

STRESZCZENIE

UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ

2,2-bis (p-hydroksyfenylo)propan – bisfenol A (BPA) oraz alkilofenole: 4-*tert*-oktylofenol (4-*t*-OP) i 4-nonylofenol (4-NP) to pochodne fenolu, które należą do grupy związków endokrynnie aktywnych. Działanie tych ksenoestrogenów opiera się m.in. o zbliżoną budowę do endogennych hormonów, dzięki czemu łączą się one z receptorami, modulując, wywołując lub blokując odpowiedzi układu hormonalnego (Sonnenschein i Soto, 1998). Pochodne fenolu są niebezpieczne dla zachowania zdrowia i przeżycia organizmów nawet w niewielkich środowiskowo istotnych stężeniach. Ze względu na trudności wynikające z prowadzenia badań na żywych ptakach, najwięcej doniesień o negatywnym wpływie pochodnych fenolu na zwierzęta dotyczy ryb. Związki te wykazują działanie genotoksyczne, muta- oraz teratogenne, powodując m.in.: stres oksydacyjny, modulację ekspresji genów, uszkodzenia DNA, zaburzenia metaboliczne, zmiany zwyrodnieniowe narządów wewnętrznych, liczne wady rozwojowe (np. deformacje kręgosłupa, czaszki, obrzęk serca), zmiany w zachowaniu godowym, zaburzenia płodności, rozrodczości, przeżywalności zarodków i ich prawidłowego rozwoju (Chaube i in., 2012; Traversi i in., 2014; Won i in., 2014; Sharma i Chadha, 2016; Faheem i Lone, 2017; Li i in., 2017; Lee i in., 2018; Shirdel i in., 2020; Tran i in., 2020). Szczególnie niepokojące informacje dotyczą transgeneracyjnego wpływu pochodnych fenolu na sukces reprodukcyjny i rozwój zarodkowo-larwalny ryb obserwowany u potomstwa dwa, a nawet trzy pokolenia później (Gray i in., 1999; Bhandari i in., 2015). Pochodne fenolu stanowią więc zagrożenie nie tylko dla pojedynczego osobnika, ale również mogą mieć wpływ na liczebność i kondycję całych populacji. Choć niewiele wiadomo o wpływie pochodnych fenolu na ptaki, w nielicznych badaniach wskazano na możliwość podobnych zaburzeń do tych obserwowanych u ryb (Oshima i in., 2012; Cheng i in., 2017; Mentor i in., 2020).

Bisfenol A (BPA) to monomer służący głównie do syntezy żywic poliwęglanowych i epoksydowych – tworzyw syntetycznych o ważnym znaczeniu gospodarczym (US EPA, 2010). Z tego względu BPA jest obecnie jednym z najpopularniejszych związków na świecie, należących do chemikaliów o dużej wielkości produkcji (HPV, ang. high production volume chemicals) (OECD, 2004). Z kolei alkilofenole produkowane są w żywicach i oksymach fenolowych. Pochodne fenolu jako wszechobecny składnik tworzyw sztucznych znajdują się w opakowaniach i butelkach, puszkach, płytach CD, oponach, paragonach, sprzęcie sportowym, medycznym, urządzeniach elektronicznych, zabawkach, soczewkach czy

materiałach dentystycznych (US EPA, 2010; Flint i in., 2012; DEPA, 2013; Rochester, 2013). BPA stosowany jest również w środkach zmniejszających palność (US EPA, 2010). Istotnym zastosowaniem alkilofenoli i ich etoksylatów są ponadto niejonowe środki powierzchniowo czynne obecne w różnego rodzaju detergentach, stabilizatorach, emulgatorach oraz środkach pianotwórczych (Ying i in., 2002; Acir i Guenther, 2018). Tak szerokie zastosowanie pochodnych fenolu pozostaje nie bez znaczenia dla ich obecności w środowisku. Związki te emitowane są głównie do mórz i oceanów wraz z wodami z przemysłowych i komunalnych oczyszczalni ścieków (Corrales i in., 2015; Acir i Guenther, 2018). BPA i alkilofenole obecne są ponadto w atmosferze nad terenami przemysłowymi i rolniczymi, jak również oddalonymi czystymi rejonami mórz (Van Ry i in., 2000; Xie i in., 2006; Graziani i in., 2019; Vasiljevic i Harner, 2021). W środowisku morskim, związki te adsorbują się na cząstkach stałych w osadach (Koniecko i in., 2014; Staniszevska i in., 2016b) i ulegają biokumulacji w organizmach ze wszystkich poziomów troficznych (Diehl i in., 2012; Staniszevska i in., 2014; Korsman i in., 2015; Nehring i in., 2018). Dodatkowo, w morzach bezpośrednim zagrożeniem dla zwierząt są również tworzywa sztuczne, które ulegając degradacji rozpadają się na mniejsze odpadki. Te mikrocząstki mogą być połknięte przez ptaki, prowadząc do kumulacji pochodnych fenolu w ich organizmach (Tanaka i in., 2015; Wang i in., 2021).

W związku z doniesieniami o negatywnym wpływie pochodnych fenolu na organizmy, w 2006 r. BPA i 4-NP zostały włączone na listę substancji niedozwolonych do stosowania w kosmetykach (*Dz. U. z 2006 r. Nr 85, poz. 593*). Zakazano również wprowadzania do obrotu i stosowania niektórych produktów zawierających 4-NP oraz zawierających ten związek preparatów w stężeniach równych lub większych niż 0,1 % masowego (*Dz. U. z 2006 r. Nr 127, poz. 887 z późn. zm.*). Z kolei na terenie Unii Europejskiej zakazano stosowania BPA w butelkach do karmienia dzieci do lat 3 (EU, 2011). Ponadto, 4-*t*-OP i 4-NP włączone zostały na listę priorytetowych substancji lub grup substancji niebezpiecznych w dziedzinie polityki wodnej Wspólnoty (EC, 2001) oraz na listę priorytetowych substancji zanieczyszczających środowisko wodne (*Dz. U. z 2019 r. poz. 528*). Powyższe regulacje zminimalizowały narażenie ludzi na niektóre pochodne fenolu, jednakże nie wyeliminowały ich dopływu do środowiska morskiego. Morze Bałtyckie, ze względu na swoje położenie oraz charakter, znajduje się pod silną antropopresją, przez co narażone jest na zwiększone zanieczyszczenie chemiczne oraz koncentrację morskich odpadów. Akwen ten jest niewielki i płytki, a jego obszar jest prawie czterokrotnie mniejszy od obszaru zlewiska, który zamieszkuje ponad 85 mln ludzi. Wymiana wody z Morzem

Północnym przez wąskie i płytkie cieśniny wynosi ok. 30 lat (HELCOM, 2018). Jednym z priorytetowych działań ujętych w najnowszym strategicznym programie środków i działań

HELCOM na rzecz osiągnięcia dobrego stanu środowiska morskiego, jest wprowadzenie do 2027 r. środków umożliwiających ograniczenie stosowania i zapobieganie uwalnianiu do środowiska Bałtyku, pochodnych fenolu o działaniu endokrynnie aktywnym (BSAP, 2021).

Morze Bałtyckie jest również ważnym miejscem odpoczynku, żerowania, pierzenia, lęgów i zimowania dla około 80 gatunków ptaków. Wg najnowszych danych, populacja ptaków wodnych w sezonie lęgowym i w okresie zimowania w rejonie Bałtyku w latach 2011 – 2016 zmalała odpowiednio o około 30 % i 20 % (HELCOM, 2018). Jednakże wpływ wzrostu uprzemysłowienia na ptaki morskie widoczny jest na całym świecie. Wg szacunków doprowadził on w ostatnich 60 latach do 70 % spadku światowej populacji ptaków morskich (Palczyński i in., 2015). Ptaki od dawna są dobrze znanymi bioindykatorami zanieczyszczenia środowiska, ponieważ są szczególnie wrażliwe na zmiany środowiskowe. Niemniej dotychczas skupiano się głównie na badaniach metali śladowych i trwałych zanieczyszczeń organicznych, podczas gdy niewiele uwagi poświęcono pochodnym fenolu. Tym samym, praca ta stanowi pierwszą, która szeroko dokumentuje obecność BPA, 4-*t*-OP i 4-NP w miejscach, w których zachodzi ich wnikanie, biokumulacja oraz potencjalna toksyczność, a także wybrane drogi, którymi związki te mogą być usuwane. Aby jak najlepiej odzwierciedlić los BPA i alkilofenoli w organizmach ptaków (alki *Alca torda*, łodówki *Clangula hyemalis* i nurogęsi *Mergus merganser*) postanowiono zbadać na obecność tych związków krew, tkanki (jelita, płuca, mięśnie, nerki, wątroby, mózgi, tłuszcz podskórny, gonady), a także wytwory naskórka (pazury i lotki). Analizie poddano wpływ potencjalnych czynników na wielkość stężeń pochodnych fenolu w poszczególnych tkankach, w tym cech gatunkowych (poziom troficzny, środowisko) oraz osobniczych (kondycja, wiek, płeć). Jako parametr dodatkowy do pracy włączono analizę stabilnych izotopów $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{13}\text{C}$, które pozwoliły ustalić poziom troficzny wybranych gatunków ptaków i pochodzenie ich pokarmu.

W **pierwszej publikacji** skupiono się na dwóch najważniejszych drogach wnikania zanieczyszczeń do organizmów ptaków, w tym uznawanej za główną – pokarmową oraz często pomijaną – oddechową. Ptaki będąc długowiecznymi drapieżnikami, znajdującymi się u szczytu łańcucha troficznego, narażone są szczególnie na zwiększoną biokumulację zanieczyszczeń w ich organizmach (Burger i Gochfeld, 2004). Ponadto, ich jelita i płuca mogą stanowić wysoki potencjał we wskazaniu zanieczyszczenia konkretnych elementów środowiska, w tym spożywanego przez ptaki pokarmu oraz otaczającego powietrza. Należy jednak zaznaczyć, że płuca i przewód pokarmowy, podobnie jak skóra są głównymi

barierami oddzielającymi organizmy wyższe od środowiska o wysokich stężeniach ksenobiotyków (Lehman-McKeeman, 2008). Pochodne fenolu jako związki endokrynnie aktywne muszą przekroczyć przynajmniej jedną z tych barier, aby móc połączyć się z receptorem i wywołać odpowiedź organizmu. Dlatego też krew okazała się w pierwszej pracy istotnym narzędziem do oceny biodostępności pochodnych fenolu.

Niezależnie od wielkości stężeń pochodnych fenolu w jelitach lub płucach, transfer ten niekoniecznie musi odzwierciedlać rzeczywistą ilość danego ksenobiotyku na jaki narażony jest ptak. Ponadto, krew dostarcza informacji o narażeniu chwilowym i jest nośnikiem ksenoestrogenów do miejsc ich oddziaływania (Espín i in., 2016). W związku z tym, aby ocenić narażenie ptaków na pochodne fenolu, w **drugiej i czwartej publikacji** skupiono się na poznaniu dystrybucji narządowej BPA i alkilofenoli z uwzględnieniem ich dróg wnikania. Mózg i gonady są tkankami szczególnie wrażliwymi na działanie endokrynnie aktywnych pochodnych fenolu (Cheng i in., 2017; Li i in., 2017; Mentor i in., 2020; Tran i in., 2020). Mięśnie i tłuszcz podskórny stanowią magazyn dla ksenobiotyków, ale mogą być również źródłem wtórnego narażenia (Lehman-McKeeman, 2008). Szczególnie w okresach silnego stresu np. podczas migracji i lęgów ptaków, zmagazynowany tłuszcz w organizmie jest metabolizowany, a wraz z nim mobilizowane są i transportowane do krwiobiegu zanieczyszczenia (Henriksen i in., 1996; Perkins i Barclay, 1997). Z kolei wątroby i nerki są narządami, dzięki którym ksenobiotyki mogą być metabolizowane i usuwane (Lehman-McKeeman, 2008). Poza tym pochodne fenole mogą wpływać również na prawidłowe funkcjonowanie tych ważnych narządów (Traversi i in., 2014; Faheem i Lone, 2017; Shirdel i in., 2020).

Ptaki będąc drapieżnikami u szczytu łańcucha troficznego, narażone są na zwiększone dawki ksenoestrogenów na skutek ich biomagnifikacji (Burger i Gochfeld, 2004). Tym samym istotnym elementem **trzeciej publikacji** było ustalenie czy zwierzęta te mają również możliwość przynajmniej częściowej eliminacji pochodnych fenolu poza organizm. Zarówno pióra jak i pazury stanowią ważne drogi usuwania ksenobiotyków, w tym również trwałych zanieczyszczeń organicznych, preferujących gromadzenie się w tkankach tłuszczowych. Ważną częścią pracy było ponadto porównanie stężeń pochodnych fenolu w lotkach pochodzących od gatunków ptaków, które wymieniają je w dwóch skrajnie różnych rejonach o odmiennych uwarunkowaniach środowiskowych oraz odległości od potencjalnych źródeł zanieczyszczeń. Ptasie pióra z powodzeniem wykorzystywane są jako wskaźniki jakości środowiska oraz nieinwazyjne narzędzie oceny obciążenia organizmów ptaków zanieczyszczeniami (Jaspers i in., 2006; Kim i Koo, 2008; Meyer i in., 2009).

CELE PRACY

Ptaki morskie doświadczają dużego stresu co odzwierciedla drastyczny spadek ich światowej populacji, a kumulacja i oddziaływanie zanieczyszczeń na ich organizmy jest jednym z bodźców zewnętrznych odpowiadających za ten spadek (Croxall i in., 2012; Paleczny i in., 2015). Badania dziko żyjących ptaków wodnych rzadko są możliwe do zrealizowania, co wynika z trudności związanych z pozyskaniem materiału. Niewiele wiadomo o ekspozycji ptaków wodnych na pochodne fenolu, a tym bardziej o dalszym losie tych ksenoestrogenów w ich organizmach oraz skutkach tego narażenia. Określone w pracy główne miejsca kumulacji pochodnych fenolu mogą wskazać kierunek badań nad potencjalnym wpływem tych związków na ptaki. Natomiast wiedza o wielkości stężeń BPA, 4-*t*-OP i 4-NP w poszczególnych tkankach stanowić może podstawę do zbadania możliwych negatywnych skutków wywoływanych przy środowiskowych stężeniach badanych związków. Przedłożona praca miała za zadanie dostarczyć również nowych informacji o potencjale jaki niosą za sobą ptaki w badaniach biomonitoringu środowiska.

Przystępując do pracy postawiono następujące hipotezy badawcze:

1. Alki *Alca torda*, lodówki *Clangula hyemalis* i nurogęsi *Mergus merganser* bytujące w rejonie południowego Bałtyku charakteryzują się zróżnicowanym narażeniem na BPA i alkilofenole.
2. Inhalacja stanowi istotną drogę narażenia alki *Alca torda*, lodówki *Clangula hyemalis* i nurogęsi *Mergus merganser* na BPA, 4-*t*-OP i 4-NP.
3. Narządy strategiczne dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania ptaków tj. gonady, mózgi, nerki i wątroby, stanowią główne miejsca kumulacji endokrynnie aktywnych pochodnych fenolu.
4. Pióra i pazury alki *Alca torda* oraz lodówki *Clangula hyemalis* stanowią istotną drogę eliminacji pochodnych fenolu z ich organizmów.
5. Jelita, płuca i pióra alki *Alca torda*, lodówki *Clangula hyemalis* i nurogęsi *Mergus merganser* są dobrymi wskaźnikami zanieczyszczenia środowiska pochodnymi fenolu.

Hipotezy zweryfikowano poprzez realizację następujących głównych celów badawczych:

1. Określenie głównych dróg wnikania pochodnych fenolu do organizmów ptaków oraz czynników determinujących ich ekspozycję w rejonie południowego Bałtyku (publikacja 1).
2. Rozpoznanie dystrybucji narządowej pochodnych fenolu w organizmach ptaków wodnych (publikacja 2 i 4).
3. Rozpoznanie potencjału piór i pazurów do eliminacji pochodnych fenolu z organizmów ptaków (publikacja 3).
4. Określenie potencjału wybranych tkanek i wytworów naskórka ptaków jako wskaźników zanieczyszczenia środowiska oraz obciążenia organizmów ptaków przez pochodne fenolu (publikacja 1 i 3).

ZEBRANY MATERIAŁ I ANALIZY CHEMICZNE

Badania prowadzono na martwych ptakach pozyskanych z przyłowu, wyłowionych w latach 2015 – 2016 z rejonu południowego Bałtyku. Wśród nich znajdowały się: lodówki (*Clangula hyemalis*), alki zwyczajne (*Alca torda*) oraz nurogęsi (*Mergus merganser*). Lodówki wyłowiono z dwóch akwenów – Zatoki Gdańskiej i Zatoki Pomorskiej. Alki pochodziły wyłącznie z Zatoki Gdańskiej, a nurogęsi z Zalewu Szczecińskiego. Dla alki Bałtyk jest stałym miejscem bytowania, podczas gdy nurogęsi i lodówki przylatują w rejon południowego Bałtyku jedynie w okresie pozalęgowym. Podstawę diety lodówek w okresie pozalęgowym stanowi głównie zoobentos. Natomiast alki i nurogęsi żywią się wyłącznie rybami (Cramp and Simmons, 1977; Cramp, 1985; Stempniewicz, 1995).

W czasie sekcji ptaków pobrano jelita, płuca, mięśnie piersiowe, nerki, wątroby, tłuszcz podskórny, mózg, gonady, pióra, pazury oraz krew z serca. Jelita opróżniono z zawartości pokarmowej i przepłukano wodą mili-Q. Pobrane próbki do czasu analizy zostały zamrożone (-20°C). Przed analizą jelita, płuca, mięśnie piersiowe, nerki, wątroby, gonady, pióra i pazury liofilizowano, a następnie homogenizowano. Dodatkowo, przed analizą oba wytwory naskórka myto w acetonie przy użyciu ultradźwięków przez 10 min. w 20°C. Tak przygotowane tkanki i wytwory naskórka przechowywano w szkle borokrzemowym w eksykatorze w stałych warunkach (temp. 20°C ± 2°C, wilgotność 45% ± 5%). Mózg oraz tłuszcz homogenizowano bezpośrednio przed analizą. W obu tych tkankach określono dodatkowo wilgotność w celu przeliczenia wyników w mokrej masie na suchą. Podczas sekcji ptaków, oznaczono ich wiek na podstawie cech upierzenia (Baker, 2016). Płeć określano po wyglądzie gonad. Każdy osobnik został również zważony, a stan ciała oceniano na podstawie zawartości tłuszczu jelitowego i tłuszczu podskórnego zgodnie z przyjętą skalą (Camphuysen i in., 2007). Szczegółowy opis materiału zestawiono w Tabeli 1.

Stężenia BPA, 4-*t*-OP i 4-NP w jelitach, płucach, mięśniach, nerkach, wątrobach, gonadach, piórach i pazurach oznaczano wg metody opisanej przez Xiao i in. (2006) oraz zmodyfikowanej przez Staniszwęską i in. (2014; 2018). Odważony materiał biologiczny poddawano ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej w mieszaninie metanolu, 0,01M octanu amonu i 4M kwasu chlorowego (VII). Otrzymane ekstrakty oczyszczano na szklanych kolumnkach Oasis HLB (200 mg, 5 cm³). Oznaczenia stężeń pochodnych fenolu we krwi przeprowadzono wykorzystując metodę opisaną przez Xiao i in. (2006). Próbki poddawano ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej mieszaniną n-heksanu i eteru dietylowego (70:30)

z octanem amonu (0,01 M). Z kolei tłuszcz i mózg poddawano dwukrotnej ekstrakcji w acetonitrylu. Ekstrakty następnie łączono, odwirowywano i oczyszczano poprzez wytrąsanie z zastosowaniem heksanu (Geens i in., 2012). Wszystkie otrzymane ekstrakty odparowywano do sucha i uzupełniano acetonitrylem do 0,2 cm³.

Tabela 1 Zestawienie gatunków ptaków, rodzaju oraz liczby próbek materiału biologicznego wykorzystanego do analiz w poszczególnych publikacjach

publikacja	gatunek	krew	jelita	płuca	mięśnie	nerki	wątroby	tłuszcz	mózgi	gonady	pióra	pazury
publikacja 1	<i>Clangula hyemalis</i>	30	29	30								
	<i>Alca torda</i>	15	15	15								
	<i>Mergus merganser</i>	8	8	8								
publikacja 2	<i>Clangula hyemalis</i>				29	30	30	28	28			
	<i>Alca torda</i>				15	15	15	15	14			
	<i>Mergus merganser</i>				7	8	8	8	8			
publikacja 3	<i>Clangula hyemalis</i>										29	29
	<i>Alca torda</i>										15	14
publikacja 4	<i>Clangula hyemalis</i>									47		

Oznaczenia końcowe stężeń bisfenolu A, 4-*tert*-oktylofenolu i 4-nonylofenolu wykonano z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym i kolumną chromatograficzną Thermo Scientific HYPERSIL GOLD C18 PAH (250×4,6 mm; 5 μm). Długość generowanej fali wzbudzającej wynosiła $\lambda = 275$ nm, natomiast emisję mierzono przy długości fali $\lambda = 300$ nm. Proces rozdzielania chromatograficznego przeprowadzono w warunkach gradientowych stosując fazę ruchomą (woda:acetonitryl). Odzysk został wyznaczony w próbkach z dodatkiem znanej ilości analitu, na podstawie pięciokrotnego pomiaru stężeń BPA, 4-*t*-OP i 4-NP. Precyzja metody została wyrażona jako współczynnik zmienności. Granicę oznaczalności metody wyznaczono dla próbki z niewielką zawartością analitu jako dziesięciokrotny stosunek sygnału do szumu. Odzysk dla wszystkich próbek wynosił zawsze > 80%, a precyzja metody < 15%. Granica oznaczalności wahała się w zależności od związku i materiału biologicznego od 0,07 do 2,0 (ng·cm⁻³ we krwi oraz ng·g⁻¹ s.m. w pozostałych próbkach).

Analiza stabilnych izotopów została zlecona i wykonana w laboratorium Wydziału Chemii Politechniki Łódzkiej. Analizę wykonano w uprzednio zliofilizowanych

i zhomogenizowanych mięśniach ptaków, ponieważ odzwierciedlają one ostatnie 3-4 tygodnie diety ptaków (Hobson and Clark, 1992). Oznaczenia izotopów $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{13}\text{C}$ przeprowadzono za pomocą Isotope Ratio Mass Spectrometer Sercon 20-22. Jako katalizatora spalania użyto V_2O_5 , a lokalny standard stanowił kwas tiobarbiturowy (azot atmosferyczny i PDB odpowiednio dla $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{13}\text{C}$).

WNIOSKI

Alka, lodówka i nurogęś bytujące w rejonie południowego Bałtyku narażone są na wnikanie pochodnych fenolu zarówno drogą pokarmową jak i oddechową. Najwyższe stężenia w jelitach i płucach przypadające na BPA i 4-NP są skutkiem ich wysokiej produkcji i późniejszego uwalniania do środowiska, powodującego szerokie rozpowszechnienie tych związków w jego elementach. Dominującą drogą narażenia na BPA, u wszystkich badanych gatunków ptaków była ekspozycja pokarmowa. Natomiast szlaki wnikania alkilofenoli do organizmów ptaków były bardziej zróżnicowane i uwarunkowane rejonem bytowania oraz nawykami żywieniowymi. 4-NP wnikał do organizmów ptaków rybożernych głównie drogą pokarmową, podczas gdy u bentofagów dominowała droga oddechowa. Ponadto, wraz ze wzrostem pozycji troficznej ptaków, wzrastało również ich narażenie pokarmowe na 4-NP. Z kolei 4-*t*-OP u ptaków bytujących w rejonie Zatoki Gdańskiej wnikał głównie poprzez inhalację, podczas gdy dla ptaków przebywających w rejonie Zatoki Pomorskiej przeważała droga pokarmowa (**publikacja 1**). Tym samym, zweryfikowano **1 i 2 hipotezę**, wykazując zróżnicowane narażenie alki *Alca torda*, lodówki *Clangula hyemalis* i nurogęsi *Mergus merganser* na pochodne fenolu oraz ukazując inhalację jako istotną drogę ekspozycji ptaków na te związki.

Wykazano również, że pochodne fenolu przenikają do krwi, a więc pokonują bariery biologiczne i mogą być dystrybuowane po całym organizmie, w tym również do miejsc docelowych dla ich endokrynnie aktywnego działania (**publikacja 1, 2**). W pracy ukazano szeroką dystrybucję wszystkich trzech związków do wątrób, nerek, mięśni, tłuszczu podskórnego, mózgu i gonad, co sugeruje, że pochodne fenolu podlegają w organizmach ptaków kumulacji oraz szeregowi procesów transformacji i eliminacji. Jednak szlaki dystrybucji pochodnych fenolu różniły się i były uwarunkowane najprawdopodobniej właściwościami poszczególnych ksenobiotyków, a szczególnie ich lipofilowością i potencjałem do wiązania z białkami oraz rozpuszczania w tłuszczach. BPA i 4-NP ulegały największej dystrybucji do mięśni, wątrób oraz nerek u wszystkich badanych gatunków ptaków, a 4-NP również do gonad. Natomiast 4-*t*-OP transportowany był głównie do mózgu, tłuszczu podskórnego oraz wątroby (**publikacja 2, 4**). Uzyskane wyniki potwierdzają postawioną **3 hipotezę**, iż narządy strategiczne dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania ptaków tj. gonady, mózgi, nerki i wątroby, stanowią główne miejsca kumulacji endokrynnie aktywnych pochodnych fenolu.

Różne miejsca docelowej kumulacji poszczególnych pochodnych fenolu wskazują, że każdy z badanych związków może nieść za sobą odmienne skutki zdrowotne u ptaków (**publikacja 2, 4**). W związku z największą biokumulacją BPA i 4-NP w wątrobach i nerkach, w przyszłych badaniach należy przyjrzeć się ich potencjalnemu wpływowi na upośledzenie funkcji tych ważnych narządów odpowiadających za biotransformację i eliminację zanieczyszczeń. Co więcej, wątroba była jedynym narządem, w którym wszystkie trzy związki wykazywały wysokie stężenia oraz pozytywne korelacje między sobą. Ukazuje to ważną funkcję selektywnej sekwestracji pochodnych fenolu w wątrobie, będącej pierwszym narządem, do którego transportowane są ksenobiotyki wnikające do organizmu drogą pokarmową. W pracy sugerowano, że proces ten może być determinowany dobrą kondycją ptaków, sprzyjając transferowi pochodnych fenolu z jelita do wątroby wraz ze wzrostem zawartości tłuszczu jelitowego (**publikacja 2**).

Na szczególną uwagę zasługuje odznaczająca się na tle pozostałych związków zdolność 4-*t*-OP do przenikania bariery krew-mózg, gdyż nagromadzenie tego ksenobiotyku w mózgu może prowadzić do zmian w zachowaniu np. godowym. Sprzyjać temu może również krążąca we krwi wolna frakcja 4-*t*-OP, która dostępna jest do transportowania do miejsc oddziaływania. Wykazano jednak, że mózg ptaków może być chroniony przed nagromadzeniem lipofilowych ksenoestrogenów, poprzez ich odkładanie w tłuszczu podskórnym, które zmniejsza jednocześnie transfer do mózgu (**publikacja 1, 2**).

Podkreślenia wymaga również szczególnie wysokie powinowactwo 4-NP względem gonad, wskazujące na możliwy potencjał tego związku do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania tego ważnego gruczołu rozrodczego. Szczególnie, iż na przykładzie gonad lodówki, na podstawie otrzymanych wyników oraz analizy literatury wykazano, że stężenia pochodnych fenolu w gruczole rozrodczym ptaków były na podobnym poziomie, przy którym w dotychczas przeprowadzonych badaniach obserwowano negatywne skutki spowodowane ich endokrynnie aktywnym działaniem. Pokazuje to, że badane ksenoestrogeny mogą zaburzyć rozmnażanie i rozwój ptaków. Na przykładzie gonad lodówki, ujawniono również wpływ wieku i płci na wielkość stężeń pochodnych fenolu w gruczole rozrodczym. Wykazano, że dorosłe lodówki charakteryzują się wyższymi stężeniami pochodnych fenolu w stosunku do osobników młodych, co może wynikać z wieloletniej biokumulacji, jak również zróżnicowanego zanieczyszczenia rejonów ich bytowania. Z kolei wśród dorosłych lodówek, pochodne fenolu charakteryzowały się wyższymi stężeniami w samcach w stosunku do samic, co prawdopodobnie związane jest z posiadaniem przez samice dodatkowej drogi eliminacji zanieczyszczeń z organizmów

poprzez ich transfer z matki do jaja. Tym samym, nie można wykluczyć potencjalnego wpływu pochodnych fenolu na rozwój embrionów we wrażliwym okresie wzrostu, kiedy stężenia ksenobiotyków, tak samo jak inne substancje odżywcze, mogą być przekazywane z matki do jaja (**publikacja 4**).

Dla większości tkanek wewnętrznych, poziom troficzny ptaków i ich nawyki żywieniowe nie decydowały o wielkości stężeń pochodnych fenolu. Jednak ptaki z najwyższego poziomu troficznego charakteryzowały się wyższymi stężeniami pochodnych fenolu wyłącznie w nerkach. Wskazuje to na efektywną eliminację pochodnych fenolu, zapobiegającą zwiększonej biokumulacji spowodowanej biomagnifikacją ksenobiotyków w łańcuchu troficznym. Ponadto, na przykładzie dwóch gatunków ptaków z tego samego poziomu troficznego, ale o zróżnicowanych preferencjach żywieniowych pokazano, że biomagnifikacja pochodnych fenolu może być wyższa u bentofagów w porównaniu do gatunków żerujących na rybach pelagicznych. Spośród badanych pochodnych fenolu, 4-NP odznaczał się największym potencjałem do biomagnifikacji w badanych gatunkach ptaków. Należy jednak podkreślić, że biomagnifikacja pochodnych fenolu w tkankach ptaków może być niedoszacowana i okazać się wyższa niż przedstawione w niniejszej pracy wartości. Szczególnie w przypadku 4-*t*-OP, który ulegał największej kumulacji w mózgach, a nie w mięśniach, dla których zostały obliczone współczynniki biomagnifikacji (**publikacja 2**).

Wbudowywanie pochodnych fenolu w wytwory naskórka tj. pióra oraz pazury, umożliwia ptakom ich eliminację ze swoich organizmów. Eliminacja pochodnych fenolu w zależności od związku i wytworu naskórka wynosi od 12 do 34 %. Dla większości związków i ptaków największy udział w eliminacji przypadał na pazury. Biorąc pod uwagę tylko te dwie drogi usuwania pochodnych fenolu stwierdzono, że wielkość eliminacji jest niższa od kumulacji w zbadanych dotychczas tkankach wewnętrznych ptaków. Eliminacja ta wydaje się jednak efektywna na tyle, aby zapobiec możliwej bioakumulacji z wiekiem oraz biomagnifikacji u ptaków żerujących na organizmach z wyższych poziomów troficznych. Potwierdza to postawioną **4 hipotezę**, iż pióra i pazury alki *Alca torda* oraz lodówki *Clangula hyemalis* stanowią istotne drogi eliminacji pochodnych fenolu z ich organizmów. Szczególnie, iż pochodne fenolu usuwane są prawdopodobnie ze wszystkich lub przynajmniej większości tkanek wewnętrznych, przy czym mózg może być bardziej odporny na ich eliminację. Spośród pochodnych fenolu, największym potencjałem do eliminacji charakteryzował się 4-NP, zarówno z piórami, jak i pazurami, podczas gdy najslabiej usuwany był 4-*t*-OP (**publikacja 3**).

Ujawniono różnice w stopniu zanieczyszczenia BPA i alkilofenolami wód oraz powietrza rejonu Zatoki Gdańskiej i Zatoki Pomorskiej, wskazując na potencjał jelit i płuc ptaków jako bioindykatorów zanieczyszczenia poszczególnych elementów środowiska pochodnymi fenolu (**publikacja 1**). Również lotki ptaków okazały się być obiecującym wskaźnikiem zanieczyszczenia środowiska 4-NP. Porównanie stężeń w lotkach lodówki i alki, które pierzą je w dwóch różnych środowiskach o odmiennym stopniu zanieczyszczenia i odległości od źródeł, pozwoliło ustalić, że Morze Bałtyckie jest ok. 3-krotnie bardziej zanieczyszczone 4-NP od obszarów morskich rosyjskiej Arktyki (**publikacja 3**). Tym samym, potwierdzono częściowo **5 hipotezę** postawioną w niniejszej pracy, iż jelita, płuca i pióra alki *Alca torda*, lodówki *Clangula hyemalis* i nurogęsi *Mergus merganser* są dobrymi wskaźnikami zanieczyszczenia środowiska pochodnymi fenolu. Nie udało się jednak potwierdzić użyteczności pazurów w biomonitoringu środowiska ani żadnego z wytworów naskórka jako bezinwazyjnego narzędzia badania poziomów narażenia ptaków na BPA i alkilofenole (**publikacja 3**).

Słowa kluczowe: ptaki, bioindykatory, endokrynnie aktywne pochodne fenolu, narażenie, biokumulacja, eliminacja