórne przekaźniki określają mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów wapnia i aktywują kinazę białkową C (PKC). Kalmodulina, której poziom jest regulowany przez ilość wewnątrzkomórkowych

jonów wapnia, aktywuje dalej kinazę lekkich łańcuchów miozyny (MLCK). Dalsza fosforylacja MLCK pociąga za sobą tworzenie się mostków aktyna – miozyna i w efekcie skurcz mięśniówki gładkiej (Gimpl i Fahrenholz, 2001; Arrowsmith i Wray, 2014). Estradiol jest włączony także w kolejny etap regulacji kurczliwości i komunikacji pomiędzy komórkami miometrium poprzez regulację kluczowych białek integrujących (*key contractile-associated integral protein*): kaweolin (*caveolin*, CAV; Watson i wsp., 2014; Elmes i wsp., 2015) i białek szczelinowych (*gap junction proteins*, GAP; Firestone i Kapadia, 2012). Należy również podkreślić, że E2 zwiększa endometrialną sekrecję czynnika hamującego białaczkę (leukemia inhibitory factor, LIF), który jest niezbędny do implantacji zarodka (Takabatake i wsp., 1997). Natomiast zwiększenie ilości LIF pociąga za sobą wzmożoną produkcję prostaglandyny (PG)E2 w liniach komórek trofoblastu (Horita i wsp., 2007). Stymulacja receptorów PGE2 wywołuje relaksację macicy. Działanie E2 prowadzi również do wzrostu produkcji PGF2, która jest obok OT jednym z najsilniejszych czynników wzmagających kurczliwość miometrium (Egarter i Husslein, 1992; Olson, 2003). Dodatnia pętla sprzężenia zwrotnego między OT i PGF2 jest u krów dobrze udokumentowana (Kotwica i wsp., 1999; Skarzynski i wsp., 1999).

Progesteron (P4), we wczesnej ciąży jest produkowany przez ciało żółte, a następnie przez łożysko. Pełni on fundamentalną rolę w utrzymaniu ciąży wywołując tzw. „blok progesteronowy”, który znosi wpływ OT na aktywność motoryczną macicy (Lye i Porter, 1978). Jednocześnie P4 ogranicza produkcję PGs w macicy oraz ekspresję genów GAP i receptorów PGs w miometrium (Facchinetti i Vaccaro, 2009). Podobnie jak P4, jajnikowa relaksyna (RLX) jest uznawana za czynnik, który w znacznym stopniu ogranicza kurczliwość miometrium podczas ciąży (Longo i wsp., 2003). Receptory RLX (RRLX) są powiązane z białkami G (Van der Westhuizen i wsp., 2008), podobnie jak ROT. Stąd dalsza transmisja sygnału jest podobna do opisanego wcześniej szlaku przekazu sygnału OT.

C.2. Cel publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

Celem cyklu prac, stanowiących przedstawione osiągnięcie, było określenie mechanizmów zakłóceń regulacji aktywności motorycznej miometrium pod wpływem wybranych pestycydów:

- chlordan, heptachlor, mireks (Wróbel i Młynarczuk, 2017a (P.1)),
- atrazyna, linuron (Wróbel i Młynarczuk, 2017b (P.2)),
- endryna, toxafen (Wróbel i Młynarczuk, 2018 (P.3)),
- glifosat / Roundup (Wróbel, 2018a (P.4)),

- aldryna, DDT / DDE, dieldryna (Wróbel, 2018b (P.5)).

Osiągnięcie celu było możliwe poprzez realizację celów szczegółowych:

1. Rozpoznanie potencjalnej przyczyny zakłócenia rozrodu przez pestycydy (poziom tkankowy).

Założono określenie bezpośredniego wpływu badanych substancji na podstawową i stymulowaną OT kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy (P.1, P.2, P.3, P.4, P.5).

2. Wyjaśnienie mechanizmów działania badanych pestycydów na sekrecję bezpośrednich regulatorów kurczliwości miometrium (PGF2, PGE2, OT) oraz steroidów (T, E2, P4), które pośrednio mogą modulować kurczliwość macicy, warunkując odbiór sygnału do skurczu (poziom komórkowy).

a) Określenie przeżywalności komórek układu rodowego macicy pod wpływem pestycydów (P.1, P.2, P.3, P.4).

b) Określenie udziału PGs, wydzielanych z miometrium i endometrium, w mechanizmie szkodliwego działania pestycydów, zakłócających kurczliwość mięśniówki macicy (P.1, P.2, P.3, P.4).

c) Określenie udziału OT, wydzielanej z komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego oraz z komórek lutealnych, w mechanizmie szkodliwego działania pestycydów, zakłócających kurczliwość mięśniówki macicy (P.1, P.2, P.3, P.4).

d) Określenie udziału steroidów, wydzielanych z komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego (T, E2) lub komórek lutealnych (P4), w mechanizmie szkodliwego działania pestycydów, zakłócających kurczliwość mięśniówki macicy (P.1, P.2, P.3, P.4).

3. Wyjaśnienie mechanizmu działania badanych pestycydów na wytworzenie i przekaz sygnału do skurczu (poziom molekularny).

a) Określenie wpływu pestycydów na syntezę OT w komórkach lutealnych (P.1, P.2, P.3, P.4).

b) Określenie wpływu pestycydów na odczyt sygnału do skurczu (ekspresja mRNA dla ROT) / relaksacji (ekspresja mRNA dla RRLX) w komórkach miometrium (P.5).

c) Określenie wpływu pestycydów na dalszy (wewnątrz i międzykomórkowy) przekaz sygnału do skurczu (P.5).

C.3. Materiały i metody

Materiał do badań

Macice i jajniki pobierano poubojowo od krów z 8-12 dnia cyklu rujowego (P.1, P.2, P.3, P.4, P.5) lub z 5-8 miesiąca ciąży (P.5). Komórki ziarniste pęcherzyka pozyskiwano w wyniku

aspiracji płynu pęcherzykowego (P.1, P.2, P.3, P.4). Komórki lutealne pozyskiwano w wyniku perfuzji ciała żółtego (P.1, P.2, P.3, P.4). Komórki miometrium (P.1, P.2, P.3, P.4, P.5) i endometrium (P.1, P.2, P.3, P.4) pozyskiwano w wyniku trawienia enzymatycznego, natomiast skrawki mięśniówki gładkiej wycinano z miometrium (P.1, P.2, P.3, P.4, P.5).

Badane substancje

Materiał poddawano działaniu pestycydów (0,1/1/10 ng/ml; 6-72 h).

Pestycydy wybrano na podstawie powszechności ich użycia oraz bioakumulacji w środowisku i w organizmach żywych. Zgłoszone osiągnięcie ma na celu wyjaśnienie wielopoziomowego mechanizmu szkodliwego działania nowoczesnych i powszechnie stosowanych w rolnictwie środków ochrony roślin na tle wpływu pestycydów starszego typu (zakazanych w użyciu i wycofywanych ze stosowania, ale wciąż obecnych w środowisku i w tkankach żywych organizmów).

W grupę badanych pestycydów wchodziły związki:

- o zróżnicowanym stanie prawnym:
 - ¹⁾ powszechnie stosowane w rolnictwie, ale ich dopuszczenie do dalszego użycia podlega dyskusji i budzi liczne kontrowersje (glifosat / Roundup, atrazyna i linuron),
 - ²⁾ zakazane w użyciu (należące do tzw. „Dirty dozen”), ale wciąż wykrywane w środowisku i w tkankach zwierząt (aldryna, dieldryna, endryna, chlordan, DDT wraz z metabolitem DDE, heptachlor, mireks i toksafen);
- o zróżnicowanej budowie chemicznej:
 - ¹związki chloroorganiczne - węglowodory aromatyczne (DDT / DDE),
 - ²związki chloroorganiczne - cyklodienowe (aldryna, dieldryna, endryna, heptachlor) i pochodne cyklodienowe (chlordan, mireks),
 - ³związki chloroorganiczne - z dodatkowymi atomami azotu (triazyny – atrazyna; pochodne mocznika - linuron),
 - ⁴związki chloroorganiczne – pochodne kamphenu (toksafen),
 - ⁵związki fosfoorganiczne (glifosat / Roundup);
- o działaniu skierowanym przeciwko jednemu z najliczniejszych grup szkodników upraw rolnych:
 - ¹środki chwastobójcze (atrazyna, glifosat / Roundup, linuron),
 - ²środki owadobójcze (DDT / DDE, aldryna, dieldryna, endryna, chlordan, mireks, heptachlor, toksafen).

Metody

- 1) Pomiar podstawowej i/lub stymulowanej OT siły skurczu skrawków miometrium (HSE Schuler Organbath apparatus; March-Hugstetten, Niemcy) wykonano dla określenia wpływu pestycydów na aktywność motoryczną mięśniówki macicy (P.1, P.2, P.3, P.4, P.5).
- 2) Metodę enzymatyczno-immunologiczną (EIA) zastosowano do pomiaru wpływu pestycydów na :
 - aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTT), co zastosowano dla określenia przeżywalności komórek lutealnych, granulozy, endometrium i miometrium krowy (P.1, P.2, P.3, P.4);
 - ilość T, E2 i OT w medium po hodowli komórek ziarnistych pęcherzyka (P.1, P.2, P.3, P.4);
 - ilość OT i P4 w medium po hodowli komórek lutealnych (P.1, P.2, P.3, P.4);
 - ilość PGE2 oraz PGFM - metabolitu PGF2 w medium po hodowli komórek miometrium i endometrium (P.1, P.2, P.3, P.4);
 - ilość wtórnych przekaźników (DAG, IP3, PKC, MLCK) sygnału do skurczu w miometrium (P.5);
 - ilość białek (CAV, GAP) zintegrowanych z międzykomórkowym przekazem sygnału (P.5).
- 3) Real-Time PCR zastosowano do pomiaru:
 - ekspresji mRNA dla NP-I/OT oraz PGA w komórkach lutealnych (P.1, P.2, P.3, P.4),
 - receptorów OT i RLX w komórkach miometrium (P.5).

C.4. Omówienie wyników prac eksperymentalnych

1. Wpływ badanych substancji na kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy.

Podstawowa i stymulowana OT siła skurczu miometrium, pobranego w cyklu rujowym, była obniżona pod wpływem heptachloru (P1), atrazyny, linuronu (P2) i endryny (P3), a toksafen obniżał jedynie kurczliwość stymulowaną przez OT (P3). Kurczliwość tej tkanki nie uległa zmianie pod wpływem chlordanu (P1), glifosatu i Roundup'u (P4). Jedynie mireks zwiększał podstawową i stymulowaną OT siłę skurczu skrawków mięśniówki gładkiej macicy pobranej

w cyklu rujowym (P1). Natomiast DDE zwiększało, a dieldryna obniżała także siłę skurczu skrawków miometrium, pobranych od krów w zaawansowanej ciąży (P5).

W takim razie zdecydowana większość badanych pestycydów (dieldryna, endryna, toksafen, heptachlor, atrazyna i linuron) może raczej wydłużyć ciążę i opóźnić/utrudnić zapoczątkowanie porodu, co potwierdzają moje wcześniejsze badania wpływu aldryny i dieldryny na funkcjonowanie macicy i jajnika w cyklu rujowym (Załącznik 5: II.B.14). Warto tu podkreślić, że jest to problem, który stosunkowo łatwo zaobserwować i przeciwdziałać w przypadku ludzi oraz zwierząt gospodarskich. Natomiast ograniczenie kurczliwości i opóźnienie lub uniemożliwienie porodu może być szczególnie niebezpieczne dla zwierząt dziko żyjących, niepodlegających stałej opiece weterynaryjnej (P1).

Jedynie mireks i DDE, a przy uwzględnieniu moich wcześniejszych badań wstępnych także DDT (Załącznik 5: II.B.13), zwiększają aktywność motoryczną miometrium. Jest duże prawdopodobieństwo, że w ten sposób mireks, DDT/DDE mogą utrudnić implantację zarodka lub wywołać poród, a w efekcie skrócić ciążę (tj. wywołać poronienia lub przedwczesne porody).

Wcześniej wykazano, że E2 zwiększał kurczliwość macicy (Hawk i wsp., 1983) oraz podstawową i stymulowaną OT kurczliwość skrawków miometrium (Załącznik 5: II.A.2) u krów. Dlatego kwalifikuje to mireks oraz potwierdza wcześniejsze zakwalifikowanie DDE do grupy substancji naśladujących estrogeny (tzw. „oestrogen-like substances”, Kuiper i wsp., 1998). W takim razie, przeciwnie działające: atrazynę, dieldrynę, linuron, heptachlor, endrynę i toksafen, można zaliczyć do „anti-oestrogenic-like substances”.

Ten przeciwstawny (tj. obniżający lub zwiększający) wpływ pestycydów na kurczliwość miometrium był powodem dla szczegółowego prześledzenia ich wpływu, zarówno na stężenie czynników regulujących kurczliwość mięśniówki gładkiej, jak i na odbiór oraz dalszy przekaz informacji o sygnale do skurczu.

2.a. Określenie wpływu badanych związków na przeżywalność komórek macicy i jajnika.

Przeżywalność komórek macicy (miometrium i endometrium) oraz jajnika (komórek lutelnych i ziarnistych pęcherzyka) krowy nie uległa zmianie pod wpływem mireksu, chlordanu, heptachloru (P1), atrazyny, linuronu (P2), endryny, toksafenu (P3), glifosatu, Roudnup'u (P4). Warto podkreślić, że brak wpływu aldryny, dieldryny, DDT i DDE na przeżywalność badanych komórek macicy i jajnika był określony uprzednio (Załącznik 5: II.B.1, II.B.13, II.B.14). Zatem obserwowany wpływ badanych pestycydów, użytych w

dawkach odpowiadających ich stężeniu w środowisku i / lub w tkankach żywych organizmów, na kurczliwość macicy oraz procesy związane z regulacją tej kurczliwości nie był następstwem upośledzenia żywotności komórek macicy i jajnika krowy.

2.b. Określenie wpływu badanych substancji na sekrecję prostaglandyn, jako czynnika regulującego kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy.

Tylko endryna obniżyła wydzielanie PGF2 z miometrium, ale nie miała wpływu na sekrecję PGE2 (P3). Co więcej wydzielanie obu prostaglandyn (PGF2 i PGE2) z tych komórek nie uległo zmianie pod wpływem mireksu, chlordanu, heptachloru (P1), atrazyny i linuronu (P2). Ograniczenie wydzielania PGF2 z miometrium przez endrynę, może być bezpośrednim powodem, dlaczego endryna obniżyła siłę skurczu miometrium (P3). Tym bardziej, że DDE (P5), które stymulowało kurczliwość miometrium, zwiększało również wydzielanie PGF2 z miometrium (Załącznik 5: II.B.13). Skoro jednak większość badanych pestycydów nie zmieniało wydzielania obu PGs z miometrium, natomiast miały różnorodny wpływ na kurczliwość, należy przyjąć, że PGs nie uczestniczą w mechanizmie bezpośredniego wpływu badanych pestycydów na aktywność motoryczną, poza oczywiście endryną.

Wydzielanie PGF2 i PGE2 z komórek endometrium obniżały toksafen (P3) oraz Roundup (P4). Co więcej wydzielanie samej PGE2 z endometrium ulegało obniżeniu pod wpływem chlordanu (P1), atrazyny i linuronu (P2). Natomiast wydzielanie obu PGF2 i PGE2 nie zmieniały mireks, heptachlor (P1) oraz endryna (P3). Jednostronne działanie (tj. tylko stymulujące lub tylko obniżające) pojedynczego pestycydu na obie PGs może sugerować, że ostatecznie ich stosunek nie ulegnie zmianie. W takim razie chlordan, atrazyna i linuron miałyby raczej potencjał, aby jednak zwiększyć ilość PGF2 w stosunku do PGE2. Jak dotąd w moich wcześniejszych badaniach sugerowałem, że tylko DDT i DDE istotnie zakłócają stosunek PGF2 : PGE2 wydzielanych z nabłonków endometrium (Załącznik 5: II.B.1) i jajowodu (Załącznik 5: II.B.8) na korzyść wzmagającej kurczliwość PGF2. Zatem nie można wykluczyć, że zmiany w wydzielaniu PGs z endometrium mogą pośrednio uczestniczyć w mechanizmie zakłócania kurczliwości pod wpływem niektórych z badanych pestycydów.

2.c. Określenie wpływu badanych substancji na sekrecję oksytocyny, jako czynnika stymulującego kurczliwość mięśniówki gładkiej układu rodnego.

Wydzielanie OT do medium, po hodowli komórek lutealnych i ziarnistych pęcherzyka jajnikowego, rosło pod wpływem mireksu (P1), linuronu (P2) i endryny (P3). Ponadto glifosat / Roundup stymulowały wydzielanie OT z komórek lutealnych, a chlordan (P1) i atrazyna

(P2) z komórek ziarnistych pęcherzyka. Te pestycydy mogą być w takim razie odpowiedzialne za przedłużone zwiększenie natężenia sygnału do skurczu.

Toksafen obniżał wydzielanie OT z komórek lutealnych, które są głównym źródłem OT w jajniku. Wprawdzie heptachlor zwiększała ilość OT wydzielanej z komórek ziarnistych pęcherzyka, ale przy jednoczesnym obniżeniu wydzielania OT z komórek lutealnych, powinien wywołać ogólne obniżenie ilości wydzielanej OT. Należy podkreślić podobny wpływ DDT, DDE, aldryny i dieldryny na wzrost wydzielania OT z komórek jajnika (Załącznik 5: II.B.1, II.B.14), rozumianych jako „wytworzenie siły sygnału”. Natomiast bezpośrednie działanie DDT i DDE na siłę skurczu miometrium (Załącznik 5: II.B.13) było przeciwne do działania aldryny i dieldryny (Załącznik 5: II.B.14). Dlatego istotne wydaje się sprawdzenie, jak badane związki wpływają nie tylko na siłę sygnału do skurczu, ale także na jego odczyt i dalszy przekaz.

2.d. Określenie wpływu badanych substancji na sekrecję steroidów w jajniku.

Wydzielanie T i E2 z komórek ziarnistych jajnika rosło pod wpływem chlordanu (P1), atrazyny (P2) i endryny (P3). Natomiast malało po inkubacji z mireksem, heptachlorem (P1) i toksafenem (P3). Glifosat zwiększał wydzielanie E2, ale jego komercyjny produkt (Roundup) nie wykazał już żadnego wpływu na ilość tego hormonu (P4). Natomiast linuron nie miał wpływu na wydzielanie E2, mimo, że zwiększał wydzielanie T (P2), czyli substratu dla syntezy E2. W takim razie jedynie linuron może upośledzać proces przekształcania T w E2 w komórkach ziarnistych jajnika.

Heptachlor, mireks (P.1), atrazyna, linuron (P.2), glifosat / Roundup (P.4) obniżały ilość P4 wydzielanego z komórek lutealnych. Toksafen i endryna nie zmieniły jego sekrecji (P.3), a jedynie chlordan zwiększał stężenie P4 w medium podczas hodowli komórek lutealnych (P1).

Do pełnej oceny udziału steroidów w mechanizmie działania pestycydów upośledzających kurczliwość miometrium należy jednak wziąć pod uwagę ich równoczesne działanie na wydzielanie T, E2 i P4. Okazuje się, że mireks i heptachlor obniżają, a chlordan zwiększa wydzielanie T, E2 i P4 w jajniku. Skoro E2 zwiększa ekspresję OTR (Richter i wsp., 2004) a P4 znosi wrażliwość miometrium na OT (Lye i Porter, 1978), jest możliwe, że każdy z wymienionych pestycydów może znosić swoje działanie na odbiór sygnału w ROT. Atrazyna, glifosat i endryna, które zwiększają ilość E2 i obniżają lub nie zmieniają ilości P4, mogą pośrednio pobudzić syntezę receptorów OT i osłabić lub przynajmniej nie zmienić siły bloku progesteronowego. Na tej drodze mogą przyczynić się do zwiększenia kurczliwości

miometrium i być może przedwczesnego zakończenia ciąży, pamiętając jednak, że same bezpośrednio nie zwiększały siły skurczu mięśniówki gładkiej macicy. Podobny wpływ mogą wykazać linuron i Roundup, które wprawdzie nie zmieniają ilości E2, ale mogą osłabić blok progesteronowy. Jedynie toksafen, ograniczając E2 i nie zmieniając P4 może jednak wzmocnić efekt bloku progesteronowego i opóźnić akcję porodową. Należy podkreślić, że toksafen obniżył siłę skurczu miometrium, stymulowanego przez OT (P3).

3.a. Określenie wpływu pestycydów na syntezę OT.

Ekspresję mRNA dla genu NP-I/OT zwiększały linuron (P.2), endryna (P.3) i Roundup (P.4). To było działanie przeciwne jedynie do wpływu toksafenu (P.3). Żaden z pestycydów nie zmieniał ekspresji mRNA dla PGA (P.1, P.2, P.3, P.4). Wykazana wcześniej wzmocniona sekrecja OT znalazła więc odbicie w zakłóceniu syntezy OT pod wpływem endryny, linuronu i Roundupu. Co więcej ograniczenie sekrecji OT miało również podłoże na poziomie molekularnym skoro toksafen obniżał ekspresję mRNA dla prekursora OT. To jednak brak wpływu chlordanu, mireksu, glifosatu i heptachloru wskazuje, że albo te pestycydy zakłócają inny punkt szlaku syntezy OT albo przyspieszają jedynie uwalnianie wytworzonej OT.

3.b. Określenie wpływu pestycydów na odczyt sygnału do skurczu.

Ekspresję mRNA dla genu receptora OT zwiększył E2, ale nie DDT, DDE, aldryna i dieldryna. Co więcej DDE i dieldryna, podobnie jak E2, obniżyły ekspresję receptora relaksyny (RLX) (P.5). W takim razie, żaden z badanych pestycydów nie wpłynął na odczyt sygnału do skurczu, ale ograniczył odczyt sygnału do relaksacji mięśniówki, pośrednio więc mogą one na tej drodze przedłużyć stan wzmoczonej kurczliwości.

3.c. Określenie wpływu pestycydów na dalszy przekaz sygnału do skurczu.

Aldryna, dieldryna, DDT i DDE nie zmieniły ilości przekaźników sygnału (DAG, IP3, PKC, MLCK) wewnątrz komórki. Jednocześnie DDT i DDE zwiększyły ilość CAV, a dieldryna obniżyła ilość GAP (P5). W takim razie DDT i DDE mogą ułatwić przekaz sygnału OT między komórkami, a przez to wzmocnić kurczliwość macicy. Natomiast dieldryna może raczej ograniczyć przekaz sygnału do skurczu. To znalazło potwierdzenie w opisanym powyżej ich bezpośrednim działaniu na kurczliwość miometrium.

C. 5. Podsumowanie

(Poniżej przedstawiono podsumowanie wyników poszczególnych prac eksperymentalnych)

P.1. Wrobel MH., Młynarczuk J. (2017a)

Secretory function of ovarian cells and myometrial contractions in cow are affected by chlorinated insecticides

(chlordan, heptachlor, mirex) in vitro. Toxicology and Applied Pharmacology 314, 63-71.

1. Chlordan, heptachlor i mireks nie obniżyły żywotności badanych komórek.
2. Heptachlor zmniejszał, a mireks zwiększał podstawową i stymulowaną OT kurczliwość miometrium.
3. Wszystkie pestycydy zwiększały wydzielanie OT z komórek ziarnistych pęcherzyka, a mireks także z komórek lutealnych. Jedynie heptachlor obniżał wydzielanie OT w hodowlach komórek lutealnych.
4. Żaden z pestycydów nie zmienił ekspresji mRNA badanych genów związanych z syntezą OT w komórkach lutealnych.
5. Chlordan zwiększał, a heptachlor i mireks obniżały wydzielanie wszystkich badanych steroidów (T, E2, P4) z badanych komórek jajnika.
6. Jedynie chlordan obniżał wydzielanie PGE2 z endometrium.

P.2. Wróbel MH., Młynarczuk J. (2017b)

The inhibition of myometrial contractions by chlorinated herbicides (atrazine and linuron), and their disruptive effect on the secretory functions of uterine and ovarian cells in cow, in vitro. Pesticide Biochemistry and Physiology 142, 44-52.

1. Atrazyna i linuron nie obniżyły żywotności badanych komórek.
2. Linuron i atrazyna zmniejszały siłę podstawowej i stymulowanej OT kurczliwości mięśniówki gładkiej macicy.
3. Obydwa pestycydy zwiększały wydzielanie OT z komórek ziarnistych pęcherzyka, a tylko linuron zwiększał wydzielanie OT z komórek lutealnych.
4. Tylko linuron zwiększał ekspresję mRNA dla prekursora OT.
5. Obydwa związki zwiększały sekrecje T, a atrazyna również E2 z komórek ziarnistych pęcherzyka. Natomiast atrazyna i linuron obniżały wydzielanie P4 z komórek lutealnych.
6. Obydwa pestycydy nie zakłóciły sekrecji PGs z miometrium, a tylko najniższe dawki obu testowanych substancji obniżały sekrecję PGE2 z endometrium. Ponadto atrazyna i linuron znosiły wpływ OT, stymulujący sekrecję obu PGs z endometrium.

P.3. Wróbel MH., Młynarczuk J. (2018)

Chlorinated insecticides (toxaphene and endrin) affect oxytocin, testosterone, oestradiol and prostaglandin secretion from ovarian and uterine cells as well as myometrial contractions in cow in vitro. Chemosphere 198, 432-441.

1. Endryna i toksafen nie obniżyły żywotności badanych komórek.
2. Endryna zmniejszała podstawową i stymulowaną OT siłę skurczu miometrium, a toksafen nie tylko obniżał siłę skurczu stymulowanego OT, ale także całkowicie znosił działanie OT.
3. Endryna zwiększała sekrecję OT z komórek lutealnych i ziarnistych pęcherzyka, a toksafen obniżał sekrecję OT z komórek lutealnych.
4. Toksafen hamował, natomiast endryna zwiększała ekspresję mRNA dla NP-I/OT.
5. Toksafen hamował, natomiast endryna zwiększała sekrecję T i E2 z komórek ziarnistych, ale obie nie zmieniały sekrecji P4.
6. Toksafen zmniejszał wydzielanie PGs z endometrium, a endryna wydzielanie PGF2 z miometrium.

P.4. Wrobel MH. (2018a)

Glyphosate affects the secretion of regulators of uterine contractions in cows, while it does not directly impair the motoric function of myometrium in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 349, 55–61.

1. Glifosat i Roundup nie obniżyły żywotności badanych komórek.
2. Glifosat i Roundup nie zmieniały aktywności motorycznej miometrium.
3. Glifosat zwiększał wydzielanie E2 z komórek ziarnistych pęcherzyka, natomiast obydwie substancje obniżały wydzielanie P4 z komórek lutealnych.
4. Glifosat i Roundup zwiększyły wydzielanie OT z komórek lutealnych.
5. Jedynie Roundup zwiększał ekspresję mRNA prekursora OT.
6. Obydwie substancje obniżały wydzielanie PGF2, a Roundup także PGE2 z komórek endometrium.

P.5. Wrobel MH. (2018b)

Do chlorinated insecticides (aldrin and DDT) or products of their transformations (dieldrin and DDE) impair signal transfer from regulators (oxytocin and relaxin) of bovine myometrium motility in vitro? *Environmental Research* 167, 234–239.

1. Dieldryna zmniejszała, a DDE zwiększało podstawową kurczliwość miometrium.
2. Dieldryna i DDE obniżały ekspresję mRNA dla receptora relaksyny w miometrium.
3. Aldryna, dieldryna, DDT i DDE nie zmieniały ekspresji mRNA dla ROT
4. Aldryna, dieldryna, DDT i DDE nie zmieniały ilości pozareceptorowych przekaźników sygnału do skurczu (DAG, IP3, PKC, MLCK).
5. DDT, DDE zwiększały ilość CAV, a dieldryna zmniejszała ilość GAP (tj. elementów szlaków komunikacyjnych dla przekazu sygnału do skurczu pomiędzy komórkami miometrium).

C. 6. Wnioski

(Wnioski dotyczące całego cyklu prac stanowiących osiągnięcie)

Do najważniejszych osiągnięć cyklu publikacji zaliczam wykazanie, że:

1. Zmiany w funkcjonowaniu komórek jajnika i macicy nie były następstwem cytotoksycznego działania podawanych substancji (P.1, P.2, P.3, P.4).
2. Aktywność motoryczna miometrium może być zakłócona już przez śladowe ilości badanych chloroorganicznych pestycydów (P.1, P.2, P.3, P.5), ale nie przez glifosat / Roundup (P.4).
3. U podstaw zmian kurczliwości mięśniówki gładkiej macicy pod wpływem badanych pestycydów leżą zakłócenia czynności wydzielniczej komórek jajnika, które przeważają nad zakłóceniami czynności wydzielniczej macicy:
 - a) Zmiany w wydzielaniu OT, tj. czynnika stymulującego kurczliwość macicy, są częścią mechanizmu szkodliwego działania badanych chloroorganicznych pestycydów na czynność motoryczną miometrium (P.1, P.2, P.3, P.4),
 - b) Zmiany w wydzielaniu steroidów (E2 i P4), regulujących odpowiednio ilość i aktywność miometrialnych receptorów OT, mogą pośrednio uczestniczyć w mechanizmie działania pestycydów na czynność motoryczną mięśniówki gładkiej macicy (P.1, P.2, P.3, P.4),
 - c) Wydzielane z komórek macicy prostaglandyny (PGF2 i PGE2), regulujące jej kurczliwość, w niewielkim stopniu uczestniczą w mechanizmie szkodliwego działania pestycydów na aktywność motoryczną miometrium (P.1, P.2, P.3, P.4).
4. Zakłócenia przekazu sygnału do skurczu w komórkach miometrium stanowią element mechanizmu działania DDT / DDE i dieldryny na czynność motoryczną macicy (P.5).
5. Pestycydy mają potencjał do upośledzenia procesów zapłodnienia i implantacji oraz do zmiany długości ciąży (P.1, P.2, P.3, P.4, P.5).

Podsumowując, należy podkreślić, że wyniki otrzymane w badaniach własnych, oprócz wymiaru naukowego, można uznać za przydatne w praktyce. Znając bowiem szczegółową drogę działania czynników zakłócających funkcjonowanie układu rodowego można łatwiej poszukiwać substancji, która będzie neutralizowała zmiany wywołane przez skażenie środowiska.



C.7. Literatura:

- Ackerman F, Whited M, Knight P, 2014. Would banning atrazine benefit farmers? *Int. J. Occup. Environ. Health* 20:61–70.
- Almberg KS, Turyk ME, Jones RM, Rankin K, Freels S, Stayner LT, 2018. Atrazine Contamination of Drinking Water and Adverse Birth Outcomes in Community Water Systems with Elevated Atrazine in Ohio, 2006–2008 *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15: 1889.
- Antonio-Nkondjio C, Sonhafouo-Chiana N, Ngadjeu CS, Doumbe-Belisse P, Talipouo A, Djamouko-Djonkam L, Kopya E, Bamou R, Awono-Ambene P, Wondji CS, 2017. Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasit Vectors*. 10:472.
- Arrowsmith S, Wray S, 2014. Oxytocin: its mechanism of action and receptor signaling in the myometrium. *J. Neuroendocrinol.* 26:356-369.
- Barron MG, Ashurova ZJ, Kukaniev MA, Avloev HK, Khaidarov KK, Jamshedov JN, Rahmatullova OS, Atolikshoeva SS, Mamadshova SS, Manzenyuk O, 2017. Residues of organochlorine pesticides in surface soil and raw foods from rural areas of the Republic of Tajikistan. *Environ. Pollut.* 224:494-502.
- Bento CP, Goossens D, Rezaei M, Riksen M, Mol HG, Ritsema CJ, Geissen V, 2017. Glyphosate and AMPA distribution in wind-eroded sediment derived from loess soil. *Environ. Pollut.* 220:1079-1089.
- Bonefeld Jørgensen EC, Autrup H, Hansen JC, 1997. Effect of toxaphene on estrogen receptor functions in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 18: 1651-1654.
- Bravo N, Grimalt JO, Chashchin M, Chashchin VP, Odland JØ, 2019. Drivers of maternal accumulation of organohalogen pollutants in Arctic areas (Chukotka, Russia) and 4,4'-DDT effects on the newborns. *Environ Int.* 124:541-552.
- Bulletti C, de Ziegler D, 2006. Uterine contractility and embryo implantation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 18:473-484.
- Byrne S, Miller P, Waghiyi V, Buck CL, von Hippel FA, Carpenter DO, 2015. Persistent organochlorine pesticide exposure related to a formerly used defense site on St. Lawrence Island, Alaska: data from sentinel fish and human sera. *J. Toxicol. Environ. Health. A*, 78, 976-992.
- Cai W, Ji Y, Song X, Guo H, Han L, Zhang F, Liu X Zhang H, Zhu B, Xu M, 2017. Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 55:148-155.
- Deti H, Hymete A, Bekhit AA, Mohamed AMI, Bekhit AD, 2014. Persistent organochlorine pesticides residues in cow and goat milks collected from different regions of Ethiopia. *Chemosphere* 106:70–74.
- Egarter CH, Husslein P, 1992. Biochemistry of myometrial contractility. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 6:755-769.
- Elmes M, Szyszka A, Pauliat C, Clifford B, Daniel Z, Cheng Z, Wathes C, McMullen S, 2015. Maternal age effects on myometrial expression of contractile proteins, uterine gene expression, and contractile activity during labor in the rat. *Physiol. Rep.* 3: e12305. doi: 10.14814/phy2.12305.
- Facchinetti F, Vaccaro V, 2009. Pharmacological use of progesterone and 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate in the prevention of preterm delivery. *Minerva Ginecol.* 61:401-409.
- Firestone GL, Kapadia BJ, 2012. Minireview: Regulation of Gap Junction Dynamics by Nuclear Hormone Receptors and Their Ligands. *Mol. Endocrinol.* 26:1798–1807.
- Gimpl G, Fahrenholz F, 2001. The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81:629-683.
- Hawk HW, 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 66:2645-2660.
- Henderson KM, Swanston IA, 1978. Androgen aromatization by luteinized bovine granulosa cells in tissue culture. *J. Reprod. Fertil.* 52:131-134.
- Horita H, Kuroda E, Hachisuga T, Kashimura M, Yamashita U, 2007. Induction of prostaglandin E2 production by leukemia inhibitory factor promotes migration of first trimester extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo. *Hum. Reprod.* 22:1801-1809.
- Jiang Y, Liu Z, Wu D, Zhang J, Zhou J, Li S, et al. 2016. Toxaphene levels in retail food from the Pearl River Delta area of South China and an assessment of dietary intake. *Chemosphere.* 152: 318-327.

- Jorgenson JL, 2001. Aldrin and dieldrin: a review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. *Environ. Health Perspect.* 109:113-139.
- Kamarianos A, Karamanlis X, Goulas P, Theodosiadou E, Smokovitis A, 2003. The presence of environmental pollutants in follicular fluid of farm animals (cattle, sheep, goats and pigs). *Reprod. Toxicol.* 17:185-195.
- Kitamura S, Mita M, Shimizu Y, Sugihara K, Ohta S. 1999. Conversion of dieldrin to aldrin by intestinal bacteria in rats. *Contam Toxicol.* 22:880-882.
- Kotwica J, Skarzynski D, Miszkiel G, Melin P, Okuda K, 1999. Oxytocin modulates the pulsatile secretion of prostaglandin F₂α in initiated luteolysis in cattle. *Res. Vet. Sci.* 66, 1-5.
- Krieg SA, Shahine LK, Lathi RB, 2016. Environmental exposure to endocrine-disrupting chemicals and miscarriage. *Fertil. Steril.* 106:941-947.
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA, 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. *Endocrinology*, 139:4252-4263.
- Lee HR, Jeung EB, Cho MH, Kim TH, Leung PC, Choi KC. 2013 Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors. *J Cell Mol Med.* 17:1-11.
- Li YF, Zhulidov AV, Robarts RD, Korotova LG, Zhulidov DA, Gurtovaya TY, Ge LP, 2006. Dichlorodiphenyltrichloroethane usage in the former Soviet Union. *Sci. Total Environ.* 357:138-145.
- Longo M, Jain V, Vedernikov YP, Garfield RE, Saade GR., 2003. Effects of recombinant human relaxin on pregnant rat uterine artery and myometrium in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188:1468-1474.
- Lushchak VI, Matviishyn TM, Husak VV, Storey JM, Storey KB, 2018. Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI J.* 17:1101-1136.
- Lye SJ, Porter DG, 1978. Demonstration that progesterone 'blocks' uterine activity in the ewe in vivo by a direct action on the myometrium. *J. Reprod. Fertil.* 52:87-94.
- Mahmoud AF, Ikenaka Y, Yohannes YB, Darwish WS, Eldaly EA, Morshdy AE, et al., 2016. Distribution and health risk assessment of organochlorine pesticides (OCPs) residue in edible cattle tissues from northeastern part of Egypt: High accumulation level of OCPs in tongue. *Chemosphere* 144:1365-1371.
- Malinowska E, Jankowski K, Wyrębek H, Truba M, 2015. Struktura sprzedaży i zużycia środków ochrony roślin w Polsce w latach 2000-2012. *Z.N. Seria Administracja i Zarządzanie* 104:173-185.
- Moreno-Aliaga MJ, Matsumura F, 2002. Effect of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (p,p'-DDT) on 3T3-L1 and 3T3-F442A adipocyte differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 63:997-1007.
- Mustafa MD, Banerjee BD, Ahmed RS, Tripathi AK, Guleria K, 2013. Gene-environment interaction in preterm delivery with special reference to organochlorine pesticides. *Mol. Hum. Reprod.* 19:35-42.
- Nguyen PT, Conley AJ, Soboleva TK, Lee RS, 2012. Multilevel regulation of steroid synthesis and metabolism in the bovine placenta. *Mol. Reprod. Dev.* 79:239-254.
- Olson DM, 2003. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract. Res. Clin. Obstetrics & Gynaecology* 17, 717-730.
- Petrelli G, Figà-Talamanca I, Lauria L, Mantovani A, 2003. Spontaneous abortion in spouses of greenhouse workers exposed to pesticides. *Environ. Health Prev. Med.* 8:77-81.
- Rattan S, Zhou C, Chiang C, Mahalingam S, Brehm E, Flaws JA, 2017. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J. Endocrinol.* 233:R109-R129.
- Richter ON, Kübler K, Schmolling J, Kupka M, Reinsberg J, Ulrich U, 2004. Oxytocin receptor gene expression of estrogen-stimulated human myometrium in extracorporeally perfused non-pregnant uteri. *Mol. Hum. Reprod.* 10:339-346.
- Rider CV, Furr JR, Wilson VS, Gray LE Jr. 2010. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. *Int J Androl.* 33:443-462.
- Rogan WJ, Chen A, 2005. Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *Lancet* 366:763-773.
- Salleh N, Giribabu N, Feng AO, Myint K, 2015. Bisphenol A, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and Vinclozolin Affect ex-vivo Uterine Contraction in Rats via Uterotonin (Prostaglandin F₂α, Acetylcholine and Oxytocin) Related Pathways. *Int. J. Med. Sci.* 12:914-925.

- Saxena MC, Siddiqui MK, Seth TD, Krishna Murti CR, Bhargava AK, Kutty D, 1981. Organochlorine pesticides in specimens from women undergoing spontaneous abortion, premature of full-term delivery. *J. Anal. Toxicol.* 5:6-9.
- Sharma N, Garg D, Deb R, Samtani R, 2017. Toxicological profile of organochlorines aldrin and dieldrin: an Indian perspective. *Rev. Environ. Health.* 32:361-372.
- Sheldrick EL, Flint APF, 1989. Post-translational processing of oxytocin-neurophysin prohormone in the ovine corpus luteum: activity of peptidyl glycine-amidating mono-oxygenase and concentrations of its cofactor, ascorbic acid. *J. Endocrinol.* 122:313-322.
- Shipitalo MJ, Owens LB, 2011. Comparative losses of glyphosate and selected residual herbicides in surface runoff from conservation-tilled watersheds planted with corn or soybean. *J. Environ. Qual.* 40:1281-1289.
- Shunthirasingham C, Gawor A, Hung H, Brice KA, Su K, Alexandrou N, Dryfhout-Clark H, Backus S, Sverko E, Shin C, Park R, Noronha R, 2016. Atmospheric concentrations and loadings of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in the Canadian Great Lakes Basin (GLB): Spatial and temporal analysis (1992-2012). *Environ. Pollut.* 217:124-133.
- Sifakis S, Androutopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA, 2017. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 51:56-70.
- Skarzynski DJ, Bogacki M, Kotwica J, 1999. Involvement of ovarian steroids in basal and oxytocin-stimulated prostaglandin (PG) F₂ α secretion by the bovine endometrium in vitro. *Theriogenology*, 52, 385-397.
- Sruthi SN, Shyleshchandran MS, Mathew SP, Ramasamy EV, 2017. Contamination from organochlorine pesticides (OCPs) in agricultural soils of Kuttanad agroecosystem in India and related potential health risk. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24:969-978.
- Stockholm Convention (2001) Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) United Nations environment programme URL <http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/tabid/3351/Default.aspx>
- Takabatake K, Fujiwara H, Goto Y, Nakayama T, Higuchi T, Fujita J, Maeda M, Mori T, 1997. Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum. Reprod.* 12:2102-2107.
- Thakur SJ, Prinja S, Singh D, Rajwansi A, Prasad R, Parwana HK, Kumar R, 2010. Adverse reproductive and child health outcomes among people living near highly toxic waste water drains in Punjab, India. *J. Epidemiol. Community Health* 64:148-154.
- Toichuev RM, Zhilova LV, Paizildaev TR, Khametova MS, Rakhmatillaev A, Sakibaev KS, Madykova ZA, Toichueva AU, Schlumpf M, Weber R, Lichtensteiger W, 2018. Organochlorine pesticides in placenta in Kyrgyzstan and the effect on pregnancy, childbirth, and newborn health. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25:31885-31894.
- Torres-Arreola L, Berkowitz G, Torres-Sánchez L, López-Cervantes M, Cebrián ME, Uribe M, López-Carrillo L, 2003. Preterm birth in relation to maternal organochlorine serum levels. *Ann. Epidemiol.* 13:158-162.
- Tsai WT, 2010. Current status and regulatory aspects of pesticides considered to be persistent organic pollutants (POPs) in Taiwan. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 7:3615-3627.
- Tyagi V, Garg N, Mustafa MD, Banerjee BD, Guleria K, 2015. Organochlorine pesticide levels in maternal blood and placental tissue with reference to preterm birth: a recent trend in North Indian population. *Environ. Monit. Assess.* 187:471. doi: 10.1007/s10661-015-4369-x.
- Van der Westhuizen ET, Halls ML, Samuel CS, Bathgate RA, Unemori EN, Sutton SW, Summers RJ, 2008. Relaxin family peptide receptors--from orphans to therapeutic targets. *Drug Discov. Today* 13:640-651.
- Wang W, Bai J, Zhang G, Wang X, Jia J, Cui B, Liu X, 2017. Depth-distribution, possible sources, and toxic risk assessment of organochlorine pesticides (OCPs) in different river sediment cores affected by urbanization and reclamation in a Chinese delta. *Environ. Pollut.* 230:1062-1072.
- Watson CS, Hu G, Paulucci-Holthauzen AA, 2014. Rapid actions of xenoestrogens disrupt normal estrogenic signaling. *Steroids* 81:36-42.
- WHO, 1989. Aldrin and dieldrin. *Environ. Health Crit.* 91: 1-335.
- Wu C, Luo Y, Gui T, Huang Y, 2014. Concentrations and potential health hazards of organochlorine pesticides in (shallow) groundwater of Taihu Lake region, China. *Sci. Total Environ.* 470-471, 1047-1055.
- Zhu Y, Huang B, Li QX, Wang J, 2015. Organochlorine pesticides in follicular fluid of women undergoing assisted reproductive technologies from central China. *Environ. Pollut.* 207:266-272.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Opis osiągnięć przed uzyskaniem stopnia doktora

Jednolite studia magisterskie rozpocząłem w 1997 roku na wydziale Biologii, kierunku biologia, Akademii Rolniczo-Technicznej (od 1999 - Uniwersytet Warmińsko-Mazurski) w Olsztynie. W 1999 roku, w ramach przygotowywania pracy magisterskiej: „Aktywność motoryczna jajowodu u krów – badanie wpływu oksytocyny, acetylocholin i noradrenaliny na skurcze mięśniówki jajowodu”, rozpocząłem badania dotyczące regulacji czynności motorycznej jajowodu krów. Praca została wykonana w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem dr hab. Genowefy Kotwicy, prof. UWM.

W trakcie ówczesnej pracy naukowej wykazałem:

- wzrost kurczliwości mięśniówki jajowodu w okresie około owulacyjnym, pod wpływem OT
- wzrost kurczliwości mięśniówki jajowodu w fazie lutealnej i pęcherzykowej, pod wpływem acetylocholin,
- zmniejszenie kurczliwości mięśniówki jajowodu w fazie lutealnej i pęcherzykowej, pod wpływem noradrenaliny.

W maju 2002 roku obroniłem pracę magisterską i uzyskałem tytuł magistra biologii. Wyniki pracy były zaprezentowane jako doniesienie naukowe na forum międzynarodowym (Załącznik 5: III.A.1) oraz opublikowane (Załącznik 5: II.A.1).

Od czerwca 2002 r. zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Zakładzie Endokrynologii Rozrodu Bydła, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, gdzie rozpocząłem szczegółowe badania dotyczące zakłóceń regulacji hormonalnej układu rodowego krowy pod wpływem odpadów przemysłowych (polichlorowanych bifenyli – PCBs).

W latach 2003-2005 byłem wykonawcą projektu KBN: „Wpływ polichlorowanych bifenyli oraz fitoestrogenów na czynność układu rodowego krowy” (Załącznik 5: II.G.1).

W latach 2006-2008 wykonywałem projekt badawczy (promotorski): „Mechanizm wpływu polichlorowanych bifenyli na motorykę miometrium oraz czynność sekrecyjną endometrium krowy” (Załącznik 5: II.G.2).

W trakcie ówczesnej pracy naukowej wykazałem:

- wpływ polichlorowanych bifenyli (PCBs) na kurczliwość miometrium, mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów wapnia w komórkach miometrium oraz sekrecję PGs z macicy;
- częściowe znoszenie zakłóceń czynności macicy, wywołanych pod wpływem PCBs, przez naturalne estrogeny (fitoestrogeny).

Powyższe wyniki zostały zaprezentowane podczas 2 zagranicznych (Załącznik 5: III.A.2, III.A.3) oraz 6 krajowych (Załącznik 5: III.B.1-6) konferencji naukowych, a następnie opublikowane w 4 eksperymentalnych (Załącznik 5: II.A.2-4, II.A.6) i w jednej pracy przeglądowej (Załącznik 5: II.A.5). Część tych wyników opublikowano również po uzyskaniu stopnia doktora (Załącznik 5: II.B.3).

Zestawienie *impact factor* (IF) i punktów dla prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, których byłem współautorem, przedstawiono w Tab. 1, a ich pełną bibliografię w Załączniku 5: II.A.1-9.

Tab.1. Zestawienie publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora. IF wg Journal Citation Report (Thomson Reuters Scientific). Punktacja wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Wykaz publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora						
Czasopismo	Rok	Liczba publikacji	IF*	Punkty wg MNiSW*	Sumaryczny IF	Sumaryczna ilość punktów wg MNiSW
<i>Annual Report Polish Academy of Sciences</i>	2008	1	-	3	-	3
<i>Medycyna Weterynaryjna</i>	2008	2	-	6	-	12
<i>Reproductive Biology</i>	2005	2	-	6	-	18
	2006	1	-	6		
<i>Theriogenology</i>	2003	1	1,839	21	1,839	21
<i>Veterinarni Medicine</i>	2005	1	0,621	20	1,089	40
	2007	1	0,468	20		
Ogółem	-	9	-	-	2,928	94

* Wartość *impact factor* (IF) oraz punktów wg MNiSW z roku wydania publikacji.

Pracę doktorską wykonywałem pod kierunkiem Prof. dr hab. Jana Kotwicy w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN. We wrześniu 2008 roku obroniłem, przed Radą Naukową Wydziału Biologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, moją rozprawę doktorską pt: „Mechanizm działania polichlorowanych bifenyli na motorykę miometrium oraz czynność sekrecyjną endometrium krowy.” Uchwałą Rady

Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, otrzymałem stopień doktora nauk biologicznych, a moja praca doktorska została wyróżniona zarówno przez w/w Radę, jak i przez Dyrektora IRZBŻ PAN w Olsztynie.

Opis osiągnięć po uzyskaniu stopnia doktora

W styczniu 2009 roku, awansowałem na stanowisko adiunkta w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Zwierząt, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

Częściowo kontynuując tematykę rozpoczętą w pracy doktorskiej, rozwinąłem oraz wzbogaciłem ją o szereg nowych tematów badawczych. Moje zainteresowania obejmowały i obecnie koncentrują się na szczegółowym wyjaśnieniu mechanizmów zakłócających regulację funkcjonowania mięśniówki gładkiej układu rodnej krowy (miometrium, szyjki macicy oraz jajowodu), pod wpływem skażeń środowiskowych (wcześniej – PCBs / obecnie – pestycydy). Składa się na to zarówno: zaburzenie w wytworzeniu samego sygnału do skurczu (tj. upośledzenie czynności wydzielniczej jajnika, jajowodu i macicy), zakłócenia jego odbioru, jak również dalszy przekaz tego sygnału oraz bezpośredni wpływ pestycydów na skurcz mięśniówki gładkiej. Przedmiotem badań jest wpływ różnorodnych pestycydów na poziomie tkankowym, komórkowym i molekularnym, badany zarówno w cyklu oraz podczas ciąży u krowy.

W czasie mojej dotychczasowej pracy naukowej uczestniczyłem również w innych niż zgłoszone osiągnięciach, przedstawionych poniżej badaniach:

- **Weryfikacja wpływu ksenobiotyków (DDT, PCBs) i ich pochodnych na funkcjonowanie tkanek jajowodu.**

Tkanki jajowodu miały być początkowo potencjalnym elementem tworzonego modelu, który miał posłużyć dla określenia mechanizmu działania skażeń środowiska na układ rozrodczy krowy. Opracowano metodę izolacji komórek nabłonka jajowodu. Następnie wykazano wpływ PCBs, DDT oraz produktów ich przemiany (hydroksy-PCB i DDE) na czynność motoryczną jajowodu, syntezę i wydzielanie PGs z komórek jajowodu oraz udział PGs w mechanizmie działania tych pestycydów (Załącznik 5: II.B.4, II.B.8). Jak się później okazało wpływ ten był zbliżony do działania w/w ksenobiotyków na funkcjonowanie tkanek macicy. Jednak ze względu na to, że zakłócenia czynności jajowodu nie były tak wyraźne jak wykryto to w macicy, nie włączono tkanek jajowodu do tworzonego modelu doświadczalnego. Wszystkie prace związane z niniejszą

tematyką były realizowane w ramach projektu MNiSW (N N311 006536), którego byłem kierownikiem (Załącznik 5: II.G.3).

- **Opracowanie podstaw dla stworzenia modelu przekrojowej analizy mechanizmu wpływu działania skażeń środowiska na funkcjonowanie układu rozrodczego.**

Wytypowano potencjalne kierunki zakłóceń czynności układu rodnej krwi przez pestycydy (DDT, aldryna, dieldryna; Załącznik 5: II.B.1, II.B.2, II.B.5, II.B.13, II.B.14). W ramach tych wstępnych badań powstały zręby modelu służącego do szybkiej analizy wpływu nowo wprowadzanych na rynek pestycydów. Wykazano, również że DDT / DDE zwiększały ekspresję czynnika hamującego białaczkę (LIF) w miometrium (Załącznik 5: II.B.13), który jest nieodzowny dla prawidłowego procesu implantacji zarodka, ale może także wzmacniać produkcję PGs. Zatem prace tworzące osiągnięcie, zostały poprzedzone szeregiem doświadczeń wstępnych, wykonanych i opublikowanych m.in. w ramach grantu MNiSW / NCN (N N311 082140), którego byłem kierownikiem (Załącznik 5: II.G.5). Celem ich było stworzenie modelu do szybkiej weryfikacji wpływu pestycydów oraz do wytypowania potencjalnych kierunków zakłóceń czynności układu rodnej krwi przez pestycydy. Część tych badań została wykonana również w ramach prac magisterskich, których byłem promotorem (Załącznik 5: III.F.1-2).

- **Weryfikacja wpływu fitoestrogenów jako związków potencjalnie przeciwdziałających wpływowi ksenobiotyków.**

Wcześniejsze badania wykazały potencjał fitoestrogenów do znoszenia wpływu PCBs na kurczliwość miometrium (Załącznik 5: II.B.4, II.B.6). W takim razie należało sprawdzić na ile ich działanie może wpłynąć na inne funkcje układu rodnej krwi. Jednakże, wykazano znaczną stymulację syntezy i sekrecji OT w hodowlach komórek lutealnych i ziarnistych jajnika pobranego w cyklu rujowym oraz podczas ciąży u krowy, pod wpływem fitoestrogenów. Zatem fitoestrogeny mogą nasilić działanie PCBs/DDT w jajniku (Załącznik 5: II.B.6, II.B.9).

- **Określenie wpływu chloro-organiczných ksenobiotyków na funkcjonowanie jajnika krowy za pośrednictwem receptora „sierocego” (Steroidogenic Factor – 1, SF-1).**

Wykazano, udział receptora SF-1 w regulacji procesów steroidogenezy i w wydzielaniu OT (Załącznik 5: II.B.10), a następnie we wpływie w/w ksenobiotyków na syntezę i sekrecję OT oraz steroidów (E2 i P4) (Załącznik 5: II.B.11, II.B.12). Badania te były prowadzone w ramach projektu MNiSW (N N308 006136), którego byłem głównym wykonawcą (Załącznik 5: II.G.4).

- **Udział relaksyny (RLX) w mechanizmie działania PCBs.**

Prowadzono badania nad włączeniem RLX, jako czynnika rozkurczającego mięśniówkę macicy, w skonstruowany model badawczy weryfikujący mechanizm działania ksenobiotyków na aktywność motoryczną macicy. Wykazano także, że mRNA receptora RLX w miometrium, ulega obniżeniu pod wpływem PCBs. Część wyników opublikowano (Załącznik 5: III.A.11).

- **Określenie podłoża endometriozy u klaczy.**

Prowadzone są badania mające określić wpływ kwasu lizofosfatydowego (LPA) i prostaglandyn (PGF2 i PGE2) w regulacji skurczu miometrium klaczy w cyklu rujowym i w ciąży. Uczestniczyłem w wykonaniu pomiarów i analizie wyników, których część przedstawiono w komunikacie na międzynarodowej konferencji (Załącznik 5: III.A.11).

- **Wpływ nowoczesnych pestycydów na funkcjonowanie szyjki macicy.**

Potencjalne zmniejszenie drożności kanału szyjki w czasie rui lub porodu mogłoby utrudnić dalszą drogę plemnikom lub zatrzymać płód w macicy. Z drugiej strony nadmierna relaksacja szyjki macicy w trakcie ciąży pod wpływem rozkurczających pestycydów może być istotnym czynnikiem wywołującym przedwczesny poród. Jednak, kurczliwość szyjki macicy jest niezależna od kurczliwości miometrium, a oba elementy macicy mają też różną podatność na regulatory kurczliwości. Sama szyjka może się kurczyć niezależnie od rogu macicy. Są to najbardziej aktualne badania, które prowadzone są w ramach projektu NCN 2017/25/B/NZ9/01620, którego jestem kierownikiem (Załącznik 5: II.G.7). Badania te obejmują określenie wpływu obecnie powszechnie stosowanych pestycydów na:

- kurczliwość szyjki macicy (w cyklu/ciąży),
- regulację kurczliwości,
- odczyt sygnału do skurczu
- syntezę i sekrecję PGE2.

Główne kierunki badawcze realizowałem w ramach 4 projektów naukowych, którymi kierowałem lub obecnie kieruję. Jednocześnie uczestniczyłem w 3 innych projektach naukowych jako ich wykonawca (Załącznik 5: II.G 1-7).

Po uzyskaniu stopnia doktora byłem autorem lub współautorem doniesień naukowych prezentowanych podczas 8 międzynarodowych (Załącznik 5: III.A.4-11) oraz 12 krajowych (Załącznik 5: III.B.7-18) konferencji naukowych. Wyniki opublikowano w 20 pracach (Tab. 2; Załącznik 5: I.B.1-5, II.B.1-15).

Tab.2. Zestawienie publikacji wg. Journal Citation Report (Thomson Reuters Scientific) oraz Punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Wykaz publikacji po uzyskaniu stopnia doktora						
Czasopismo	Rok	Liczba publikacji	IF*	Punkty wg MNiSW*	Sumaryczny IF	Sumaryczna ilość punktów wg MNiSW
<i>Animal Reproduction Science</i>	2013	2	1,581	30	3,162	60
<i>Annual Report Polish Academy of Sciences</i>	2011	1	-	3	-	3
<i>Chemosphere</i>	2018	1	4,427	35	4,427	35
<i>Environmental Research</i>	2014	1	4,373	45	4,373	45
	2018	1	4,732	45	4,732	45
<i>Environmental Toxicology</i>	2013	1	2,562	30	2,562	30
<i>Journal of Clinical and Molecular Endocrinology</i>	2017	1	-	5	-	5
<i>Pesticide Biochemistry and Physiology</i>	2017	1	3,440	30	3,440	30
<i>Reproduction in Domestic Animals</i>	2011	1	1,356	32	1,356	32
<i>Reproductive Toxicology</i>	2009	2	3,367	20	6,734	40
<i>Theriogenology</i>	2014	1	1,798	35	1,798	35
<i>Toxicology</i>	2009	1	3,241	24	3,241	24
	2010	1	3,641	32	3,641	32
<i>Toxicology and Applied Pharmacology</i>	2010	1	3,993	32	3,993	32
	2012	1	3,975	40	3,975	40
	2015	1	3,847	40	3,847	40
	2017	1	3,616	40	3,616	40
	2018	1	3,616	40	3,616	40
Ogółem	-	20	-	-	58,513	608

* Wartość *impact factor* (IF) oraz punktów wg MNiSW z roku wydania publikacji.

W 2012 roku odbyłem staż naukowy w The Hebrew University of Jerusalem, FAFE & The Volcani Center - Rehovot, Izrael (Załącznik 5: III.G.A.1). Głównie cele mojego wyjazdu to nauka zakładania hodowli komórkowej adipocytów i warstwy ziarnistej jajnika, praktyka w stosowaniu immunohistochemii i Real-Time PCR oraz wymiana wiadomości o wpływie *endocrine disruptors* na układ rozrodczy (zaprezentowałem uzyskane dotąd wyniki dotyczące molekularnego mechanizmu szkodliwego wpływu polichlorowanych ksenobiotyków na kurczliwość mięśniówki macicy krowy). Udział w stażu pozwolił mi poszerzyć spektrum komórek jajnikowych, jakie będę mógł użyć w moich badaniach, skoncentrowanych na wpływie środowiskowych zanieczyszczeń na funkcjonowanie układu rodneg krowy. Co więcej zakładam, że komórki z tkanki tłuszczowej będą dobrym wyznacznikiem działania skażeń środowiskowych na rozród ze względu na lipofilność ksenobiotyków. Uważam również, że immunohistochemia będzie mogła być użyta do wizualizacji wpływu polichlorowanych ksenobiotyków na różnicowanie i dojrzewanie komórek pobranych z układu rodneg krowy. Podczas mojego pobytu poszerzyłem wiedzę o innej grupie ksenobiotyków – ftalanach. Okazało się to bardzo pomocne dla ogólnego spojrzenia na wpływ skażenia środowiskowego na rozród.

Wprawdzie charakter pracy w Instytucie to przewaga pracy naukowo-badawczej nad dydaktyczną, to jednak byłem promotorem 2 prac magisterskich (Załącznik 5: III.F.A.1-2), wygłosiłem wykłady dla studentów (Załącznik 5: III.F.B.1-2) oraz popularyzowałem naukę i pracę naukową (Załącznik 5: III.E.1-6).

W latach 2014-2017 byłem skarbnikiem Olsztyńskiego Oddziału Towarzystwa Rozrodu Zwierząt (Załącznik 5: III.D.1).

Jestem członkiem *Editorial Board* w 3 czasopismach naukowych zajmujących się przede wszystkim toksykologią i endokrynologią (Załącznik 5: III.C.1-3). Ponadto byłem recenzentem 22 manuskryptów oraz projektów naukowych (Załącznik 5: III.H.1, III.I.1-21).

Równolegle z pracą zawodową wziąłem udział w 13 kursach i szkoleniach podnoszących moje kwalifikacje (Załącznik 5: III.G.B.1-13).

Za prowadzoną działalność naukowo-publicystyczną uzyskałem 2 nagrody naukowe (Załącznik 5: II.H.1, II.H.2).

VI. Podsumowanie działalności naukowo-badawczej, dydaktycznej i organizacyjnej

1.	Liczba wszystkich publikacji naukowych	29
	Publikacje - pierwszy autor i/lub autor korespondencyjny	19
	Publikacje stanowiące zgłoszone osiągnięcie naukowe (z listy JCR)	5
	Publikacje po doktoracie, niestanowiące osiągnięcia naukowego (z listy JCR)	13
	Publikacje po doktoracie, niestanowiące osiągnięcia naukowego (pozostałe)	2
	Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora	9
2.	Całkowita punktacja MNiSW (wg roku publikacji)	702
	Suma punktów cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	190
	Suma punktów publikacji niestanowiących osiągnięcia naukowego	418
	Suma punktów publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora	94
3.	Sumaryczny Impact Factor (IF) wg listy JCR z roku publikacji	61,436
	Sumaryczny IF cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	19,831
	Sumaryczny IF publikacji niestanowiących osiągnięcia naukowego	41,605
	Sumaryczny IF publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora	2,928
4.	Indeks Hirsha wg bazy Web of Science	9
5.	Liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS) bez autocytowań	128
	Liczba cytowań cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wg (WoS), bez autocytowań	2
	Liczba cytowań (bez autocytowań) publikacji z poza osiągnięcia	126
	Liczba cytowań (bez autocytowań) publikacji przed uzyskaniem stopnia doktora	29
6.	Liczba doniesień naukowych	29
	Liczba doniesień naukowych przed / po uzyskaniu stopnia doktora	9/20
	^a Liczba doniesień naukowych przedstawionych w formie referatów ustnych na międzynarodowych / krajowych konferencjach naukowych	^a 3/9
	^b Liczba doniesień naukowych przedstawionych w formie plakatów na międzynarodowych / krajowych konferencjach naukowych	^b 8/9
7.	Recenzje manuskryptów i projektów naukowych (po uzyskaniu stopnia doktora)	22
8.	Zagraniczne staże naukowe	1
9.	Udział w projektach badawczo-naukowych (w tym jako kierownik projektu)	7 (4)
10.	Opieka naukowa nad magistrantami	2
11.	Nagrody / wyróżnienia za działalność naukową	4

Olsztyn, 28 marca 2019

