

Załącznik 2

Dr Robert Sobkowiak

Autoreferat

przedstawiający opis dorobku
i osiągnięć naukowych

**Przeciwstawne efekty działania nikotyny na poziomie
molekularnym, subkomórkowym i behawioralnym**

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Wydział Biologii

Zakład Biologii Komórki

Poznań 2018

1. IMIĘ I NAZWISKO: Robert Sobkowiak

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – fizjologia roślin.

Praca doktorska pt. „Molekularne aspekty oddziaływania kadmu na podziały komórkowe w kulturze zawieszinowej soi (*Glycine max* L.)” wykonana w Zakładzie Ekofizjologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 2003 r.
Promotor: dr hab. Joanna Deckert

Dyplom magistra w zakresie biologii molekularnej. Praca magisterska pt. „Klonowanie cDNA kodującego białko CBP 20 z *Arabidopsis thaliana*” wykonana w Zakładzie Ekspresji Genów, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 1998 r. Promotor: dr Artur Jarmołowski

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Zakład Ekofizjologii Roślin

Starszy technik ½ etatu

- umowa na czas określony od 01.10.2003 do 30.09.2004

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Zakład Biologii Komórki

(do 2005 r. noszący nazwę Zakładu Cytologii i Histologii)

Adiunkt

- umowa o pracę na czas określony od 01.10.2004 do 30.09.2005
- umowa o pracę na czas określony od 01.10.2005 do 30.09.2008
- mianowanie na czas określony od 01.10.2008 do 30.09.2014
- umowa o pracę na czas określony od 01.10.2014 do 30.09.2019

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) Tytuł osiągnięcia naukowego

„Przeciwstawne efekty działania nikotyny na poziomie molekularnym, subkomórkowym i behawioralnym”

B) Publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego

1. Sobkowiak R.*, Lesicki A. 2009
Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay
Drug and Chemical Toxicology 32 (3) 252-257
(IF₂₀₀₉ 1,25; punkty MNiSW 15)
(liczba cytowań według Web of Science 15)
(mój udział procentowy szacuję na 95 %)
2. Sobkowiak R.*, Kowalski M., Lesicki A. 2011
Concentration- and time-dependent behavioral changes in *Caenorhabditis elegans* after exposure to nicotine
Pharmacology Biochemistry and Behavior 99: 365–370
(IF₂₀₁₁ 2,532; punkty MNiSW 35)
(liczba cytowań według Web of Science 19)
(mój udział procentowy szacuję na 90 %)
3. Sobkowiak R.*, Musidlak J., Lesicki A. 2014
In vitro genoprotective and genotoxic effect of nicotine on human leukocytes evaluated by the comet assay.

Drug and Chemical Toxicology 37(3): 322-328

(IF₂₀₁₄ 1,233; punkty MNiSW 15)

(liczba cytowań według Web of Science 3)

(mój udział procentowy szacuję na 80 %)

4. Sobkowiak R. *, Zieleziński A., Karłowski W. M., Lesicki, A. 2017a
Nicotine affects protein complex rearrangement in *Caenorhabditis elegans* cells.
Drug and Chemical Toxicology 40(4): 470-483.
(IF₂₀₁₇ 1,531; punkty MNiSW 15)
(liczba cytowań według Web of Science 1)
(mój udział procentowy szacuję na 80 %)

5. Sobkowiak R. *, Kaczmarek P., Kowalski M., Kabaciński R., Lesicki A. 2017b
Behavior of *Caenorhabditis elegans* in a nicotine gradient modulated by food.
Drug and Chemical Toxicology 1-12; doi: 10.1080/01480545.2017.1405971
(IF₂₀₁₇ 1,531; punkty MNiSW 15)
(liczba cytowań według Web of Science 0)
(mój udział procentowy szacuję na 80 %)

*Autor do korespondencji

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

Osiągnięcie naukowe stanowią wyniki badań opisane w cyklu pięciu oryginalnych prac opublikowanych w latach 2009-2017 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny *impact factor* (zgodny z rokiem opublikowania) tych pozycji wynosi **8,077**, natomiast suma punktów **MNiSW** to **95** (wg listy z 9 grudnia 2016). We wszystkich pięciu publikacjach jestem autorem pierwszym i korespondencyjnym, z moim udziałem szacowanym na co najmniej 80%.

Z powodu palenia tytoniu na świecie co roku umiera około 7 mln ludzi (WHO, 2017). Jednym z głównych farmakologicznie czynnych składników dymu tytoniowego jest nikotyna. Nikotyna jest substancją silnie oddziałującą na organizm człowieka. Istotnym problemem, wynikającym z wpływu nikotyny na układ limbiczny, jest wywoływanie uzależnienia przez ten alkaloid. Uzależnienie od nikotyny pozostaje olbrzymim, nierozwiązanym problemem społecznym na świecie, jak i również w Polsce, który jeszcze bardziej pogłębił się wraz z wprowadzeniem na rynek e-papierosów. Dlatego, ze względów społecznych, celowe wydaje się głębsze poznanie natury działania tego alkaloidu na organizm, umożliwiające odkrycie, w efekcie finalnym, nowych metod terapii chorób związanych z uzależnieniem od nikotyny.

W badaniach skoncentrowałem się na lewoskrętnym izomerze optycznym nikotyny, ponieważ wyroby tytoniowe zawierają głównie taką formę alkaloidu (Sobkowiak i Lesicki, 2013). Nikotyna współzawodniczy z acetylocholiną w wiązaniu się z cholinergicznym receptorem nikotynowym (nAChR). Spektrum działania nikotyny jest węższe od acetylocholino, gdyż jest ligandem jedynie receptorów związanych z kanałem jonowym, a acetylocholina pobudza także receptory metabotropowe. Komunikacja międzykomórkowa wykorzystująca cząsteczkę acetylocholino jako substancję sygnałną, w toku rozwoju ewolucyjnego, pojawiła się dość wcześnie (Horiuchi i wsp., 2003, Kawashima i wsp., 2007). Taki system sygnalizacji zwiększał zdolności adaptacyjne organizmów i nie był eliminowany przez dobór naturalny. Spowodowało to, że sygnalizację cholinergiczną odnajdujemy w grupach zwierząt, które dziś filogenetycznie są od siebie odległe (Le Novere i Changeux, 1995). I tak na przykład nicianie, podobnie jak kręgowce, mają receptory nikotynowe

(nAChR). Co ciekawe nicienie *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) mają 29 różnych podjednostek receptora nAChR a jedynie 17 podjednostek receptora nAChR występuje u ptaków i ssaków (Jones i wsp., 2007). Nasuwa to przypuszczenie, że podstawowe reguły funkcjonowania sygnalizacji cholinergicznej u wszystkich zwierząt na poziomie molekularnym mogą być bardzo podobne.

Tak liczna grupa podjednostek nAChR oraz występowanie innych receptorów u *C. elegans* sugeruje, że prosty układ nerwowy nicienia, zawierający tylko 302 neurony, wykształcił skomplikowany system sygnalizacyjny, który może być wykorzystany do badań nad substancjami psychoaktywnymi takimi, jak na przykład nikotyna (Schafer, 2004, Feng i wsp., 2006). Zaletą tego modelu jest również to, że badania mogą być równolegle prowadzone na poziomie molekularnym (Sobkowiak i wsp., 2017a - publikacja nr 4 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego), subkomórkowym (Sobkowiak i Lesicki, 2009 - publikacja nr 1 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego), oraz na poziomie organizmalnym/behawioralnym (Sobkowiak i wsp., 2011, Sobkowiak i wsp., 2017b - publikacje nr 2 i 5 wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego). Nicienie poza tym łączą w sobie szereg zalet takich jak: łatwość hodowli w laboratorium na pożywkach stałych i płynnych, krótki – ok. 3 dniowy – cykl życiowy, obojnaczość, przezroczystość i niewielkie rozmiary oraz cechują się prostą budową ciała, o stałej liczbie komórek (959). W pełni opisana jest ich anatomia i rozwój, dostępne są kompletne sekwencje genomowe oraz inne informacje zawarte w bogatych bazach danych (np. WormBase i WormAtlas). Wielokierunkowe badania prowadzone na tym organizmie modelowym umożliwiają osadzenie otrzymanych wyników w szerokim kontekście poznawczym.

Ten modelowy organizm wydaje się być kompromisem między prostotą a złożonością. Historia badań naukowych pokazuje, że analiza prostych, niezłożonych organizmów dostarcza bardzo cennych informacji na temat natury wielu skomplikowanych procesów biologicznych. Wszystko to sprawiło, że zdecydowałem się na wykorzystanie jako modelu badawczego właśnie *Caenorhabditis elegans*. Doświadczenia z wykorzystaniem nicieni prowadziłem na *C. elegans*, dzikiej linii N2 Bristol, otrzymanej w 2005 r. dzięki uprzejmości *Caenorhabditis* Genetics Center University of Minnesota USA.

Celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie efektów działania nikotyny na *C. elegans* na różnych poziomach organizacji struktur biologicznych.

Nikotyna zawarta w dymie papierosowym, poprzez płuca i krwiobieg, już po kilkunastu sekundach, od momentu zapalenia papierosa, dociera do mózgu, prawie natychmiastowo tłumiąc u osoby uzależnionej nikotynowy zespół abstynencyjny, objawiający się między innymi irytacją, obniżeniem nastroju, niepokojem, pogorszeniem koncentracji uwagi i pamięci oraz zwiększonym łaknieniem. Sugeruje to, że komórkowe szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez nikotynę modulują cytofizjologię komórki znacznie szybciej niż można byłoby tego oczekiwać, gdyby proces ten odbywał się na drodze zmian poziomu ekspresji określonych genów i syntezy nowych białek. Ponadto nikotyna po wniknięciu do organizmu ulega szeregowi złożonych przemian metabolicznych, a czas jej półtrwania w krwiobiegu wynosi tylko od około od 60 do 120 min (Sobkowiak i Lesicki, 2013). Stąd, by badać pierwotne efekty działania nikotyny, zdecydowałem się prowadzić większość doświadczeń tuż po podaniu nikotyny (w przedziale czasowym 0-3600 s). Wybranie tak krótkich czasów nie tylko zwiększa prawdopodobieństwo obserwacji pierwotnych efektów działania nikotyny, ale również minimalizuje ryzyko obserwacji wtórnych efektów działania nikotyny lub jej metabolitów. Takie podejście zwiększa jednak ryzyko pominięcia subtelnych różnic pomiędzy próbami badanymi, a kontrolnymi. Aby ograniczyć ten problem, zdecydowałem się na wykorzystanie bardzo czułych testów, które wymagały ode mnie znaczącego poszerzenia umiejętności laboratoryjnych o nowoczesne lub mało rozpowszechnione metody, takie jak:

- comet assay – metoda umożliwiająca wykrywanie uszkodzeń DNA nawet przy bardzo niskim poziomie naturalnych uszkodzeń;
- rozdziały elektroforetyczne typu CAT umożliwiające obserwację rearanżacji kompleksów białkowych, w postaci zmieniających się wzorów prążków, możliwych do zaobserwowania na żelu w krótkim, nie przekraczającym jednej godziny, czasie działania nikotyny;
- oraz testów behawioralnych, w których nicienie, dzięki czułości własnych chemoreceptorów i zintegrowanej odpowiedzi całego organizmu na informacje od nich płynące, wykazują skomplikowane reakcje w obecności szerokiego zakresu stężeń nikotyny.

Kluczowym procesem biologicznym, niezbędnym do życia wszystkich organizmów żywych jest utrzymanie integralności materiału genetycznego, dlatego założyłem, że selekcja stężeń nikotyny do dalszych badań powinna zakładać również dobór takich stężeń, które nie

wywołują uszkodzeń DNA. Mając na celu obserwację jak najbardziej pierwotnych efektów działania nikotyny, postanowiłem wybrać takie stężenia nikotyny, które nie prowadziły do uszkodzeń DNA, a obserwowane reakcje nie były odpowiedzią komórek na uszkodzenia materiału genetycznego, oraz powinny to być to takie zakresy stężeń, które wyraźnie wywołują zmiany w zachowaniu nicieni. Znany lekarz Paracelsus, uznawany za ojca toksykologii i hormezy, jest autorem słynnego stwierdzenia: „Cóż jest trucizną? Wszystko jest trucizną i nic nie jest trucizną. Tylko dawka czyni, że dana substancja nie jest trucizną”. Dlatego postanowiłem, zwłaszcza w testach behawioralnych, zbadać bardzo szerokie spektrum stężeń nikotyny, nie wykluczając *a priori*, możliwości zaobserwowania zjawiska hormezy polegającego na tym, że substancja szkodliwa dla organizmu w większych dawkach, w małych dawkach działa na niego korzystnie. Implikuje to stwierdzenie, że istnieją też takie stężenia substancji, które wydają się nie działać na organizm. Dlatego postanowiłem odnaleźć progowe zakresy stężeń nikotyny, w obecności których obserwuje się zmiany w poziomie genotoksyczności oraz zmiany w zachowaniu nicieni.

Ocenę genotoksycznych efektów działania nikotyny przeprowadziłem przy użyciu metody comet assay. Aby móc wykorzystać tę metodę do badań poziomu uszkodzeń DNA należało dysponować pojedynczymi komórkami. Problem ten rozwiązałem wyprowadzając hodowlę komórek zarodkowych *C. elegans* (Sobkowiak i Lesicki, 2009 - publikacja nr 1 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Do 2016 r. była to jedyna praca, w której wykorzystano taki układ doświadczalny (Park i wsp., 2016). Ważnym osiągnięciem tych badań było stwierdzenie, że nikotyna w zakresie niskich stężeń (1 i 10 μM) obniża poziom uszkodzeń DNA w stosunku do próby kontrolnej (Sobkowiak i Lesicki, 2009 - publikacja nr 1 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Natomiast wysokie (100 μM) stężenia nikotyny ewidentnie zwiększały poziom uszkodzeń DNA (Sobkowiak i Lesicki, 2009 - publikacja nr 1 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego).

Z danych literaturowych wiadomo, że nikotyna wykazuje silne działanie biologiczne na wiele typów komórek (Sobkowiak i Lesicki, 2011). Interesująca więc okazała się odpowiedź na pytanie czy nieoczekiwane przeciwstawne działanie niskich i wysokich stężeń nikotyny, dotyczy wyłącznie komórek bezkręgowców czy ma bardziej uniwersalny charakter. Hipotezę tę zweryfikowałem przeprowadzając badania z wykorzystaniem ludzkich leukocytów (Sobkowiak i wsp., 2014 - publikacja nr 3 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). W przypadku komórek ludzkich wyznaczyłem stężenie nikotyny (0,1 μM)

w obecności, którego ilość uszkodzeń DNA jest niższa niż warunkach kontrolnych. Stężenie to mieści się w granicach stężeń tego alkaloidu osiąganego we krwi po wypaleniu papierosa (0,06 – 0,31 μM) (Matta i wsp., 2007). Wyższe stężenia nikotyny (>10 μM) wyraźnie przyczyniały się do zwiększenia poziomu uszkodzeń. Co ciekawe, w obecności genoprotekcyjnego (1 μM dla komórek *C. elegans* i 0,1 μM dla leukocytów) i genotoksycznego stężenia nikotyny (100 μM dla komórek *C. elegans* i 10 μM dla leukocytów), zaobserwowałem zmiany w obrazach kometek niezwiązane bezpośrednio z fragmentacją DNA. Obszar głowy kometki, czyli miejsca w którym pierwotnie znajdowało się jądro komórkowe, był zwiększony/rozpulchniony w przypadku stężeń genotoksycznych i bardziej skondensowany w przypadku stężeń genoprotekcyjnych. Co, jak się okazało po przeprowadzeniu kolejnych badań, mogło być skutkiem przebudowy chromatyny pod wpływem nikotyny (Sobkowiak i wsp., 2017a - publikacja nr 4 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Podsumowując można stwierdzić, że schemat dwukierunkowego, przeciwstawnego działania nikotyny na poziom uszkodzeń DNA w komórkach *C. elegans* i leukocytach człowieka był bardzo podobny. Obserwowane przesunięcie zakresu efektywnych stężeń nikotyny o rząd wielkości pomiędzy tymi dwoma gatunkami wynika najprawdopodobniej z mniejszego powinowactwa nikotyny do receptorów nAChR *C. elegans* w porównaniu do receptorów nAChR człowieka. Najistotniejszym osiągnięciem naukowym tych badań było wykazanie, że nikotyna w zakresie stężeń występujących we krwi palacza może przyczyniać się do obniżania poziomu uszkodzeń DNA. Badania te pozwoliły wykryć przeciwstawne działanie tzw. „wysokich” i „niskich” stężeń nikotyny. Prowadząc je wykazałem, że odpowiedź organizmów na działanie nikotyny nie jest liniowo zależna od dawki i możemy mieć tutaj do czynienia z efektem hormezy. Idea ta została uznana i cytowana w literaturze przedmiotu (Taki i wsp., 2013, 2014a i 2014b).

Na poziomie komórki, mimo jej całej złożoności, nigdy nie zaobserwujemy koordynacji, współdziałania i wzajemnych zależności, jakie zachodzą na poziomie organizmalnym. Nikotyna, działając na układ nerwowy poprzez receptory nAChR, silniej wpływa na homeostazę całego organizmu, niż mogłoby to wynikać z jej cytotoksyczności w hodowlach komórkowych. Jedną z najczulszych metod badania oddziaływania substancji na organizm jest badanie zmian zachowania. Celem tych doświadczeń było wyznaczenie stężeń i czasu działania nikotyny, w których nicienie wykazują ewidentne zmiany behawioru. W pierwszej kolejności przeprowadziłem badania aktywności lokomotorycznej nicieni

w obecności różnych stałych (bez wyróżnionych gradientów) stężeń nikotyny. W eksperymentach tych zastosowałem, zaprojektowane i skonstruowanego przeze mnie, unikatowe urządzenie do śledzenia ruchów nicieni (WormTracker). Doświadczenia polegały na automatycznej, długoczasowej obserwacji ruchu *C. elegans* w obecności bardzo szerokiego zakresu stężeń nikotyny (Sobkowiak i wsp., 2011 - publikacja nr 2 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Otrzymane wyniki wskazują, że nicienie reagują na obecność nikotyny w bardzo szerokim zakresie jej stężeń w środowisku (tj. od 1 μM do 30 000 μM , (Sobkowiak i wsp., 2011 - publikacja nr 2 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Najistotniejszym osiągnięciem tych badań było wykazanie, że nikotyna w ściśle określonych przedziałach stężeń (większych lub równych 0,01 i mniejszych od 1 mM nikotyny) działa stymulująco na nicienie, zwiększając ich aktywność lokomotoryczną, natomiast w innych zakresach (około 0,001 mM) działa w sposób hamujący. Zmniejszenie aktywności lokomotorycznej zaobserwowałem w obecności stężeń nikotyny większych lub równych 10 mM, było to najprawdopodobniej spowodowane postępującym paraliżem nicieni. Istnieją też takie zakresy stężeń nikotyny (około 1 mM nikotyny), których efekty działania nie różnią się w sposób statystycznie istotny od warunków kontrolnych. Podsumowując w badaniach behawioralnych także zaobserwowano dualizm w działaniu nikotyny. Istotnym osiągnięciem przedstawionym w pracy Sobkowiak i wsp. 2011 (publikacja nr 2 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego) było wykazanie, że nicienie po 30 min od momentu przeniesienia na kolejną szalkę Petriego obniżają prędkość ruchu o ok. 27% na wskutek stymulacji mechanicznej. Do tej pory w bardzo wielu publikacjach behawioralnych efekty te, najprawdopodobniej błędnie, przypisywano skutkom działania badanych substancji.

Jak już wcześniej wspomniano zaspokojenie głodu nikotynowego u palaczy już po kilkudziesięciu sekundach od momentu rozpoczęcia wdychania dymu papierosowego pozwala przypuszczać, że obserwowane szybkie skutki działania nie są związane ze zmianą ekspresji genów i syntezą nowych polipeptydów, lecz prawdopodobnie ich podłoże leży w rearanzacji kompleksów białkowych wewnątrz komórek, wywołanych związaniem się nikotyny z receptorami nAChR. Hipotetycznie założyłem, że związanie nikotyny z receptorem nikotynowym wywołuje zmiany w składzie kompleksów białkowych w komórkach. Dlatego chcąc przyjrzeć się dokładniej podstawom molekularnym działania nikotyny w zależności od jej stężenia, przeprowadziłem analizę procesu rearanzacji kompleksów białkowych w komórkach *C. elegans* w warunkach kontrolnych oraz

w obecności 0,01 i 1 mM nikotyny. Stężenia te wytypowano analizując wyniki doświadczeń behawioralnych. Pomimo tego, że nicienie znajdowały się w obecności nikotyny, której stężenia różniły się stukrotnie, ich aktywność lokomotoryczna była zbliżona (Sobkowiak i wsp., 2011 ryc. 2 i 3 - publikacja nr 2 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Postawiłem hipotezę, że zadziałały tu mechanizmy homeostyczne, które w obecności niskich stężeń (0.01 mM) nikotyny zadziałały w przeciwnym kierunku niż w obecności wyższych stężeń (1 mM), jednak w każdym przypadku prowadziły do utrzymania parametrów lokomotorycznych w zakresie fizjologicznym, porównywalnym z warunkami kontrolnymi. Cykliczność aktywności lokomotorycznej nicieni w obecności 1 mM nikotyny sugerowała, że być może najtrafniej będzie badać proces rearanżacji kompleksów białkowych w komórkach *C. elegans* po czasie nie dłuższym niż 60 min licząc od momentu podania alkaloidu (Sobkowiak i wsp., 2011, ryc. 3d - publikacja nr 2 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Takie podejście mogło dodatkowo zwiększyć prawdopodobieństwo uchwycenia głównie pierwotnych efektów działania nikotyny.

W pracy opublikowanej w 2017 r. w *Drug and Chemical Toxicology* wykazałem, że nikotyna wpływa na procesy na poziomie molekularnym poprzez modyfikację składu kompleksów białkowych (Sobkowiak i wsp., 2017a - publikacja nr 4 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Zidentyfikowano 91 białek, które stanowią kompleks rdzeniowy występujący we wszystkich wariantach doświadczalnych, do których przyłącza się bardzo wiele białek. W obecności nikotyny przyłączają się do niego białka zaangażowane w proces lipolizy i sygnalizacji insulinowej. Zaobserwowano także obecność katalazy - białka systemu antyoksydacyjnego, co mogłoby tłumaczyć zauważone we wcześniejszych badaniach genoprotekcyjne działanie nikotyny (Sobkowiak i Lesicki, 2009, Sobkowiak i wsp., 2014 - publikacje nr 1 i 3 wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego). W obecności niskich stężeń nikotyny zidentyfikowałem całą gamę białek, którym przypisuje się udział w rozwoju choroby Alzheimera, cukrzycy i otyłości (Sobkowiak i wsp., 2017a - publikacja nr 4 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Wykazałem także, że pod wpływem nikotyny, dochodzi do przebudowy chromatyny. Obserwowane zmiany epigenetyczne związane były z modyfikacją histonu H3. Przeprowadzone badania proteomiczne wykazały, że działanie nikotyny na komórki jest bardzo złożone i wiąże się, ze zmianą przebiegu wielu procesów komórkowych.

Podsumowując ten fragment badań, wg mojej najlepszej wiedzy, jako pierwszy na świecie wykorzystałem elektroforezę typu CAT, w połączeniu z technikami identyfikacji białek przy użyciu metod spektrometrii masowej, do poszukiwania molekularnych podstaw działania nikotyny we wnętrzu komórki. Stosując wytypowane, na podstawie badań behawioralnych, stężenia i czas działania nikotyny uzyskałem, co jest moim zdaniem warto podkreślenia, widoczne już na poziomie analizy wybarwienia kompleksów białkowych, różnice pomiędzy próbą kontrolną, a próbami badanymi. Analiza interakcji białkowych wykazała ogromną ilość oddziaływań pomiędzy zidentyfikowanymi polipeptydami. Zaobserwowanie tak dużej liczby białek, wchodzących ze sobą w wielokrotne i różnorodne interakcje, szczególnie w aspekcie oddziaływania nikotyny na rearanżację kompleksów białkowych, jest ewenementem w literaturze światowej.

Badania nad *C. elegans* jako organizmem modelowym wpisują się w znacznie szerszą, niż zarysowana w tytule pracy, problematykę, tj. w problematykę uzależnienia organizmów od nikotyny, związaną ze zmianami zachowania. Dlatego w kolejnych doświadczeniach postanowiłem zbadać behavior nicieni zaadaptowanych do niskich (0,01 mM), wysokich stężeń nikotyny (1 mM) oraz mających po raz pierwszy kontakt z nikotyną w zależności od obecności/braku pożywienia podczas 1h eksperymentu. Chciałem sprawdzić hipotezę mówiącą, że ilość nikotyny w organizmie ma wpływ na poziom łaknienia i rozmiary ciała. Pomysł ten pojawił się po odkryciu, że nikotyna jest zaangażowana w sygnalizację insulinową i regulację metabolizmu energetycznego związanego z rozwojem otyłości i skojarzeniu z tym, że niektórzy palacze zażywają nikotynę w celu kontroli masy ciała (Nichter i wsp., 2004, Sobkowiak i wsp., 2017a). W tym celu, we współpracy z inżynierami z Politechniki Poznańskiej, skonstruowałem kolejne urządzenie (WormSpy) umożliwiające analizę zachowania nicieni w gradiencie badanej substancji (Kowalski i wsp., 2014). W pracy (Sobkowiak i wsp., 2017b - publikacja nr 5 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego) przeanalizowałem zmiany zachowań nicieni *C. elegans* w gradiencie stężenia nikotyny wywoływane obecnością bądź brakiem pożywienia. Porównałem zachowanie nicieni wcześniej zaadaptowanych do tego alkaloidu z tymi, które z nikotyną kontaktowały się po raz pierwszy. Mając na uwadze uzależniające właściwości nikotyny przeprowadziłem szereg badań behawioralnych, w których nicienie mogły wybrać w trakcie eksperymentu stężenie nikotyny, w którym chcą przebywać (Sobkowiak i wsp., 2017b - publikacja nr 5 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Badania behawioralne nicieni zaadaptowanych do niskich

(0,01 mM) stężeń nikotyny wykazały znaczące różnice w zachowaniu w porównaniu do nicieni zaadaptowanych do wysokiego stężenia nikotyny (1 mM) (Sobkowiak i wsp., 2017b - publikacja nr 5 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Nicienie zaadaptowane do niskiego stężenia nikotyny (0,01 mM) po umieszczeniu ich w gradiencie stężenia tego alkaloidu w obecności jedzenia wybierały takie samo stężenie nikotyny jak nicienie zaadaptowane do wysokiego jej stężenia. Jednak w przypadku braku pożywienia nicienie zaadaptowane do niskiego stężenia nikotyny, umieszczone w gradiencie stężenia tego alkaloidu, wybierały takie stężenia nikotyny jak nicienie kontrolne, które nigdy nie miały kontaktu z alkaloidem. Nicienie zaadaptowane do wysokich stężeń nikotyny w obecności pożywienia wybierały niskie stężenia nikotyny, natomiast w przypadku braku pożywienia na szalce wybierały stężenia około połowę niższe niż nicienie kontrolne i te zaadaptowane do niskiego stężenia nikotyny. Ponadto nicienie hodowane w obecności wysokiego stężenia nikotyny miały mniejsze rozmiary ciała w porównaniu do nicieni kontrolnych i wykazywały pewne cechy anoreksji (Sobkowiak i wsp., 2017b - publikacja nr 5 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Wyniki te są zbieżne z danymi otrzymanymi z badań proteomicznych, gdzie odnotowaliśmy wiele białek biorących udział w procesach katabolicznych (np. lipolizie i proteolizie) (Sobkowiak i wsp., 2017a - publikacja nr 4 wchodząca w zakres osiągnięcia naukowego). Otrzymane wyniki wskazują że *C. elegans* może być przydatnym modelem badań nad wpływem nikotyny na ilość przyjmowanych pokarmów i związaną z tym zmianą masy ciała prowadzącą często u ludzi do rozwoju anoreksji bądź otyłości.

Przedstawione w powyższym przeglądzie publikacji wyniki eksperymentów mogą stanowić bazę do jeszcze bardziej zaawansowanych badań na poziomie molekularnym i komórkowym, które być może ułatwią opracowanie nowych metod terapeutycznych pomagających uwolnić się od uzależnienia od nikotyny oraz zrozumieć mechanizm rozwoju patologicznej otyłości, cukrzycy oraz choroby Alzheimera, które jak się wydaje mają ze sobą wiele wspólnego.

Podsumowanie:

W podsumowaniu stwierdzam, że w moim odczuciu najistotniejszym osiągnięciem habilitacyjnym było wykazanie, że nikotyna może wykazywać działanie antynomiczne, co zaobserwowałem na poziomie:

- **behawioralnym – przeciwstawne efekty działania w aspekcie aktywności lokomotorycznej nicieni;**
- **subkomórkowym – przeciwstawne efekty tj. genoprotekcyjność i genotoksyczność;**
- **molekularnym – zmiany w składzie jakościowym i ilościowym kompleksów białkowych, mogące działać przeciwstawnie, zależne od stężenia nikotyny, utrzymując homeostazę na poziomie organizmalnym/behawioralnym.**

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Oprócz pięciu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe opisane w punkcie 4C autoreferatu, jestem współautorem dodatkowych 9 publikacji.

Wśród mojego dorobku naukowego znajduje się praca opisująca możliwości i techniczne zasady działania skonstruowanego, przy współpracy z inżynierami z Politechniki Poznańskiej, urządzenia umożliwiającego śledzenie zachowania nicieni (Kowalski i wsp., 2014). Wykorzystując to urządzenie, w ramach współpracy międzynarodowej z dr Nikolettą Ntalli (Department of Pesticides Control & Phytopharmacy, Benaki Phytopathological Institute, Laboratory of Biological Control of Pesticides, Kifissia, Athens, Greece) przeanalizowaliśmy zachowanie nicieni *Caenorhabditis elegans* i *Meloidogyne incognita* pod wpływem nematocydów pochodzenia roślinnego (Sobkowiak i wsp., 2018). Wykazaliśmy, że niektóre z tych substancji są atraktantami, co można byłoby wykorzystać do zwiększenia efektywności działania komercyjnych syntetycznych nematocydów stosowanych powszechnie jako środki nicieniobójcze w rolnictwie (Sobkowiak i wsp., 2018).

Dwie publikacje przeglądowe prezentują aktualny stan wiedzy na temat oddziaływania i metabolicznych losów nikotyny w organizmie człowieka. Jedna z nich analizuje wewnątrzkomórkowych szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez nikotynę (Sobkowiak i Lesicki, 2011). Kolejna praca przeglądowa dotyczyła wchłaniania, przemian metabolicznych i wydalania nikotyny u człowieka (Sobkowiak i Lesicki, 2013). Cieszą się one nadspodziewanie dużą liczbą czytelników odnotowaną przez naukowy serwis społecznościowy ResearchGate (odpowiednio 223 i 740 na dzień 15.10.2018 r.).

Moje zainteresowania naukowe nie ograniczają się jedynie do wpływu substancji toksycznych na zwierzęta, ale we wcześniejszym okresie mojej pracy badawczej koncentrowały się na analizie molekularnych aspektów oddziaływania jonów metali ciężkich na rośliny. Poniżej przedstawiłem krótkie omówienia prac odnoszących się do tej tematyki. Jest to zbiór 5 oryginalnych publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports stanowiących spójną całość, opisujących oddziaływanie jonów metali ciężkich, głównie kadmu na komórki roślinne, ze szczególnym uwzględnieniem jego oddziaływania na podziały komórkowe w kulturze zawieszinowej soi.

Głównym układem modelowym w tych badaniach była kultura zawieszinowa soi *Glycine max* L. var. Naviko, składająca się z drobnych agregatów i pojedynczych komórek. Ustalone i szybkie tempo wzrostu predysponowało ją do badań nad cyklem komórkowym (Sobkowiak i Deckert, 2003). Szczególnie skupiono się na roli jonów kadmu (Cd^{2+}) w toksycznym działaniu na podziały komórkowe. W zależności od zastosowanego stężenia kadmu kultura zawieszinowa soi wykazywała zróżnicowaną odpowiedź na obecność tego metalu w pożywce. W obecności 1, 3, 4 μM obserwowano stymulację wzrostu hodowli w porównaniu do warunków kontrolnych (Sobkowiak i Deckert, 2003). W stężeniach wyższych niż 6 μM jony kadmu powodowały hamowanie wzrostu zawiesziny. Najprawdopodobniej przyczyną tego zjawiska było ograniczenie aktywności mitotycznej komórek tworzących zawieszinę oraz zmiany właściwości mechanicznych ścian komórkowych (lignifikacja). Z przeprowadzonych doświadczeń wynikało, że zakres stosowanych stężeń kadmu (1 – 11 μM) nie zmieniał żywotności komórek soi (Sobkowiak i Deckert, 2003).

W stężeniach hamujących wzrost, obserwowano brunatnienie zawiesziny już po 60 min od dodania jonów kadmu. Zmiana barwy hodowli prawdopodobnie spowodowana była syntezą związków fenolowych. Brunatnienie hodowli jest przejawem reakcji komórek zawiesziny na subletalne warunki stresu kadmowego. Obserwacje te zainicjowały nowy kierunek badań w Zakładzie Ekofizjologii Roślin nad protekcyjnym działaniem związków polifenolowych na komórki roślinne w obecności jonów metali ciężkich. Badania te kontynuowane są aż po dzień dzisiejszy. Zaobserwowano znacznie większy stopień lignifikacji ścian komórkowych w obecności jonów kadmu w porównaniu do warunków kontrolnych. Zwiększało to wytrzymałość mechaniczną ściany komórkowej oraz zmniejszało jej przepuszczalność dla wody i jonów metali, tworząc dodatkową barierę ochronną.

W badanym zakresie stężeń kadmu akumulacja tego metalu nasilała się wraz ze wzrostem jego ilości w pożywce (Sobkowiak i Deckert, 2003). Może to świadczyć o istnieniu dodatniego, sprzężenia zwrotnego pomiędzy wzrostem stężenia kadmu, a indukcją mechanizmów powodujących akumulację tego metalu w komórkach.

Zaobserwowano istotne zmiany w poziomie syntezy i akumulacji białek, zależne od stężenia i czasu ekspozycji komórek na kadm (Sobkowiak i Deckert, 2006). W stężeniach kadmu hamujących wzrost, intensywność syntezy białek jest bardzo niska. Natomiast w obecności 3 μM Cd^{2+} , w którym obserwuje się stymulację wzrostu zawiesziny, przez

pierwsze 2 dni, odnotowano zwiększoną syntezę białek, w porównaniu do warunków kontrolnych. Zaobserwowano wyraźną indukcję syntezy i akumulacji trzech polipeptydów o masach cząsteczkowych 16 kDa, 26 kDa, 38 kDa (Sobkowiak i Deckert, 2006). Pierwszy z nich należy do grupy białek PR-10. Prawdopodobnie indukowane kadmem białka pełnią funkcje ochronne, polegające na wiązaniu metalu, utrzymaniu natywnej struktury innych białek lub też mogą uczestniczyć w szlaku detoksykacji kadmu.

Obecność jonów kadmu przyspiesza inicjację fazy S, a następnie powoduje jej zahamowanie (Sobkowiak i Deckert, 2004). Jest to prawdopodobnie spowodowane powstawaniem pod wpływem kadmu uszkodzeń DNA, co jest przyczyną zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym na pograniczu faz G1 i S.

Kadm modyfikuje nie tylko aktywność enzymów antyoksydacyjnych, ale zmienia skład oraz aktywność poszczególnych ich izoform (Sobkowiak i wsp., 2004). Najbardziej widoczne zmiany obserwowano porównując profile izoenzymatyczne w stężeniach hamujących i niehamujących wzrost zawiesiny komórkowej soi. Jedynie aktywność i spektrum izoenzymatyczne dla peroksydazy askorbinianowej było stałe w badanych stężeniach kadmu. W przypadku dysmutazy ponadtlenkowej aktywność sumaryczna wszystkich izoenzymów w poszczególnych stężeniach kadmu jest podobna, a bardzo dużym zmianom ulegał profil izoenzymatyczny. Można przypuszczać, że zmiany układu izoform w poszczególnych stężeniach są rodzajem przystosowania komórek do zmieniających się warunków, mających na celu utrzymanie całkowitej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej na stałym poziomie (Sobkowiak i wsp., 2004). W stężeniach hamujących wzrost aktywność katalazy była mniejsza niż warunkach kontrolnych, a obserwowany izoenzym wykazywał zwiększoną ruchliwość elektroforetyczną. Katalaza w komórkach soi uczestniczy w detoksykacji nadtlenu wodoru, tylko w pewnym, ograniczonym zakresie koncentracji tego metalu. Można przypuszczać, że po przekroczeniu pewnej granicznej wartości stężeń kadmu, aktywność katalazy ulega inhibicji. Funkcja tego enzymu jest rekompensowana przez niewrażliwą na kadm peroksydazę ogólną. Aktywność peroksydazy ogólnej była wysoka w stężeniach hamujących wzrost (Sobkowiak i wsp., 2004). Obserwowano także pojawienie się nowych izoform tego enzymu. Wzrost aktywności peroksydazy ogólnej może chronić komórki przed nadprodukcją nadtlenu wodoru nawet w obecności toksycznych stężeń Cd^{2+} . Podwyższona aktywność peroksydaz ogólnych prowadzi do lignifikacji ścian komórkowych. Zmiany w aktywności enzymów SOD, CAT, POX mogą świadczyć o istnieniu stresu

oksydacyjnego, który może w sposób pośredni lub bezpośredni wpływać na mechanizmy regulujące cykl podziałów komórkowych.

W stężeniach hamujących wzrost kultury zawieszinowej soi obserwowano obniżony poziom mRNA cyklin B1 (Sobkowiak i Deckert, 2003). Obserwowany w komórkach soi obniżony poziom mRNA dla cyklin B1 w wyniku oddziaływania jonów kadmu, może powodować zatrzymanie cyklu komórkowego na pograniczu faz G2/M. Niski poziom cyklin B1 może być spowodowany bezpośrednim wpływem jonów kadmu na transkrypcję lub też zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie S. Obniżeniu poziomu cyklin, białek pełniących funkcje regulatorowe, towarzyszy zatrzymanie podziałów komórkowych, co może stanowić przyczynę obserwowanego zahamowania wzrostu zawiesiny komórkowej soi (Sobkowiak i wsp. 2003). Jony kadmu, w badanym zakresie stężeń, nie wpływają na poziom mRNA kinaz CDK-A. Poziom mRNA kinaz CDK-A był także niezależny od fazy cyklu i zastosowanej metody synchronizacji (Sobkowiak i Deckert, 2004). Prawdopodobnie ekspresja tego genu jest hamowana przez kadm na poziomie translacji lub aktywności enzymatycznej.

W obecności jonów kadmu i ołowiu wzrasta liczba uszkodzeń DNA (Rucinska i wsp., 2004, Sobkowiak i Deckert, 2004). Może to być bezpośrednią przyczyną uniemożliwiającą prawidłowy przebieg fazy S. Powstałe uszkodzenia prowadzą do uruchomienia mechanizmów kontroli podziałów komórkowych, działających na pograniczu faz G1/S, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania aktywności podziałowej komórek.

Przeprowadzone przeze mnie badania nad oddziaływaniem metali ciężkich na komórki roślinne znacząco poszerzyło stan wiedzy w tym obszarze, co również znalazło odzwierciedlenie w wysokiej liczbie cytowań artykułów (181), w których zaprezentowano otrzymane wyniki. Dla mnie osobiście wiedza zdobyta podczas badań na temat reakcji obronnych roślin na działanie czynników środowiskowych okazała się szczególnie cenna w interpretacji wyników dotyczących wpływu toksyn chemicznych na behavior nicieni i ułatwiła ich szerszą dyskusję z uwzględnieniem potencjalnych oddziaływań roślina – pasożyt.

Podsumowując, badania nad cyklem komórkowym, wpływem metali ciężkich na rośliny, oddziaływaniem nikotyny na modele zwierzęce, współpraca z innymi ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą (załącznik nr 4, pkt III Q 2) oraz udział w projektach badawczych (załącznik nr 4, pkt. II I) i szkoleniach (załącznik nr 4, pkt III Q 3) umożliwiły mi poznanie szerokiego wachlarza metod eksperymentalnych oraz podejść metodycznych obejmujących kultury *in vitro* komórek roślinnych i zwierzęcych, elektroforezę białek natywnych i zdenaturowanych oraz elektroforezę DNA, preparatykę materiału biologicznego do obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym, konfokalnym, metody immunologiczne oraz wspomniane wcześniej metody badań behawioralnych. Moja aktywność naukowa zaowocowała 14 publikacjami naukowymi (załącznik nr 4, pkt. IB, IIA, IID) i 28 doniesieniami na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym (załącznik nr 4, pkt. IIK i IIIB). Za osiągnięcia w pracy naukowej zostałam wyróżniona nagrodą zespołową III stopnia przyznaną przez Rektora Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Dane bibliometryczne

Sumaryczny *impact factor* zgodny z rokiem opublikowania dla wszystkich prac (wliczając publikacje stanowiące osiągnięcie habilitacyjne) wynosi 15,86, natomiast suma punktów MNiSW wg listy z 9 grudnia 2016 roku wynosi 288. Łączna liczba cytowań wg bazy Web of Science na dzień 15.10.2018 wynosi 224 (209 bez autocytowań), natomiast indeks Hirscha wg bazy Web of Science wynosi 7.

Literatura

- Feng Z., Li W., Ward A., Piggott B. J., Larkspur E. R., Sternberg P. W. i Xu X. Z. (2006). "A *C. elegans* model of nicotine-dependent behavior: regulation by TRP-family channels." *Cell* 127(3): 621-633.
- Horiuchi Y., Kimura R., Kato N., Fujii T., Seki M., Endo T., Kato T. i Kawashima K. (2003). "Evolutional study on acetylcholine expression." *Life Sci* 72(15): 1745-1756.
- Jones A. K., Davis P., Hodgkin J. i Sattelle D. B. (2007). "The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode *Caenorhabditis elegans*: an update on nomenclature." *Invert Neurosci* 7(2): 129-131.
- Kawashima K., Misawa H., Moriwaki Y., Fujii Y. X., Fujii T., Horiuchi Y., Yamada T., Imanaka T. i Kamekura M. (2007). "Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems." *Life Sci* 80(24-25): 2206-2209.
- Kowalski M., Kaczmarek P., Kabaciński R., Matuszczak M., Tranbowicz K. i Sobkowiak R. (2014). "A simultaneous localization and tracking method for a worm tracking system." *Intern J Appl Math Comp Sci* 24(3): 599-609.
- Le Novere N. i Changeux J. P. (1995). "Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells." *J Mol Evol* 40(2): 155-172.
- Matta S. G., Balfour D. J., Benowitz N. L., Boyd R. T., Buccafusco J. J., Caggiula A. R., Craig C. R., Collins A. C., Damaj M. I., Donny E. C., Gardiner P. S., Grady S. R., Heberlein U., Leonard S. S., Levin E. D., Lukas R. J., Markou A., Marks M. J., McCallum S. E., Parameswaran N., Perkins K. A., Picciotto M. R., Quik M., Rose J. E., Rothenfluh A., Schafer W. R., Stolerman I. P., Tyndale R. F., Wehner J. M. i Zirger J. M. (2007). "Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research." *Psychopharmacology (Berl)* 190(3): 269-319.
- Nichter M., Vuckovic N., Tesler L., Adrian S. i Ritenbaugh C. (2004). "Smoking as a weight-control strategy among adolescent girls and young women: a reconsideration." *Med Anthropol Q* 18(3): 305-324.
- Park S., Choi S. i Ahn B. (2016). "DNA strand breaks in mitotic germ cells of *Caenorhabditis elegans* evaluated by comet assay." *Mol Cells* 39(3): 204-210.
- Rucinska R., Sobkowiak R. i Gwozdz E. A. (2004). "Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay." *Cell Mol Biol Lett* 9(3): 519-528.
- Schafer W. R. (2004). "Addiction research in a simple animal model: the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Neuropharmacology* 47: 123-131.
- Sobkowiak R., Bojarska N., Krzyzaniak E., Wagiel K. i Ntalli N. (2018). "Chemoreception of botanical nematocides by *Meloidogyne incognita* and *Caenorhabditis elegans*." *J Environ Sci Health B*: 1-10.
- Sobkowiak R. i Deckert J. (2003). "Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean." *Plant Physiol Biochem* 41(8): 767-772.
- Sobkowiak R. i Deckert J. (2004). "The effect of cadmium on cell cycle control in suspension culture cells of soybean." *Acta Physiol Plant* 26(3): 335-344.

- Sobkowiak R. i Deckert J. (2006). "Proteins induced by cadmium in soybean cells." *J Plant Physiol* 163(11): 1203-1206.
- Sobkowiak R., Kaczmarek P., Kowalski M., Kabacinski R. i Lesicki A. (2017b). "Behavior of *Caenorhabditis elegans* in a nicotine gradient modulated by food." *Drug Chem Toxicol*: 1-12.
- Sobkowiak R., Kowalski M. i Lesicki A. (2011). "Concentration- and time-dependent behavioral changes in *Caenorhabditis elegans* after exposure to nicotine." *Pharmacol Biochem Behav* 99: 365-370.
- Sobkowiak R. i Lesicki A. (2009). "Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay." *Drug Chem Toxicol* 32(3): 252-257.
- Sobkowiak R. i Lesicki A. (2011). "Komórkowe szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez nikotynę." *Post Biol Kom* 38(4): 581-596.
- Sobkowiak R. i Lesicki A. (2013). "Wchłanianie, przemiany metaboliczne i wydalanie nikotyny u człowieka." *Post Bioch* 59(1): 33-44.
- Sobkowiak R., Musidlak J. i Lesicki A. (2014). "In vitro genoprotective and genotoxic effect of nicotine on human leukocytes evaluated by the comet assay." *Drug Chem Toxicol* 37(3): 322-328.
- Sobkowiak R., Rymer K., Rucinska R. i Deckert J. (2004). "Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells." *Acta Biochim Pol* 51(1): 219-222.
- Sobkowiak R., Zielezinski A., Karlowski W. M. i Lesicki A. (2017a). "Nicotine affects protein complex rearrangement in *Caenorhabditis elegans* cells." *Drug Chem Toxicol* 40(4): 470-483.
- Taki F. A., Pan X., Lee M. H. i Zhang B. (2014a). "Nicotine exposure and transgenerational impact: a prospective study on small regulatory microRNAs." *Sci Rep* 4: 7513.
- Taki F. A., Pan X. i Zhang B. (2013). "Nicotine exposure caused significant transgenerational heritable behavioral changes in *Caenorhabditis elegans*." *EXCLI J* 12: 793-806.
- Taki F. A., Pan X. i Zhang B. (2014b). "Chronic nicotine exposure systemically alters microRNA expression profiles during post-embryonic stages in *Caenorhabditis elegans*." *J Cell Physiol* 229(1): 79-89.
- WHO (2017). WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies. Geneva: World Health Organization.

Robert Sobkowiak