

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Agnieszka Maria Grzelak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

- Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biofizyki nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska 25.01.2005 roku. Tytuł rozprawy **„Zmiany zachodzące w procesie starzenia replikacyjnego drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”**. Promotorem rozprawy był prof. dr hab. Grzegorz Bartosz, recenzentami rozprawy byli prof. dr hab. Ewa Sikora oraz prof. dr hab. Marcin Kruszewski.
 - Tytuł magistra biologii w zakresie biofizyki 1999 roku. Tytuł rozprawy: **„Wpływ nadtlenoazotynu na aktywność antyoksydacyjnych enzymów ochronnych i transportera K^+/Cl^- w erytrocytach”**. Promotorem rozprawy był prof. dr hab. Grzegorz Bartosz.
-

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 2015-obecnie, adiunkt w grupie pracowników naukowo-dydaktycznych, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Molekularnej, Zakład Biofizyki Błon, Pracownia Cytometrii.
 - 2009-2015 zatrudniona do realizacji projektu „Rola transporterów oporności wielolekowej w farmakokinetyce i toksykologii – testy in vitro w praktyce farmaceutycznej i klinicznej” realizowanego przez UŁ w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka jako adiunkt naukowy posiadający stopień naukowy doktora, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Molekularnej, Zakład Biofizyki Błon, Pracownia Cytometrii
 - 2005-2009 adiunkt w grupie pracowników naukowo-dydaktycznych, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Molekularnej, Zakład Biofizyki Błon, Pracownia Cytometrii
 - 2003-2005 asystent-doktorant w grupie pracowników naukowo-dydaktycznych
-

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

Rola stresu oksydacyjnego w odpowiedzi komórek ssaków na działanie nanocząstek srebra i jego implikacje dla zjawiska oporności wielolekowej.

b) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy.

1. *Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles.*

Kruszewski M, Grądzka I, Bartłomiejczyk T, Chwastowska J, Sommer S, **Grzelak A**, Zuberek M, Lankoff A, Dusinska M, Wojewódzka M. *Toxicol Lett.* 2013,219(2):151-9. (IF=3,35 MNISW=35)

Wkład habilitantki: 40% polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, optymalizacji i walidacji wykorzystanych procedur cytometrycznych, dyskusji i analizie danych doświadczalnych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji.

2. *Collateral sensitivity: ABCG2-overexpressing cells are more vulnerable to oxidative stress.*

Krzyżanowski D, Bartosz G, **Grzelak A**.

Free Radic Biol Med. 2014, 76:47-52. (IF=5,736 MNISW= 40)

Wkład habilitantki: 55% polegał na opracowaniu koncepcji badań, dyskusji i analizie danych doświadczalnych oraz współprzygotowaniu manuskryptu publikacji.

3. *Glucose availability determines silver nanoparticles toxicity in HepG2.*

Zuberek M, Wojciechowska D, Krzyżanowski D, Meczynska-Wielgosz S, Kruszewski M, **Grzelak A**.

J Nanobiotechnology. 2015, 13:72. doi: 10.1186/s12951-015-0132-2. (IF= 5,381 MNISW=35)

Wkład habilitantki: 40% polegał na opracowaniu koncepcji badań, współtworzeniu manuskryptu, dyskusji i analizie danych doświadczalnych.

4. *Crucial role of chelatable iron in silver nanoparticles induced DNA damage and cytotoxicity.*

Grzelak A, Wojewódzka M, Meczynska-Wielgosz S, Zuberek M, Wojciechowska D, Kruszewski M.

Redox Biol. 2018, 15:435-440 (IF= 6,899 MNISW=40)

Wkład habilitantki: 69% polegał na opracowaniu koncepcji badań, współtworzeniu manuskryptu, dyskusji i analizie danych doświadczalnych.

5. *Silver nanoparticles can attenuate nitrative stress.*

Zuberek M, Paciorek P, Bartosz G, **Grzelak A**.

Redox Biol. 2017, 11:646-652. (IF= 6,899 MNISW=40)

Wkład habilitantki: 36% polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, analizie i dyskusji danych doświadczalnych, współtworzeniu manuskryptu publikacji.

6. *Exposure of human neurons to silver nanoparticles induces similar pattern of ABC transporters gene expression as differentiation: Study on proliferating and post-mitotic LUHMES cells.*

Zuberek M, Stępkowski TM, Kruszewski M, **Grzelak A**.

Mech Ageing Dev. 2018, 171:7-14. (IF= 3,087 MNISW= 35)

Wkład habilitantki: 40% polegał na opracowaniu koncepcji badań, analizie i dyskusji otrzymanych wyników, współtworzeniu manuskrypt publikacji, naniesieniu poprawek do manuskryptu.

7. *Nanoparticles-Caused Oxidative Imbalance.*

Zuberek M, Grzelak A.

Adv Exp Med Biol. 2018, 1048:85-98. doi: 10.1007/978-3-319-72041-8-6. (IF=1,937 MNISW=25)

Wkład habilitantki: 70% polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, współtworzeniu manuskryptu pracy, opracowaniu koncepcyjnym rycin i tabel, naniesieniu poprawek do manuskryptu.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania – 33,276

Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – 250

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science):

Liczba cytowań dotycząca osiągnięcia: 60.

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

Rola stresu oksydacyjnego w odpowiedzi komórek ssaków na działanie nanocząstek srebra i jego implikacje dla zjawiska oporności wielolekowej.

Wstęp

Stres oksydacyjny to zaburzenie równowagi pomiędzy ilością powstających i usuwanych wolnych rodników tlenowych i nierodnikowych reaktywnych form tlenu (dalej ogólnie nazwane - RFT). RFT powstają w reakcji jedno- lub dwuelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego. Produkty redukcji tlenu są indywidualami chemicznymi w stanie trypletowym, co za tym idzie, są dużo bardziej reaktywne niż cząsteczka tlenu w stanie podstawowym. Najczęściej powstającymi RFT są anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) oraz nadtlenuk wodoru (H_2O_2).

Anionorodnik ponadtlenkowy jest produktem jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego. Ulega on reakcji dysmutacji, w wyniku której powstaje H_2O_2 i tlen cząsteczkowy. Nadtlenuk wodoru powstający w procesie dysmutacji jest usuwany przez wydajny system enzymatyczny, aczkolwiek nieusunięty z komórki może w bezpośredniej reakcji utleniać grupy tiolowe białek, a w obecności jonów żelaza lub innych metali przejściowych wchodzi w reakcję Fentona, w wyniku której powstaje $\cdot OH$. Powstający $\cdot OH$, ze względu na swoją wysoką reaktywność reaguje bezpośrednio z każdą cząsteczką w otoczeniu.

Uszkodzenia spowodowane przez ten rodnik są lokalne, gdyż ze względu na wysokie stałe szybkości reakcji z komponentami komórki nie dyfunduje on na znaczne odległości.

RFT powstają w komórkach w procesach fizjologicznych. Ich źródłem są reakcje oksydoreduktaz, oksydaz, a przede wszystkim fosforylacja oksydacyjna zachodząca w aktywnym łańcuchu mitochondrialnym [1,2]. Za główny produkt związany z aktywnością łańcucha mitochondrialnego przez długi czas uważano H_2O_2 . Odkrycie, że mitochondria mają zdolność dysmutacji $O^{2\cdot-}$ przez autonomiczną dysmutazę (MnSOD, E.C.1.15.1.1) dowiodło, że pierwotnym rodnikiem w metabolizmie mitochondrialnym jest $O^{2\cdot-}$ [3,4]. Głównym źródłem powstawania $O^{2\cdot-}$ w mitochondriach jest kompleks I i III [5], a na intensywność powstawania $O^{2\cdot-}$ wpływa wartość potencjału mitochondrialnego, wewnątrzmitochondrialny poziom ATP i NADPH dostępnych do przeprowadzenia reakcji fosforylacji oksydacyjnej.

Stres oksydacyjny powstaje także w wyniku ekspozycji na różnorakie czynniki, np. nanocząstki, ksenobiotyki, promieniowanie, toksyny. Skutkiem stresu oksydacyjnego jest m.in. gromadzenie się uszkodzonych cząsteczek DNA, białek, lipidów oraz cukrów, co prowadzi do zmian w funkcjonowaniu komórki, a w przypadku dużego nagromadzenia uszkodzeń oksydacyjnych może skutkować jej śmiercią. W związku z tym, komórki ssaków wykształciły mechanizmy umożliwiające szybką adaptację do warunków czasowego zwiększonego poziomu RFT. Zwiększony poziom RFT prowadzi do zwiększenia poziomu białek zmniejszających stres oksydacyjny, takich jak enzymy antyoksydacyjne, metalotioneiny, ferrytyna oraz glutation. Najważniejsze enzymy związane z utrzymaniem homeostazy redoks to peroksydaza glutationowa (GPX, E.C.1.11.1.9.), reduktaza glutationowa (GR, EC 1.8.1.7), system tioredoksyn (forma utleniona i zredukowana TRXo/TRXr) oraz glutaredksyn (forma utleniona i zredukowana GRXo/GRXr). Enzymy te utrzymują właściwy status redoks komórki wykorzystując zredukowany glutation (GSH) oraz zredukowaną formę fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH). Za usuwanie $O^{2\cdot-}$ odpowiedzialna jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, E.C.1.15.1.1), natomiast katalaza (CAT, E.C.1.11.1.6) unieczynnia nadmiar H_2O_2 .

Mechanizmem regulującym odpowiedź na stres oksydacyjny są szlaki sygnalizacyjne zależne od RFT, tj. czynnik jądrowy *κ*B (NF-*κ*B), czynnik jądrowy pochodzenia erytroidalnego typu 2 (Nrf-2) czy czynnik transkrypcyjny-1 (AP-1). Wiele czynników transkrypcyjnych (m.in. NF-*κ*B, AP-1, HIF-1, p53) zawiera w miejscach odpowiedzialnych za wiązanie do DNA cysteinę, aminokwas wrażliwy na proces utleniania [6]. Model aktywacji odpowiedzi komórki na stres wywołany przez RFT zakłada następującą kolejność zdarzeń: (1) czynnik wywołujący stres powoduje wzmożone wydzielanie RFT, co wywołuje aktywację różnych szlaków sygnalizacyjnych, tj. Nrf-2, kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny (MAPK), i/lub NF-*κ*B, prowadzącą do zwiększenia syntezy enzymów i białek antyoksydacyjnych i przywrócenia równowagi wewnątrzkomórkowej; (2) w przypadku stresu przekraczającego zdolności adaptacyjne komórki, następuje skierowanie jej na drogę apoptozy.

Jednym z czynników mogących wywoływać stres oksydacyjny na poziomie komórkowym jest ekspozycja komórek na działanie nanocząstek. Nanocząstki występują w środowisku naturalnie lub są wytwarzane, modyfikowane i wprowadzane do środowiska przez człowieka. W przypadku jednokomórkowych patogenów jest to efekt pożądany, gdyż prowadzi do ich eliminacji. Jednak w przypadku organizmów wielokomórkowych działanie takie nie jest jednoznacznie pozytywne. Odkrycie, że nanocząstki mogą powodować stan zapalny, alergie,

choroby autoimmunologiczne, choroby płuc, zaburzać embriogenezę oraz przyczyniać się do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych doprowadziło do intensyfikacji badań nad podłożem toksyczności nanomateriałów. Badania takie prowadzą do poprawy bezpieczeństwa stosowanych nanomateriałów oraz pozwalają w sposób odpowiedzialny wprowadzać je do środowiska abiotycznego, tak aby zminimalizować negatywne skutki ich stosowania.

Stres oksydacyjny indukowany przez nanocząstki wynika z uszkodzenia przez nie błon mitochondrialnych, co hamuje syntezę ATP i powoduje uwalnianie dużych ilości $O_2^{\cdot-}$, a to z kolei powoduje nieodwracalne uszkodzenia białek, DNA oraz lipidów i skierowanie komórki na drogę apoptozy [7,8]. Nanocząstki, poprzez generowany stres, aktywują różne mechanizmy inicjacji apoptozy, aczkolwiek mechanizm zależny od mitochondriów wydaje się być kluczowy w toksyczności nanocząstek metalicznych [9]. Toksyczność nanocząstek zależy od wielu czynników, tj. wielkość nanocząstek i ich kształt, skład chemiczny oraz rodzaju materiału zaabsorbowanego na powierzchni nanocząstek (np. gazy, tj. ozon bądź azot, lub metale grup przejściowych) [10,11]. Materiał z jakiego zbudowane są nanocząsteczki ma ogromne znaczenie w procesie generacji RFT. RFT najefektywniej generują nanocząstki zbudowane z metali grupy przejściowej, tj. żelazo, miedź, chrom, wanad oraz krzemionki. Jest to związane z udziałem jonów metali grup przejściowych w reakcji Fentona [12]. Nanocząstki zawierające metale przejściowe mogą aktywować NF- κ B oraz szlak MAPK [13]. Nanocząstki zdeponowane we wnętrzu mitochondriów stymulują wydzielanie RFT poprzez rozprzęgnięcie łańcucha oddechowego, aktywację enzymów NADPH-zależnych, co w efekcie prowadzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej [9,14]. W związku z tym postuluje się, że w wielu rodzajów nanocząstek wywołuje śmierć komórek przez wolnorodnikowe uszkodzenia mitochondriów [15]. Wzmoczona produkcja RFT zachodząca pod wpływem ekspozycji na nanocząstki powoduje mobilizację wewnątrzkomórkowego systemu ochrony antyoksydacyjnej.

W przypadku komórek układu odpornościowego, tj. makrofagi czy neutrofile, pod wpływem nanocząstek dochodzi do wzmoczonego wydzielania nie tylko RFT, ale również reaktywnych form azotu. Stwierdzono, że makrofagi pęcherzyków płucnych oraz inne komórki fagocytyczne uwalniają pod wpływem nanocząstek duże ilości rodników tlenowych [16], a czynnikiem wyzwalającym te procesy jest samo wnikanie nanocząstek [17,18], które prowadzi do aktywacji oksydazy NADPH. Proces ten zaobserwowano także *in vivo* w fagocytach obecnych w płucach organizmów narażonych wziewnie na działanie nanomateriałów [19]. Wzmoczony stres oksydacyjny w połączeniu z wysoką aktywnością indukowalnej syntazy tlenku azotu prowadzi do tworzenia nadtlenoazotynu, który jest związkami bardzo reaktywnym i łatwo uszkadza cząsteczki budujące komórkę [20].

Nanocząstki srebra (AgNP) są jednymi z najwcześniej zaprojektowanych i wprowadzonych do produkcji na dużą skalę. Z powodu swoich właściwości antysepetycznych stosowane są w kosmetologii, chemii gospodarczej, przemyśle tekstylnym i spożywczym. Znalazły również zastosowanie w medycynie jako alternatywa dla antybiotyków, gdyż w odróżnieniu od klasycznych terapeutów o działaniu bakteriostatycznym czy

bakteriobójczym, AgNP nie wywołują u drobnoustrojów chorobotwórczych mechanizmów oporności.

Nanocząstki, w tym AgNP, mogą wnikać do organizmów żywych drogą pokarmową, wziewną lub mogą być podawane celowo - poprzez iniekcję. Niezależnie od drogi podania, nanocząstki usuwane są z organizmu wraz z moczem i kałem, natomiast część z puli która przedostaje się do krwioobiegu deponowana jest w narządach wewnętrznych. Szczególnie duża część nanocząstek jest deponowana w wątrobie (ze względu na udział tego organu w procesach detoksykacyjnych), śledzionie oraz w mózgowiu [21,22]. Do wnętrza komórek nanocząstki mogą wnikać na drodze pinocytozy i endocytozy lub biernie przenikać przez błony komórkowe, możliwe jest także wnikanie po związaniu nanocząstki przez receptory błonowe.

Nanocząstki mają także zdolność do przekraczania tkanek barierowych, np. krew/mózg, jelito/krew, krew/jądra, krew/łożysko [23]. Przekraczanie tkanek barierowych odbywa się na drodze dyfuzji lub za pośrednictwem makrofagów. Ważnym elementem tworzącym tkanki barierowe są transportery z rodziny ABC, które mają zdolność do aktywnego usuwania z komórek ksenobiotyków. Transportery ABC to duże białka zbudowane z charakterystycznych domen (NBD i TMD). Domeny NBD są odpowiedzialne za przyłączanie i hydrolizę ATP, natomiast domeny TMD odpowiadają za specyfikę substratową danego białka oraz uwolnienie przyłączonego substratu [24].

Budowa białek z nadrodziny ABC jest wysoce konserwatywna, a przedstawiciele białek tej rodziny występują we wszystkich królestwach systematycznych. Ich rolą jest zachowanie równowagi pomiędzy pobieraniem substancji gwarantujących prawidłowy katabolizm komórkowy, a usuwaniem toksyn pobranych ze środowiska i substancji toksycznych powstałych w wyniku procesów metabolicznych [25]. Kierunek w jakim transportowane są dane substancje zależy od pełnionych przez białko funkcji, a także jego lokalizacji. W komórkach wyższych eukariontów białka ABC usuwają poza obręb komórki toksyczne metabolity i ksenobiotyki, oraz odpowiedzialne są za dystrybucję substancji egzogennych lub syntetyzowanych w wyniku endogennego metabolizmu cząsteczek do/z poszczególnych organelli (np. retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów czy peroksyzomów) [26]. Ze względu na sposób uporządkowania domen oraz homologię sekwencji występującą w obrębie poszczególnych domen NBD i TMD transportery z rodziny ABC podzielono na siedem podrodzin (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCE, ABCF, ABCG). Mutacje w obrębie genów kodujących białka tych podrodzin leżą u podstaw wielu chorób związanych z dystrybucją i syntezą lipidów (szczególnie w chorobach związanych z centralnym układem nerwowym - CUN), zaburzeń biosyntezy cholesterolu, wydzielania żółci, mukowiscydozy, zwyrodnień siatkówki, czy niektórych rodzajów niedokrwistości [27]. Ze względu na swą specyficzność substratową i „kierunkowość” usuwania niepożądanych dla komórki substancji, białka te są ważnym komponentem tkanek barierowych. To między innymi ich działanie jest odpowiedzialne za utrudnioną penetrację leków przez barierę krew/mózg i zjawisko tzw. oporności wielolekowej.

Oporność wielolekowa, szczególnie w przypadku chorób nowotworowych, jest zjawiskiem bardzo źle rokującym dla chemioterapii. Polega ona na tym, że w odpowiedzi na kontakt komórek z ksenobiotykami (tj. leki przeciwnowotworowe, ale też substancje naturalne,

np. będące składnikami diety flawonoidy), a także w odpowiedzi na czynniki fizyczne (np. promieniowanie jonizujące, którego efektem działania na poziomie komórkowym jest generacja dużej ilości RFT), dochodzi do stymulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za kodowanie białek ABC i zwiększenia poziomu tych białek w komórce, a co za tym idzie większej oporności na leki. W tym aspekcie najintensywniej badane są białka z rodziny ABCB, ABCC oraz białko ABCG2.

Białko ABCB1 (glikoproteina P) jest historycznie pierwszym białkiem z rodziny ABCB, które zostało sklonowane i w pełni scharakteryzowane pod względem sekwencji i występowania izoform. Izoforny ABCB1 charakteryzują się zbliżonym spektrum substratowym i wykazują około 70% homologii w budowie cząsteczki. Ekspresja ABCB1 jest powszechna w komórkach o różnym pochodzeniu tkankowym i bierze ono udział w tworzeniu tkanek barierowych. Wysoki poziom ekspresji ABCB1 obserwuje się w komórkach śródbłonna bariery krew/mózg, rdzeniu nadnerczy, rdzeniu nerki, wątrobie, trzustce, płucach, nerkach, okrężnicy, jelicie czczym i odbytnicy [28,29]. Fizjologiczną i najważniejszą funkcją tego białka jest zapobieganie wchłanianiu toksyn ze światła jelita, przewodów żółciowych, kanalików nerkowych i nadnerczy oraz ochrona mózgu, płynu mózgowo-rdzeniowego, jąder, szpiku kostnego i rozwijającego się płodu przed ksenobiotykami [30]. Białko ABCB1 wpływa tym samym na właściwości farmakologiczne leków i ich metabolitów, zmieniając ich wchłanianie po podaniu doustnym.

Kolejnymi białkami uznanymi za ważne w zjawisku oporności wielolekowej są białka rodziny ABCC. Do rodziny ABCC należy 13 białek i wszystkie pełnią ważną rolę w procesie tworzenia barier. Są odpowiedzialne za selektywną akumulację, dystrybucję oraz eliminację leków oraz ich metabolitów, a także toksycznych produktów przemiany materii. W badaniach *in vitro* wykazano, że białka ABCC odpowiadają za oporność na niektóre cytostatyki pochodzenia naturalnego (antracykliny, alkaloidy barwinka, epipodofilotoksyny) i ich sprzężone metabolity, a także związki platyny, antagonistów kwasu foliowego, analogi nukleotydów i nukleozydów, związki arsenowe i antymonowe oraz leki alkilujące. Ich dystrybucja tkankowa wiąże się bezpośrednio z pełnioną rolą w tworzeniu barier i ochronie komórek [31,32]. Wzmoczoną ekspresję tych białek stwierdza się w wielu typach nowotworów o różnym pochodzeniu tkankowym [29,31,33,34].

Inne białko o kluczowej roli w zjawisku oporności wielolekowej to białko ABCG2. Ulega ono ekspresji w wielu typach komórek i podobnie jak w przypadku omawianych wcześniej białek, jego fizjologiczną rolą jest zachowanie szczelności tkanek barierowych, udział w detoksykacji i usuwanie z komórek szkodliwych metabolitów. Ulega ono ekspresji w komórkach nowotworowych i tkankach prawidłowych, np. jajnikach, łożysku, jelicie, wątrobie, jądrach, nerkach i mózgu. Transporter ten odgrywa ważną rolę w eliminacji ksenobiotyków przez wątrobę oraz ochronie płodu przed działaniem szkodliwych substancji [35]. Po raz pierwszy białko to wykryto w izolatach komórek nowotworu piersi opornego na dokсорubicynę i początkowo sądzono, że występuje wyłącznie w komórkach nowotworowych. Następnie pojawiły się doniesienia o jego ekspresji w łożysku [29,36]. Obecność tego białka została również potwierdzona w komórkach nowotworu okrężnicy opornych na mitoksantron [37].

Ze względu na specyficzną rolę w ochronie organizmu przed czynnikami zewnętrznymi i detoksykacji, regulacja transkrypcyjna transporterów ABC jest bardzo złożona. Najlepiej poznana jest regulacja ekspresji ABCB1, którego ekspresja jest pobudzana przez wiele czynników, np. szok termiczny, promieniowanie elektromagnetyczne, zaburzenia w homeostazie redoks, ekspozycja na ksenobiotyki czy obecność cytokin. Czynniki transkrypcyjne wprost zaangażowane w regulację transkrypcji ABCB1 to GC, HSF-1, AP-1, NF-IL6, NF-Y, EGR1, YB-1, MEF-1. Wielość mechanizmów oraz fakt, że region promotorowy genu ABCB1 jest atypowy (nie zawiera sekwencji promotorowej TATA) powodują, że kontrola regulacji ekspresji ABCB1 jest zjawiskiem zależnym od bardzo wielu czynników. Jednym z dobrze poznanych jest stres oksydacyjny.

Jak wspominałam wcześniej, wzmożone wydzielanie RFT prowadzi do aktywacji szlaków sygnalizacji odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy redoks. Szlaki te kontrolują proliferację, przerzutowanie, apoptozę, odpowiedź prozapalną, regulują cykl komórkowy [38], a także ekspresję genów transporterów ABC. Nanocząstki generując stres oksydacyjny wpływają na w szlaki wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów co sugeruje, że mogą modulować poziom transporterów ABC w komórkach. Poprzez zmianę ilości aktywnych transporterów w tkankach barierowych mogą więc zaburzać prawidłowy metabolizm tkanek za barierami lub wpływać na dostępność terapeutyków, a co za tym idzie przesądzać o powodzeniu lub niepowodzeniu terapii.

U podstaw mojej rozprawy leży próba odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób nanocząstki srebra generują stres oksydacyjny, jakie RFT są kluczowe dla toksyczności nanomateriałów oraz wyjaśnienia wzajemnego uwarunkowania pomiędzy stresem oksydacyjnym i ekspresją białek transporterów ABC.

W skład osiągnięcia wchodzi 6 prac oryginalnych i jedna praca przeglądowa.

Omówienie prac wchodzących w skład osiągnięcia

Praca nr 1.

Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles.

Kruszewski M, Grądzka I, Bartłomiejczyk T, Chwastowska J, Sommer S, **Grzelak A**, Zuberek M, Lankoff A, Dusinska M, Wojewódzka M. *Toxicol Lett.* 2013, 219(2):151-9. (*IF=3,35 MNISW=35*)

Pierwsza i chronologicznie najstarsza praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego poświęcona jest scharakteryzowaniu stresu oksydacyjnego i poszukiwaniu mechanizmów odpowiedzialnych za cytotoksyczność AgNP w komórkach ssaków. W pracy porównano wpływ AgNP na trzy linie komórkowe będące modelem komórek organów najbardziej narażonych na działanie nanocząstek. Otrzymane wyniki wykazały, że długoterminowa toksyczność AgNP, wyrażona jako zdolność tworzenia kolonii, koreluje z poziomem stresu oksydacyjnego i liczbą uszkodzeń DNA w traktowanych komórkach, a te z kolei z liczbą AgNP jakie wykrywa się wewnątrz komórek. Stwierdziliśmy także, że profil uszkodzeń DNA był zależny od badanej linii komórkowej. W komórkach linii A549 (linia

drobnokomórkowego raka płuc) krótkotrwała ekspozycja na AgNP (2 godz.) powodowała takie same uszkodzenia jak inkubacja 24-godzinna. Ponadto zaobserwowaliśmy, że profil wykrywanych uszkodzeń DNA jest różny w różnych czasach inkubacji. Przy krótkotrwałej inkubacji przeważającymi uszkodzeniami były modyfikacje zasad powiązane z ich utlenianiem, natomiast przy 24-godzinnej inkubacji więcej było pojedynczoniowych pęknięć DNA. W przypadku linii HT29 zaobserwowaliśmy natomiast, że poziom uszkodzeń koreluje dodatnio z czasem inkubacji komórek z nanocząstkami. W przypadku linii HepG2 2-godzinna inkubacja z nanocząstkami powodowała większe uszkodzenia DNA niż inkubacja 24-godzinna, co może wskazywać na skuteczne procesy naprawcze, a także stymulację enzymów oraz antyoksydantów związanych z obroną antyoksydacyjną. W pracy tej wykazaliśmy również, że chociaż dane literaturowe sugerują, że mechanizmy wnikania nanocząstek do komórek ssaków są uniwersalne dla wszystkich rodzajów komórek, to liczba nanocząstek wnikających do komórek ssaków jest specyficzną cechą każdego rodzaju komórek (lub linii komórkowej) i może różnić się między liniami.

Za największą wartość tej pracy uważam wykazanie, że w zależności od wewnątrzkomórkowego statusu redoks i plastyczności odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny, nanocząstki mogą wywoływać inny efekt biologiczny. Praca ta dała początek moim badaniom nad modulacją przez nanocząstki statusu redoks komórek.

Praca nr 2.

Collateral sensitivity: ABCG2-overexpressing cells are more vulnerable to oxidative stress.

Krzyżanowski D, Bartosz G, **Grzelak A.**

Free Radic Biol Med. 2014, 76:47-52. (IF=5,736 MNISW= 40)

Chemioterapia jest jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów, aczkolwiek jest całkowicie nieskuteczna w przypadku tak zwanych nowotworów lekoopornych. Lekooporność nowotworów wiąże się ze zjawiskiem oporności wielolekowej. Oporność wielolekową definiuje się jako pojawienie się w komórkach niewrażliwości na kilka grup czynników terapeutycznych, często o odmiennym mechanizmie działania, która pojawiają się na skutek ekspozycji komórek na pojedynczy ksenobiotyku lub czynnik fizyczny. U podstaw zjawiska lekooporności leżą różne mechanizmy. Są nimi np.: aktywny wyrzut leków, ograniczona wewnątrzkomórkowa aktywacja leków, ich szybsza detoksykacja, czy stymulacja mechanizmów naprawczych usuwających uszkodzenia związane z działaniem leków. Często w komórkach lekoopornych mechanizmy te pojawiają się jednocześnie i współdziałając ze sobą powodują niewrażliwość komórek na terapię.

Jednym z najczęściej badanych mechanizmów lekooporności jest mechanizm związany ze zwiększoną aktywnością transporterów z rodziny ABC. Najintensywniej badanymi transporterami w kontekście występowania tego fenomenu są ABCC1, ABCB1 oraz ABCG2. Wysiłki wielu grup badawczych koncentrują się na próbach modulowania aktywności transporterów w celu zwiększenia wewnątrzkomórkowej akumulacji terapeutyków, lub takiej modyfikacji dróg podania leku, aby umożliwić mu działanie terapeutyczne. Ponadto wciąż intensywnie badane są skutki nadmiernej ilości lub niefizjologicznej lokalizacji wybranych transporterów ABC dla metabolizmu komórkowego. Bezpośrednio z tego rodzaju obserwacji

wyprowadzono pojęcie wrażliwości obocznej (równoległej) (ang. collateral sensitivity). Fenomen ten polega na tym, że w przypadku znaczącej nadekspresji transportera z rodziny ABC pojawić się może zwiększona wrażliwość na związki nie będące cytostatykami [39].

W pracy numer 2, opisano rolę transportera oporności wielolekowej ABCG2 w odpowiedzi komórek ssaków na stres oksydacyjny wywołany przez egzogenne antyoksydanty. Do badań posłużyliśmy się komórkami linii MDCKII oraz stabilnym transfektantem MDCKII-BCRP. Przyjmując mechanizm zasugerowany w pracy Brechbuhl i wsp. [40], skupiliśmy się na ocenie parametrów związanych z poziomem oraz odtwarzaniem podstawowego antyoksydanta wewnątrzkomórkowego, jakim jest glutation. Stwierdziliśmy, że w linii komórkowej z nadekspresją transportera ABCG2 (MDCKII-BCRP) stężenie glutationu jest istotnie mniejsze niż w linii podstawowej (MDCKII). Ponadto odkryliśmy, że komórki z nadekspresją transportera ABCG2 wykazują zwiększoną wrażliwość na parakwat, menadion, nadtlenek wodoru, AAPH, wodoronadtlenek tert-butylu oraz $K_2Cr_2O_7$.

Oceniliśmy także poziom aktywności enzymów zaangażowanych w procesy redoks związane z glutationem. Stwierdziliśmy, że w aktywność S-transferazy glutationowej oraz reduktazy glutationowej w komórkach z nadekspresją transportera ABCG2 jest niższa niż w linii bez nadekspresji, natomiast aktywność peroksydazy glutationowej nie wykazuje zmian pomiędzy liniami. Jednocześnie, komórki te cechowały się zwiększonym poziomem H_2O_2 i mitochondrialnego $O_2^{\cdot-}$. Na podstawie danych doświadczalnych zaproponowaliśmy mechanizm wyjaśniający zwiększoną wrażliwość komórek z nadekspresją ABCG2 na oksydanty o różnym potencjale do generowania stresu oksydacyjnego (zarówno silne utleniacze, związki mogące modulować status redoks poprzez regulacje dostępności grup tiolowych, jak i wchodzące w cykliczne reakcje redoks).

W pracy tej po raz pierwszy zaobserwowaliśmy zjawisko „collateral sensitivity” dla komórek z nadekspresją transportera ABCG2 oraz zaproponowaliśmy mechanizm tej oporności uwzględniający nie tylko poziom ATP (jak w przypadku prac na temat transportera ABCB1), ale i poziom glutationu. Potwierdziliśmy tym samym uniwersalną strategię terapeutyczną polegającą na eliminacji komórek wykazujących nadekspresję transporterów ABC poprzez zastosowanie substancji generujących reaktywne formy tlenu, a tym samym powodujących wzmożony stres oksydacyjny w komórkach.

Prace 1 i 2 stanowiły podstawę do postawienia hipotezy badawczej o kluczowej roli stresu oksydacyjnego w odpowiedzi komórek na działanie nanocząstek oraz o wzajemnej zależności między nasileniem tego stresu a ekspresją białek oporności wielolekowej. Kolejne prace doświadczalne były próbą zweryfikowania tej hipotezy i wyjaśnienia mechanizmów związanych z toksycznością nanomateriałów, a szczególnie AgNP.

Praca nr 3.

Glucose availability determines silver nanoparticles toxicity in HepG2.

Zuberek M, Wojciechowska D, Krzyzanowski D, Meczynska-Wielgosz S, Kruszewski M, Grzelak A.

J Nanobiotechnology. 2015, 22;13:72. (IF= 5,381 MNISW=35)

Celem tej pracy było wyjaśnienie wpływu endogennej produkcji RFT zależnej od aktywności łańcucha oddechowego na toksyczność AgNP. Badania nad tym zagadnieniem

rozpoczęliśmy analizując przeżywalność komórek rosnących w medium o różnej zawartości glukozy po traktowaniu AgNP. Modelem w tych doświadczeniach były komórki HepG2, które charakteryzują się dużą tolerancją na zmiany zawartości glukozy w medium hodowlanym i są stosunkowo wrażliwe na toksyczne działanie AgNP (co wykazaliśmy w pracy nr 1).

Zaobserwowaliśmy, że komórki hodowane w warunkach ograniczonej dostępności glukozy (stężenie w medium hodowlanym wynoszące 5,5 mM, co odzwierciedla fizjologiczne stężenie glukozy w krwi) są bardziej odporne na toksyczne działanie AgNP, niż komórki hodowane w medium o podwyższonym stężeniu glukozy (25 mM).

W oparciu o te obserwacje postawiliśmy hipotezę, która zakładała, że fizjologiczna produkcja RFT wynikająca z aktywności łańcucha oddechowego może być czynnikiem modulującym toksyczność AgNP. W celu weryfikacji tej hipotezy oceniliśmy generację RFT z użyciem cytofluorymetru przepływowego oraz sond fluorescencyjnych (DHE, DHR123, MitoSox) oraz wektora reporterowego (HyperMito). Pozwoliło to na ocenę generacji RFT w miejscu ich powstawania (MitoSOX, DHE oraz HyperMito), a także powstających w wyniku reakcji następczych (DHR123).

Metodą PCR w czasie rzeczywistym oceniliśmy profil zmian ekspresji genów kluczowych w odpowiedzi na stres oksydacyjny, a zachodzących pod wpływem endogennej aktywności łańcucha oddechowego. Stwierdziliśmy zwiększoną ekspresję m.in. genów *NOS2*, *GSTM5*, *ALB*, *MBL2*, *SCARA3* i *CAT*. Jednocześnie zaobserwowaliśmy obniżenie ilości mRNA genów związanych z metabolizmem glutationu (*GSS*, *GSTZ1*, *GSTA4*, *GPX*). Wnioskujemy z tego, że detoksykacja RFT zachodzi na drodze szybkich, enzymatycznych reakcji, a rola drobnocząsteczkowych antyoksydantów, tj. GSH, nie jest kluczowa dla tego procesu. Jednocześnie sugeruje to, że zmiana stosunku GSH/GSSG oraz stopniowe obniżenie stężenia glutationu (w przypadku komórek intensywnie produkujących RFT w wyniku zwiększonej aktywności łańcucha oddechowego) jest sygnałem aktywującym szlak NF- κ B, co kieruje metabolizm komórki na drogę indukcji mechanizmów antyoksydacyjnych i jest przyczynkiem dla zwiększonej oporności tych komórek na stres wywołany przez AgNP.

Za najbardziej wartościowe wnioski wynikające z tej pracy uważam stwierdzenie, że toksyczność AgNP silnie zależy od stanu metabolicznego komórki, a stymulacja obrony antyoksydacyjnej związana z umiarkowanym stresem oksydacyjnym związanym z fizjologiczną aktywnością łańcucha oddechowego skutkuje większą opornością komórek na toksyczne działanie AgNP.

Podążając tym tokiem rozumowania, możemy założyć, że komórki których metabolizm energetyczny oparty jest o glikolizę mogą być wrażliwsze na działanie AgNP. Ponieważ komórki nowotworowe produkują energię głównie w procesie glikolizy, a więc w warunkach ograniczenia aktywności łańcucha oddechowego generującego RFT (efekt Warburga), można przypuszczać, że różnice we wrażliwości komórek nowotworowych i prawidłowych na nanomateriały mogą przynajmniej częściowo wynikać z różnic w metabolizmie glukozy. Jest to ważna informacja przy projektowaniu nowych nanofarmaceutyków, które powinny uwzględniać różnice w utlenianiu tkanek i wynikające z tego różnice w metabolizmie/wrażliwości komórek nowotworowych i prawidłowych. Praca nr 3 wskazuje na kluczową rolę mitochondriów i endogennej produkcji RFT w toksyczności AgNP.

Praca nr 4.

Crucial role of chelatable iron in silver nanoparticles induced DNA damage and cytotoxicity.

Grzelak A, Wojewódzka M, Meczynska-Wielgosz S, Zuberek M, Wojciechowska D, Kruszewski M.

Redox Biol. 2018, 15:435-440. (IF= 6,899 MNISW=40)

Wątek opisujący rolę mitochondriów w toksyczności AgNP był kontynuowany w pracy numer 4. W pracy tej opisano mechanizm odpowiedzialny za powstawanie uszkodzeń oksydacyjnych w DNA komórek narażonych na działanie AgNP. Skoncentrowaliśmy się w niej na ocenie roli poszczególnych reaktywnych form tlenu oraz jonów żelaza w cyto- i genotoksyczności nanomateriałów. Za pomocą specyficznego chelatora jonów żelaza, deferoksaminy (DFO), wykazaliśmy kluczową rolę jonów żelaza w toksyczności i generowaniu uszkodzeń oksydacyjnych powstających w wyniku działania AgNP. Dzięki temu zaproponowaliśmy mechanizm toksyczności AgNP, uwzględniający rolę jonów żelaza. Metodyka stosowana w tej pracy opiera się ocenie przeżywalności komórek, ocenie generacji wolnych rodników tlenowych oraz teście kometowym służącym do oceny rodzaju i liczby uszkodzeń DNA.

Podobnie jak w pracy nr 3, generację RFT oceniano wykorzystując specyficzne sondy fluorescencyjne (DHR123, MitoSOX, DHE) oraz wrażliwe na utlenianie białko reporterowe (HyperMito). Za pomocą tego panelu sond stwierdziliśmy, że pierwotnie powstającym wolnym rodnikiem tlenowym po inkubacji komórek z AgNP jest $O_2^{\cdot-}$, a głównym miejscem jego powstawania są mitochondria. Następnie oceniliśmy ilość uszkodzeń DNA powstającą w komórkach traktowanych AgNP w obecności chelatora jonów żelaza lub kiedy pula wolnego żelaza nie została zmieniona. Wykazaliśmy, że ilość uszkodzeń powstających w komórkach w których żelazo było skompleksowane jest znacząco mniejsza niż w przypadku komórek, gdzie żelazo powstawało nieskompleksowane.

Za najważniejsze wnioski wynikające z tej pracy uważam wykazanie, że za toksyczność nanomateriałów odpowiada głównie H_2O_2 oraz jony żelaza, które w reakcji Fentona generują $\cdot OH$, będący bardzo efektywnym czynnikiem uszkadzającym komponenty komórki. Jednocześnie wyjaśniliśmy pozorną sprzeczność między niską reaktywnością rodników generowanych przez łańcuch oddechowy a powstawaniem uszkodzeń DNA. W mitochondriach generowany jest $O_2^{\cdot-}$, którego reaktywność w stosunku do DNA jest niewielka. Natomiast jego dysmutacja do H_2O_2 i powstanie $\cdot OH$ w wyniku reakcji Fentona wyjaśnia powstawanie uszkodzeń DNA powszechnie obserwowane w komórkach traktowanych nanocząstkami. Zaproponowany mechanizm wyjaśniający zależne od nanocząstek generowanie $\cdot OH$ i roli jonów żelaza w tym procesie może przyczynić się do zwiększenia bezpieczeństwa stosowania nanomateriałów.

Praca nr 5.

Silver nanoparticles can attenuate nitrate stress.

Zuberek M, Paciorek P, Bartosz G, **Grzelak A**.

Redox Biol. 2017, 11:646-652. (IF= 6,899 MNISW=40)

Praca nr 5 jest kontynuacją prób wyjaśnienia mechanizmów generacji stresu oksydacyjnego przez AgNP w układzie komórkowym z modulowaną za pomocą stężenia glukozy aktywnością łańcucha mitochondrialnego (praca nr 3). Celem tej pracy była ocena zmian w produkcji reaktywnych form azotu indukowanych w wyniku biologicznej aktywności AgNP, w zależności od profilu metabolizmu energetycznego komórki, a także ocena roli nadtlenoazotynu w toksyczności nanomateriałów. W pracy tej szczególną uwagę zwróciliśmy na potencjalną rolę nadtlenoazotynu w toksyczności AgNP. Wykazaliśmy, że w warunkach ograniczonej dostępności glukozy i zwiększonej aktywności łańcucha oddechowego następuje stymulacja wytwarzania tlenku azotu, co w warunkach zwiększonego wydzielania $O_2^{\cdot-}$ promuje powstawanie nadtlenoazotynu.

Badania wykazały, że pomimo znacząco wyższej generacji RFT, w komórkach suplementowanych 25 mM glukozą i traktowanych AgNP nie stwierdzono powstawania większej ilości nitrotyrozyny, uznawanej za marker działania nadtlenoazotynu w układach biologicznych. Ponadto wykazaliśmy, że zwiększone wydzielanie tlenku azotu nie prowadzi do powstawania nadtlenoazotynu w żadnym badanym układzie doświadczalnym.

Aby zweryfikować hipotezę o wpływie nanocząstek na stabilność nadtlenoazotynu, wykonaliśmy doświadczenia w układzie bezkomórkowym *in vitro*, w których wykazaliśmy, że obecność AgNP przyspiesza dekompozycję nadtlenoazotynu. Ocena nitracji białek wywołanej egzogennym nadtlenoazotynem wykazała wyższy poziom nitracji w komórkach hodowanych w medium o obniżonym stężeniu glukozy. Naszym zdaniem wynika to z faktu, że białka zawierające nitrotyrozynę były szybciej usuwane w komórkach hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy, co jest związane z większą aktywnością proteasomu.

Efekt stymulacji usuwania nitrowanych białek zaobserwowaliśmy w komórkach hodowanych w medium o niższym stężeniu glukozy poddanych działaniu AgNP. Fenomen ten powiązaliśmy z aktywacją szlaku NRF-2, która powoduje wzrost aktywności proteasomu. Efektywniejsza eliminacja zmienionych aminokwasów w obecności AgNP jest prawdopodobnie jedną z przyczyn zwiększonej oporności komórek rosnących w warunkach prawidłowej glikemii. Obserwacje te pozwoliły nam na postawienie tezy, że nadtlenoazotyn oraz produkty jego działania, takie jak nitrotyrozyna, nie mają znaczenia w toksyczności AgNP w przypadku komórek z prawidłowo działającym łańcuchem oddechowym.

Za najważniejsze wnioski płynące z tej pracy uważam ocenę roli reaktywnych form azotu w toksyczności nanomateriałów, a także stwierdzenie, że w pewnych warunkach może dojść pod wpływem AgNP do stymulacji aktywności proteasomu.

Praca nr 6.

Exposure of human neurons to silver nanoparticles induces similar pattern of ABC transporters gene expression as differentiation: Study on proliferating and post-mitotic LUHMES cells.

Zuberek M, Stępkowski TM, Kruszewski M, Grzelak A.

Mech Ageing Dev. 2018; 171:7-14. (IF= 3,087, MNISW= 35)

Fizjologiczną rolą transporterów ABC jest utrzymywanie homeostazy poprzez eliminację ze środowiska wewnątrzkomórkowego ksenobiotyków lub niedopuszczenia do wniknięcia substancji niebezpiecznej do wnętrza komórki. Ze względu na swą specyficzną funkcję transportery ABC wchodzą w skład tkanek barierowych, tj. bariera krew/mózg, krew/jelito czy bariera w łożysku. Ponieważ wiadomo, że AgNP mogą przenikać przez bariery i gromadzić się w narządach poza barierami wykazując tam aktywność biologiczną, zasadnym wydaje się podjęcie wysiłków mających na celu ocenę działania toksycznego AgNP w stosunku do komórek fizjologicznie znajdujących poza barierą krew/mózg.

W pracy nr 6 kontynuując badania nad rolą transporterów oporności wielolekowej w odpowiedzi na stres oksydacyjny scharakteryzowaliśmy zmiany ekspresji genów transporterów ABC w zróżnicowanych i nie zróżnicowanych ludzkich neuronach traktowanych AgNP.

Model doświadczalny stanowiły komórki linii LUHMES. Są to komórki które zostały wyizolowane ze śródmózgowia płodu i mają zdolność do różnicowania w dojrzałe neurony dopaminergiczne. W przeprowadzanych doświadczeniach poddawaliśmy inkubacji z AgNP komórki zróżnicowane oraz komórki intensywnie proliferujące i oceniliśmy zmiany w poziomie mRNA dla wybranych transporterów ABC. W pracy zaobserwowaliśmy, że zmiany zachodzą głównie w ekspresji genów białek ABC regulowanych przez szeroko pojęty stres oksydacyjny oraz jego produkty (utlenione sterole). Szczególnie intensywnie dodatnio regulowaną rodziną były białka z rodziny ABCA, która to rodzina jest zaangażowana w transport i prawidłową dystrybucję lipidów. Opierając się o dane literaturowe zaproponowaliśmy potencjalny model modulowania ilości mRNA dla białek z rodziny ABCA w oparciu o aktywację czynnika transkrypcyjnego LXR.

Za najciekawsze obserwacje płynące z pracy nr 7 uważam wykazanie, że zmiany w ekspresji transporterów ABC wywołane przez AgNP podobne są do zmian zachodzących podczas różnicowania neuronów. Może to mieć potencjalne znaczenie w przypadku ekspozycji *in utero*, kiedy nanocząstki mogą wpływać na prawidłowy rozwój układu nerwowego u płodu.

Praca nr 7

Nanoparticles-Caused Oxidative Imbalance.

Zuberek M, **Grzelak A.**

Adv Exp Med Biol. 2018;1048:85-98. (*IF=1,937 MNISW=25*)

Praca nr 7 jest pracą przeglądową w której podsumowaliśmy istniejący stan wiedzy na temat stresu oksydacyjnego indukowanego w komórkach ssaków przez nanomateriały, ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień związanych z generowaniem RFT. W części wstępnej pracy opisaliśmy podstawowe wiadomości dotyczące zjawiska stresu oksydacyjnego, przytoczyliśmy najważniejsze definicje oraz poruszyliśmy tematy związane z odpowiedzią komórek na występowanie stresu oksydacyjnego.

Następnie skupiliśmy się na fenomenie generowania przez różnego rodzaju nanomateriały stresu oksydacyjnego w liniach komórkowych oraz innych modelach badawczych, tj. drobnoustroje. Podsumowane zostały tu wyniki wielu prac doświadczalnych,

w których kryterium porządkującym był rodzaj nanomateriału, rodzaj wykrywanego rodnika tlenowego, reaktywnej formy tlenu czy parametru odpowiedzialnego za homeostazę redoks, metody wykrywania wyżej wymienionych parametrów (sondy fluorescencyjne, oznaczenia uszkodzeń na poziomie komórkowym takie jak uszkodzenia DNA czy produkty peroksydacji lipidów).

Dalej poruszyliśmy problem przenikania nanomateriałów do komórek. Zestawiono informacje na temat funkcjonalizacji powierzchni nanomateriałów w celu polepszenia wnikania do wnętrza komórek, a także problemu wielkości wnikających do komórek nanocząstek. Omówione zostały jakie efekty biologiczne mogą wywoływać nanomateriały ze szczególnym uwzględnieniem roli RFT, których wzmożona generacja towarzyszy ekspozycji komórek na nanocząstki.

Najwięcej uwagi poświęciliśmy zagadnieniom wiążącym stres oksydacyjny wynikający z narażenia na nanocząstki z regulacją przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych i związanych z tym efektów biologicznych. Wskazaliśmy na szlaki wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów, które są szczególnie wrażliwe na regulacyjne działanie poprzez status redoks komórek, oraz implikacje dla komórek wynikające z aktywacji wrażliwych na status redoks czynników transkrypcyjnych. Podsumowaliśmy również scharakteryzowaną sieć zależności pomiędzy fizjologicznie generowanymi reaktywnymi formami tlenu, a indukowanym przez nanomateriały stresem oksydacyjnym wskazując na miejsca w szlakach wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów, które mogą być krytyczne dla odpowiedzi komórek na działanie nanomateriałów.

Podsumowanie

Przedstawione w osiągnięciu naukowym prace doświadczalne stanowią spójny panel eksperymentów, które uszczegóławiają i wyjaśniają rolę RFT w toksyczności AgNP. Zwracają również uwagę na to, w jaki sposób toksyczność AgNP zależy od endogennej aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego i związanego z nią wewnątrzkomórkowego statusu redoks. Prace te poruszają także problem wpływu wywołanego przez nanocząstki stresu oksydacyjnego na zmiany profilu aktywności białek ABC i implikacji tego zjawiska dla różnicowania komórek oraz indukcji oporności wielolekowej w komórkach ssaków.

PLANY NAUKOWE

Moje zainteresowania naukowe skupiają się wokół zagadnień związanych z szeroko pojętym stresem oksydacyjnym, jako czynnikiem regulującym metabolizm komórkowy. Mam zamiar kontynuować badania związane z toksycznością nanomateriałów, w szczególności badania wpływu nanomateriałów na stabilność i poziom miRNA regulujących proces przerzutowania nowotworów. Ponadto rozpoczął badania nad modulacją przez stres oksydacyjny, wywoływany przez popularne nanomateriały, estrogenozależnych szlaków przekazywania sygnałów na drodze niezależnej od wiązania liganda hormonalnego.

LITERATURA

1. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*. 2015. doi:10.1038/cmi.2014.89
2. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000. doi:10.1016/S0891-5849(00)00317-8
3. Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohé L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*. 1974. doi:10.1016/0014-5793(74)80281-4
4. Forman HJ, Kennedy JA. Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974. doi:10.1016/0006-291X(74)90418-5
5. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009. doi:10.1042/BJ20081386
6. Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal*. 2002. doi:10.1016/S0898-6568(02)00053-0
7. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett*. 2008. doi:10.1016/j.toxlet.2008.04.015
8. Eom HJ, Choi J. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ Sci Technol*. 2010. doi:10.1021/es1020668
9. Xia T, Kovoichich M, Brant J, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett*. 2006. doi:10.1021/nl061025k
10. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 2003. doi:10.1016/S0891-5849(03)00149-7
11. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007. doi:10.1116/1.2815690
12. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
13. Smith KR, Klei LR, Barchowsky A. Arsenite stimulates plasma membrane NADPH oxidase in vascular endothelial cells. *Am Physiol Soc Lung Cell Mol Physiol*. 2001. doi:10.1152/ajplung.2001.280.3.L442
14. Sioutas C, Delfino RJ, Singh M. Exposure assessment for atmospheric Ultrafine Particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. *Environ Health Perspect*. 2005. doi:10.1289/ehp.7939
15. Shi Y, Wang F, He J, Yadav S, Wang H. Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. *Toxicol Lett*. 2010. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.014
16. Fadeel B, Kagan VE. Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils: regulation

- by reactive oxygen species. *Redox Rep.* 2003. doi:10.1097/SAP.0b013e31816d8275
17. Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. In: *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* ; 2005. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012
 18. Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer.* 2004. doi:10.1002/ijc.11708
 19. Coccini T, Barni S, Vaccarone R, Mustarelli P, Manzo L, Roda E. Pulmonary toxicity of instilled cadmium-doped silica nanoparticles during acute and subacute stages in rats. *Histol Histopathol.* 2013. doi:10.14670/HH-28.195
 20. PRYOR WA, STONE K. Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. *Ann N Y Acad Sci.* 1993. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb39148.x
 21. Austin CA, Hinkley GK, Mishra AR, et al. Distribution and accumulation of 10 nm silver nanoparticles in maternal tissues and visceral yolk sac of pregnant mice, and a potential effect on embryo growth. *Nanotoxicology.* 2016. doi:10.3109/17435390.2015.1107143
 22. Gonzalez-Carter DA, Leo BF, Ruenraroengsak P, et al. Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity through induction of H₂S-synthesizing enzymes. *Sci Rep.* 2017. doi:10.1038/srep42871
 23. Kruszewski M, Brzoska K, Brunborg G, et al. Toxicity of Silver Nanomaterials in Higher Eukaryotes. *Adv Mol Toxicol.* 2011. doi:10.1016/B978-0-444-53864-2.00005-0
 24. Bianchet MA, Ko YH, Amzel LM, Pedersen PL. Modeling of nucleotide binding domains of ABC transporter proteins based on a F₁-ATPase/recA topology: Structural model of the nucleotide binding domains of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). *J Bioenerg Biomembr.* 1997. doi:10.1023/A:1022443209010
 25. Schneider E, Hunke S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev.* 1998. doi:10.1016/S0168-6445(98)00002-3
 26. Becker JP, Depret G, Van Bambeke F, Tulkens PM, Prévost M. Molecular models of human P-glycoprotein in two different catalytic states. *BMC Struct Biol.* 2009. doi:10.1186/1472-6807-9-3
 27. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annu Rev Biochem.* 2002. doi:10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055
 28. Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem.* 1998. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2510252.x
 29. Takano M, Yumoto R, Murakami T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol Ther.* 2006. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.06.005
 30. Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JHM. Concise Review: Clinical Relevance of Drug Drug and Herb Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist.* 2007. doi:10.1634/theoncologist.12-8-927
 31. Deeley RG, Westlake C, Cole SPC. Transmembrane Transport of Endo- and

- Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassette Multidrug Resistance Proteins. *Physiol Rev.* 2006. doi:10.1152/physrev.00035.2005
32. Bradshaw DM, Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol.* 1998. doi:10.1200/JCO.1998.16.11.3674
 33. Plasschaert SLA, De Bont ESJM, Boezen M, et al. Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1096
 34. Filipits M, Haddad V, Schmid K, et al. Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *Clin Cancer Res.* 2007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2446
 35. Kim RB. Transporters and drug discovery: Why, when, and how. *Mol Pharm.* 2006. doi:10.1021/mp050084o
 36. Breedveld P, Beijnen JH, Schellens JHM. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2006. doi:10.1016/j.tips.2005.11.009
 37. Miyake K, Mickley L, Litman T, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999.
 38. Li JJ en, Muralikrishnan S, Ng CT, Yung LYL, Bay BH. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Exp Biol Med.* 2010. doi:10.1258/ebm.2010.010021
 39. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002. doi:10.1038/nrc706
 40. Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelkerand DR, Day BJ. Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J Biol Chem.* 2010. doi:10.1074/jbc.M109.090506

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłam współautorką 11 prac doświadczalnych, których tematyka koncentrowała się wokół zagadnień związanych z wpływem stresu oksydacyjnego na poszczególne komponenty i struktury wewnątrzkomórkowe związane z obroną antyoksydacyjną. Badania obejmowały głównie zdefiniowane układy bezkomórkowe. W pracach tych koncentrowałam się głównie na wyjaśnianiu mechanizmów reakcji badanych produktów rodnikowych oraz modelowych antyoksydantów.

1. Melatonin does not react rapidly with hydrogen peroxide. Grzelak A, Macierzyńska E, Bartosz G. *Free Radic Res.* 2004;38(11):1155-8.
2. Pro-oxidative effects of Tempo in systems containing oxidants. Balcerczyk A, Grzelak A, Soszynski M, Bartosz G. *Redox Rep.* 2004;9(3):153-9.

3. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. Balcerzyk A, Grzelak A, Janaszewska A, Jakubowski W, Koziol S, Marszalek M, Rychlik B, Soszynski M, Bilinski T, Bartosz G. *Biofactors*. 2003;17(1-4):75-82.
4. Pro-oxidative activity of nitroxides in their reactions with glutathione. Głębska J, Skolimowski J, Kudzin Z, Gwoździński K, Grzelak A, Bartosz G. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(3):310-6.
5. EDTA loses its antioxidant properties upon storage in buffer. Głębska J, Grzelak A, Pułaski Ł, Bartosz G. *Anal Biochem*. 2002;311(1):87-9.
6. Reactive oxygen species are formed in cell culture media. Grzelak A, Rychlik B, Bartosz G. *Acta Biochim Pol*. 2000;47(4):1197-8.
7. Peroxynitrite activates K⁺-Cl⁻ cotransport in human erythrocytes. Grzelak A, Mazur J, Bartosz G. *Cell Biol Int*. 2001;25(11):1163-5
8. Hemoglobin can nitrate itself and other proteins. Grzelak A, Balcerzyk A, Mateja A, Bartosz G. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1528(2-3):97-100.
9. Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. Grzelak A, Rychlik B, Bartosz G. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(12):1418-25
10. Dopamine-melanin protects against tyrosine nitration, tryptophan oxidation and Ca⁽²⁺⁾-ATPase inactivation induced by peroxynitrite. Stepień K, Zajdel A, Wilczok A, Wilczok T, Grzelak A, Mateja A, Soszyński M, Bartosz G. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1523(2-3):189-95.
11. Inactivation of antioxidant enzymes by peroxynitrite. Grzelak A, Soszyński M, Bartosz G. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60(4):253-8.

Moja praca doktorska, dotyczyła zagadnień związanych z gerontologią eksperymentalną drożdży. W ramach przygotowania rozprawy doktorskiej opracowałam metodę uzyskiwania dużej liczby komórek *Saccharomyces cerevisiae* wykazujących fentotyp starzenia replikacyjnego. Określiłam podstawowe parametry redoks starych replikacyjnie komórek *Saccharomyces cerevisiae*, co było podstawą do opublikowania pracy:

12. Decreased antioxidant defense during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* studied using the 'baby machine' method. **Grzelak A**, Skierski J, Bartosz G. *FEBS Lett*. 2001;492(1-2):123-6.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora rozszerzyłam moje zainteresowania o zagadnienia związane z regulacją stresu oksydacyjnego oraz skutkami działania wolnych rodników i RFT dla organizmów eukariotycznych, tym razem głównie na modelach komórkowych. Badania te stały się podstawą do ubiegania się przeze mnie o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego.

Tym niemniej, oprócz badań nad stresem oksydacyjnym, uczestniczyłam także w innych pracach:

- (1) Opracowałam założenia dwóch testów o potencjale diagnostycznym. Jeden pozwala na szybkie i precyzyjne typowanie gatunku drożdżaków z rodzaju *Candida* oraz grzybów

dermatofitycznych za pomocą analizy HRM. Opracowałam również założenia testu przesiewowego mającego w celu określenia wrażliwości drożdżaków *Candida albicans* na azole w oparciu o analizę HRM. Oprócz publikacji badania te pozwoliły też na uzyskanie patentu na terenie RP.

1. Principles of a new protocol for prediction of azole resistance in *Candida albicans* infections on the basis of ERG11 polymorphisms. Caban M, Strapagiel D, Dziadek J, Korycka-Machala M, **Grzelak A**. *Curr Microbiol.* 2016; 73(2):172-82. doi: 10.1007/s00284-016-1039-3.
2. Sposób identyfikacji gatunków chorobotwórczych zawartych w próbce pobranej od pacjenta. Caban M., Strapagiel D, G. Bartosz, P. Stączek, A. Ciesielska, M. Gadzalski, **A. Grzelak** (2016) Biuletyn Urzędu Patentowego 1 (1096) 2016. Patent udzielony w 2018 r. numer 408734.

(2) Nadal wykorzystywałam umiejętności i wiedzę z zakresu gerontologii eksperymentalnej prowadząc badania wyjaśniające rolę stresu oksydacyjnego w procesie starzenia replikacyjnego i generatywnego drożdży. Mój dorobek związany z tymi zagadnieniami podsumowany jest w pracach:

3. A genetic analysis of nitric oxide-mediated signaling during chronological aging in the yeast. Lewinska A, Macierzynska E, **Grzelak A**, Bartosz G. *Biogerontology.* 2011; 12(4): 309-20. doi: 10.1007/s10522-011-9329-4.
4. Nucleolus as an oxidative stress sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lewinska A, Wnuk M, **Grzelak A**, Bartosz G. *Redox Rep.* 2010;15(2): 87-96. doi: 10.1179/174329210X12650506623366
5. Application of a YHB1-GFP reporter to detect nitrosative stress in yeast. Lewinska A, **Grzelak A**, Bartosz G. *Redox Rep.* 2008; 13(4) :161-71. doi: 10.1179/135100008X259268.
6. The effect of growth medium on the antioxidant defense of *Saccharomyces cerevisiae*. Macierzynska E, **Grzelak A**, Bartosz G. *Cell Mol Biol Lett.* 2007; 12(3): 448-56. doi: 10.2478/s11658-007-0017-y.
7. Accumulation of oxidative damage during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Grzelak A**, Macierzynska E, Bartosz G. *Exp Gerontol.* 2006; 41(9): 813-8.

(3) Rozwijając moje zainteresowania dotyczące chorób neurodegeneracyjnych oraz funkcjonowania komórek OUN uczestniczyłam w badaniach mających na celu ocenę udziału stresu oksydacyjnego w etiologii niektórych chorób neurodegeneracyjnych oraz psychicznych.

8. Antioxidant properties of atypical antipsychotic drugs used in the treatment of schizophrenia. Sadowska-Bartosz I, Galiniak S, Bartosz G, Zuberek M, **Grzelak A**, Dietrich-Muszalska A. *Schizophr Res.* 2016; 176(2-3): 245-251.
9. 6-OHDA-induced changes in parkinson's disease-related gene expression are not affected by the overexpression of PGAM5 in in vitro differentiated embryonic mesencephalic cells. Stępkowski TM, Wasyk I, **Grzelak A**, Kruszewski M. *Cell Mol Neurobiol.* 2015; 35(8): 1137-47.

(4) W ramach współpracy z innymi jednostkami naukowymi zajmowałam się również wpływem wysiłku fizycznego, diety i czynników środowiskowych na generacje stresu oksydacyjnego.

10. Effect of 5-week moderate intensity endurance training on the oxidative stress, muscle specific uncoupling protein (UCP3) and superoxide dismutase (SOD2) contents in vastus lateralis of young, healthy men. Majerczak J, Rychlik B, **Grzelak A**, Grzmil P, Karasinski J, Pierzchalski P, Pulaski L, Bartosz G, Zoladz JA. *J Physiol Pharmacol*. 2010; 61(6): 743-51.
11. Magnesium content, total antioxidant status and lipid peroxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Brucka-Jastrzebska E, Kawczuga D, **Grzelak A**, Bartosz G. *Magnes Res*. 2009; 22(4): 273-9.

(5) Kontynuowałam badania dotyczące mechanizmów reakcji wolnorodnikowych w zdefiniowanych układach chemicznych oraz w na poziomie komórkowym i organizmalnym:

12. A drastic superoxide-dependent oxidative stress is prerequisite for the down-regulation of IRP1: Insights from studies on SOD1-deficient mice and macrophages treated with paraquat. Milczarek A, Starzyński RR, Styś A, Jończy A, Staroń R, **Grzelak A**, Lipiński P. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0176800. doi: 10.1371/journal.pone.0176800.
13. The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes. **Grzelak A**, Kruszewski M, Macierzyńska E, Piotrowski Ł, Pulaski Ł, Rychlik B, Bartosz G. *Cell Mol Biol Lett*. 2009; 23-34. doi: 10.2478/s11658-008-0031-8.
14. Interaction between antioxidants in assays of total antioxidant capacity. Błaż A, Pilaszek T, **Grzelak A**, Dragan A, Bartosz G. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(7): 2365-8. doi: 10.1016/j.fct.2008.03.018.
15. Melatonin does not affect total antioxidant capacity of blood plasma in vitro. **Grzelak A**, Bartosz G. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005; 77-81.

(6) Podczas realizacji projektu TESTOPLEK byłam zaangażowana w organizację rekrutacji ochotników do badań populacyjnych oraz walidację i kontrolę pobranego materiału biologicznego oraz zebranych danych ankietowych, a także byłam zaangażowana w tworzenie bazy danych antropometrycznych z których obecnie korzystają liczne jednostki naukowe. Efektem tego aspektu mojej działalności jest praca:

16. Association between body height and month of birth among women of European origin in northern and southern hemispheres. Rosset I, Żądzińska E, Strapagiel D, **Grzelak A**, Henneberg M. *Am J Hum Biol*. 2017; 29(3).

6. Dane bibliometryczne (według Web of Science)

Liczba publikacji: 36
Indeks Hirscha: 12
Liczba cytowań: 502 (bez autocytowań 489)
Liczba cytowań dotyczących osiągnięcia: 60

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-9695-6693>

Agnieszka Grzelak

141 W. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 100-108 (2001)

142 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 109-117 (2001)

143 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 118-126 (2001)

144 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 127-135 (2001)

145 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 136-144 (2001)

146 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 145-153 (2001)

147 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 154-162 (2001)

148 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 163-171 (2001)

149 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 172-180 (2001)

150 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 181-189 (2001)

151 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 190-198 (2001)

152 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 199-207 (2001)

153 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 208-216 (2001)

154 J. Knapik, *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 217-225 (2001)