

AUTOREFERAT

dr n. wet. Lidia Radko

Zakład Farmakologii i Toksykologii
Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Puławy, 2019

1. Imię i nazwisko

Lidia Radko

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

2017-2018 Studia podyplomowe - Zwierzęta laboratoryjne - hodowla i użytkowanie – Wydział Nauk o Zwierzętach, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

2014-2015 Studia podyplomowe – Dietetyka i planowanie żywienia- Wydział Nauk Społecznych i Nauk Medycznych, Wyższa Szkoła Nauk Społecznych w Lublinie

2010-2012 Tytuł: specjalisty z zakresu użytkowania i patologii zwierząt laboratoryjnych, Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Puławy

2006-2008 Tytuł: specjalisty z zakresu prewencji weterynaryjnej i higieny pasz, Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Puławy

2003-2008 Stopień naukowy doktora nauk weterynaryjnych, specjalność: toksykologia weterynaryjna, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
Tytuł rozprawy doktorskiej: Badania nad ochronnym wpływem sylimaryny wobec cytotoksycznego działania wybranych antybiotyków jonoforowych.

Promotor: dr hab. Wojciech Cybulski- prof. nadzw. AR Lublin

Recenzenci: prof. dr hab. Ryszard Bobowiec,

prof. dr hab. n. med. Waldemar Andrzej Turski

2003 Prawo wykonywania zawodu lekarza weterynarii wydane przez Lubelską Okręgową Izbę Lekarsko – Weterynaryjną

1997-2003 Tytuł zawodowy lekarza weterynarii, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet
Przyrodniczy) w Lublinie

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

01.05.2010 do dnia dzisiejszego - Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy
Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut
Badawczy w Puławach, adiunkt

01.05.2009 - 30.04.2010 - Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut
Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach, główny specjalista - badawczo-techniczny

01.02.2008 - 30.04.2009 - Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut
Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach, specjalista inżynierjno-techniczny

01.10.2003 - 30.09.2008 - Zakład Toksykologii i Ochrony Środowiska, Katedra
Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział
Medycyny Weterynaryjnej Akademia Rolnicza, Lublin,
uczestniczka studiów doktoranckich

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

- a) Osiągnięciem naukowym jest jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

„Badanie toksyczności wybranych substancji obcych z wykorzystaniem metod *in vitro*”

- b) Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

H.1. Radko L., Cybulski W., Rzeski W.: The protective effects of silybin on the cytotoxicity of thiram in human, rat and chicken cell cultures. 2017. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 154-160.

IF₂₀₁₇ = **3,440**; MNiSW = **30 pkt.**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **1**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, współprowadzeniu hodowli komórkowych, wykonaniu części testów oceny cytotoksyczności, opracowaniu i interpretacji wyników, opracowaniu wykresów i tabel, zebraniu piśmiennictwa, sformułowaniu wniosków, redagowaniu manuskryptu, wysłaniu pracy do druku oraz wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

H.2. Radko L., Minta M., Stypuła-Trębas S.: Differential toxicities of albendazole and its two main metabolites to Balb/c 3T3, HepG2, and FaO lines and rat hepatocytes. 2016. *Journal of Veterinary Research*, 60, 495-500.

IF₂₀₁₆ = **0,462**; MNiSW = **15 pkt.**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **2**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczenia, zakładaniu hodowli komórkowej w celu wykonania badań, wykonaniu testów oceny cytotoksyczności, interpretacji uzyskanych wyników, zebraniu piśmiennictwa, opracowaniu wykresów i tabel, redagowaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H.3. Radko L., Minta M., Jedziniak P., Stypuła-Trębas S.: Comparison of albendazole cytotoxicity in terms of metabolite formation in four model systems. 2017. *Journal of Veterinary Research*, 61, 313-319.

IF₂₀₁₇ = **0,811**; MNiSW = **15 pkt.**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **0**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczenia, izolacji hepatocytów szczura, prowadzeniu hodowli komórkowych, wykonaniu testów oceny cytotoksyczności, interpretacji uzyskanych wyników, zebraniu piśmiennictwa, opracowaniu wykresów i tabel, redagowaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H.4. Cybulski W., Radko L., Rzeski W.: Cytotoxicity of monensin, narasin and salinomycin and their interaction with silybin in HepG2, LMH and L6 cell cultures. 2015. *Toxicology in Vitro*, 29, 337-344.

IF₂₀₁₅ = **3,338**; MNiSW = **30 pkt.**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **10**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, współprowadzeniu hodowli komórkowych, wykonaniu części testów cytotoksyczności, opracowaniu i interpretacji wyników, opracowaniu wykresów i tabel, zebraniu piśmiennictwa, sformułowaniu wniosków, redagowaniu manuskryptu, wysłaniu pracy do druku oraz wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

H.5. Radko L., Olejnik M.: Cytotoxicity of anticancer candidate salinomycin and identification of its metabolites in rat cell cultures. 2018. *Toxicology in Vitro*, 52, 314-320.

IF₂₀₁₈ = **3,105**; MNiSW = **30 pkt.**; liczba cytowań (Web of Science Core Collection) – **0**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, izolacji hepatocytów szczura, prowadzeniu hodowli komórkowych, przeprowadzeniu testów oceny cytotoksyczności, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników badań z cytotoksyczności, zebraniu piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu do publikacji oraz opracowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

- Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (Impact Factor, IF) dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe według Web of Science Core Collection – **11,156**.
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe – **120 pkt.**

* Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy znajdują się odpowiednio w załącznikach 4 i 5 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

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

Ze względów etycznych, przepisów prawnych o ochronie zwierząt oraz uwarunkowań ekonomicznych coraz większy nacisk kładzie się obecnie na badania, metodami alternatywnymi do konwencjonalnych badań na zwierzętach, toksycznych efektów działania różnych substancji. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych również jasno określa konieczność stosowania metod alternatywnych, poprzedzając konwencjonalne badania na zwierzętach, jako wiodących metod badawczych, co pozwala na ograniczenie wykorzystania zwierząt w eksperymencie. Wszystkie działania w tym zakresie uwzględniają zasadę 3R. Pomysłodawcami tej idei byli, dwaj Anglicy, Russel i Burch, którzy w roku 1959 nakreślili jej zasady (Russell i Burch, 1959). 1R - Reduction - ograniczenie liczby zwierząt - postępowanie to obejmuje metody, które pozwalają na zmniejszenie całkowitej liczby zwierząt użytych w doświadczeniu lub teście i uzyskanie porównywalnego zakresu danych (informacji) z użyciem mniejszej ich liczby lub większej liczby danych od tej samej liczby zwierząt. 2R -Refinement - udoskonalenie metod - postępowanie to obejmuje metody, które radykalnie minimalizują ból, cierpienie, dystres lub trwałe urazy, jakich mogą doświadczać zwierzęta, i równie znacząco poprawiają ich dobrostan. Udoskonalenie odnosi się do wszystkich aspektów wykorzystywania zwierząt, począwszy od warunków ich utrzymania do warunków, w jakich prowadzony jest eksperyment. Ostatnim elementem opisywanej zasady jest 3R- Replacement - zastępowanie zwierząt w eksperymencie przez modele badawcze nie odczuwające cierpienia. Oznacza to zastosowanie metod, które pozwalają uniknąć wykorzystania lub zastąpić zwierzęta w badaniach bądź testach. W niektórych przypadkach, wstępne lub względne zastąpienie jest stosowane jako pierwszy etap bezwzględnej eliminacji zwierząt z doświadczenia – jest to zastąpienie wyższych zwierząt kręgowych przez hodowle tkankowe lub komórkowe, embriony kręgowców lub zwierzęta bezkręgowce. Przykładami takiego postępowania są: wykorzystanie ludzkich tkanek bądź komórek; ciągłych linii komórkowych lub komórek i tkanek pobranych od zwierząt, które użyto wyłącznie do tego celu, nieobjętych ochroną prawną płodów kręgowców czy zwierząt bezkręgowych, oraz wykorzystanie modeli matematycznych lub komputerowych.

Powstało wiele fundacji i instytucji opracowujących nowe programy badawcze w ramach metod alternatywnych. Jednym z najstarszych jest program FRAME (The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments), którego założenia powstały już w 1969 roku. Koordynowaniem realizacji tych zamierzeń w Europie i prawidłowym rozwojem badań alternatywnych zajmuje się ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods) powołany przez Parlament UE w Brukseli. W ostatnich latach zainteresowanie badaczy wzbudziło wprowadzanie modeli narządów (organ on chips) w doświadczeniach. Z dużym powodzeniem sprawdzają się one w badaniach m.in. w kardiologii, w badaniach nad patomechanizmem astmy i w badaniach przerzutów nowotworów złośliwych jak i nad komórkami hematopoetycznymi (Baker i wsp. 2015, Burdrn i wsp. 2015, Doke i wsp. 2015). Wykorzystanie tego modelu w toksykologii wymaga jednak jeszcze wielu udoskonaleń. W chwili obecnej testy substancji o działaniu drażniącym, które stosowane są w kosmetologii oraz jako składniki niektórych leków prowadzi się wyłącznie *in vitro* na hodowlach komórkowych (Baker i wsp. 2015, Burdrn i wsp. 2015) eliminując tym samym udział zwierząt w testach. Należy także podkreślić, że wykorzystanie badań *in vitro* ma ogromne znaczenie w obliczu obowiązujących regulacji prawnych zakładających konieczność rejestracji wszystkich substancji chemicznych, zarówno obecnych i wprowadzanych na rynek, z jednoczesną charakterystyką ich oddziaływania na zdrowie człowieka i środowisko naturalne (REACH, Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals).

Ze względu na brak wystarczającej wiedzy odnośnie wpływu na zdrowie ludzi i zwierząt ogromnej liczby obecnych w żywności i w środowisku substancji chemicznych, duża uwaga świata nauki skupiona jest na opracowaniu szybkich i tanich testów pozwalających na przeprowadzenie oceny toksykologicznej. W ostatnich latach coraz większe nadzieje pokłada się w metodach *in vitro*, zwłaszcza takich, w których jako modele badawcze stosuje się hodowle komórkowe: ciągłych linii komórkowych, ustalonych linii komórkowych oraz izolowanych komórek z narządów (hodowle pierwotne). W badaniach toksyczności *in vitro* z powodzeniem wykorzystywane są różne modele komórkowe. Spośród istniejących, do oceny toksyczności *in vitro*, szczególną uwagę przywiązuje się do badań z udziałem komórek zachowujących zdolność metaboliczną zwłaszcza komórek wątroby w tym

hepatocytów (Guillouzo, 1998). Pozwalają one na ocenę substancji, zwłaszcza leków, których metabolity mogą być bardziej toksyczne od substancji macierzystej oraz na badanie wrażliwości międzygatunkowej. Istotne jest to z punktu widzenia weterynarii gdzie prowadzenie takich badań wymagało wykorzystania dużej liczby zwierząt. Należy także pamiętać, że wrażliwość ludzi na wiele substancji obecnych w żywności nie została do chwili obecnej dokładnie określona. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie w badaniach toksyczności ciągłych linii komórkowych, które całkowicie eliminują organizmy żywe z doświadczeń, zastępując je hodowlami komórek, które są nieśmiertelne. Najczęściej wykorzystywane w badaniach są ciągłe linie komórkowe, pochodzące z komórek nowotworowych lub powstające w wyniku transformacji lub też transfekcji prawidłowych komórek. Metody te zyskują coraz częstsze zastosowanie w badaniach przesiewowych z uwagi na najmniejsze ograniczenia w zakresie zasady 3R. Również do badań toksyczności podstawowej substancji wybiera się najczęściej ciągłe linie komórkowe z uwagi na ich dobrą charakterystykę, względną stabilność i stosunkowo łatwą obsługę hodowli (Castel, 2006). Największą wadą takiego rozwiązania jest jednak brak linii komórkowej charakteryzującej się zarówno odpowiednim tempem i liczbą podziałów jak i posiadającej fenotyp możliwie najbardziej zbliżony do izolowanych komórek z narządów zwierząt lub ludzi. Wątrobowe linie komórkowe charakteryzują się praktycznie nieograniczoną liczbą podziałów, ale ich funkcje, np. produkcja mocznika czy aktywność poszczególnych izoform cytochromu P450 są upośledzone. Pośród istniejących ciągłych linii komórkowych najczęściej wykorzystywana jest linia HepG2, pochodząca z nowotworu wątrobowo komórkowego człowieka. Linia ta wyróżnia się, na tle innych, fenotypem najbardziej zbliżonym do wątrobowego, np. synteza albuminy i innych białek, w tym czynników krzepnięcia oraz zachowaniem żywotności i funkcjonalności podczas perfuzji osoczem pochodzącym od pacjentów z niewydolnością wątroby (Coward, 2009). Największą wadą jest brak możliwości przekształcania amoniaku do mocznika ze względu na brak funkcjonalnych enzymów cyklu mocznikowego – arginazy I i karbamoylotransferazy ornitynowej oraz obniżone zdolności detoksykacyjne, w tym aktywności cytochromu P450. W przypadku cytochromu ogromny wpływ na jego działanie mają warunki hodowli – skład medium hodowlanego i numer pasażu (Doostdar, 1988; Wilkening, 2003). Wiele badań

odnośnie toksyczności *in vitro* jest również prowadzona na ciągłych liniach komórkowych pochodzących od zwierząt, m.in. szczurów, myszy, kur a nawet owadów. Ze względu na wiele ograniczeń jakie posiadają ciągłe linie komórkowe oraz trudności w ekstrapolacji uzyskanych wyników na warunki *in vivo*, badania prowadzone są także na izolowanych komórkach z narządów zwierząt lub ludzi. Hodowle izolowanych hepatocytów zaliczane są do „złotego standardu” modelu badań nad toksycznością w tym nad biotransformacją ksenobiotyków. Hodowle te wykazują ekspresję enzymów zarówno fazy I jak i II metabolizmu. Umożliwiają identyfikację leków, które są induktorami lub inhibitorami m.in. monooksygenaz i transferaz oraz badania nad ich hepatotoksycznością. Hodowle tego typu są również w stanie odtworzyć profil metaboliczny leku podobny do otrzymanego *in vivo*. Ze względu na zachowanie różnic gatunkowych są doskonałym modelem mogącym służyć do badań porównawczych dotyczących toksyczności leków. Na izolowanych komórkach pochodzących od jednego osobnika można przeprowadzić badania toksyczności kilku substancji co nie jest możliwe w warunkach *in vivo*. Wszystkie te cechy sprawiają, że hodowle pierwotne hepatocytów są bardzo często stosowane w badaniach. W związku z istotną kwestią jaką jest nieregularny dostęp do komórek ludzkich, w badaniach wykorzystuje się model komórek zwierzęcych, zwłaszcza szczura jako zwierzęcia modelowego w badaniach toksyczności leków. Zaletą wymienionego gatunku jest fakt, że cytochrom CYP3A4, najpowszechniej występująca izoforma, charakteryzuje się najmniejszą zmiennością międzygatunkową i to właśnie szczur (ale jedynie osobniki męskie ze względu na prawie 7-krotną różnicę w metabolizowaniu między samcami a samicami) jest modelem rekomendowanym dla ludzkich hepatocytów (Bogaards, 2000). Poza działaniem cytochromu P450, hepatocyty szczurze i ludzkie wykazują wiele cech różniących m.in. aktywność transporterów zaangażowanych w wyrzut substancji szkodliwych czy ilość wydzielanych kwasów żółciowych (Marion, 2012). Wadami modelu pierwotnych hodowli, jest stosunkowo krótki okres przeżywania komórek oraz niestabilność fenotypowa związana z trudnością w standaryzacji metody w związku z wysoką różnorodnością międzyosobniczą. Eutanazja pewnej liczby zwierząt w prowadzonych badaniach toksyczności *in vitro* jest niestety konieczna

w celu pobrania materiału, który najlepiej odzwierciedla procesy zachodzące w warunkach *in vivo*.

We współczesnej toksykologii coraz silniej odczuwa się potrzebę poszukiwania odpowiednich mierników (biomarkerów) pozwalających na ocenę szkodliwych skutków narażenia na substancje obce, a którymi mogą być każde pomiary związane z interakcjami zachodzącymi w systemach biologicznych pod wpływem czynnika toksycznego (Eisenbrand i wsp. 2002, Freshney, 2001). Wśród biomarkerów wyróżniamy: biomarkery ekspozycji – stężenia substancji lub ich metabolitów w tkance; biomarkery wrażliwości – odnoszące się do różnic gatunkowych, osobniczych itp. oraz biomarkery skutku – mierzalne zmiany w organizmie. Na poziomie komórkowym, efektami oddziaływania substancji toksycznej z docelowymi miejscami uszkodzenia mogą być m.in. zakłócenia cyklu komórkowego, uruchomienie procesów apoptozy, zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych, zmiany w ekspresji genów. W warunkach *in vivo* zaburzenia takie, w zależności od nasilenia i czasu trwania, mogą prowadzić do powstania zaburzeń w czynnościach fizjologicznych, a następnie zmian patologicznych w obrębie narządu. Także w układzie *in vitro* niezbędne jest dysponowanie odpowiednio dobranymi biomarkerami, których pomiar umożliwi ocenę współzależności pomiędzy stężeniem badanej substancji, a zaobserwowanym efektem. Ze względu na różnorodność mechanizmów prowadzących do śmierci komórki, wprowadzono szereg metod pozwalających wnioskować o oddziaływaniu badanej substancji na poszczególne struktury i funkcje komórkowe. Obecnie najbardziej wyczerpującym źródłem informacji na temat alternatywnych metod stosowanych w toksykologii, prowadzonych w warunkach *in vitro* są dane znajdujące się w protokołach zawartych w banku danych INVITTOX (The ERGATT/ FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology). Wybór odpowiedniego testu podyktowany jest celem badań oraz wymaganiami odnośnie wykorzystania komórek w dalszej ocenie. W badaniach cytotoksyczności podstawowej najczęściej wykorzystuje się testy umożliwiające ocenę: integralności błon komórkowych (m.in. test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej z komórki (test LDH); zdolności proliferacyjnych (m.in. pomiar całkowitego białka komórkowego (test Kenacid Blue (KB)); aktywności mitochondrialnej komórek (m.in. test redukcji bromku 3-(4,5-

dimetylo-2-tiazoilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazolu (test MTT); aktywności lizosomalnej komórek (m.in. test wychwytu czerwieni obojętnej (test Neutral Red Uptake (NRU))). Wymienione parametry są bardzo czułymi wskaźnikami toksycznego działania substancji, pozwalającymi nie tylko na stwierdzenie działania toksycznego, ale również wskazującymi, na które elementy subkomórkowe wywierają wpływ badane substancje.

Brak szczegółowych danych dotyczących toksycznego działania wybranych substancji stosowanych w rolnictwie i w medycynie weterynaryjnej na zwierzęta, a szczególnie na człowieka (jako konsumenta narażonego na pozostałości tych substancji w produktach spożywczych) skłoniło mnie do podjęcia badań, które koncentrowały się na wykorzystaniu różnych modeli hodowli komórkowej i przydatności ich w badaniach oceny szeroko rozumianego bezpieczeństwa chemicznego.

Podsumowując głównymi celami podjętych przeze mnie badań było:

1. Określenie cytotoksyczności wybranych substancji stosowanych w rolnictwie i w medycynie weterynaryjnej na hodowlach komórek pochodzących z ciągłych linii komórkowych: człowieka (linia HepG2), szczura (linia FaO i L6), myszy (linia Balb/c 3T3), kurczaka (linia LMH).
2. Określenie cytotoksyczności wybranych leków weterynaryjnych w hodowlach izolowanych hepatocytów szczura.
3. Określenie wpływu biotransformacji wybranych leków przeciwpasożytniczych na ich cytotoksyczność w hodowlach komórek pochodzących z ciągłych linii i w hodowlach pierwotnych hepatocytów szczura.
4. Ocena przydatności różnych modeli komórkowych w badaniach biotransformacji leków weterynaryjnych.

Podczas realizacji badań mających na celu ocenę cytotoksyczności wybranych substancji skoncentrowałam się na tiuramie najczęściej stosowanym jako fungicyd w rolnictwie oraz na dwóch grupach leków przeciwpasożytniczych (bezimidazole,

kokcydiostatyki) stosowanych w medycynie weterynaryjnej. Wszystkie zaplanowane i wykonane przeze mnie doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem tak zwanych alternatywnych modeli doświadczalnych, czyli na modelach, które pozwalają ograniczyć liczbę oraz cierpienie zwierząt użytych do eksperymentów do niezbędnego minimum. Większość doświadczeń wykonano na komórkach pochodzących z ciągłych linii komórkowych, pozyskanych komercyjnie, pochodzących od człowieka, szczura, myszy i kurczaka, eliminując tym samym ich udział w badaniach. Jednakże doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem izolowanych hepatocytów szczura wymagało udziału zwierząt i było zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną w Lublinie. Należy podkreślić, że zastosowanie metod alternatywnych do klasycznych badań na zwierzętach nie zmniejszyło wiarygodności otrzymywanych wyników i nie wpłynęło na możliwość ich ekstrapolacji do warunków *in vivo*.

Pierwszy etap badań obejmował weryfikację wrażliwości międzygatunkowej, w tym człowieka, na działanie tiuramu - fungicydu powszechnie stosowanego w rolnictwie. Do przeprowadzenia tego etapu wykorzystano ciągłe linie komórkowe: człowieka, szczura i kurczaka. Najważniejsze wyniki przeprowadzonego eksperymentu zostały zaprezentowane w pracy:

H.1. Radko L., Cybulski W., Rzeski W.: The protective effects of silybin on the cytotoxicity of thiram in human, rat and chicken cell cultures. 2017. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 154-160.

Powszechne stosowanie pestycydów często prowadzi do ich kumulowania się w środowisku zwiększając ryzyko narażenia zarówno zwierząt i ludzi. Przykładem jest tiuram, fungicyd należący do grupy ditiokarbaminianów stosowany w rolnictwie w zabiegach agro-technicznych jako zaprawa do nasion oraz jako środek dolistny używany w uprawach owoców i warzyw. Wysokie dawki tej substancji stosowane są jako repelent na ptaki, gryzonie i inne ssaki w polach i sadach. Tiuram jest również produktem degradacji innych pestycydów (ferbam, ziram) co związane jest z jego obecnością w glebie i wodzie stanowiąc poważne zagrożenie dla ekosystemu (Jouany i wsp. 1985). Ogromna większość dostępnych danych z badań toksyczności tiuramu pochodzi z doświadczeń żywieniowych. Związek ten, wciąż

jest źródłem zatruc u niektórych gatunków zwierząt, uwarunkowanych prawdopodobnie różnym stopniem metabolizmu. Obecność tiuramu w łańcuchu pokarmowym stanowi niebezpieczeństwo dla zdrowia ludzi ze względu na fakt, iż nawet niski poziom tiuramu w diecie człowieka, w połączeniu z azotynami, jest potencjalnym prekursorem dla tworzenia się rakotwórczych nitrozoamin. Podobne zależności obserwowano także u zwierząt. U drobiu, działanie toksyczne tiuramu, obecnego w paszy, powiązано z wystąpieniem choroby metabolicznej układu kostnego tzw. dyschondroplazji piszczelowej (Tibial Dyschondroplasia, (TP)) (Li i wsp. 2007). Objawy zatrucia tiuramem obserwowano także u szczurów i psów rasy Beagle co przejawiało się niedotlenieniem mięśni oraz utratą napięcia mięśniowego, a w konsekwencji prowadziło do paraliżu nóg u tych gatunków zwierząt (Maita i wsp. 1991). Tiuram został zakwalifikowany jako substancja szkodliwa: LD₅₀-375 mg/kg masy ciała (szczur); 1 g/kg masy ciała (mysz); 210 mg/kg masy ciała (królik). Opisywano także jego niekorzystny wpływ na funkcje wątroby, układ nerwowy, oraz na układ rozrodczy (Maita i wsp. 1991, Han i wsp. 2003, Stoker i wsp. 2003). Mechanizm toksyczności tiuramu jest złożony i różni się między poszczególnymi gatunkami zwierząt. Przedstawione powyżej dane uzasadniały podjęcie badań toksyczności biorąc także pod uwagę zależność działania tej substancji od użytych hodowli komórkowych pochodzących od różnych gatunków. Kierując się zasadą 3R, wdrażaną we współczesnej toksykologii, w badaniach posłużono się hodowlami komórkowymi pochodzącymi z ciągłych linii komórkowych: 1. metabolizującymi: HepG2- komórki hepatoma człowieka; FaO – komórki hepatoma szczura; LMH – komórki hepatoma kurczęcia oraz 2. nie metabolizującą linią - L6 - mioblasty szczura. Dodatkowo oceniono wpływ sylibiny (substancji o udowodnionym działaniu hepatoprotekcyjnym) na cytotoksyczność badanego fungicydu.

Otrzymane wyniki wykazały że tiuram był bardziej cytotoksyczny dla mioblastów (L6) szczura niż komórek hepatoma człowieka (HepG2), szczura (FaO) i kurczaka (LMH). Obserwacja gęstości komórek pod mikroskopem świetlnym oraz ocena zmian ich wyglądu potwierdziła różnice we wrażliwości wśród badanych hodowli komórkowych. Wyniki badań wskazały różną wrażliwość komórek hepatoma pochodzących od poszczególnych gatunków. Stwierdzono, że komórki kurczaka (LMH) są bardziej wrażliwe na tiuram niż komórki szczura (FaO) lub

człowieka (HepG2). Mechanizm działania fungicydu we wszystkich badanych hodowlach komórkowych prowadził do silnego hamowania aktywności mitochondrialnej komórek. Ciekawą kwestią jest działanie sylibiny, która zmniejszała aktywność cytotoksyczną tiuramu w zakresie hamowania aktywności mitochondrialnej i uszkodzenia błony komórkowej we wszystkich użytych hodowlach. Działanie protekcyjne sylibiny wykazywało charakter silnego antagonizmu z badanym fungicydem. Uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w praktyce żywienia drobiu, a dodatek sylimaryny może zmniejszyć straty hodowlane spowodowane obecnością tiuramu w paszy.

Opublikowane wyniki stanowią pierwsze doniesienie na temat potencjalnego cytotoksycznego działania tiuramu w zależności od gatunku użytych w doświadczeniu komórek z ciągłych linii komórkowych (kurczak > szczur ≥ człowiek) a także od hodowli komórkowej (mioblasty > komórki hepatoma). W chwili podejmowania badań brak było również informacji na temat protekcyjnego działania sylibiny wobec cytotoksyczności indukowane tiuramu.

Obiecujące wyniki otrzymane podczas badań z użyciem tiuramu skłoniły mnie do kontynuowania tego kierunku i zapoczątkowały serię doświadczeń mających na celu ocenę cytotoksyczności powszechnie stosowanego leku przeciw pasożytniczego – albendazolu. W badaniach tych wykorzystałam model hodowli ciągłych linii komórkowych oraz dodatkowo hodowli pierwotnej hepatocytów szczura. Analizę albendazolu (ABZ) i powstałych jego metabolitów: sulfotlenku albendazolu (ABZ-SO) i sulfonu albendazolu (ABZ-SO₂) w płynie z nad hodowli komórkowych przeprowadzono z zastosowaniem metody chromatografii ciekłowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS). Wyniki badań oceniających cytotoksyczności albendazolu i jego metabolitów oraz zależność występującej toksyczności leku od jego biotransformacji w warunkach *in vitro* przedstawiłam w dwóch poniższych pracach:

H.2. Radko L., Minta M., Stypuła-Trębas S.: Differential toxicities of albendazole and its two main metabolites to Balb/c 3T3, HepG2, and FaO lines and rat hepatocytes. 2016. *Journal of Veterinary Research*, 60, 495-500.

H.3. Radko L., Minta M., Jedziniak P., Stypuła-Trębas S.: Comparison of albendazole cytotoxicity in terms of metabolite formation in four model systems. 2017. *Journal of Veterinary Research*, 61, 313-319.

Profilaktyczne stosowanie leków przeciw pasożytniczych jest powszechną praktyką stosowaną u zwierząt i ludzi. Dużą uwagę zwraca się na ich skuteczność zapominając niejednokrotnie o działaniach niepożądanych. Stosowanie leków w weterynarii bez konsultacji lekarza niesie ze sobą ryzyko pozostałości tych leków w żywności pochodzenia zwierzęcego. Regularne spożywanie przez konsumentów niskich stężeń leków obecnych w żywności prowadzi do poważnych następstw w wyniku ich kumulowania się w organizmie, m.in. występowanie alergii i zaburzeń rozwoju płodów (Rico i wsp. 1985). Przykładem takiego leku jest albendazol należący do grupy benzimidazoli stosowany jako lek przeciw pasożytniczy. Mechanizm jego działania polega na hamowaniu polimeryzacji mikrotubuli przez wiązanie z β -tubuliną w komórce. Ostatnie doniesienia wskazują również na jego właściwości przeciwnowotworowe (Noorani i wsp. 2015). Po podaniu *per os* lek jest szybko metabolizowany w wątrobie do sulfotlenku, a następnie do sulfonu albendazolu. Obecne w surowicy metabolity występują w wyższych stężeniach niż sam lek i kumulują się w wątrobie oraz nerkach, przechodząc następnie do mleka, co stanowi zagrożenie dla zdrowia konsumentów produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Ostra toksyczność albendazolu jest niska; jednakże u leczonych zwierząt obserwowano działanie hepatotoksyczne i zaburzenia rozwoju płodu. Obserwowane są również różnice międzygatunkowe, które związane są z różnym stopniem wchłaniania leku. Najbardziej wrażliwe są owce i bydło, u których wchłanianie jest na poziomie 50%, a najmniej człowiek (1-2%). Jednakże jak dotąd nie ma jednoznacznego stanowiska, która z substancji, albendazol czy jego metabolity są odpowiedzialne za działania niepożądane. W związku z tym albendazol został zaklasyfikowany jako "wysoki" priorytet dla szczegółowej oceny ryzyka toksykologicznego (Capleton i wsp. 2006).

Celem przeprowadzonych badań była ocena potencjału cytotoksycznego albendazolu i jego dwóch głównych metabolitów: sulfotlenku i sulfonu albendazolu biorąc pod uwagę zależność od zastosowanej hodowli komórkowej. Dodatkowo badano zależność toksyczności albendazolu od jego metabolizmu. Badania wykonano

na hodowlach komórkowych pochodzących z ciągłych linii komórkowych: 1. metabolizujących: HepG2 – komórki hepatoma człowieka; FaO – komórki hepatoma szczura, oraz 2. nie metabolizującej linii - Balb/c 3T3, mysich fibroblastach. W oparciu o wyniki uzyskane na powyższym modelu w badaniu wykorzystano hodowle pierwotne, izolowanych hepatocytów szczura. W celu uzyskania izolowanych hepatocytów do badań toksyczności albandazolu wykorzystano zwierzęta. Do oznaczania stężeń albandazolu i jego metabolitów w płynie z hodowli komórkowych zastosowano metodę LC-MS/MS.

W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że albandazol był bardziej toksyczny niż jego metabolity, a jego toksyczność była zależna od zastosowanego modelu komórkowego. Stwierdzono także, że biotransformacja albandazolu prowadzi do jego detoksykacji. Spośród czterech hodowli komórkowych najbardziej wrażliwe na działanie leku i jego metabolitu (sulfotlenku albandazolu) były nie metabolizujące fibroblasty mysie, Balb/c 3T3, a następnie komórki linii hepatoma człowieka (HepG2). Izolowane hepatocyty i komórki linii hepatoma szczura (FaO) nie były wrażliwe na lek i jego metabolity. Mechanizm działania cytotoksycznego badanych substancji polegał na uszkodzeniu błon komórkowych i hamowaniu aktywności mitochondrialnej komórek. Najbardziej aktywne metabolicznie były izolowane hepatocyty szczura. Wskazano istnienie różnic jakościowych i ilościowych w biotransformacji albandazolu pomiędzy komórkami linii hepatoma szczura (FaO) i człowieka (HepG2). Komórki linii hepatoma człowieka (HepG2) metabolizowały lek do dwóch metabolitów ale ich stężenia były niższe w porównaniu do komórek linii hepatoma szczura (FaO), których metabolizm prowadził do powstania jednego metabolitu, sulfotlenku albandazolu.

W oparciu o badania *in vitro* można stwierdzić że toksyczność albandazolu jest wysoka co jest sprzeczne z badaniami *in vivo*. Biotransformacja leku prowadzi do jego detoksykacji wskazując na wysoką wrażliwość międzygatunkową. Zwrócić należy uwagę na działanie hepatotoksyczne leku w przypadku pacjentów z uszkodzoną wątrobą lub jej niewydolnością. Opublikowane wyniki stanowią pierwsze doniesienie na temat zależności toksycznego działania albandazolu od procesów biotransformacji przy wykorzystaniu w badaniach, hodowli komórkowych. Izolowane hepatocyty szczura okazały się doskonałym modelem badawczym

metabolizmu albendazolu oraz jakościowej i ilościowej oceny powstałych jego metabolitów.

Biorąc pod uwagę dane dotyczące wysokiej wrażliwości międzygatunkowej na kokcydiostatyki jonoforowe przy jednoczesnym braku, w dostępnej literaturze, danych dotyczących wpływu tej grupy leków na człowieka, postanowiłam skupić się na ustaleniu ich cytotoksyczności. Opis działania monenzyny, narazyny i salinomycyny – trzech kokcydiostatyków powszechnie stosowanych u zwierząt na hodowle komórek ciągłych linii: człowieka (HepG2), szczura (L6) i kurczęcia (LMH) przedstawiłam w pracy:

H.4. Cybulski W., Radko L., Rzeski W.: Cytotoxicity of monensin, narasin and salinomycin and their interaction with silybin in HepG2, LMH and L6 cell cultures. 2015. *Toxicology in Vitro*, 29, 337-344.

Zwiększenie zapotrzebowania ludzi na żywność prowadzi do wzrostu ilości hodowanych zwierząt. W związku z tym, stosowanie leków weterynaryjnych gwałtownie wzrasta. Istotne znaczenie mają leki podawane w celach profilaktycznych zmierzających do ograniczenia występowania chorób na fermie. Przykładem takich substancji są kokcydiostatyki jonoforowe stosowane powszechnie w profilaktyce kokcydiozy u zwierząt. Należą one do grupy antybiotyków jonoforowych produkowanych przez *Streptomyces spp.* Pozostałości tych leków stwierdza się w ramach badania monitoringu produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego (jaja, mięśnie, wątroba). Najczęstszymi przyczynami pozostałości są przedawkowanie leku, nieprzestrzeganie czasów karencji i niezgodne ze wskazaniami stosowanie leków (Olejnik i wsp. 2007; Dorne i wsp. 2013). Tym bardziej, że kokcydiostatyki jonoforowe odznaczają się niskim współczynnikiem terapeutycznym, czyli małą rozpiętością pomiędzy stężeniem (dawką) leczniczym i toksycznym. Badania nad ich toksycznością, a także występujące przypadki zatruc wykazały bardzo duże różnice we wrażliwości na ich toksyczne działanie w zależności od gatunku. Drób jest jednym z mniej wrażliwych gatunków zwierząt na działanie jonoforów w przeciwieństwie do bardziej wrażliwego gatunku jakim są konie. Narażenie człowieka na kokcydiostatyki jest głównie narażeniem zawodowym. Skutki przypadkowych zatruc pracowników mieszalni pasz lub ferm

wielkotowarowych sugerują, że wrażliwość człowieka na toksyczne działanie tych substancji jest dość duża. Ze względu na fakt, że obecnie trwają badania dotyczące potencjalnego zastosowania salinomycyny i monenzyny w terapii przeciwnowotworowej (Huczyński, 2012) istnieje potrzeba podjęcia szczegółowych badań oceniających toksyczność tych leków. Mechanizm ich działania (terapeutyczny, jak i toksyczny) związany jest ze zdolnością do kompleksowania i transportowania kationów przez błony komórek, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. Zaburzenie transportu błonowego doprowadza do zachwiania równowagi sodowo-potasowej i wzrostu ciśnienia osmotycznego we wnętrzu komórki, co prowadzi w konsekwencji do jej śmierci. Przyczyny różnic we wrażliwości gatunkowej na działanie toksyczne kokcydiostatyków nie zostały ustalone, jednak uważa się, że dotyczą prawdopodobnie procesów metabolicznych.

W związku z powyższym głównym celem badań było określenie różnic toksyczności powszechnie stosowanych kokcydiostatyków jonoforowych (monenzyny, narazyny i salinomycyny) z wykorzystaniem hodowli komórek ciągłych linii komórkowych pochodzących od trzech gatunków. Linia komórkowa: LMH - pochodziła z komórek hepatoma kurczęcia (gatunek docelowy); HepG2 – były to komórki pochodzące z hepatoma człowieka (konsumenta) i L-6 - mioblasty szczura (komórki wrażliwe na kokcydiostatyki w warunkach *in vivo*). Oceniono również wpływ substancji o udowodnionym działaniu hepatoprotekcyjnym – sylibiny, na cytotoksyczność badanych kokcydiostatyków.

Otrzymane wyniki wykazały wyraźnie różnice w mechanizmie działania badanych kokcydiostatyków w zależności od gatunku i rodzaju komórek. Wykazano, że mechanizm działania monenzyny i narazyny prowadził do hamowania aktywności mitochondrialnej komórek pochodzących z komórek hepatoma człowieka (HepG2), a salinomycyna powodowała zaburzenia w funkcjonowaniu błony komórkowej. Podobne wyniki dla monenzyny i salinomycyny uzyskano na komórkach hepatoma kurczaka (LMH) przy czym stwierdzono, że narazyna powodowała uszkodzenie błony komórkowej. Działanie narazyny i salinomycyny na mioblasty szczura (L6) związane było głównie z zaburzeniem integracji błony komórkowej w przeciwieństwie do monenzyny, która hamowała ich aktywność mitochondrialną. Dodatkowo wykazano protekcyjny wpływ sylibiny na działanie toksyczne badanych

kokcydiostatyków. Interakcje pomiędzy sylibiną a jonoforami miały charakter antagonistyczny. Należy podkreślić, iż podobne wyniki uzyskano w uprzednim badaniach z tiuramem wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego (H.1).

Podsumowując uzyskane wyniki wykazano że najbardziej cytotoksyczna była monenzyna, której mechanizm działania prowadził do hamowania aktywności mitochondrialnej. Wykazano również że komórki pochodzące z hepatoma człowieka (HepG2) i kurczaka (LMH) były najbardziej wrażliwe na działanie badanych kokcydiostatyków w porównaniu do mioblastów (L6) (komórek nie metabolizujących). Wynik ten wskazuje, że toksyczność tych leków może być powiązana z ich metabolizmem wątrobowym.

Kontynuacja tego kierunku badań, pod wpływem uzyskanych wcześniej wyników, skłoniła mnie do zwrócenia szczególnej uwagi na antybiotyk jonoforowy o silnych właściwościach przeciwnowotworowych jakim jest salinomycyna. W ramach realizacji projektu badawczego w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii zapoczątkowano doświadczenie, które miało na celu wyjaśnienie czy toksyczność salinomycyny jest zależna od jej biotransformacji. Opis wyników uzyskanych z postanowionego celu przedstawiłam w pracy:

H.5. Radko L., Olejnik M.: Cytotoxicity of anticancer candidate salinomycin and identification of its metabolites in rat cell cultures. 2018. *Toxicology in Vitro*, 52, 314-320.

W tym celu, hodowle komórkowe pochodzące od szczura (jako zwierzęcia modelowego w badaniach toksykologicznych): komórki hepatoma (linia FaO), mioblasty (linia L6) i izolowane hepatocyty, zostały wybrane do badania cytotoksyczności salinomycyny i jej połączeń z tiamuliną (inhibitorem metabolizmu salinomycyny) i prednizolonem (stymulatorem metabolizmu salinomycyny). Hodowle izolowanych hepatocytów szczura pochodziły od tych samych zwierząt, które były wykorzystane w badaniach cytotoksyczności albendazolu, a opisane wyniki wchodzą w skład osiągnięcia naukowego, H.2. i H.3. Do oznaczania stężeń salinomycyny i jej metabolitów w płynie hodowlanym zastosowano metodę LC-MS/MS. Należy zwrócić szczególną uwagę na innowacyjność tych badań ze względu na brak zidentyfikowanych metabolitów salinomycyny. Badania *in vitro*

przeprowadzone z wykorzystaniem hodowli komórek pochodzących z wątroby wykazały ścieżki biotransformacji salinomycyny oraz oceniły wpływ na jej właściwości toksyczne. Mechanizm działania leku polegał na silnym hamowaniu aktywności lizosomalnej we wszystkich użytych hodowlach komórek. Interesujące jest działanie salinomycyny na izolowane hepatocyty, które prowadzi do zaburzeń integracji błony komórkowej. Dane literaturowe wskazują, że mechanizm działania farmakologicznego i toksycznego salinomycyny polega na zakłócaniu przepływu jonów jednowartościowych (K^+/Na^+) przez błony komórkowe. Prowadzi to do przeciążenia, w komórkach, jonami Ca^{2+} pod wpływem, których następuje zmniejszenie i hamowanie degradacji lizosomalnych białek (Grinde, 1983; Boehmerle i wsp. 2011; Sommer i wsp. 2016; Zou i wsp. 2017). Uzyskane wyniki są zgodne z badaniami innych autorów, w których salinomycyna hamowała aktywność lizosomalną w różnych komórkach prowadzącą ostatecznie do ich śmierci (Yue i wsp. 2013; Sommer i wsp. 2016; Xipell i wsp. 2016; Zou i wsp. 2017).

W ostatnich latach badaczy zainteresowała aktywność przeciwnowotworowa salinomycyny. Wykazano, że zarówno komórki macierzyste niektórych nowotworów jak i komórki lekooporne są wrażliwe na działanie salinomycyny przy niskiej toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych. Bardzo niskie stężenia leku, od 0,1 μM (0,08 $\mu g/ml$) do 10-30 μM (7,51-22,5 $\mu g/ml$), działały cytotoksycznie na komórki nowotworowe pochodzące z różnych narządów (Gupta i wsp. 2009; Lieke i wsp. 2012; Scherzed i wsp. 2013; Jangamreddy i wsp. 2013). Uzyskane w tym badaniu stężenia cytotoksyczne salinomycyny mieściły się w cytowanym zakresie stężeń (<0,52 do 21 μM) dla komórek hepatoma szczura (FaO). Izolowane hepatocyty i komórki hepatoma (FaO) szczura były bardziej wrażliwe na badany lek niż mioblasty (L6). Podobne obserwacje dotyczą wcześniejszej pracy wchodzącej w skład cyklu (H.4.), wskazując że komórki hepatoma człowieka (HepG2) i kurczaka (LMH) były bardziej wrażliwe na salinomycynę niż mioblasty (L6).

Wykazano wzrost cytotoksyczności salinomycyny w połączeniu z tiamuliną wskazując na synergistyczny charakter zachodzących interakcji pomiędzy oba lekami. Potwierdzają to obserwacje kliniczne wskazujące na toksyczne (synergistyczne) interakcje pomiędzy badanymi lekami, prowadzące do śmierci

zwierząt (Islam i wsp. 2008; Weisman i wsp. 1980). Interakcja salinomycyny z tiamuliną wiąże się z ich wpływem na aktywność cytochromu P-450, który odgrywa ważną rolę w biotransformacji oksydacyjnej salinomycyny (Nebbia i wsp. 1999). Z drugiej strony, spadek cytotoxycznosc leku był obserwowany we wszystkich modelach komórkowych przy współdziałaniu z prednizolonem, co wskazuje na antagonistyczny charakter interakcji między tymi lekami. Wiele badań sugeruje, że prednizolon może stymulować aktywność cytochromu CYP3A4 (Matoulkova i wsp. 2014). Podobne działanie udowodniono na przykładzie innego glukokortykoidu (deksametazon), który wpływa na metabolizm monenzyny (Szucs i wsp. 2004).

Elementem innowacyjnym w tej pracy jest wykorzystanie badań *in vitro* do oceny biotransformacji salinomycyny z przeprowadzoną równolegle oceną jej cytotoxycznosci w celu określenia wpływu powstałych metabolitów na działanie toksyczne leku. Wydajność biotransformacji salinomycyny w hodowlach komórek hepatoma (linia FaO) i izolowanych hepatocytów szczura była niska (28%). Istotne jest, że współdziałanie salinomycyny z tiamuliną lub prednizolonem prowadziło do zmiany wydajności biotransformacji tych komórek. Zgodnie z oczekiwaniami (Nebbia i wsp. 1999; Szucs i wsp. 2000), tiamulina zmniejszyła tempo biotransformacji, co szczególnie było zauważalne w izolowanych hepatocytach. W oparciu o ten model wykryto 16 potencjalnych metabolitów salinomycyny - głównie są to produkty hydroksylacji. Wyniki tych badań potwierdzają dane uzyskane z badań *in vivo* (Rychen i wsp. 2017). Trzy metabolity zidentyfikowane w komórkach hepatoma (FaO) szczura (M5, M9 i M12), powstawały również w ludzkich komórkach hepatoma (HepG2) (Olejnik i wsp. 2018). Izolowane hepatocyty szczura były znacznie bardziej aktywne metaboliczne, co doprowadziło do powstania di- i trihydroksy pochodnych salinomycyny, które wcześniej zidentyfikowano u kurcząt w badaniach *in vivo*. Uzyskane wyniki dotyczące szczurów są słabo dostępne w danych literaturowych co tym bardziej wskazuje, że zachodzący metabolizm salinomycyny u tego gatunku prowadzi do powstawania podobnych metabolitów jak u kurcząt (Anadón i wsp. 2004). Podobieństwo profilu metabolicznego salinomycyny u szczurów i kurcząt wskazują na podobną wrażliwość obu tych gatunków na ten antybiotyk.

Podsumowanie i wnioski:

1. Wykazano, że hodowle komórek z ciągłych linii komórkowych pochodzących od kilku gatunków są przydatnym modelem do badań przesiewowych nad toksycznością substancji obcych. Mechanizm działania tiuramu prowadził do hamowania aktywności mitochondrialnej komórek, z tym że jego mechanizm działania wobec mioblastów reprezentujących komórki nie metabolizujące, prowadził do większej toksyczności w porównaniu do komórek hepatoma (człowieka, szczura, kurczaka) reprezentujących komórki metabolizujące. Komórki kurczaka okazały się bardziej wrażliwe na toksyczne działanie badanego fungicydu w porównaniu do komórek człowieka lub szczura.
2. Udowodniono, że badania *in vitro* umożliwiają ocenę toksyczności substancji oraz ich metabolitów. Wykazano wysoką cytotoksyczność albendazolu w porównaniu do jego metabolitów. Mechanizm działania cytotoksycznego albendazolu i jego metabolitów polegał na uszkodzeniu błon komórkowych i hamowaniu aktywności mitochondrialnej komórek. Biotransformacja albendazolu prowadzi do jego detoksykacji. Albendazol był bardziej toksyczny dla fibroblastów reprezentujących komórki nie metabolizujące (brak metabolitów w płynie hodowlanym) w porównaniu do izolowanych hepatocytów szczura i komórek hepatoma (człowieka i szczura) reprezentujących komórki metabolizujące (obecność metabolitów albendazolu). Wśród komórek hepatoma - komórki człowieka okazały się bardziej wrażliwe na toksyczne działanie badanego leku (oznaczono dwa metabolity w niskich stężeniach) niż komórki szczura (oznaczono jeden metabolit w wyższym stężeniu niż w komórkach człowieka). Izolowane hepatocyty szczura okazały się doskonałym modelem badawczym biotransformacji albendazolu (oznaczono dwa metabolity w wysokich stężeniach).
3. Wskazano, że prowadzenie badań na hodowlach komórek nie metabolizujących i metabolizujących umożliwia potencjalną ocenę cytotoksyczności powstałych metabolitów badanych substancji. Wykazano wyższą wrażliwość komórek metabolizujących (komórki hepatoma człowieka i kurczęcia) na działanie kokcydiostatyków jonoforowych w porównaniu do komórek nie

metabolizujących (mioblasty szczura). Wśród badanych kokcydiostatyków najbardziej cytotoksyczna była monenzyna, której mechanizm działania prowadził do hamowania aktywności mitochondrialnej komórek. Wykazano, że toksyczność salinomycyny jest zależna od typu komórek (komórki hepatoma były bardziej wrażliwe) co również potwierdza jej działanie przeciwnowotworowe.

4. Izolowane hepatocyty szczura okazały się doskonałym modelem badawczym biotransformacji leków weterynaryjnych: albendazolu (oznaczono 2 metabolity) i salinomycyny (oznaczono 16 metabolitów).
5. Dowiedziono, że połączenie badań *in vitro* z analizą instrumentalną płynu hodowlanego w kierunku metabolitów umożliwiło uzyskanie danych dotyczących jakościowej i ilościowej identyfikacji metabolitów salinomycyny (pierwsze na świecie doniesienia).

Piśmiennictwo:

1. Anadón A., Arzo M.A., Bories G., Brantom P., Barbera J.B. de, Chesson A., Cocconcelli P.S., Knecht J. de, Dierick N., Flachowsky G., Franklin A., Gropp J., Haldorsen A.-K., Halle I., Mantovani A., Peltonen K., Rychen G., Sanders P., Wester P. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the safety and efficacy of product “BIO-COX 120G” as feed additive in accordance with Council Directive 70/524/EEC. *EFSA J.* 2004. 75, 1–51.
2. Anon.: INVITTOX- The ERGATT/FRAME Data BANK OF in Vitro Techniques in Toxicology “The FRAME cytotoxicity test (Kenacid Blue)”, 1992, 3b.
3. Anon.: INVITTOX- The ERGATT/FRAME Data BANK OF in Vitro Techniques in Toxicology “MTT assay”, 1990, 17.
4. Anon.: INVITTOX- The ERGATT/FRAME Data BANK OF in Vitro Techniques in Toxicology “The frame neutral red release assay”, 1992, 54.
5. Baker M.: Tissue models: A living system on a chip. *Nature* 2011, 471, 661–665.
6. Boehmerle W., Endres M. Salinomycin induces calpain and cyochrome c-mediated neuronal cell death. *Cell Death Dis.* 2011, 2, e168.
7. Bogaards J.J., Bertrand M., Jackson P., Oudshoorn M.J., Weaver R.J., van Bladeren P.J., Walther B. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 2000, 30, 1131-1152.
8. Burden N., Chapman K., Sewell F., Robinson V. Pioneering better science through the 3Rs: An introduction to the national centre for the Replacement, Refinement and

- Reduction of animals in research (NC3Rs). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2015, 54, 198–208.
9. Capleton A.C., Courage C., Rumsby P., Holmes P., Stutt E., Boxall A.B.A., Levy L.S.: Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. *Toxicol Lett.* 2006, 163, 213–223.
 10. Castell J.V., Jover R., Martínez-Jiménez C.P., Gómez-Lechón M.J. Hepatocyte cell lines; their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert. Opin. Drug Metab Toxicol.* 2006, 2, 183-212.
 11. Coward S.M., Legallais C., David B., Thomas M., Foo Y., Mavri-Damelin D., Hodgson H.J., Selden C. Alginate-encapsulated HepG2 cells in a fluidized bed bioreactor maintain function in human liver failure plasma. *Artif Organs* 2009, 33, 1117-1126.
 12. Doke S.K., Dhawale S.C. Alternatives to animal testing. A review. *Saudi Pharm. J.* 2015, 23, 223–229.
 13. Doostdar H., Duthie S.J., Burke M.D., Melvin W.T., Grant M.H. The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Lett.* 1988, 241, 15-18.
 14. Dorne, J.L.C.M., Fernández-Cruz, M.L., Bertelsen, U., Renshaw, D.W., Peltonen, K., Anadon, A., Feil, A., Sanders, P., Wester, P., Fink-Gremmels, J. Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013. 270, 196–208.
 15. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dz.U. UE L 276/33 z dnia 20.10.2010.
 16. Eisenbrand G., Pool-Zobel B., Baker V., Balls M., Blaauboer B. J., Boobis A., Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J. C., Pieters R., Kleiner J. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol* 2002, 40, 193-236.
 17. Franco N.H., Olsson I.A.S. Scientists and the 3Rs: attitude to animal use in biomedical research and the effect of mandatory training in laboratory animal science. *Lab. Anim.* 2014, 48, 50–60.
 18. Freshney I. Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biol Toxicol* 2001, 17, 213-230.
 19. Graham M.L., Prescott M.J. The multifactorial role of 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *Eur. J. Pharm.* 2015, 759, 19–29.
 20. Grinde B. Effect of carboxylic ionophores on lysosomal protein degradation in rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 1983, 149, 27-35.
 21. Guillouzo A. Liver cell models in vitro toxicology. *Environ Health Perspect.* 1998, 106, 511-532.
 22. Gupta P.B., Onder T.T., Jiang G., Tao K., Kuperwasser C., Weinberg R. a, Lander E.S. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009, 138, 645–59.

23. Han M.S., Shin K.J., Kim Y.H., Kim S.H., Lee T., Kim E., Ryu S.H., Suh P.G. Thiram and ziram stimulate non-selective cation channel and induce apoptosis in PC12 cells, *NeuroToxicology* 2003, 24, 425–434.
24. Huczynski A. Polyether ionophores-promising bioactive molecules for cancer therapy. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012, 22, 7002-7010.
25. Huczynski A. Salinomycin: a new cancer drug candidate. *Chem Biol Drug Des.* 2012, 79, 235-238.
26. Islam K.M.S., Afrin S., Khan M.J., Das P.M., Hassan M.M., Valks M., Burch D.G.S., Pesti G.M. Compatibility of a combination of tiamulin plus chlortetracycline with salinomycin in feed during a long-term co-administration in broilers. *Poult. Sci.* 2008, 87, 1565–1568.
27. Jangamreddy J.R., Ghavami S., Grabarek J., Kratz G., Wiechec E., Fredriksson B.A., Rao Pariti, R.K., Cieślak-Pobuda A., Panigrahi S., Łos M.J. Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013, 1833, 2057-2069.
28. Jouany J.M., Truhaut R., Vasseur P., Klein D., Ferard J.F., Deschamps P. An example of interaction between environmental pollutants: modification of thiram toxicity to freshwater organisms by nitrites or nitrates in relation to nitrosamine synthesis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1985, 9, 327–338.
29. Kawaguchi T., Nomura K., Hirayama Y., Kitagawa T. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res.* 1987, 47, 4460-4464.
30. Li J., Bi D., Pan S., Zhang Y. Effect of diet with thiram on liver antioxidant capacity and tibial dyschondroplasia in broilers. *Br. Poult. Sci.* 2007, 48, 724–728.
31. Lieke T., Ramackers W., Bergmann S., Klempnauer J., Winkler M., Klose J. Impact of salinomycin on human cholangiocarcinoma: induction of apoptosis and impairment of tumor cell proliferation in vitro. *BMC Cancer* 2012, 12, 1-12.
32. Maita K., Tsuda S., Shirasu Y. Chronic toxicity studies with thiram in Wistar rats and beagle dogs. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1991, 16, 667–686.
33. Marion T.L., Perry C.H., St Claire R.L. 3rd, Brouwer K.L. Endogenous bile acid disposition in rat and human sandwich-cultured hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012, 261, 1-9.
34. Matoulkova P., Pavek P., Maly J., Vlcek J. Cytochrome P450 enzyme regulation by glucocorticoids and consequences in terms of drug interaction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2014, 10, 425–435.
35. Nebbia C., Ceppa L., Dacasto M., Carletti M., Nachtmann C. Oxidative metabolism of monensin in rat liver microsomes and interactions with tiamulin and other chemotherapeutic agents: evidence for the involvement of cytochrome P-450 3A subfamily. *Drug Metab. Dispos.* 1999, 27, 1039–1044.
36. Noorani L., Stenzel M., Liang R., Pourgholami M.H., Morris D.L. Albumin nanoparticles increase the anticancer efficacy of albendazole in ovarian cancer xenograft model. *J Nanobiotechnology.* 2015, 25, 13-25.
37. Olejnik M., Szprengier-Juszkiewicz T. Coccidiostats residues In poultry tissues and eggs. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1539-1545.

38. Olejnik M., Radko L., Jedziniak P. Identification of metabolites of anticancer candidate salinomycin using liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight and hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2018, 32, 629-634.
39. Rico A.G., Burgat-Sacaze V. Veterinary drugs and food safety: a toxicological approach. *Rev sci tech Off int Epiz.* 1985, 4, 111–119.
40. Russell W.M.S., Burch R.L. The principle of humane experimental technique. Universities Federation for Animal Welfare, 1959. Potters Bar, England.
41. Rychen G., Aquilina G., Azimonti G., Bampidis V., de Lourdes Bastos M., Bories G., Chesson A., Cocconcelli P.S., Flachowsky G., Kolar B., Kouba M., Puente S.L., López-Alonso M., Mayo B., Ramos F., Saarela M., Villa R.E., Wallace R.J., Wester P., Brantom P., Halle I., van Beelen P., Holczknecht O., Vettori M.V., Gropp J. Scientific opinion on the safety and efficacy of Sacox® microGranulate (salinomycin sodium) for chickens for fattening and chickens reared for laying. *EFSA J.* 2017, 15, 4670, p. 40.
42. Scherzed A., Hackenberg S., Froelich K., Rak K., Technau A., Radeloff A., Nöth U., Koehler C., Hagen R., Kleinsasser N. Effects of salinomycin on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Toxicol. Lett.* 2013, 218, 207-214.
43. Sommer A.K., Hermawan A., Mickler F.M., Ljepoja B., Knyazev P., Bräuchle C., Ullrich A., Wagner E., Roidl A. Salinomycin co-treatment enhances tamoxifen Cytotoxicity in luminal A breast tumor cells by facilitating lysosomal degradation of receptor tyrosine kinases. *Oncotarget* 2016, 7, 50461-50476.
44. Stoker T.E., Jeffay S.C., Zucker R.M., Cooper R.L., Perreault S.D. Abnormal fertilization is responsible for reduced fecundity following thiram-induced ovulatory delay in the rat. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 2142–2149.
45. Szucs G., Laczay P., Bajnógel J., Mora Z. Studies on the toxic interaction between monensin and tiamulin in rats: effects on P450 activities. *Acta Vet. Hung.* 2000, 17, 361–368.
46. Szucs G., Tamási V., Laczay P., Monostory K. Biochemical background of toxic interaction between tiamulin and monensin. *Chem. Biol. Interact.* 2004, 147, 151–61.
47. Weisman Y., Shlosberg A., Egyed M.N. Acute poisoning in turkeys caused by incompatibility of monensin and tiamulin. *Vet. Res. Commun.* 1980, 4, 231–235.
48. Wilkening S., Bader A. Influence of culture time on the expression of drugmetabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003, 17, 207-213.
49. Wilkening S., Stahl F., Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 2003, 31, 1035-1042.
50. Xipell E., Gonzalez-Huarriz M., Martinez de Irujo J.J., García-Garzón A., Lang F.F., Jiang H., Fueyo J., Gomez-Manzano C., Alonso M.M. Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma. *Oncotarget* 2016, 7, 30626-30641.

51. Yue W., Hamaï A., Tonelli G., Bauvy C., Nicolas V., Tharinger H., Codogno P., Mehrpour M. Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells interferes with their maintenance. *Autophagy* 2013, 9, 714-729.
52. Zou Z.Z., Nie P.P., Li Y.W., Hou B.X., Rui-Li Shi X.P., Ma Z.K., Han B.W., Luo X.Y. Synergistic induction of apoptosis by salinomycin and gefitinib through lysosomal and mitochondrial dependent pathay overcomes gefitinib resistance in colorectal cancer. *Oncotarget* 2017, 8, 22414-22432.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Moje pierwsze doświadczenia naukowe pochodzą z okresu ostatniego roku studiów, kiedy jako studentka Wydziału Medycyny Weterynaryjnej asystowałam w badaniach ankietowych z zakresu deontologii i historii weterynarii, których wyniki zostały zaprezentowane w postaci doniesień konferencyjnych. Po ukończeniu studiów na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie rozpoczęłam studia doktoranckie w Zakładzie Toksykologii i Ochrony Środowiska, Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych tego samego Wydziału, pod opieką dr hab. Wojciecha Cybulskiego. W okresie studiów doktoranckich skupiałam się na udoskonalaniu metod i wprowadzaniu nowych modeli komórkowych stosowanych w badaniach nad oceną cytotoksyczności leków używanych w medycynie weterynaryjnej (głównie kokcydiostatyków jonoforowych) oraz substancji biologicznie czynnych (głównie sylimaryny). W tym czasie rozpoczęłam także szczegółowe badania dotyczące sposobu obniżenia cytotoksyczności lazalocydu stosowanego w profilaktyce kokcydiozy u kurcząt rzeźnych, których wyniki przedstawiłam w pracy doktorskiej. W okresie studiów doktoranckich brałam udział w szkoleniach z zakresu higieny pasz oraz farmakologii i terapii roślinnymi dodatkami oraz z zakresu metod analitycznych w ocenie jakości leków, celem doskonalenia umiejętności metod i pogłębienia wiedzy w omawianym obszarze. Brałam także aktywny udział w realizacji projektu badań własnych, którego celem była optymalizacja metod oceny cytotoksyczności substancji obcych. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora uczestniczyłam w dwóch projektach badawczych, wśród których, jednym byłam kierownikiem i jedynym wykonawcą. Efektem badań prowadzonych w tym okresie są 3 publikacje w czasopismach z listy

JCR oraz monografie i 4 publikacje w innych recenzowanych czasopismach (lista B MNiSW). Wyniki moich badań były także prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci 17 wykładów i doniesień posterowych.

1. **Radko L.**, Cybulski W., Wessely-Szponder J., Rzeski W. 2006. Badania cytotoksyczności monenzyny i narazyny w hodowli linii ciągłej hepatocytów szczura. *Medycyna Weterynaryjna*, 62, 834-837. (IF₂₀₀₆ = 0,259; MNiSW =15)
2. Cybulski W., Wessely-Szponder J., **Radko L.**, Bobowiec R. 2006. Wpływ monenzyny na żywotność i aktywność izolowanych neutrofilii od jałówek w przebiegu zespołu oddechowego BRD. *Medycyna Weterynaryjna*, 62, 915-954. (IF₂₀₀₆ = 0,259; MNiSW =15)
3. **Radko L.**, Cybulski W., Rzeski W. 2007. Cytotoxicity of salinomycin and lasalocid in a model hepatocyte cell line of a rat. *Medycyna Weterynaryjna*, 63, 839-843. (IF₂₀₀₇ = 0,259; MNiSW = 10)
4. **Radko L.**, Cybulski W. 2007. Application of silymarin in human and animal medicine. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 1, 22-26.
5. **Radko L.**, Cybulski W. 2005. Zatrucia zwierząt jadami owadów błonkoskrzydłych. *Magazyn Weterynaryjny*, 02, 59-62.
6. Cybulski W., **Radko L.** 2006. Środki farmaceutyczne z grupy beta-agonistów- aspekty farmakologiczne, toksykologiczno-higieniczne i legislacyjne. *Życie Weterynaryjne*, 2006, 11, 760-766.
7. **Radko L.**, Cybulski W. 2007. Zastosowanie sylimaryny u zwierząt. *Magazyn Weterynaryjny*, 16, 52-54. (MNiSW=2)

Sumaryczny Impact Factor = 0,777

Punkty MNiSW = 42

Zakończeniem tego etapu moich badań było uzyskanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, 30 września 2008 roku na podstawie pracy „Badania nad ochronnym wpływem sylimaryny wobec cytotoksycznego działania wybranych antybiotyków jonoforowych”, której promotorem był dr hab. Wojciech Cybulski, prof. nadzw. UP w Lublinie.

5.2. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Uzyskane w toku pracy doktorskiej wyniki wykazały, że zastosowanie metod *in vitro* w ocenie toksyczności lazalocydu, koresponduje z wynikami badań *in vivo*.

Lazalocyd wykazał się działaniem cytotoksycznym niezależnie od zastosowanej hodowli komórek ciągłych linii komórkowych. Równoległe zastosowanie trzech testów oceny aktywności cytotoksycznej pozwoliło na bliższe poznanie mechanizmów działania lazalocydu. Fakt, że niezależnie od użytej linii komórek hepatoma: LMH - kurczaka, FaO - szczurze, HepG2- ludzkie, związek ten hamował aktywność mitochondrialną. Największą wrażliwość wykazywały komórki hepatoma człowieka, a najmniejszą kurczęcia. W przypadku miocytów (linia L6) mechanizm cytotoksycznego działania wskazuje na uszkodzenie błony komórkowej. Dodatkowo wykazano, że łączna ekspozycja komórek na lazalocyd i silybinę powodowała częściową protekcję komórek szczura i kurczęcia, a całkowite zniesienie toksycznego działania lazalocydu w komórkach człowieka. Wyniki pracy doktorskiej zostały przedstawione w następujących pracach oryginalnych:

1. **Radko L.**, Cybulski W., Rzeski W. 2011. Cytotoxicity studies of lasalocid and silibinin in rat hepatoma cell culture. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 55, 547-554. (IF₂₀₁₁ = 0.414; MNiSW = 20)
2. **Radko L.**, Cybulski W., Rzeski W. 2013. The protective effect of silybin against lasalocid cytotoxic exposure on chicken and rat cell lines. *BioMed Research International*, 2013, Article ID 783519, 1-8. (IF₂₀₁₃ = 2,706; MNiSW = 30)
3. **Radko L.**, Cybulski W., Rzeski W. 2013. Cytoprotective effect of silybin against lasalocid-induced toxicity in HepG2 cells. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16, 275-282. (IF₂₀₁₃ = 0.712; MNiSW = 20)

W celu potwierdzenia wyników *in vitro* uzyskanych z pracy doktorskiej przeprowadzono badania *in vivo* na brojlerach kurzych. Ptakom z czterech grup przez cały cykl produkcyjny (49 dni) podawano lazalocyd w dawkach: 75, 125, 150, 200 ppm, natomiast kolejnym czterem grupom podawano lazalocyd ww. dawkach z sylimaryną w dawce 800 ppm. Uzyskane wyniki wykazały istotny spadek pozostałości lazalocydu w mięśniach i w wątrobie w grupie zwierząt otrzymujących lazalocyd z sylimaryną. Wykazano brak wpływu sylimaryny na efektywność terapeutyczną lazalocydu. Wyniki z tych badań zostały szczegółowo opisane w poniżej wymienionej pracy, której byłam inicjatorem i którą koordynowałam.

1. **Radko L.**, Cybulski W. 2019. The decrease of lasalocid residue in the edible tissues by silymarin supplementation of chicken diet. *Food Additives & Contaminants: Part A*, doi.10.1080/19440049.2019.1584406. (IF₂₀₁₇ = 2,129; MNiSW = 30)

Na początku mojej pracy w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB w Puławach kontynuowałam badania z wykorzystaniem znanych mi modeli i metod do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków. Rozpoczęcie mojej pracy w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii, zbiegło się z zainteresowaniem opinii publicznej dwoma substancjami, których obecność stwierdzono, mimo zakazu ich stosowania, w żywności. Były to zieleń malachitowa w rybach i melamina w mleku dla niemowląt i innych produktach, np. sos sojowy. Zieleń malachitowa ze względu na wysoką skuteczność (przeciwgrzybiczą, przeciw pasożytniczą), łatwą dostępność, niską cenę oraz tradycyjne przyzwyczajenie hodowców, mimo wprowadzenia zakazu stosowania w gospodarstwach rybnych nadal bywa stosowana nielegalnie. Niebezpieczeństwo narażenia ludzi i zwierząt na zieleń malachitową i jej metabolit (zieleń leukomalachitowa) wynika z jej potencjalnego działania genotoksycznego, mutagennego, kancerogennego i teratogennego. Melamina inaczej cyjanuramid to związek chemiczny stosowany przy produkcji żywic syntetycznych wykorzystywany m.in. do produkcji tworzyw sztucznych. Melamina ze względu na wysoką zawartość azotu bywa stosowana nielegalnie do zawyżania zawartości białka w produktach spożywczych. Mimo braków dowodów na działanie mutagenne, rakotwórcze czy teratogenne to wysokie stężenia powodowały zatrucia ludzi i zwierząt. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wykazano mniejszą aktywność cytotoksyczną metabolitu zieleni malachitowej, zieleni leukomalachitowej w porównaniu do substancji macierzystej. Generalnie wrażliwość komórek metabolizujących (linii komórek hepatoma: szczura (FaO) i człowieka (HepG2)) na działanie zieleni malachitowej była wyższa w porównaniu do komórek nie metabolizujących (linia mioblastów (L6)). Wykazano, że mechanizm działania zieleni malachitowej i jej metabolitu prowadził do hamowania aktywności lizosomalnej i mitochondrialnej w komórkach. Badania z udziałem melaminy wykazały słabe działanie toksyczne w porównaniu do zieleni malachitowej. Najbardziej wrażliwe na ten związek były mioblasty, a mechanizm

działania prowadził do hamowania aktywności mitochondrialnej i lizosomalnej komórek. Ocena substancji, jaką uzyskano w przeprowadzonych badaniach w dużym stopniu koresponduje z wynikami zarówno *in vitro* jak *in vivo*. Wyniki uzyskane podczas realizacji tych badań przedstawiono w dwóch pracach:

1. **Radko L.**, Minta M., Stypuła-Trębas S. Żmudzki J. 2010. Determination of melamine cytotoxicity. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54, 223-228. (IF = 0.321; MNiSW = 20)
2. **Radko L.**, Minta M., Stypuła-Trębas S. 2011. Cellular toxicity of malachite green and leucomalachite green evaluated on two rat cell lines by MTT, NRU, LDH and protein assays. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 55, 347-353. (IF = 0.414; MNiSW = 20)

Następnym etapem badań *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek z ciągłych linii komórkowych była ocena i porównanie cytotoksyczności wybranych grup leków weterynaryjnych. W badaniach tych postanowiłam skupić się na lekach, o których wiadomo, że poza podstawowym działaniem terapeutycznym, stanowią zagrożenie dla zdrowia konsumentów ze względu na ich pozostałości stwierdzane w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego oraz w środowisku. W związku z tym w przeprowadzonych doświadczeniach porównałam działanie nitrozoimidazoli (metronidazolu, tindazolu, ronidazolu, ornidazolu) na hodowlach komórek hepatoma człowieka (linia HepG2) i szczura (linia FaO). Uzyskane wyniki wskazują, że oceniane substancje są mało toksyczne w obu zastosowanych hodowlach co koresponduje z ich oceną *in vivo*. Kolejnym badaniem była ocena cytotoksyczności fluorochinolonów (enrofloksacyna, cyprofloksacyna, norfloksacyna, danofloksacyna, sarafloksacyna, difloksacyna, marbofloksacyna), którą przeprowadzono wykorzystując hodowle komórek: metabolizujących (komórki hepatoma człowieka – linia HepG2) i nie metabolizujących (mysie fibroblasty – linia Balb/c 3T3). Badania wykazały, że toksyczność fluorochinolonów jest zależna od użytej w badaniu hodowli komórkowej. Wrażliwe na ich działanie były fibroblasty Balb/c 3T3 w porównaniu do komórek hepatoma HepG2. Cytotoksyczność badanych leków była również zależna od czasu ekspozycji. Następną grupą leków, którą zbadalam

z wykorzystaniem hodowli fibroblastów (linia Balb/c 3T3) i komórek hepatoma

człowieka (linia HepG2) są leki o działaniu hormonalnym i anabolicznym (etynyloestradiol, dietylostilbestrol, propionian testosteronu i trenbolon). Badane substancje estrogenowe charakteryzowały się wysoką toksycznością, a toksyczność androgenów była zależna od użytej hodowli komórkowej. Najważniejsze uzyskane wyniki oraz wnioski z wykonanych badań przedstawiłam w następujących pracach:

1. **Radko L.**, Minta M. 2012. Cytotoxicity of some nitroimidazole derivatives - comparative studies on human and rat hepatoma cell lines. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56, 579-584. (IF = 0.377; MNiSW = 20).
1. **Radko L.**, Minta M., Stypuła-Trębas S. 2013. Influence of fluoroquinolones on viability of Balb/c 3T3 and HepG2 cells. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57, 599-606. (IF = 0.365; MNiSW = 20).
2. Minta M., **Radko L.**, Stypuła-Trębas S., Żmudzki J. 2014. Cytotoxic effects of the synthetic oestrogens and androgens on Balb/c 3T3 and HepG2 cells. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58, 613-620. (IF = 0.357; MNiSW = 15).

W latach 2013-2017 uczestniczyłam w realizacji projektu badawczego, którego głównym celem było ustalenie wpływu metabolizmu salinomycyny na jej toksyczność. W badaniu wykorzystano różne modele komórkowe pochodzące od różnych gatunków zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem człowieka. Określono cytotoksyczności salinomycyny na izolowanych hepatocytach szczura i indyka oraz na hepatocytach człowieka, a także pośrednio – poprzez identyfikację metabolitów salinomycyny ustalono ich wpływ na występowanie efektów toksycznych. Wyniki z jednego etapu badań (na izolowanych hepatocytach szczura) wchodzi w skład jednotematycznego cyklu publikacji mojego osiągnięcia naukowego (**H.5**). Udział w realizacji tego projektu rozwinął mój warsztat badawczy i umiejętności izolacji hepatocytów szczura a zwłaszcza indyka, gatunku na którym dotychczas nie wykonywano izolacji tych komórek. Efektem badań było ustalenie, zależności wpływu metabolizmu wątrobowego na toksyczność salinomycyny u poszczególnych gatunków zwierząt i człowieka oraz poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów występowania efektów toksycznych tego leku. Wyniki uzyskane podczas realizacji badań zostały częściowo opublikowane oraz są na etapie przygotowywania manuskryptów. Prezentowane były również w postaci doniesień na konferencjach międzynarodowych.

1. Olejnik M., **Radko L.**, Jedziniak P. 2018. Identification of metabolites of anticancer candidate salinomycin using liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight and hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32, 629-634.(IF = 1,97; MNiSW = 30)

- **Radko L.**, Olejnik M., Korycińska B. 2015. Cytotoxicity evaluation of salinomycin and identification of its metabolites in two rat cellular models. 51st Congress of the European Societies of Toxicology, Porto, Portugalia.
- **Radko L.**, Olejnik M., Korycińska B. 2016. Cytotoxicity evaluation of salinomycin and identification of its metabolites in rat primary hepatocytes. 19th International Congress on In Vitro Toxicology (ESTIV), Juan-les-Pins, Francja.
- **Radko L.**, Olejnik M., Korycińska B., Sell B. 2017. Toxicity of salinomycin and identification of its metabolites in turkey primary hepatocytes. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Bratysława, Słowacja.

Od szeregu lat uczestniczę również w badaniach prowadzonych we współpracy z Danylo Halytsky Lviv National Medical University z Ukrainy dotyczących oceny cytotoksyczności nowo syntetyzowanych substancji. Biorąc pod uwagę fakt, że głównym celem badań toksykologicznych jest ocena mechanizmu toksycznego działania badanych związków chemicznych, najczęściej stosowanym modelem są hodowle komórkowe z ciągłych linii komórek nie metabolizujących (linia Balb/c 3T3) i metabolizujących (linia HepG2) ze względu na ich względną stabilność, dobrą charakterystykę oraz łatwą obsługę hodowli. Wyniki dotychczasowych badań zostały opublikowane w pracy:

1. Lozynski A., Zimenkovsky B., **Radko L.**, Stypula-Trebas S., Roman O., Gzella A. K. Lesyk R. 2018. Synthesis and cytotoxicity of new thiazolo[4,5-b]pyridine-2(3H)-one derivatives based on α,β -unsaturated ketones and α -ketoacids. *Chemical Papers*, 72, 669–681. (IF = 0,963; MNiSW = 20)

Moją szczególną tematyką zainteresowań naukowych są interakcje leków weterynaryjnych z innymi substancjami. Temat stanowi po części kontynuację badań rozpoczętych w okresie studiów doktoranckich. Zagadnienie to wzbudza coraz większe zainteresowanie ze względu na liczbę cytowań moich publikacji poruszających ten problem. Ze względu na ograniczone dane literaturowe dotyczące

tego problemu w 2017 roku otrzymałam dofinansowanie z Narodowego Centrum Nauki na realizację badań, którego byłam kierownikiem i wykonawcą w ramach projektu Miniatura 1. Aktualnie w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii realizowane są dwa projekty badawcze podejmujące problematykę interakcji: enrofloksacyny z fipronilem, którego jestem kierownikiem (badania własne pracowników PIWet-PIB) oraz interakcje deoksyniwalenolu z trzema lekami weterynaryjnymi powszechnie stosowanymi w hodowli świń (projekt Opus finansowany przez Narodowe Centrum Nauki), którego jestem wykonawcą.

Szczególną uwagę opinii publicznej zwraca fakt obecności leków weterynaryjnych w środowisku naturalnym. Głównymi źródłami są odchody leczonych ludzi/zwierząt. Czas ich rozkładu w środowisku waha się od kilku dni do kilku miesięcy, stanowiąc potencjalne źródło narażenia. Należy zwrócić uwagę, iż obecność leków w żywności i ekosystemie sprzyja wzrostowi występowania alergii i oporności drobnoustrojów. W Unii Europejskiej fluorochinolony (enrofloksacyna) należą do grupy jednych z najczęściej stosowanych leków w weterynarii. W zależności od gatunku ok. 40% dawki enrofloksacyny w formie biologicznie aktywnej wydalane jest do środowiska. W ostatniej dekadzie znacząco wzrosło zainteresowanie zanieczyszczeniem żywności i pasz mikotoksynami, które są wtórnymi metabolitami naturalnie występujących grzybów pleśniowych. Toksyczne działanie mikotoksyn na organizm ludzki i zwierzęcy doprowadza do szeregu chorób oraz poważnych strat ekonomicznych. Największe znaczenie mają mikotoksyny należące do grupy trichotecenów, w tym deoksyniwalenol. Poważny problem stanowi narażenie zwierząt leczonych enrofloksacyną na mikotoksyny naturalnie zawarte w paszy. Prowadzi to do zwiększenia ryzyka zanieczyszczenia środowiska stosowanym lekiem w związku z wpływem deoksyniwalenolu na proces biotransformacji enrofloksacyny. Głównym celem zrealizowanego działania naukowego w ramach projektu Miniatura było określenie wpływu deoksyniwalenolu na toksyczności enrofloksacyny w badaniach *in vitro*. Wyniki wykazały toksyczne interakcje zachodzące pomiędzy badanym lekiem, a mikotoksyną o charakterze synergistycznym oraz hamujący wzajemny wpływ na biotransformację w komórkach linii HepG2. Wyniki prac *in vitro* wskazały na konsekwencje biochemiczne oddziaływania enrofloksacyny z mikotoksyną nie

pokazując jednak efektów biologicznych. Ten projekt zamierzał wypełnić tę lukę poprzez przeprowadzenie badań toksyczności *in vivo* na organizmie modelowym jakim były ryby *Danio rerio*. Badania na rybach wykonałam dzięki nawiązaniu współpracy z Ośrodkiem Medycyny Doświadczalnej, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W badaniach *in vivo* wykazałam hamujący wpływ obu badanych substancji i ich mieszaniny na rozwój *Danio rerio*. Wyniki uzyskane podczas realizacji tych badań są w trakcie przygotowywania manuskryptu. Dotychczas przedstawiłam je w postaci doniesień ustnych i posterowych na XIV Międzynarodowym Kongresie Europejskiego Towarzystwa Farmakologów i Toksykologów Weterynaryjnych (EAVPT) we Wrocławiu (2018) oraz na XXXV Konferencji Naukowo-Technicznej pt. „Bezpieczeństwo i jakość handlowa pasz” w Puławach (2018). Dodatkowo wygłosiłam wykład na Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej pt. “Doświadczenia na zwierzętach jako przedmiot refleksji interdyscyplinarnej”, KUL w Lublinie (2018).

W czasie mojej pracy w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB w Puławach, ewoluował także profil moich zainteresowań naukowych. Obecność w środowisku substancji zaburzających funkcjonowanie układu endokrynnego jest jednym z głównych zagrożeń. Prowadzi to do wzrostu częstości występowania hormono-zależnych nowotworów, bezpłodności w populacji zwierząt i ludzi oraz zaburzeń prawidłowego rozwoju płodu. Substancje zaburzające funkcje układu hormonalnego i wywołujące wspomniane efekty określa się mianem związków endokrynnie czynnych. Pozostałości tych substancji w środowisku wskazuje, że mogą one być obecne w różnych ogniwach łańcucha pokarmowego. Do określenia potencjalnego ryzyka dla zdrowia, związanego z ewentualnymi pozostałościami, niezbędna jest ich charakterystyka toksykologiczna w kierunku określenia zmian w organizmie. W związku z przyznanym projektem badawczym na lata 2010-2013 przez KBN N N308 267238. „Biotesty w ocenie aktywności hormonalnej żywności” rozpoczęłam badania *in vivo*, oceniające działanie związków endokrynnie czynnych z wykorzystaniem jako modelu badawczego chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*). Gatunek ten z powodzeniem był dotychczas stosowany w badaniach z zakresu teratogenności wykonywanych w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii. Rozpoczęcie prac na tym modelu zwierzęcym poprzedziłam pracami

metodycznymi, w celu optymalizacji dwóch zalecanych przez OECD testów do oceny aktywności hormonalnej substancji lub próbek tj. testu wzrostu masy macicy (OECD 440) i testu Hershbergera (OECD 441). Zaplanowałam i przeprowadziłam serię doświadczeń w celu opracowania protokołu eksperymentalnego pozwalającego na uzyskanie wiarygodnych wyników z oceny działania hormonalnego substancji obcych na organizm zwierzęcy. Najważniejsze wyniki z wykonanych doświadczeń przedstawiłam w następujących pracach:

1. **Radko L**, Minta M., Jasik A., Stypuła-Trębas S, Żmudzki J. 2015. Usefulness of immature golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as a model for uterotrophic assay. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59, 533-539.(IF₂₀₁₅ = 0,468; MNiSW = 15)
2. **Radko L.**, Minta M., Stypuła-Trębas S. 2017. Estrogenic activity of commercial milk as revealed in immature hamster uterotrophic assay – pilot study. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 68, 303-307.(MNiSW = 14)

Równocześnie z prowadzonymi badaniami *in vivo* włączyłam się w badania *in vitro*, oceniające aktywność hormonalną substancji i próbek żywności. Badania te prowadzone są z wykorzystaniem modelu genetycznie modyfikowanych komórek drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*). Dotychczasowym efektem badań *in vitro* realizowanych w ramach tego obszaru są następujące prace:

1. Stypuła-Trębas S., Minta M., **Radko L.**, Żmudzki J. 2015. Application of the yeast-based reporter gene bioassay for the assessment of estrogenic activity in cow's milk from Poland. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 876-885.(IF₂₀₁₅ = 2,187; MNiSW = 25)
2. Stypuła-Trębas S., Minta M., **Radko L.**, Żmudzki J. 2016. Oestrogenic and (anti)androgenic activity of zearalenone and its metabolites in two *in vitro* yeast bioassays. *World Mycotoxin Journal*, 9, 247-255.(IF₂₀₁₆ = 2,189; MNiSW = 25)
3. Stypuła-Trębas S., Minta M., **Radko L.**, Jedziniak P., Posyniak A. 2017. Nonsteroidal mycotoxin alternariol is a full androgen agonist in the yeast reporter androgen bioassay. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 55, 208-211. (IF₂₀₁₇ = 2,776; MNiSW = 25)
4. Stypuła-Trębas S., Minta M., **Radko L.**, Posyniak A. 2017. Ocena aktywności estrogennej mleka i jego przetworów z wykorzystaniem testu *in vitro* aktywacji transkrypcyjnej receptora estrogenowego. *Medycyna Środowiskowa – Environmental Medicine*, 20, 44-48. (MNiSW = 8)

W trakcie wykonywania doświadczeń na zwierzętach szczególną uwagę zwróciłam na problem zanieczyszczeń pasz dla zwierząt laboratoryjnych i ich związek z jakością otrzymywanych wyników. W związku z brakiem kontroli jakości pasz dla zwierząt laboratoryjnych podjęłam się wykonania badań zmierzających do oceny pasz używanych przez hodowców tych zwierząt. Żywnienie jest jednym z czynników środowiskowych wpływających nie tylko na wyniki hodowlane i zdrowotne zwierząt laboratoryjnych ale także na ich jakość jako modelu doświadczalnego, a w konsekwencji na wyniki prowadzonych badań. Potencjalne chemiczne i biologiczne zanieczyszczenia pasz są głównym źródłem zafałszowania wyników prowadzonych doświadczeń. Przewlekłe narażenie zwierząt laboratoryjnych na niskie stężenia mieszaniny stwierdzanych zanieczyszczeń, prowadzi do pogorszenia wyników hodowli. Z punktu widzenia eksperymentatora wpływa to na uzyskiwanie fałszywych wyników badań, zwiększenia liczby wykorzystanych zwierząt w doświadczeniach oraz na trudności w ekstrapolacji wyników na organizm człowieka. Badania te są w trakcie realizacji, a wstępne wyniki zostały opublikowane w formie poniższych monografii i publikacji naukowych:

1. Minta M., **Radko L.**, Stypuła-Trębas S. 2011. Wpływ obecności związków bioaktywnych w paszy zwierząt laboratoryjnych na wyniki testu wzrostu macicy (Uterotrophic Assay), w: Toksykologia w ocenie bezpieczeństwa chemicznego ludności, Monografia. Wyd. PTToks w Warszawie pod red. prof. dr hab. Jana K. Ludwickiego, dr Katarzyny Góralczyk i dr Pawła Strucińskiego, 2011, 178-185
2. Minta M., **Radko L.**, Stypuła-Trębas S., Woźniak B, Żmudzki J. 2013. Influence of dietary soy isoflavines on immature hamster uterotrophic and Hershberger assays. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2013, 57, 579-585. (IF₂₀₁₃ = 0.365; MNiSW = 20)
3. Woźniak B, Minta M., Stypuła-Trębas S., **Radko L.**, Żmudzki J. 2014. Evaluation of estrogenic activity in animal diets using in vitro assay. *Toxicology in Vitro*, 28, 70-75. (IF₂₀₁₄ = 2,903; MNiSW = 30)
4. **Radko L.**, Stypuła-Trębas S., Posyński A. 2018. Jakość pasz dla zwierząt laboratoryjnych jako czynnik otrzymanych wyników badań. *Pasze Przemysłowe*, 27, 67-72. (MNiSW = 3)

Wykorzystując swoją wiedzę z zakresu toksykologii weterynaryjnej zainicjowałam, a także współtworzyłam publikacje skierowane do lekarzy praktyków:

1. **Radko L.**, Cybulski W. 2005. Zatrucia zwierząt jadami owadów błonkoskrzydłych. *Magazyn Weterynaryjny*, 02, 59-62.
2. Cybulski W., **Radko L.** 2006. Środki farmaceutyczne z grupy beta-agonistów- aspekty farmakologiczne, toksykologiczno-higieniczne i legislacyjne. *Życie Weterynaryjne* 2006, 11, 760-766.
3. **Radko L.**, Cybulski W. 2007. Zastosowanie sylimaryny u zwierząt. *Magazyn Weterynaryjny*, 16, 52-54.
4. Cybulski W., **Radko L.** 2009. Enrofloksacyna – aspekty stosowania u zwierząt i jej wpływ na środowisko naturalne. *Magazyn Weterynaryjny*, 2, 166-169. (MNiSW = 2)
5. Cybulski W., **Radko L.** 2010. Fipronil i pyriprol - zagrożenia w terapii i dla środowiska. *Magazyn Weterynaryjny*, 19, 78-8. (MNiSW = 2)
6. Cybulski W., Sell B., Giergiel M., **Radko L.**, Bednarek D. 2018. Najczęstsze przyczyny zatruc bydła - stan obecny. Wybrane choroby niezakaźne w patologii bydła. *Lecznica Dużych Zwierząt*, 37-40. (MNiSW = 3)

5.3. Udział w projektach badawczych

Jako kierownik projektu finansowanego z funduszy NCN:

1. 2017-2018. Badanie wpływu deoksyniwalenolu na cytotoksyczność enrofloksacyny oraz ich jednoczesnego oddziaływania na rozwój ryb *Danio rerio*. Narodowe Centrum Nauki, MINIATURA 1.

Jako kierownik projektu finansowanego z innych funduszy:

1. 2006-2007. Badania *in vitro* i *in vivo* nad ochronnym działaniem substancji aktywnych ostropestu plamistego w warunkach cytotoksycznego i subtoksycznego działania chemicznych dodatków paszowych z grupy antybiotyków jonoforowych u drobiu. Projekt badawczy realizowany w ramach programu konkursowego finansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego i Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego (EFS-ZPORR) na finansowanie prac naukowych doktorantów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie jako szansa dla lubelskiego rynku innowacji.

2. 2019-2020. Interakcje leków weterynaryjnych w badaniach *in vitro*. Projekty badawcze własne pracowników naukowych Instytutu PIWet-PIB w Puławach.

Jako wykonawca projektów finansowanych z funduszy NCN lub KBN:

1. 2017-2020. Interakcje mikotoksyn i antybiotyków w układzie pokarmowym i immunologicznym świni - badania *in vitro*. Narodowe Centrum Nauki, OPUS, (kierownik – dr hab. Piort Jedziniak – prof. nadzw.).
2. 2013-2017. Badania nad wpływem metabolizmu salinomycyny na jej toksyczność. Narodowe Centrum Nauki, SONATA 2 (kierownik - dr hab. Małgorzata Olejnik - prof. nadzw.).
3. 2010-2013. Biotesty w ocenie aktywności hormonalnej żywności. KBN N N308 267238 (kierownik – dr hab. Maria Minta).

Jako wykonawca projektów finansowanych z innych funduszy:

1. 2019-2020. Zastosowanie ukierunkowanej na efekt identyfikacji pozostałości leków weterynaryjnych i biocydów do oceny stanu zanieczyszczenia wód powierzchniowych w okolicy ferm wielkotowarowych. Projekty badawcze własne pracowników naukowych Instytutu PIWet-PIB.
2. 2018-2019. Rozwój technik separacyjnych połączonych z tandemową spektrometrią mas w toksykologii weterynaryjnej. Rozwój Potencjału Badawczego w ramach Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”.
3. 2015-2017. Wdrożenie i rozwój nowoczesnych metod w obszarze toksykologii weterynaryjnej. Grant badawczy w ramach „Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”.

Z chwilą rozpoczęcia pracy w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB w Puławach realizowałam i realizuję projekty badawcze prowadzone w ramach działalności statutowej:

1. 2019- 2020. Przydatność pasz dla zwierząt laboratoryjnych dostępnych w kraju do badań nad związkami aktywnymi hormonalnie. Wykonawca.

2. 2019-2020. Badania przeglądowe w kierunku aktywności hormonalnej żywności. Wykonawca.
3. 2018. Badania przeglądowe w kierunku aktywności hormonalnej żywności pochodzenia zwierzęcego. Wykonawca.
4. 2016-2017. Ocena aktywności estrogennej mleka i jego przetworów z wykorzystaniem biotestów *in vitro/in vivo*. Wykonawca.
5. 2014-2015. Porównanie cytotoksyczności i metabolizmu wybranych weterynaryjnych produktów leczniczych w hodowli komórek hepatoma (linia ciągła FaO i HepG2) oraz w hodowli pierwotnej hepatocytów szczura. Wykonawca.
6. 2010-2013. Zastosowanie zestawu testów *in vitro* do oceny toksyczności ksenobiotyków, w tym wybranych leków weterynaryjnych. Wykonawca.
7. 2008-2009. Doskonalenie szybkich testów *in vitro* do oceny toksyczności ksenobiotyków. Wykonawca.

5.4. Działalność dydaktyczna

Od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich (2003), po odbyciu 6-cio miesięcznego kursu pedagogicznego, brałam czynny udział w przygotowywaniu i prowadzeniu ćwiczeń, w tym ćwiczeń laboratoryjnych na kierunku weterynaria Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (toksykologia weterynaryjna, ochrona środowiska, higiena pasz, historia weterynarii i deontologia) Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W czasie pracy w Instytucie z zakresu badań cytotoksyczności przeszkoliłam 4 osoby odbywające staż w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB w Puławach.

5.5. Działalność organizacyjna

- W latach 2004-2007 sprawowałam funkcję zastępcy przewodniczącego Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

- W latach 2006-2008 byłam członkiem (z ramienia doktorantów) Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.
- Od roku 2015 jestem członkiem zespołu dyscyplinarnego PIWet-PIB w Puławach.
- Od roku 2016 pełnię funkcję wyznaczonego lekarza weterynarii do świadczenia usług weterynaryjnych dla zwierząt laboratoryjnych.
- Od 2016 jestem członkiem Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie.

5.6. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

1. Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych, od 2009 do chwili obecnej, członek.
2. Polskie Towarzystwo Toksykologiczne, od 2010 do chwili obecnej, członek.
3. Polskiego Towarzystwa Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych – PolLASA, od 2010 do chwili obecnej, członek.

5.7. Nagrody i wyróżnienia

1. Otrzymałam nagrodę III stopnia przyznana przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych w 2016 roku, za pracę:
 - Cybulski W., **Radko L.**, Rzeski W.: Cytotoxicity of monensin, narasin and salinomycin and their interaction with silybin in HepG2, LMH and L6 cell cultures, *Toxicology in Vitro* 2015, 29, 337-344.
2. Jestem laureatem 2 nagród przyznanych przez Dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – PIB w Puławach za najlepsze publikacje pracowników naukowych Państwowego Instytutu Badawczego (lata 2013 i 2016):
 - Woźniak B., Minta M., Stypula-Trębas S., **Radko L.**, Żmudzki J.: Evaluation of estrogenic activity in animal diets using in vitro assay. *Toxicology in Vitro* 2013, 28, 70-75.

- Cybulski W., **Radko L.**, Rzeski W.: Cytotoxicity of monensin, narasin and salinomycin and their interaction with silybin in HepG2, LMH and L6 cell cultures. *Toxicology in Vitro* 2015, 29, 337-344.
3. Moja współpraca z Zakładem Wirusologii i Immunologii, UMCS w Lublinie zaowocowała publikacjami, które zostały wyróżnione dwoma nagrodami przyznanymi przez J.M. Rektora Uniwersytetu Marii Skłodowskiej Curie w Lublinie w roku akademickim 2015/2016 i 2016/2017.
- Cybulski W., **Radko L.**, Rzeski W. 2015. Cytotoxicity of monensin, narasin and salinomycin and their interaction with silybin in HepG2, LMH and L6 cell cultures. *Toxicology in Vitro*, 29, 337-344.
 - **Radko L.**, Cybulski W., Rzeski W. 2017. The protective effects of silybin on the cytotoxicity of thiram in human, rat and chicken cell cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 154-160.
4. Otrzymałam wyróżnienie w sesji posterowej na XXXV Jubileuszowej Konferencji Naukowo-Technicznej Bezpieczeństwo i jakość handlowa pasz w 2018:
- **Radko L.**, Jedziniak P., Jakubaszek A., Stypuła-Trębas S., Posyniak A.: Wpływ mikotoksyn wykrywanych w paszach na rozwój ryb *Danio rerio*.

5.8. Szkolenia i staże

W celu pogłębienia wiedzy z zakresu metod badań toksyczności *in vitro* i *in vivo* brałam udział w następujących szkoleniach:

1. Université Catholique de Louvain, Faculty of Public Health, Brussels, Belgium, 02-05 wrzesień 2018, Exposure, hazard and risk assessment of mixtures of pesticides/ chemicals in food using the tools developed in the EuroMix project.
2. Państwowy Instytut Weterynaryjny -PIB w Puławach, 13-14 czerwca 2018, szkolenie, „Bezpieczeństwo i jakość handlowa pasz”.

3. Państwowy Instytut Weterynaryjny - PIB w Puławach, Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Vet-Twin, 05-09 marzec 2018, udział w szkole zimowej „Chemical Risk Assessment”.
4. Uniwersytet Medyczny, Ośrodek Medycyny Doświadczalnej w Lublinie, 20-21 kwiecień 2017, Workshop – Principles of zebrafish model in toxicology and behavioural studies.
5. MatTek In Vitro Life Science Laboratories, Bratislava, Slovakia, 10-13 wrzesień 2017, Nanotoxicology and risk assessment: the state of the art.
6. SeCAM Services & Consultation on Alternative Methods and Bayer, Sophia Antipolis, France, 20-21 październik 2016, Practical Training Course, In vitro methods for dermal, Ocular, Lung, Hepatic & Developmental Toxicity Testing.
7. Państwowy Instytut Weterynaryjny - PIB w Puławach, 05-09 październik 2015, szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń na zwierzętach oraz za ich przeprowadzenie, dla osób sprawujących opiekę nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku, dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach.
8. Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, 19 – 22 wrzesień 2011 – Letni kurs hodowli komórek zwierzęcych.
9. Państwowy Instytut Weterynaryjny -PIB w Puławach, 5 grudzień 2011, Warsztaty organizowane przez Thomson Reuters nt. Platformy Web of Knowledge.
10. Państwowy Instytut Weterynaryjny -PIB w Puławach, 04 listopad 2011, szkolenie “7 Program Ramowy UE- praktyczne wskazówki jak uzyskać europejski grant badawczy”.
11. Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, 8-11 wrzesień 2004, Workshop on Pharmacokinetics.

5.9. Podsumowanie dorobku naukowego

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej, otrzymanych nagrodach oraz działalności popularyzującej naukę znajdują się **w załączniku numer 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego**).

5.10. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych

Liczba publikacji w czasopismach z listy JCR	25
- w tym: opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	22
- w tym: stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	5
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy JCR oraz autorstwa w monografiach	17
Liczba komunikatów konferencyjnych	60
w tym: zaprezentowanych na konferencjach krajowych	43
w tym: zaprezentowanych na konferencjach zagranicznych	17
Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF)	33,713
- w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	32,936
- w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	11,156
Suma punktów MNiSW	572
- w tym: dla publikacji po uzyskaniu stopnia doktora	530
- w tym: dla publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne	120
Liczba cytowań wg. Web of Science Core Collection	47
- w tym: bez autocytowań	27
Indeks Hirscha wg. Web of Science Core Collection	4

Czasopismo	Liczba publikacji (w tym jako pierwszy autor)
Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy/ Journal of Veterinary Research	10(8)
Medycyna Weterynaryjna	3(1)
Toxicology in Vitro	3(1)
Pesticide Biochemistry and Physiology	1(1)
Food Additives and Contaminants: Part A	1(1)
BioMed Research International,	1(1)
Polish Journal of Veterinary Sciences	1(1)
Environmental Toxicology and Pharmacology	2(0)
World Mycotoxin Journal	1(0)
Rapid Communications in Mass Spectrometry	1(0)
Chemical Papers	1(0)
Journal of Pre-Clinical and Clinical Research	1(1)
Roczniki Państwowego Zakładu Higieny	1(1)
Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine	1(0)
Pasze Przemysłowe	2(1)
Magazyn Weterynaryjny	4(2)
Życie Weterynaryjne	1(0)
Lecznica Dużych Zwierząt	1(0)

Puławy, 25.02.2019 r.

