

Załącznik Z-1a

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: **Anita Krokosz**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktor nauk biologicznych **Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 2000**
Dyscyplina: biofizyka

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Zmiany strukturalne błony plazmatycznej erytrocytów człowieka w procesie nabywania radiooporności pod wpływem niskich dawek promieniowania jonizującego*”

Promotor: prof. dr hab. Zofia Szweda-Lewandowska

Magister chemii **Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 1992**

Tytuł rozprawy magisterskiej: „*Badanie polarograficznej aktywności wybranych związków fosfonowych*”

Promotor: dr hab. Włodzimierz Jędrzejewski, prof. UŁ

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Adiunkt (2000-obecnie) Zakład Radiobiologii Katedry Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Asystent (1992-2000) Katedra Biofizyki, po reorganizacji w 1993 r. Zakład Radiobiologii Katedry Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki, Łódź

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. nr 65, poz. 595 ze zm.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Ocena możliwości zastosowania fulerenolu C₆₀(OH)₃₆ i innych hydroksyzwiązków do ochrony przed stresem oksydacyjnym generowanym radiacyjnie i chemicznie”

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie jednotematycznego cyklu publikacji. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zawarte są w Załączniku Z-3. Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znajdują się w katalogu Z-Prace.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Prace oryginalne:

1. **Krokosz A.** The effect of hypochlorite on human erythrocytes pretreated with X-radiation.

- Cell. Mol. Biol. Lett.* 2003. 8 (1), 215-219; IF(2003) 0,455; IF(aktualny) 1,953; MNiSW 15.
2. **Krokosz A**, Szweda-Lewandowska Z. Changes in the activity of acetylcholinesterase and Na,K-ATPase in human erythrocytes irradiated with X-rays. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2005. 10, 471-478; IF(2005) 0,829; IF(aktualny) 1,953; MNiSW 15.
 3. **Krokosz A.**, Koziczak R., Gonciarz M. and Szweda-Lewandowska Z. Study of the effect of dose-rate on radiation-induced damage to human erythrocytes. *Radiat. Phys. Chem.*, 2006. 75, 98-105; IF(2006) 0,870; IF(aktualny) 1,375; MNiSW 20.
 4. **Krokosz A**, Rodacka A, Szweda-Lewandowska Z, Puchala M. Wpływ wybranych alkoholi na uszkodzenia erytrocytów człowieka inicjowane RFT. w monografii „Błony Biologiczne”, red. J. Gabrielska i P. Misiak, 2008, 225-228, ISBN 978-83-926758-0-8; MNiSW 4.
 5. Grebowski J, **Krokosz A**, Puchala M. Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene, *BBA Biomembranes* 2013a, 1828(2), 241-248; IF(2011) 3,990; IF(aktualny) 3,389; MNiSW 35.
 6. Grebowski J, **Krokosz A**, Puchala M. Fullerenol C₆₀(OH)₃₆ could associate to band 3 protein of human erythrocyte membrane. *BBA Biomembranes* 2013b, 1828(9), 2007-2014; IF 3,389; MNiSW 35.

Praca przeglądowa:

7. **Krokosz A**. Fulereny w biologii. *Postępy Biochemii*, 2007. 53(1), 91-96; MNiSW 5.

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

Celem prowadzonych przeze mnie badań, składających się na monotematyczny cykl publikacji, było określenie mechanizmu działania promieniowania jonizującego o niskiej wartości LET (promieniowanie gamma i promieniowanie X (200 kV)) i wybranych związków chemicznych o działaniu pro- i antyoksydacyjnym na erytrocyty człowieka w warunkach przedłużonej inkubacji. Poszukiwania nowych, skutecznych związków chroniących komórki przed szkodliwym działaniem promieniowania jonizującego i nie powodujących znaczących działań ubocznych wynikają z coraz szerszego zastosowania promieniowania jonizującego w życiu człowieka.

Szczególne znaczenie ma to dla diagnostyki medycznej i radioterapii. Istotna wydaje się możliwość zmniejszenia niekorzystnych skutków działania promieniowania jonizującego na pacjenta oraz personel. Ponadto promieniowanie jonizujące ma szereg zastosowań przemysłowych, gdzie istnieje ryzyko narażenia człowieka na podwyższone dawki promieniowania jonizującego.

Z drugiej strony, w radioterapii poszukuje się związków chemicznych pozwalających zmniejszyć dawki terapeutyczne promieniowania i leków przeciwnowotworowych.

Promieniowanie jonizujące, o niskiej gęstości jonizacji, w organizmach żywych oddziałuje głównie pośrednio przez rodnikowe produkty radiolizy wody: rodnik hydroksylowy $\cdot\text{OH}$, anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\cdot-}$ i nadtlenek wodoru H_2O_2 .

Skutki biologiczne działania promieniowania jonizującego zależą od wielu czynników m. in. : mocy dawki, dawki pochłoniętej jednorazowo, rodzaju promieniowania i rodzaju komórek.

W pierwszym etapie prac określono **wpływ mocy dawki na radiacyjne uszkodzenia erytrocytów** (Krokosz i wsp., 2006 [3]). Moc dawki jest jednym z podstawowych czynników fizycznych determinujących efekty działania promieniowania jonizującego na układy biologiczne (Hall, 1972, 1991). Wraz z obniżaniem mocy dawki, a tym samym wydłużaniem czasu napromieniania dla określonej dawki całkowitej, biologiczne skutki działania promieniowania są mniejsze. Zjawisko to tłumaczy się istnieniem napraw uszkodzeń subletalnych podczas wydłużonego czasu ekspozycji (Bedford and Mitchell, 1973; Hall, 1991; Vral i wsp., 1992; Wells i Bedford, 1983). Jednak istnieją również doniesienia o efekcie odwrotnym, tzn. wzroście uszkodzeń wraz z obniżaniem mocy dawki (Amundson and Chen, 1996; Konings, 1979; Stark, 1991). W przypadku peroksydacji lipidów inicjowanej promieniowaniem jonizującym, efekt został dobrze opisany i jest wynikiem wolnorodnikowego mechanizmu reakcji (Stark, 1991). Obserwowano go również dla białek napromieniowanych w obecności lipidów (Koufen et al., 2000; Hitschke et al., 1994). Jednak, w przypadku komórek, występowanie odwróconego efektu mocy dawki (inverse dose-rate effect) jest uzależnione od kilku czynników m.in. wydajności napraw uszkodzeń subletalnych czy fazy cyklu komórkowego. Stąd celem badań było określenie czy moc dawki jest czynnikiem determinującym poziom uszkodzeń w prostym układzie komórkowym, tj. w bejądrzastych erytrocytach człowieka.

Wyniki uzyskane przeze mnie wskazują, że moc dawki jest czynnikiem modyfikującym odpowiedź erytrocytów człowieka na promieniowanie gamma. Wykazałam, że procesy takie jak: hemoliza, peroksydacja lipidów błonowych, zwiększanie płynności dwuwarstwy lipidowej, uszkodzenie białek błonowych i poziom utlenionej hemoglobiny zależą od mocy dawki. Procesy te monitorowano następującymi metodami: spektrofotometrycznie: hemolizę, na podstawie ilości uwolnionej hemoglobiny; peroksydację lipidów, na podstawie ilości produktów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS); poziom utlenionej Hb na podstawie przyrostu absorbancji przy 630 nm. Płynność dwuwarstwy lipidowej i poziom uszkodzenia białek błonowych oceniano za pomocą sond i znaczników spinowych. Zmiany w wartościach parametrów opisujących wymienione procesy wskazują na zwiększony poziom uszkodzeń komórkowych w erytrocytach wraz z obniżaniem mocy dawki.

W pracy analizowano przebieg procesów zainicjowanych działaniem promieniowania gamma o mocach dawki: $1,5 \text{ kGyh}^{-1}$, $2,2 \text{ kGyh}^{-1}$ i $4,0 \text{ kGyh}^{-1}$. Z krzywych dawka-efekt dla hemolizy

(zależność $\log(\text{frakcja niezhemolizowana})$ od dawki) wyznaczono parametry opisujące te krzywe i pozwalające ocenić wpływ mocy dawki, tzn. D_q – dawkę rzekomoprogową (dawkę wyznaczoną z przecięcia eksponencjalnej części krzywej z osią dawki), D_0 – odwrotność współczynnika kierunkowego odcinka prostoliniowego $1/k$, gdzie k można zdefiniować jako stałą szybkości hemolizy i D_{37} – dawkę, która inicjuje hemolizę 63% erytrocytów ($D_{37}=D_0+D_q$). Dawka D_q wzrasta z 1,46 kGy dla mocy dawki $1,5 \text{ kGyh}^{-1}$ do 4,13 kGy dla mocy dawki $4,0 \text{ kGyh}^{-1}$. Podobnie zmienia się parametr D_{37} . Natomiast D_0 maleje wraz ze wzrostem mocy dawki z 0,74 kGy do 0,33 kGy.

Hemolizę poprzedzała intensywna peroksydacja lipidów, której intensywność i poziom wzrastał wraz z obniżaniem mocy dawki. Dla dawki 1,5 kGy poziom peroksydacji lipidów był dwukrotnie wyższy przy mocy dawki $1,5 \text{ kGyh}^{-1}$ niż przy $4,0 \text{ kGyh}^{-1}$. Wyniki te wskazują na istnienie odwróconego efektu mocy dawki zarówno dla przeżycia erytrocytów, jak peroksydacji lipidów. Jednak szybkość hemolizy wykazuje prosty efekt mocy dawki.

Pomiary płynności dwuwarstwy lipidowej, w zakresie dawek przedhemolitycznych, metodą EPR wykazały, że mniejsza moc dawki wywołuje znaczniejsze upłynnienie dwuwarstwy lipidowej w obszarze hydrofobowym błony plazmatycznej erytrocytów, co koreluje ze zwiększoną peroksydacją lipidów dla mniejszych mocy dawki. Podobny efekt zwiększenia uszkodzeń ze zmniejszeniem mocy dawki zaobserwowano dla zmian w konformacji białek błonowych, które oznaczano metodą EPR z użyciem znacznika spinowego MSL.

Intensywność procesów wewnątrzkomórkowego utleniania oceniano na podstawie poziomu utlenionej hemoglobiny (MetHb) i glutationu w formie zredukowanej. Dla niższej mocy dawki obserwowano zwiększoną intensywność utleniania hemoglobiny. Dla dawki pochłoniętej 2,5 kGy poziom MetHb wynosił odpowiednio około 35%, 20% i 10%, dla mocy dawek 1,5, 2,2 i $4,0 \text{ kGyh}^{-1}$.

Jedynym parametrem, który nie zależał od mocy dawki był poziom glutationu zredukowanego (GSH). Spadał on wykładniczo ze wzrostem dawki.

Uzyskane wyniki potwierdziły po raz pierwszy, że odwrócony efekt mocy dawki (inverse dose-rate effect) występuje także w komórkach beźjadrzastych przy mocach dawek rzędu kGy, a nie tylko w roztworach biocząsteczek co obserwowano wcześniej (Stark, 1991; Koufen i wsp., 2000). Prace prowadzone w naszym laboratorium wykazały, że hemoliza erytrocytów napromieniowanych dawką podzieloną na dwie frakcje, z przerwą pomiędzy kolejnymi ekspozycjami, była niższa w porównaniu z hemolizą wywołaną taką samą dawką, ale podaną jednorazowo (Zaborowski i Szweda-Lewandowska, 1997; Koziczak i wsp., 1999, 2003, Szweda-Lewandowska i wsp., 2003). Efekt obserwowano zarówno w warunkach tlenowych jak też beztlenowych. Sugerowano, że relatywnie niskie dawki promieniowania jonizującego wywołują

zmiany strukturalne i/lub funkcjonalne w erytrocytach, które czynią erytrocyty bardziej opornymi na następną dawkę promieniowania.

W kolejnej pracy badałam **wpływ promieniowania X na hemolizę erytrocytów człowieka indukowaną podchlorynem sodu** (Krokosz, 2003 [1]).

Ekspozycja erytrocytów na podchloryn sodu prowadzi do pęcznienia komórek, formowania echinocytów i hemolizy. Towarzyszy temu inhibicja ATPaz jonozależnych, Na^+, K^+ -ATPazy i Mg^{2+} -ATPazy oraz utlenianie grup tiolowych białek błonowych (Zavodnik i wsp., 2001).

Grupy tiolowe białek oraz glutation są preferowanymi tarczami dla podchlorynu (Pullar i wsp., 2000). Zarówno podchloryn, jak promieniowanie jonizujące inicjują procesy utleniania biomolekuł. Interesującym stało się zagadnienie, czy efekt obniżania radiacyjnie indukowanej hemolizy po zadziałaniu odpowiednio dobranej dawki promieniowania jonizującego będzie obserwowany również dla hemolizy wywołanej czynnikiem chemicznym. Krytycznymi czynnikami wystąpienia efektu radiooporności były wielkość pierwszej dawki oraz czas pomiędzy dawkami. Największe obniżenie hemolizy indukowanej radiacyjnie zaobserwowano dla dawki wstępnej 400 Gy i czasu pomiędzy dawkami wynoszącego 3-3,5 godz. (Zaborowski i Szveda-Lewandowska, 1997; Koziczak i wsp., 1999). W swojej pracy zbadałam wpływ wstępnego napromieniowania promieniowaniem X w dawkach 40, 200 i 400 Gy na hemolizę erytrocytów człowieka wywołaną NaClO w stężeniu 0,250 mM. Zaobserwowałam, że hemoliza erytrocytów wstępnie napromieniowanych dawką 400 Gy i inkubowanych 3 godz. przed dodaniem podchlorynu była prawie dwukrotnie niższa niż erytrocytów wstępnie nienapromieniowanych i wynosiła odpowiednio 13% i 22%. Efekt był zależny od czasu pomiędzy napromieniowaniem i dodaniem podchlorynu. Dla przerwy wynoszącej 1 lub 4 godz. obserwowano obniżenie hemolizy lecz w mniejszym stopniu. Względna hemoliza erytrocytów wstępnie napromieniowanych (400 Gy) wynosiła około 80% hemolizy erytrocytów traktowanych wyłącznie podchlorynem zarówno dla przerwy 1- jak 4-godzinnej.

Wstępne napromieniowanie erytrocytów dawkami mniejszymi, 40 Gy lub 200 Gy, prowadziło do zwiększenia hemolizy inicjowanej podchlorynem. Dla dawki wstępnej 40 Gy hemoliza inicjowana podchlorynem wynosiła 27%, gdy dla erytrocytów traktowanych wyłącznie NaClO , 21%. Należy podkreślić, że wszystkie zastosowane dawki promieniowania nie inicjowały hemolizy. Nie obserwowano też podwyższenia utleniania Hb wewnątrz erytrocytów.

Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają, że promieniowanie jonizujące wywołuje w erytrocytach zmiany strukturalne i/lub funkcjonalne, które czynią erytrocyt bardziej oporny na działanie kolejnego czynnika utleniającego. Występowanie radiooporności w erytrocytach może być związane ze zmianami konformacyjnymi białek oraz uporządkowaniem lipidów błonowych oraz wzajemnym oddziaływaniem pomiędzy tymi komponentami błony plazmatycznej. W innych

pracach wykazałam, że istnieje nieliniowa zależność pomiędzy szeregiem parametrów charakteryzujących erytrocyt, np. płynnością dwuwarstwy lipidowej na różnych jej głębokościach, konformacją białek błonowych, aktywnością Na,K-ATPazy a dawką promieniowania (Szweda-Lewandowska i wsp., 2003; Krokosz i Szweda-Lewandowska, 2005 [2]). Wynika z tego, że oporność erytrocytów człowieka na inicjowaną podchlorynem hemolizę jest związana z istnieniem przejściowego, unikalnego stanu konformacyjnego błony plazmatycznej wywołanego przez ściśle określoną dawkę promieniowania. Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrapolacja efektów działania promieniowania dla niskich dawek z pomiarów wykonanych dla dawek wyższych często nie odpowiada rzeczywistej odpowiedzi komórek. Przykładem może być powstawanie odpowiedzi adaptacyjnej obserwowanej w wielu układach komórkowych (Miura i wsp., 2002; Krokosz, 2003 [1]). Innym przykładem jest zjawisko nadwrażliwości na niskie dawki promieniowania (HRS - hyperradiosensitivity) (Short i wsp., 2003; Wouters i wsp., 1996). Efekty te wiązano z uszkodzeniem DNA i jego udziałem w możliwych naprawach uszkodzeń oraz czynnikami kontrolującymi wierność naprawy DNA, szczególnie systemu odpowiedzialnego za obronę antyoksydacyjną. Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że w różnych warunkach napromieniowania można zaobserwować odmienne efekty działania promieniowania i nie muszą one bezpośrednio być powiązane z uszkodzeniem DNA.

Kolejna praca dotyczy **wpływu promieniowania X na aktywność wybranych enzymów błony erytrocytarnej** (Krokosz i Szweda-Lewandowska, 2005 [2]). Erytrocyty człowieka nie posiadają jądra komórkowego i są znacznie bardziej odporne na działanie promieniowania jonizującego niż komórki jądrzaste. Dlatego też zmiany w aktywności enzymów błonowych, acetylocholinoesterazy (AChE) i Na,K-ATPazy, wybrano jako czuły wskaźnik zmian inicjowanych promieniowaniem. Zastosowano dawki 40, 200, 400 i 600 Gy. Dawki te, w warunkach doświadczenia, nie inicjowały hemolizy, utleniania hemoglobiny, ani peroksydacji lipidów. Dawka 600 Gy w niewielkim stopniu obniżała oporność osmotyczną, zwiększając C_{50} z 59 mM do 64 mM. Z krzywych Lineweaver'a-Burka dla acetylocholinoesterazy wyznaczono V_{max} i K_m . Dawki 40 i 200 Gy nie wpływały na prędkość maksymalną enzymu, natomiast dalsze zwiększanie dawki spowodowało znaczną inhibicję AChE. Dawka 600 Gy obniżała V_{max} do 33% wartości wyjściowej. Powinowactwo enzymu do substratu obniżało się dla dawki 200 Gy (K_m wyższe o 58% wartości wyjściowej), natomiast 40 Gy nie wpływało na ten parametr. Dla wyższych dawek promieniowania, ze względu na utratę aktywności przez enzym, obserwowano pozorny wzrost powinowactwa enzymu (spadek wartości K_m). Aktywność Na,K-ATPazy nieznacznie wzrastała do dawki 200 Gy, dla której osiągnęła 114% wartości próby nienapromieniowanej. Następnie aktywność zmniejszała się wraz z dawką, osiągając 94% kontroli dla dawki 600 Gy.

Uzyskane wyniki wskazują, że obydwie enzymy błonowe wykazują odmienną wrażliwość na napromieniowanie w zakresie dawek przedhemolitycznych. Różnice te mogą wynikać z różnic w strukturze obydwu białek oraz z ich umiejscowienia w błonie erytrocytarnej. Ponadto, aktywność Na,K-ATPazy w dużym stopniu zależy od, łatwo ulegających utlenieniu, grup tiolowych białka, natomiast AChE nie posiada grup tiolowych w centrum aktywnym (Harel i wsp., 1993; Soszyński i wsp., 1996). Z drugiej strony wiadomo, że na aktywność AChE erytrocytarnej wpływa hydrofobowe środowisko błony, w którym jest zakotwiczona i oddziaływania białko-lipidy. Oddziaływanie białko-lipid zależy od płynności dwuwarstwy lipidowej. Na aktywność AChE, która jest glikoproteiną, wpływa także ładunek powierzchniowy błony plazmatycznej (Klajnert i wsp., 2004). Dalsze badania prowadzone w naszym zespole wykazały, że dawki promieniowania do 600 Gy prowadzą do zwiększenia płynności dwuwarstwy lipidowej w obszarze hydrofobowym błony oraz zmiany konformacji białek błonowych (Koziczak i wsp., 2003; Krokosz i Szveda-Lewandowska, 2006), co może wpływać na aktywność enzymów błonowych.

Biorąc pod uwagę fakt, że efekty związane z działaniem promieniowania jonizującego w układach biologicznych związane są głównie ze wzrostem stresu oksydacyjnego związanego z generowaniem reaktywnych form tlenu (RFT), substancje o działaniu antyoksydacyjnym powinny modyfikować odpowiedź na promieniowanie jonizujące oraz inne czynniki generujące stres oksydacyjny w komórkach.

W swoich badaniach skupiłam się na hydroksyzwiązkach zawierających od jednej do 36 grup hydroksylowych. Były to etanol (C_2H_5OH), mannitol ($C_6H_8(OH)_6$) i fulerenol ($C_{60}(OH)_{36}$).

Etanol i mannitol są wydajnymi zmiataczami reaktywnych form tlenu. Etanol przenika do komórek i jest w nich metabolizowany (Mesquita i wsp., 1999; Tyulina i wsp., 2006). Jest powszechną używką i rozpuszczalnikiem wielu preparatów podawanych ludziom oraz stosowanych w laboratorium. W wysokich stężeniach (M) powoduje denaturację białek, rozpuszcza fazę lipidową błon komórkowych i prowadzi do śmierci komórek (Das i Vasudevan, 2007; Akkus i wsp., 1997). Jednak w stężeniach, które mogą występować w organizmie człowieka, rzędu mM, efekty jego działania mogą być odmienne.

Mannitol nie wnika do komórek i nie jest metabolizowany w organizmie. W wysokich stężeniach (20%, około 1 M) jest podawany pacjentom w celu obniżenia ciśnienia śródczaszkowego. W radioterapii jest stosowany do zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg, co jest przydatne w diagnostyce i leczeniu guzów mózgu (Adam i wsp., 2005; Bermueller i wsp., 2006).

Celem kolejnej pracy było **określenie wpływu mannitolu i etanolu na uszkodzenia erytrocytów człowieka przez RFT generowane radiacyjnie oraz podczas przedłużonej inkubacji* (głodzenia)** (Krokosz i wsp., 2008 [4]).

Mannitol (5-100 mM) dodany do zawiesiny erytrocytów tuż po zakończeniu napromieniowania dawką 400 Gy zmniejszał poradiacyjną hemolizę, gdy jego stężenie było wyższe od 20 mM. Najbardziej wyraźny efekt zaobserwowano dla stężenia 100 mM, gdy hemoliza osiągnęła 13 % po 48 godz. inkubacji w porównaniu z 44% dla napromieniowanych erytrocytów inkubowanych bez mannitolu. Analiza cytometryczna pokazała, że mannitol nie hamował pęcznienia erytrocytów, ale zapobiegał uwalnianiu hemoglobiny. Mannitol, dzięki obecności 6 grup hydroksylowych, może oddziaływać elektrostatycznie z powierzchnią błony plazmatycznej i uszczelniać powstające pory (Beutler i Kuhl, 1988). Potwierdzeniem tego mechanizmu oddziaływania jest również brak ochronnego wpływu na degradację spektryny i białka pasma 3 oraz tworzenie agregatów białkowych w błonie erythrocytarnej (oznaczane metodą SDS-PAGE).

Etanol (0,5-60 mM) nie wpływał na poziom hemolizy inicjowanej przechowywaniem erytrocytów ani na ich wielkość. W nieznaczny sposób wpływał na kształt erytrocytów.

Etanol hamował natomiast utlenianie hemoglobiny i utlenianie glutationu. Podobnie do mannitolu, etanol nie wpływał na degradację spektryny i białka pasma 3 ani na tworzenie agregatów białkowych w błonie erythrocytarnej.

Uzyskane wyniki wskazują na różnice w oddziaływaniu badanych alkoholi wynikające z ich budowy chemicznej i różnic w metabolizmie. Etanol w stężeniu 60 mM, co odpowiada stężeniu procentowemu 0,28%, nie prowadzi do zwiększenia uszkodzeń w erythrocytach, a ponadto chroni przed procesami wewnątrzkomórkowego utleniania.

Kolejnym **hydroksywiązkiem, którego efekty działania badałam jest fulerenol** $C_{60}(OH)_{36}$. Fulerenole to hydroksylowe pochodne fulerenów. Fulereny są odmianą alotropową węgla, w której atomy węgla tworzą regularne struktury przypominające swoim wyglądem piłkę futbolową. Najtrwalszą z nich jest C_{60} składająca się z 20 pierścieni 6-członowych i 12 5-członowych. Stwierdzono także istnienie struktur C_{70} , C_{76} , C_{82} i większych. Fulerenole (polihydroksyfulereny, fulerole) $[C_{60}(OH)_n]$ są skutecznymi zmiataczami wolnych rodników generowanych w warunkach stresu oksydacyjnego w komórkach. Ta właściwość powoduje, że fulerenole ($C_{60}(OH)_n$, $n=18-24$) okazały się grupą związków o działaniu antyoksydacyjnym, działają kardioprotekcyjnie, hepatoprotekcyjnie i neuroprotekcjnie (omówione w Krokosz, 2007 [7], Grębowski i wsp., 2013c, 2013d). Ponadto, ze względu na kapsułkową budowę fulerenoli i obecność grup hydroksylowych na powierzchni węglowej klatki, dostrzega się również możliwość zastosowania ich w diagnostyce medycznej do przenoszenia związków kontrastujących oraz do transportu leków. Jednak w niektórych układach badawczych fulerenole mogą również wykazywać charakter prooksydacyjny i działać toksycznie (Roberts i wsp., 2008; Wielgus i wsp., 2010; Shimizu i wsp., 2013). Zależy to m.in. od liczby grup $-OH$ przyłączonych

do klatki fulereny. Fulerenole wysokohydroksylowane (24 lub więcej grup –OH) są mniej toksyczne od fulerenoli z niewielką liczbą grup –OH (poniżej 12).

Moje badania skupiły się na wysokohydroksylowanym fulerenolu z liczbą grup powyżej 30. Badania jego **wplywu na erytrocyty i bialka błony erytrocytarnej** (Grębowski i wsp., 2013a [5]) wykazały, że fulerenol adsorbuje się do błon erytrocytarnych i powoduje wzrost płynności błony plazmatycznej, zarówno w hydrofilowej warstwie powierzchniowej jak też wewnątrz obszaru hydrofobowego. W badaniach tych zastosowano znaczniki fluorescencyjne ANS, TMA-DPH i DPH. Według Shinitzky i Barenholz (1978), anizotropia jest odwrotnie proporcjonalna do płynności błony. Spadek anizotropii następował w obecności fulerenolu ($100\text{-}150\text{ mg/dm}^3$) dla wszystkich znaczników, natomiast stężenie 50 mg/dm^3 obniżało tylko anizotropię ANS lokującego się w powierzchniowych warstwach błony. Odplukanie fulerenolu roztworem PBS powodowało zanik oddziaływania fulerenolu dla znaczników z płytszych obszarów błony, ANS i TMA-DPH. Wskazuje to na wiązanie się fulerenolu z błoną poprzez słabe wiązania oparte na oddziaływaniach elektrostatycznych, wiązania wodorowe, oddziaływania dwubiegunowe i wiązania van der Waalsa.

Natomiast anizotropia DPH pozostawała obniżona pomimo odplukania fulerenolu co świadczy o wnikanii fulerenolu do hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy lipidowej błony.

Moje badania potwierdzają wcześniejsze wyniki uzyskane metodami modelowania molekularnego (Qiao i wsp., 2007), że fulerenol jest w stanie wnikać w głąb błony plazmatycznej, chociaż transport ten jest znacznie bardziej utrudniony w porównaniu z niepodstawionym fulerenem. Badania Qiao i wsp. (2007) wykazały, że czas przenikania $C_{60}(\text{OH})_{20}$ przez modelową błonę komórkową z dipalmitylofosfatydylocholino (DPPC) jest 9 rzędów wielkości dłuższy niż czas przenikania C_{60} . Uzyskane wyniki pozostają też w zgodzie z danymi uzyskanymi przez Monticelli i wsp., (2009), które potwierdzają, że hydrofilowe cząsteczki $C_{60}(\text{OH})_{20}$ silniej od C_{60} adsorbują się do głów fosfolipidowych w błonie plazmatycznej.

Możliwość wiązania się fulerenolu z błoną erytrocytarną potwierdziłam w doświadczeniu, w którym cienie erytrocytów inkubowano z fulerenolem przez 1 godz. w $37\text{ }^\circ\text{C}$. Ilość fulerenolu związanego z błoną była proporcjonalna do stężenia fulerenolu i odwrotnie proporcjonalna do koncentracji cieni erytrocytów. Przy stężeniu fulerenolu 150 mg/dm^3 i koncentracji cieni 1 mg/ml ilość związanego fulerenolu wynosiła $6,76\text{ }\mu\text{g/mg}_{\text{białka błon}}$ a przy stężeniu fulerenolu 50 mg/dm^3 i tej samej koncentracji cieni $2,50\text{ }\mu\text{g/mg}_{\text{białka błon}}$. Ma to związek prawdopodobnie z faktem, że zwiększanie koncentracji cieni zwiększa lepkość zawiesiny i hamuje dyfuzję fulerenolu do wnętrza błony plazmatycznej. Xiao i wsp., [31] sugerowali, że za wnikanie fulerenolu do błon są odpowiedzialne pewne białka, z którymi fulerenol się wiąże tworząc koniugaty, które mogą wnikać do komórki. Inni autorzy (Kam i wsp., 2006; Su i wsp., 2010; Iversen i wsp., 2011)

sugerowali, że ze względu na wielkość cząsteczki fulerenolu, endocytoza jest mechanizmem odpowiedzialnym za transport fulerenolu przez błony plazmatyczne.

Białka błonowe wykazujące aktywność ATPazową, które są odpowiedzialne za utrzymanie gradientu stężeń kationów po obydwu stronach błony kosztem hydrolizy ATP, odgrywają bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu komórki. Wśród ATPaz transportowych warto podkreślić rolę Na/K-ATPazy, która transportuje kationy Na^+ na zewnątrz i K^+ do wnętrza komórki (Vasic i wsp., 2008) oraz rolę Ca-ATPazy, która odpowiada za transport kationów Ca^{2+} na zewnątrz komórki (Di Leva i wsp., 2008). Obydwa białka wymagają obecności kationów Mg^{2+} do funkcjonowania (Dzneladze i wsp., 2012). Zaburzenie funkcjonowania Na/K-ATPazy prowadzi do bardzo poważnych skutków dla komórki. Inicjuje apoptozę lub „mieszana” śmierć komórki. Obniżenie stężenia K^+ wewnątrz komórki prowadzi do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , które jest ekscytotoksyczne i prowadzi do nekrotycznej śmierci neuronów (Yu, 2003).

Kolejnym etapem badań było więc, określenie wpływu fulerenolu na aktywność Na/K-ATPazy, Ca-ATPazy i Mg-ATPazy (metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar uwalniania fosforanu nieorganicznego z ATP (P_i)). Zaobserwowałam, że fulerenol silnie hamuje aktywność wszystkich badanych ATPaz jonozależnych. Przy stężeniu fulerenolu 50 mg/dm^3 aktywność ATPaz spadała o 50-60% wartości otrzymanej dla prób bez fulerenolu. Zwiększenie stężenia fulerenolu do 150 mg/dm^3 powodowało spadek aktywności o 80%. Odplukanie fulerenolu miało niewielki wpływ na odzyskanie aktywności przez Na/K-ATPazę i Ca-ATPazę. Aktywność zwiększała się o 8-14%. Natomiast odplukanie nie miało żadnego wpływu na aktywność Mg-ATPazy. Wyniki uzyskane przez innych badaczy dowodziły, że fulerenol hamował aktywność Mg-ATPazy mitochondrialnej, uniemożliwiając fosforylację ADP do ATP (Ueng i wsp., 1997). Zmiany funkcjonalne w ATPazach mogą wynikać z dwóch różnych efektów. Po pierwsze z bezpośredniego oddziaływania fulerenolu z białkami enzymatycznymi. Na/K-ATPaza jest tetramerem składającym się z dwóch katalitycznych podjednostek α i dwóch glikozylowanych podjednostek β (Brugnara, 1997). Podjednostki β odpowiadają za prawidłowe lokowanie enzymu w błonie oraz regulują aktywność podjednostek α (Antolovic, 2006). Cząsteczki fulerenolu wnikając do błony plazmatycznej mogą oddziaływać z glikozylowanymi podjednostkami β wpływając na aktywność enzymu. Sugestię tę popierają wyniki Calvaresi i Zerbetto (2010), którzy metodami modelowania molekularnego wykazali możliwość blokowania ATPaz poprzez oddziaływanie z fulerenolami. Innym wyjaśnieniem utraty aktywności przez ATPazy może być zmiana mikrolepkości błony przez fulerenol, a w konsekwencji zmiana konformacji białka i jego aktywności (Mozzanti i wsp., 1992). Inhibicja Na,K-ATPazy w erytrocytach prowadzi do zaburzenia równowagi jonowej i osmotycznej hemolizy (Krokosz i Szweda-Lewandowska, 2006). Podobne wyniki uzyskali Ciołkowski i wsp. (2012) badając wpływ dendrymerów PAMAM-OH

na aktywność ATPaz jonozależnych w błonach erytrocytarnych. Autorzy ci wykazali, że wiązania wodorowe pomiędzy grupami –OH dendrymeru i powierzchnią błony są odpowiedzialne za obserwowane przez nich zmiany aktywności ATPaz. Fulerenol ma sferyczny kształt i dużą liczbę grup –OH na powierzchni, więc podobne efekty mogą być odpowiedzialne za obserwowane przeze mnie zmiany w aktywności ATPaz.

Dalsze badania dotyczyły **wpływu fulerenolu na erytrocyty w warunkach stresu indukowanego przedłużoną inkubacją*** (Grębowski i wsp., 2013 [6]). W celu określenia wpływu fulerenolu na integralność błony erytrocytarnej, komórki inkubowano z fulerenołem 50–150 mg/dm³ w 37 °C przez 3 i 48 godz. Określono poziom hemolizy i wpływ jonów potasu (metodą emisyjnej spektrometrii atomowej). Inkubacja prób przez 3 godz. nie prowadziła do hemolizy ani do zwiększonego uwalniania jonów K⁺. Przedłużona, 48 godz. inkubacja prowadziła do autohemolizy erytrocytów i wycieku jonów K⁺. Fulerenol obecny w zawiesinie erytrocytów powodował niewielkie, zależne od stężenia obniżenie autohemolizy. Dla stężenia 150 mg/dm³ efekt ochronny wynosił 20,3% hemolizy próby inkubowanej bez fulerenolu. Podobne wyniki uzyskano dla wycieku K⁺. Dla 150 mg/dm³ fulerenolu, ilość potasu uwolnionego z erytrocytów była niższa o 21,6%. Wyciek potasu z erytrocytów wynika z zaburzenia transportu aktywnego K⁺ spowodowanego uszkodzeniem Na,K-ATPazy lub brakiem ATP, które mogą wystąpić podczas przedłużonej inkubacji erytrocytów (Krokosz i wsp., 2013a). Moje wcześniejsze badania (Grębowski i wsp., 2013a [5]) wykazały, że fulerenol hamuje aktywność Na,K-ATPazy w wyniku bezpośredniego oddziaływania i poprzez zmniejszenie mikrolepkości błony plazmatycznej. Inhibicja Na,K-ATPazy w erytrocytach prowadzi do zaburzenia równowagi jonowej i osmotycznej hemolizy (Krokosz i Szweda-Lewandowska, 2005 [2]; Krokosz i Szweda-Lewandowska, 2006). Jednak w przypadku fulerenolu, pomimo hamowania przez niego ATPaz jonozależnych, zaobserwowano niewielki efekt ochronny dla hemolizy i wycieku K⁺. Blokowanie wycieku K⁺ można wyjaśnić sterycznym blokowaniem kanałów potasowych przez cząsteczki fulerenolu. Podobny efekt obserwowano dla fulerenu i nanorurek, dla których efekt „blokowania” był zależny od wielkości i kształtu nanocząstek (Park i wsp., 2003) oraz dla alkoholu wielowodorotlenowego, mannitolu (Krokosz i wsp., 2008 [4]). Kanały jonowe mogą być otoczone przez cząsteczki fulerenolu w wyniku oddziaływań elektrostatycznych i w ten sposób wpływać na wymianę jonową.

W celu określenia wpływu fulerenolu na białka błonowe zastosowano elektroforezę SDS-PAGE w warunkach redukujących i nieredukujących. Inkubacja cieni erytrocytów z fulerenołem w stężeniu do 100 mg/dm³ przez 3 godz. nie powodowała żadnych zmian w profilu elektroforetycznym białek błonowych. Jednak inkubacja z fulerenołem w stężeniu 150 mg/dm³ prowadziła do obniżenia frakcji odpowiadającej aktywie z jednoczesnym wzrostem frakcji

odpowiadającej białku pasma 3. Obserwacje te sugerują, że fulerenol może połączyć dwie cząsteczki aktyny, tworząc agregat o masie odpowiadającej białku pasma 3.

Wydłużenie inkubacji cieni erytrocytów do 48 godz. prowadziło do zaniku pasma białka 3 i pojawieniu się szerokiego pasma białek o niskiej masie cząsteczkowej (smużenia). Spowodowane to było fragmentacją białka pasma 3 w wyniku proteolizy lub fragmentacji inicjowanej reaktywnymi formami tlenu (Rinalducci i wsp., 2012). Obecność podczas inkubacji fulerenolu we wszystkich zastosowanych stężeniach zapobiegała degradacji białka pasma 3, co może świadczyć o preferencyjnym wiązaniu się fulerenolu do tego białka błonowego, przez co nie ulega ono fragmentacji. Duża liczba grup $-OH$ na powierzchni fulerenolu daje możliwość do tworzenia wiązań zarówno z białkami cytoszkieletu jak i z innymi cząsteczkami np. lekami (Chaudhuri i wsp., 2009). Ta właściwość fulerenolu może być użyteczna do opracowania protokołu wykorzystującego erytrocyty jako przenośniki leków. Wykorzystanie związków z grupami funkcyjnymi posiadającymi silne powinowactwo do białek cytoszkieletu erytrocytów jako „kotwic” opisał Krantz, (1997). Białko pasma 3 jest głównym białkiem transportującym aniony w erytrocycie, odgrywa ważną rolę w transporcie tlenu przez erytrocyty i stanowi kotwicę dla wielu enzymów glikolitycznych i spektryny. Zmiany w białku pasma 3 wyzwalały sygnały w błonie, które prowadzą do usunięcia uszkodzonej komórki przez komórki Kupffera (D'Alessandro i wsp., 2010). Ponieważ fulerenol jest pokryty polarnymi grupami $-OH$ i może wiązać się do białka pasma 3, jest obiecującym związkiem do zastosowania jako „kotwica”/łącznik.

Inkubacja przez 48 godzin prowadzi do powstania niewielkiej ilości agregatów białek poprzez mostki $-S-S-$. Fulerenol tylko w najwyższym z użytych stężeń 150 mg/dm^3 zwiększał ilość agregatów. Agregaty te nie były redukowane przez ditiotreitól, co potwierdza możliwość asocjacji fulerenolu i białka. Fulerenol $C_{60}(OH)_{36}$, przez wiązanie się z białkiem pasma 3, nie tylko hamował jego degradację, ale również zaburzał wiązanie spektryny, białek pasma 4.1 i 4.2 oraz aktyny co prowadziło do zmian w cytoszkielecie. Zmiany te były widoczne w zmienionej morfologii erytrocytów monitorowanej za pomocą mikroskopii kontrastu fazowego i pomiarów cytometrycznych. Przedłużona inkubacja erytrocytów w $37 \text{ }^\circ\text{C}$ prowadzi do wyczerpania związków redukujących i zmian strukturalnych i funkcjonalnych w błonie, które również prowadzą do zmian w morfologii i wielkości erytrocytów. Na podstawie histogramów rozpraszania światła w obszarze kątów bocznych (SSC-A) stwierdziłam, że fulerenol w stężeniu 150 mg/dm^3 po 3 godz. inkubacji wpływał na kształt i zewnętrzną strukturę błony. Zmiany nasiliły się podczas przedłużonej inkubacji, kiedy już od stężenia 100 mg/dm^3 obserwowano obniżoną wartość parametru SSC-A. Natomiast fulerenol nie miał wpływu na wielkość erytrocytów ocenioną na podstawie histogramów rozpraszania światła w obszarze kątów czołowych (FSC-A).

Zmiany zaobserwowane za pomocą cytometrii przepływowej pozostawały w zgodzie z obserwacjami mikroskopowymi erytrocytów. Nie traktowane fulerenolem erytrocyty po 3 godz. inkubacji w 37 °C miały charakterystyczny kształt dyskocytów. Inkubacja z najwyższym stężeniem fulerenolu prowadziła do niewielkich zmian w postaci wypustek, które są typowe dla echinocytów. Przedłużona inkubacja prowadziła do transformacji echinocytarnej, którą fulerenol nasilał nieznacznie.

Powstawanie echinocytów jest wywoływane przez wiele czynników, w tym przez zmiany konformacji białka pasma 3. Biorąc pod uwagę, że fulerenol hamuje aktywność ATPazową (Grębowski i wsp., 2013a [5]), może również zaburzać dystrybucję lipidów pomiędzy zewnętrznym i wewnętrznym listkiem dwuwarstwy lipidowej, prowadząc do transformacji echinocytarnej (Seigneuret i Devaux, 1984). Zmieniona morfologia może także wynikać z oddziaływania nanocząstek fulerenolu z polarnymi głowami lipidów. Jednak przedstawione wyniki potwierdzają, że zmiany w morfologii erytrocytów wywoływane przez wysokie stężenia fulerenolu nie prowadzą do zwiększenia hemolizy i wycieku jonów potasu, nawet zapobiegając im w niewielkim stopniu.

* przedłużona inkubacja – inkubacja w czasie dłuższym niż 24 godz. w temp. 37°C.

Głównymi osiągnięciami prowadzonych przeze mnie badań są:

- wykazanie, że odwrócony efekt mocy dawki (inverse dose-rate effect) występuje w komórkach bezjądrzastych dla mocy dawek rzędu kGy, a nie tylko w roztworach biocząsteczek,
- wykazanie, że w bezjądrzastych erytrocytach człowieka odpowiednio dobrana dawka promieniowania jonizującego wywołuje oporność na działanie chemicznego czynnika utleniającego (podchlorynu sodu) poprzez zmiany w uporządkowaniu i funkcji błony plazmatycznej,
- scharakteryzowanie różnic w ochronnym działaniu powszechnie stosowanych w biologii i medycynie hydroksyzwiązków, mannitolu i etanolu, na zainicjowane RFT uszkodzenia erytrocytów,
- zaproponowanie mechanizmu oddziaływania wysoko hydroksylovanego fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z błoną plazmatyczną erytrocytów poprzez wiązanie się do białek transbłonowych,

- wykazanie ograniczonej możliwości zastosowania fulerenolu do ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym, ze względu na hamowanie aktywności ATPaz jonozależnych i zwiększanie płynności błony plazmatycznej,
- wykazanie możliwości wykorzystania fulerenolu jako łącznika pomiędzy błoną plazmatyczną a związkami o właściwościach biologicznych np. lekami, które mogą zostać przyłączone do cząsteczki fulerenolu.

Wykorzystanie wyników:

- uzyskane przeze mnie wyniki świadczą o wiązaniu się fulerenolu do białek transbłonowych erytrocytów co wskazuje na możliwość zastosowania fulerenoli jako łączników do przenoszenia substancji np. leków przez erytrocyty;
- dokładne poznanie mechanizmów działania fulerenoli może pozwolić na wykorzystanie go w radioterapii i chemoterapii do ochrony komórek prawidłowych i/lub jako uczulacza wzmagającego uszkodzenia komórek nowotworu;
- fulereny stanowią 30% wszystkich nanocząstek stosowanych w kosmetykach i są równie popularne jak nanosrebro, dokładne poznanie mechanizmów ich działania w różnych układach biologicznych, pomoże w planowaniu zakresu ich stosowania, doborze stężeń i kontroli ich uwalniania do środowiska naturalnego;
- badania dotyczące wpływu promieniowania jonizującego na układy biologiczne przyczyniły się do poszerzenia wiedzy dotyczącej efektów jego działania. Biorąc pod uwagę, że promieniowanie jonizujące ma szerokie zastosowanie w życiu człowieka, w terapii, diagnostyce medycznej, przemyśle i jako źródło energii dokładne poznanie mechanizmu jego działania przybliży nas do wyjaśnienia wielu radiacyjnych procesów np. zjawiska nadwrażliwości na niskie dawki promieniowania (HRS) albo nabywania radiooporności;
- zważywszy, że oddziaływanie promieniowania jonizującego na komórki w warunkach tlenowych, wiąże się z powstawaniem rodników $\text{OH}\cdot$ i $\text{O}_2^{\cdot-}$ oraz H_2O_2 w wyniku radiolizy wody, otrzymane w pracy wyniki mogą posłużyć do projektowania środków chroniących przed czynnikami generującymi wolne rodniki.

Powyższe wyniki badań, stanowiące główne osiągnięcie naukowe postępowania habilitacyjnego, przedstawiłam na posiedzeniu Komisji Biochemiczno-Biofizycznej Wydziału

Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w dniu 21 maja 2013 r. Tezy te zostały przyjęte jednomyślnie.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora:

Jestem absolwentką Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Studia ukończyłam w czerwcu 1992 r. uzyskując tytuł magistra chemii. Pracę magisterską pt.: „Badanie polarograficznej aktywności wybranych związków fosfonowych” wykonałam w Zakładzie Analizy Instrumentalnej pod kierunkiem prof. nadzw. UŁ dr hab. Włodzimierza Jędrzejewskiego.

W czasie studiów uczestniczyłam w działalności koła chemików i dwukrotnie wyjeżdżałam na wakacyjne obozy naukowe, w latach 1989 i 1990, na których badałam kwasowość gleby i wybranych stawów i cieków wodnych Karkonoskiego Parku Narodowego. Wyniki tych prac zostały opublikowane w rozdziale monografii (Jaskulska i wsp., 1990).

W październiku 1992 r. zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Biofizyki, po reorganizacji w Zakładzie Radiobiologii Katedry Biofizyki Molekularnej na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego.

Pracując jako nauczyciel akademicki, w początkowym okresie pracy badawczej zajmowałam się toksycnością rodników wodorotlenowych generowanych radiacyjnie i chemicznie (w reakcji Fentona) w układzie z izolowanymi błonami erytrocytarnymi oraz określeniem ochronnej roli glukozy i mannitolu w tych układach badawczych. Wyniki z tych badań zostały opublikowane w 2 pracach (Krokosz i Szweda-Lewandowska, 1996; Krokosz i Szweda-Lewandowska, 1997).

W latach 1993-1995 uczestniczyłam także w badaniach w ramach projektu KBN Grant Nr 0402/S4/92/03 (1992–1995) pt. „Oddziaływanie radiacyjnie generowanych rodników alkoholowych, albuminowych i dekstranowych z hemoglobiną człowieka”. Wynikiem tych i dalszych badań nad wpływem promieniowania jonizującego na hemoglobinę człowieka jest praca, opublikowana w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, dotycząca oddziaływania rodników nadtlenkowych alkoholi generowanych radiacyjnie na oksyhemoglobinę człowieka (Szweda-Lewandowska i wsp., 1998).

Od 1995 r. rozpoczęłam badania do mojej pracy doktorskiej. Promotorem pracy doktorskiej została prof. dr hab. Zofia Szweda-Lewandowska.

Tematyka badań dotyczyła zagadnień związanych z oddziaływaniem promieniowania gamma (^{60}Co) na erythrocyty człowieka oraz określeniem zmian poradiacyjnych towarzyszących nabywaniu oporności przez erythrocyty człowieka podczas napromieniowania ich dawką dzieloną.

Wynikiem działania promieniowania jonizującego na komórki są głównie uszkodzenia generowane przez rodniki i cząsteczki powstające w wyniku radiolizy wody, tj. rodniki wodorotlenowe, anionorodniki ponadtlenkowe (tylko w obecności tlenu) i nadtlenek wodoru. Uszkodzenia inicjowane przez reaktywne formy tlenu generowane radiacyjnie prowadzą do hemolizy erythrocytów. Zaobserwowałam, że wstępne napromieniowanie erythrocytów niską dawką (tj. nie wywołującą hemolizy erythrocytów co najmniej do 24 godz. po napromieniowaniu) powoduje obniżenie hemolizy po następnej dawce promieniowania w porównaniu z hemolizą po dawce podanej jednorazowo (Koziczak i wsp., 1999). Zjawisko zmniejszania uszkodzeń poradiacyjnych po zastosowaniu napromieniowania dawką dzieloną zaobserwowałam również podczas napromieniowania w N_2O . Przy braku tlenu nie zachodzą reakcje pomiędzy rodnikami wytworzonymi radiacyjnie a tlenem cząsteczkowym. Ponadto w N_2O wydajność radiacyjna powstawania rodnika wodorotlenowego jest dwukrotnie wyższa niż podczas napromieniowania w powietrzu oraz nie powstaje anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\cdot-}$.

W celu wyjaśnienia zjawiska radiooporności erythrocytów prowadziłam badania nad wpływem niskich dawek promieniowania gamma na zmiany strukturalne błony plazmatycznej erythrocytów w warunkach tlenowych i beztlenowych. Z przeprowadzonych badań wynikało, że pod wpływem odpowiednio niskiej dawki promieniowania jonizującego w erythrocytach człowieka zachodzą procesy, które wywołują szereg zmian strukturalnych i funkcjonalnych głównie w białkach.

Głównym procesem, zachodzącym pod wpływem napromieniowania w warunkach beztlenowych i poprzedzającym hemolizę, była agregacja białek błonowych. Agregaty białkowe powstawały przede wszystkim poprzez mostki $-\text{S}-\text{S}-$. Obniżenie ilości białka w paśmie spektryny i białka pasma 3 sugerowały ich udział w powstawaniu agregatów. Procesom agregacji towarzyszyły zmiany w konformacji białek błonowych określane za pomocą znacznika spinowego 4-maleimido-2,2,6,6-tetrametylopiperidino-N-oxyl (MSL), który wiązał się kowalencyjnie z dostępnymi grupami $-\text{SH}$ białek błonowych. W warunkach beztlenowych, w zakresie dawek przedhemolitycznych, obserwowano niewielki wzrost (10–16%) płynności dwuwarstwy lipidowej w obszarze hydrofobowym z jednoczesnym brakiem peroksydacji lipidów. Natomiast w obecności tlenu hemoliza była poprzedzona intensywną peroksydacją lipidów oraz zwiększeniem płynności dwuwarstwy lipidowej zarówno w obszarze hydrofobowym, jak powierzchniowym, blisko polarnych głów lipidów. Towarzyszyły temu głębokie zmiany w konformacji białek błonowych. Nie obserwowano natomiast agregacji białek błonowych. Dopiero przy dawce

promieniowania, która zapoczątkowywała hemolizę obserwowano bardzo niewielką agregację białek. W erytrocytach napromieniowanych w obecności tlenu atmosferycznego, dawka inicjująca wystąpienie radiooporności stymulowała Na,K-ATPazę, natomiast w N₂O aktywność tego enzymu pozostawała na poziomie erytrocytów nienapromieniowanych.

Ze względu na brak jądra komórkowego w erytrocytach za wywołanie radiooporności muszą odpowiadać zaobserwowane zmiany strukturalne.

Znaczną część wyników uzyskanych w ramach przygotowania doktoratu opublikowano w 2 pracach w czasopismach z listy filadelfijskiej (Szweda-Lewandowska i wsp., 2003; Krokosz i Szweda-Lewandowska, 2006).

W latach 1997-1999 otrzymywałam granty Uniwersytetu Łódzkiego dla pracowników prowadzących badania w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej.

Od sierpnia 1997 do stycznia 1998 byłam stypendystką Polskiej Fundacji Badań Radiacyjnych.

We wrześniu 1999 r. odbyłam krótki staż naukowy w Centrum Radiacyjnym na Uniwersytecie J. Liebiga w Giessen (*Strahlenzentrum Justus-Liebig-Universität Gießen*), Niemcy, w zespole prof. dr. Juergena Kiefera. Podczas stażu nauczyłam się technik napromieniowania komórek promieniowaniem o wysokiej wartości LET oraz zapoznałam z możliwościami techniki FISH do określania uszkodzeń DNA. Prezentowałam również wyniki swoich badań, do przygotowywanej rozprawy doktorskiej, na seminarium instytutu.

Do czasu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w specjalności biofizyka mój dorobek naukowy składał się z 2 prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR (z IF), 2 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach anglojęzycznych oraz 1 pracy doświadczałnej stanowiącej rozdział w monografii. Wyniki badań prowadzonych przed doktoratem prezentowałam też w postaci 15 komunikatów zjazdowych, w tym 4 na konferencjach międzynarodowych.

Pracę doktorską pt.: „Zmiany strukturalne błony plazmatycznej erytrocytu człowieka w procesie nabywania radiooporności pod wpływem niskich dawek promieniowania jonizującego” recenzowali: prof. dr hab. Bożenna Roszak-Różycka z Katedry Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) i prof. dr hab. Grzegorz Bartosz z Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego. Obrona doktoratu odbyła się w lipcu 2000 r., a stopień naukowy doktora nauk biologicznych w specjalności biofizyka uzyskałam decyzją Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego we wrześniu 2000 roku.

Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora:

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, od listopada 2000 r., zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta i kontynuowałam badania nad wpływem promieniowania jonizującego na erythrocyty człowieka oraz określeniem mechanizmu nabywania oporności przez erythrocyty człowieka po napromieniowaniu ich odpowiednio dobraną dawką promieniowania. Określiłam również czy i w jaki sposób warunki napromieniowania wpływają na występowanie efektu obniżenia uszkodzeń erythrocytów inicjowanych radiacyjnie lub chemicznie. Wyniki badań z tej tematyki opublikowano w 2 pracach, które w znacznej części zawierały również wyniki uzyskane w ramach przygotowania doktoratu (Szweida-Lewandowska i wsp., 2003; Krokosz i Szweida-Lewandowska, 2006) oraz 4 pracach oryginalnych w czasopismach z IF (Krokosz, 2003 [1]; Koziczak i wsp., 2003; Krokosz i Szweida-Lewandowska, 2005 [2]; Krokosz i wsp., 2006 [3]). Część publikacji, w których wykazano, że w beźjadrzastych erythrocytach człowieka promieniowanie jonizujące wywołuje zmiany w uporządkowaniu i funkcji błony plazmatycznej prowadzące do oporności na działanie podchlorynu sodu i scharakteryzowanie funkcjonalnych zmian w błonie erythrocytarnej pod wpływem przedhemolitycznych dawek promieniowania jonizującego o niskim LET, wchodzi w skład osiągnięcia naukowego omówionego wyżej, będącego przedmiotem rozprawy habilitacyjnej.

Metody spektrofotometryczne i fluorymetryczne, które wykorzystywałam w swoich badaniach, przygotowanie ze studiów chemicznych oraz nowo zdobytą wiedzę nad wykorzystaniem metod instrumentalnych do analizy układów biologicznych wykorzystywałam do napisania 4 podrzdziałów w podręczniku akademickim „Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami” pod red. Z. Józwiak i G. Bartosza wydanym przez PWN w roku 2005. Książka ta uzyskała nagrodę Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Podręcznik doczekał się już trzech dodruków w latach 2007, 2008 i 2012.

Moje dalsze badania związane były z określeniem udziału rodników $\cdot\text{OH}$ i $\text{Cl}_2\cdot^-$ w uszkodzeniach erythrocytów podczas napromieniowania w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS), w którym stężenie jonów Cl^- jest wysokie i wynosi 145 mM (Komorowska i wsp., 2007; Komorowska i wsp., 2008; Krokosz i wsp., 2008). PBS można traktować jako najprostszy roztwór odpowiadający warunkom fizjologicznym komórek. Biorąc pod uwagę, że stężenie jonów chlorkowych w surowicy i płynach tkankowych jest rzędu 100 mM, można przypuszczać, że rodniki wodorotlenowe, które powstaną podczas napromieniowania tkanki, mogą być w znacznym stopniu zmiatane przez chlorki (Saran & Bors, 1997). Prowadzi to do powstania

szeregu produktów wtórnych, w tym Cl_2^- i HOCl, które są bardzo reaktywne i mogą uszkadzać komponenty komórkowe (Saran et al., 1993).

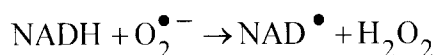
Potwierdzeniem tego efektu jest znacznie wyższa hemoliza poradiacyjna erytrocytów napromieniowanych w PBS w porównaniu z napromieniowanymi w izotonicznym buforze fosforanowym. Na podstawie wyników uzyskanych w pracy Krokosz i wsp., (2008) można wnioskować, że rodniki OH są bardziej wydajne w utlenianiu Hb i GSH, natomiast rodniki zawierające chlor są bardziej efektywne w uszkodzaniu błony plazmatycznej, prowadząc do zwiększonej hemolizy. Badania te sfinansowano z projektu finansowanego przez UŁ nr 505/365/W.

Uczestniczyłam również w pracach badawczych zespołu dr hab. B. Bukowskiej, prof. UŁ, z Katedry Biofizyki Skazań Środowiska UŁ, dotyczących wpływu herbicydów fenoksyoctowych i ich metabolitów na erytrocyty człowieka mające na celu określenie mechanizmu toksyczności kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego *in vivo* (Bukowska i wsp., 2007; Bukowska i wsp., 2008). W pierwszym etapie określono oddziaływanie związków fenolowych, potencjalnych metabolitów herbicydów fenoksyoctowych, fenolu, 2,4-dichlorofenolu (2,4-DCP), 2,4-dimetylofenolu (2,4-DMP) i katecholu na erytrocyty. Celem była odpowiedź na pytanie, czy badane związki fenolowe utleniają komponenty erytrocytów i co jest tarczą dla uszkodzeń inicjowanych przez analizowane związki fenolowe, białka czy lipidy. Przeprowadzone badania wykazały, że rodzaj podstawnika w pierścieniu fenolowym determinuje oddziaływanie związku fenolowego na komórkę oraz zdolność do generowania reaktywnych form tlenu (Bukowska i wsp., 2007). Wszystkie analizowane związki utleniały białka erytrocytarne, przede wszystkim hemoglobinę. Natomiast tylko 2,4-DCP inicjował peroksydację lipidów. Następnie, określono bezpośredni efekt działania herbicydów fenoksyoctowych, 2,4-D i MCPA, na sondy fluorescencyjne: dihydrorodaminę 123 (H2R123) i 6-karboksy-2',7'-dichlorofluorescynę (H2DCF) w układzie komórkowym oraz chemicznym (nie zawierającym komórek).

Obydwie sondy są szeroko stosowane jako markery stresu oksydacyjnego w komórce (Simarro Doorten i wsp., 2006; Chen i wsp., 2005; Bartosz, 2006). Chociaż wiadomo, że herbicydy fenoksyoctowe znacząco wpływają na status oksydacyjny w erytrocytach, nie ma bezpośrednich dowodów na ich zdolność do generowania wolnych rodników. Wykazano, że szybkość utleniania sond fluorescencyjnych jest znacząco wyższa dla 2,4-D, podczas gdy zarówno 2,4-D jak MCPA w takim samym stopniu zwiększają poziom grup karbonylowych w białkach i nie powodują denaturacji hemoglobiny (Bukowska i wsp., 2008). Wyniki powyższych prac pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że prooksydacyjne właściwości herbicydów fenoksyoctowych zależą od lokalizacji i rodzaju podstawników w pierścieniu fenolowym. Ponadto pozwoliły na

zapropozowanie przeze mnie łańcucha reakcji jakim może podlegać 2,4-D w komórkach, wyjaśniający mechanizm działania tego herbicydu.

Kolejne moje badania dotyczyły możliwości modyfikacji efektów działania reaktywnych form tlenu generowanych radiacyjnie lub podczas przedłużonej inkubacji przez mannitol, etanol i melatoninę (Krokosz i wsp., 2008 [4], Krokosz i wsp., 2013a). Melatonina wykazuje działanie antyoksydacyjne w wielu układach eksperymentalnych, zarówno *in vitro* jak *in vivo*. Jednak istnieją doniesienia o prooksydacyjnych właściwościach melatoniny w niektórych układach biologicznych (Albertini i wsp., 2006; Cristofanon i wsp., 2009; Ximenes i wsp., 2009). W swoich badaniach wykazałam, że wysokie stężenia (do 3 mM) melatoniny mogą działać prooksydacyjnie w erytrocytach zwiększając poziom RFT i utlenionej hemoglobiny. Jednocześnie melatonina działała ochronnie na błonę plazmatyczną chroniąc przed hemolizą. Tan i wsp. 2005, zaproponowali, że w układzie bez komórek NAD[•] jest przekształcany w NADH przy udziale melatoniny i w konsekwencji NADH zwiększa powstawanie H₂O₂ w wyniku reakcji:



Powstający w powyższej reakcji H₂O₂ zwiększa utlenianie HbO₂. W swojej pracy obserwowałam zwiększoną produkcję RFT i zwiększenie poziomu utlenionej Hb (metHb) dla melatoniny w stężeniu powyżej 0,6 mM. Można przypuszczać, że melatonina obecna w zawiesinie erytrocytów pozbawionej glukozy, a więc z niskim poziomem ATP i związków redukujących, prowadzi do zwiększenia poziomu nadtlenu wodoru.

W ostatnim czasie moje zainteresowania koncentrowały się na badaniu właściwości biologicznych fulerenów i ich pochodnych - cząsteczek o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych. Zainspirowała mnie do tego prof. dr hab. Zofia Szweda-Lewandowska polecając książkę „Najpiękniejsza molekula” Hugh Aldersey-Williams’a opisująca historię ich odkrycia oraz współpracy i rywalizacji w badaniach nad „nową” cząsteczką. Poszukiwania najnowszych publikacji na temat fulerenów zaowocowały pracą przeglądową „Fulereny w biologii” (Krokosz, 2007 [7]), którą włączyłam w cykl prac stanowiących osiągnięcie będące przedmiotem rozprawy habilitacyjnej. Rozpoczęłam wstępne badania z fulerem C₆₀. Jednak, ze względu na praktycznie brak rozpuszczalności C₆₀ w roztworach wodnych i trudności z oznaczeniami w układach komórkowych, podjęłam badania hydroksypochodnej fulerenu C₆₀, fulerenolu C₆₀(OH)₃₀, który otrzymałam z C₆₀ modyfikując metodę Wang i wsp., (2005) w celu przyłączenia większej liczby grup -OH. Budowę chemiczną otrzymanego fulerenolu potwierdziłam wykonując analizy metodami: spektrofotometrii UV-Vis (Cary 1), spektrofluorymetrii (Cary Eclipse), spektrofotometrii IR (NEXUS FT-IR), spektrometrii ¹H NMR

(Varian Gemini 200 MHz), spektrometrii ^{13}C NMR (Bruker Avance III 600 MHz), spektrometrii masowej MS-ESI (Varian 500MS) i analizy elementarnej. Prowadzone przeze mnie prace były nowatorskie i zainteresowały, wówczas studentów III r. biologii, którzy w ramach Naukowego Koła Młodych Biofizyków rozpoczęli pod moją opieką badania nad właściwościami fotodynamicznymi N-metylofuleropirolidyny. Badania te zaowocowały zdobyciem nagrody im. Opieńskiej-Blauth przez studentów Paulinę Kaźmierską i Jacka Grębowskiego, na Kongresie Biochemii i Biologii Komórki w 2008 r. Pan Jacek Grębowski postanowił kontynuować badania nad wpływem fulerenów i ich pochodnych na różne układy biologiczne w ramach pracy magisterskiej wykonywanej pod moją bezpośrednią opieką (promotor: prof. dr hab. Z. Szweda-Lewandowska), ukończonej w 2009 r., a następnie w ramach studiów doktoranckich. Możliwości zastosowania fulerenów w radiobiologii i fulerenoli w naukach biomedycznych zostały opisane w pracach przeglądowych (Grębowski i Krokosz, 2010; Grębowski i wsp., 2013c; Grębowski i wsp., 2013d). Wyniki naszych badań nad wpływem fulerenolu $\text{C}_{60}(\text{OH})_{30}$ na erythrocyty człowieka, w których zaproponowano mechanizm jego oddziaływania z erythrocytami znajdują się w dwóch pracach, które włączyłam do cyklu publikacji będącego osiągnięciem rozprawy habilitacyjnej (Grębowski i wsp., 2013a [5]; Grębowski i wsp., 2013b [6]). Właściwości fulerenolu w układzie z izolowanym białkiem dehydrogenazą alkoholową (ADH) w warunkach napromieniowania promieniowaniem X opisano w pracy Krokosz i wsp., 2013b, która jest w trakcie korekty po recenzjach. Prace, które prowadzono nad wpływem fulerenolu na układy biologiczne zostały sfinansowane z projektów finansowanych przez UŁ nr 505/0383 i 505/0384 ("Modyfikacja odpowiedzi na promieniowanie jonizujące w komórkach krwi przez wybrane związki chemiczne"), których byłam kierownikiem i z grantu NCN Preludium, realizowanego przez mgr Jacka Grębowskiego, nr 2011/03/N/ST4/01281 „Wyznaczenie stałych szybkości reakcji wysoko hydroksylovanego fulerenu $\text{C}_{60}(\text{OH})_{36}$ z produktami radiolizy wody i określenie mechanizmu jego oddziaływania na erythrocyty człowieka w warunkach stresu oksydacyjnego”. Grant Preludium jest realizowany w ramach przygotowania rozprawy doktorskiej przez mgr J. Grębowskiego, którego jestem promotorem pomocniczym.

W swoich badaniach zajmowałam się również wpływem tlenu na radiacyjnie indukowane uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne dehydrogenaz: aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) i mleczanowej (LDH) (Rodacka i wsp., 2012).

Kontynuowałam także współpracę z zespołem dr hab. Bożeny Bukowskiej, prof. UŁ nad mechanizmem inaktywacji acetylocholinoesterazy erythrocytarnej przez akarycydy, chlorfenwinfos i bromfenwinfos oraz jego zanieczyszczenia, dihydro-bromfenwinfos i dibromo-bromfenwinfos (Sosnowska i wsp., 2013). W swojej części pracy skupiłam się nad zaproponowaniem schematu

reakcji inhibicji AChE przez badane związki oraz matematyczną analizą wyników i wyznaczeniem stałych inhibicji kompetycyjnej i mieszanej.

Obecnie kontynuuję badania nad mechanizmem działania fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ w układach biologicznych oraz uczestniczę jako wykonawca w realizacji projektu NCN nr 2012/05/B/NZ1/00701, który został przyznany na lata 2013-2016, „Badanie indukowanych przez reaktywne formy tlenu i azotu procesów agregacji GAPDH i innych białek biorących udział w chorobach neurodegeneracyjnych. Ocena antyoksydantów w przeciwdziałaniu tym procesom”, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Grzegorz Bartosz.

Kontynuując badania nad mechanizmem działania fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ na erythrocyty, w najbliższym czasie zamierzam określić oddziaływanie fulerenolu na poziom peroksydacji lipidów i białek błonowych inicjowanej promieniowaniem jonizującym w warunkach przedłużonej inkubacji. Badania te zostaną wykonane z użyciem sondy fluorescencyjnej C11-BODIPY581/591 dla peroksydacji lipidów i metodą z oranżem ksylenolowym dla peroksydacji białek. Ponadto, określony zostanie wpływ promieniowania jonizującego w obecności fulerenolu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w erythrocytach. Zważywszy, że nasze dotychczasowe badania wskazują na adsorbowanie się fulerenolu do błony plazmatycznej, określony zostanie udział i rola grup $-SH$ białek błonowych w oddziaływaniu fulerenolu z błoną oraz możliwość ochrony przez fulerenol grup $-SH$ przed utlenianiem radiacyjnym. Określony zostanie także wpływ fulerenolu i promieniowania jonizującego w obecności fulerenolu na aktywność acetylocholinoesterazy. Enzym ten jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem służącym do określania toksyczności związku.

Dalsze badania będą dotyczyły oddziaływania fulerenolu z jednojądrzastymi komórki krwi obwodowej człowieka (MNBC) oraz określenia cytotoxyczności fulerenolu wobec komórek śródbłonna naczyniowego HUVEC. Rozszerzenie badań na komórki jądrzaste pozwoli pełniej oszacować właściwości biologiczne fulerenolu. Planuje się określić integralność błony plazmatycznej metodą uwalniania LDH, zmiany w aktywności kaspazy 3, zmiany w błonowym potencjale mitochondrialnym (za pomocą znacznika fluorescencyjnego DiOC6(3)) oraz zmiany wielkości i granularności komórek metodą cytofluorymetryczną.

Wykonane oznaczenia pozwolą zaproponować dokładniejszy mechanizm oddziaływania fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ na komórki oraz określić działanie fulerenolu w warunkach stresu oksydacyjnego generowanego radiacyjnie. Zważywszy, że oddziaływanie promieniowania jonizującego na komórki w warunkach tlenowych, wiąże się z powstawaniem reaktywnych form tlenu w wyniku radiolizy wody, otrzymane w projekcie wyniki mogą także odzwierciedlać działanie fulerenolu w warunkach stresu oksydacyjnego generowanego chemicznie lub przez

promieniowanie UV. Uzyskane wyniki mogą się okazać bardzo przydatne do oceny możliwości zastosowania fulerenolu w kosmetykach i oceny bezpieczeństwa tych kosmetyków podczas ekspozycji na promieniowanie słoneczne. Środki na planowane badania planuję zdobyć składając wniosek do NCN o grant w konkursie typu OPUS.

Mój dorobek naukowy po obronie pracy doktorskiej obejmuje 16 recenzowanych prac oryginalnych, 4 recenzowane prace przeglądowe, 1 erratę, 1 rozdział w podręczniku akademickim. Część wyników została również zaprezentowana na zjazdach krajowych i międzynarodowych (35 komunikatów konferencyjnych).

Podsumowanie:

Mój całkowity dorobek naukowy obejmuje 27 recenzowanych publikacji, w tym 20 prac opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej (17 oryginalnych, 2 przeglądowe i 1 errata), 2 artykuły w anglojęzycznych czasopismach bez współczynnika oddziaływania IF, 2 artykuły przeglądowe w polskojęzycznych czasopismach bez współczynnika oddziaływania IF, 2 artykuły oryginalne w monografiach, 1 rozdział w podręczniku akademickim oraz 50 komunikatów zawierających wystąpienia posterowe i ustne (w tym 15 na konferencjach międzynarodowych).

Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych	
Artykuły w czasopismach z listy filadelfijskiej	2
Artykuły w recenzowanych anglojęzycznych czasopismach bez współczynnika oddziaływania IF	2
Artykuł oryginalny w monografii w jęz. polskim	1
Komunikaty zawierające wystąpienia posterowe	15
Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych	
Artykuły w czasopismach z listy filadelfijskiej	18, w tym 2 artykuły przeglądowe i 1 errata
Artykuły przeglądowe w recenzowanych czasopismach bez współczynnika oddziaływania IF	2
Rozdziały w podręczniku akademickim	1

Artykuł oryginalny w monografii w jęz. polskim	1
Komunikaty zawierające wystąpienia posterowe i ustne	35
Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF	wg roku wydania: 32,196 aktualny: 41,331
Sumaryczne punkty MNiSW (2012)	485

Literatura:

- Adam JF, Biston MC, Joubert A, Charvet AM, Le Bas JF, Estève F, Elleaume H. 2005. Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption: quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 61(4), 1173-1182.
- Akkuş I, Gültekin F, Aköz M, Çağlayan O, Bahçacı S, Can UG, Ay M, Gürel A. 1997. Effect of moderate alcohol intake on lipid peroxidation in plasma, erythrocyte and leukocyte and on some antioxidant enzymes. *Clin. Chim. Acta.* 266, 141-147.
- Albertini MC, Radogna F, Accorsi A, et al. 2006. Intracellular pro-oxidant activity of melatonin deprives U937 cells of reduced glutathione without affecting glutathione peroxidase activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1091: 10-16.
- Amundson, S.A., Chen, D.J., 1996. Inverse dose-rate effect for mutation induction by gamma-rays in human lymphoblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 69, 555-563.
- Antolovic R. 2006. Low nanomolar concentrations of ouabain may induce higher activity of the Na⁺/K⁺-ATPase in human erythrocytes. *Vet. Arch.* 76, 489-495.
- Bedford, J.S., Mitchell, J.B., 1973. Dose rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiat. Res.* 54, 316-327.
- Bermueller C, Thal SC, Plesnila N, Schmid-Elsaesser R, Kreimeier U, Zausinger S. 2006. Hypertonic fluid resuscitation from subarachnoid hemorrhage in rats: a comparison between small volume resuscitation and mannitol. *J Neurol Sci.* 241(1-2), 73-82.
- Beutler E, Kuhl W. 1988. Volume control of erythrocytes during storage. The role of mannitol. *Transfusion.* 28(4), 353-357.
- Brugnara C. 1997. Erythrocyte membrane transport physiology. *Curr. Opin. Hematol.* 4, 122-127.
- Bukowska B, Michałowicz J, **Krokosz A**, Sicińska P., 2007. Comparison of the effect of phenol and its derivatives on protein and free radical formation in human erythrocytes (in vitro). *Blood Cells Mol Dis.* 39(3), 238-244.
- Bukowska B, Rychlik B, **Krokosz A**, Michałowicz J., 2008. Phenoxyherbicides induce production of free radicals in human erythrocytes: Oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 by 2,4-D-Na and MCPA-Na. *Food Chem Toxicol.* 46(1), 359-67.
- Calvaresi M, Zerbetto F. 2010. Baiting proteins with C60. *ACS Nano.* 4, 2283-2299.
- Chaudhuri P, Paraskar A, Soni S, Mashelkar RA, Sengupta S. 2009. Fullerenol-cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy. *ACS Nano* 3, 2505-2514.
- Ciolkowski M, Rozanek M, Szewczyk M, Klajnert B, Bryszewska M. 2011. The influence of PAMAM-OH dendrimers on the activity of human erythrocytes ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 2714-2723.

- Cristofanon S, Uguccione F, Cerella C, et al. 2009. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation. *Ann N Y Acad Sci*; 1171: 472-478.
- D'Alessandro A, Liumbruno G, Grazzini G, Zolla L. 2010. Red blood cell storage: the story so far. *Blood Transfus.* 8, 82-88.
- Das SK, Vasudevan DM. 2007. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.*, 81, 177-187.
- Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E. 2008. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 65-74.
- Dzneladze S, Tsakadze L, Leladze M, Kometiani Z. 2012. Cl anion-dependent Mg-ATPase. *J. Membr. Biol.* 245, 151-156.
- Grębowski J, Kaźmierska P, **Krokosz A.** 2013c. Fulerenol-właściwości i zastosowanie w naukach biomedycznych. *Postepy Hig Med. Dosw. (Online)*, 67: 859-871.
- Grębowski J, Kaźmierska P, **Krokosz A.** 2013d. Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine. *BioMed Research International*. w druku.
- Grębowski J, **Krokosz A.** Puchala M. 2013a. Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene. *BBA Biomembranes.* 1828(2), 241-248.
- Grębowski J, **Krokosz A.** Puchala M. 2013b. Fullereneol C₆₀(OH)₃₆ could associate to band 3 protein of human erythrocyte membrane. *BBA Biomembranes.* 1828(9), 2007-2014.
- Grębowski J, **Krokosz A.** 2010. Fulereny w radiobiologii. *Postepy Bioch.* 56(4), 456-462.
- Hall, E.J., 1972. Radiation dose-rate: a factor of importance in radiobiology and radiotherapy. *Br. J. Radiobiol.* 45, 81-97.
- Hall, E.J., 1991. The dose-rate factor in radiation biology. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 595-610.
- Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, I., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P., Silman, I. and Sussman, J.L. 1993. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9031-9035.
- Hitschke, K., Buehler, R., Apell, H.J., Stark, G., 1994. Inactivation of the Na,K-ATPase by radiation induced free radicals. Evidence for a radical-chain mechanism. *FEBS Lett.* 353, 297-300.
- Iversen TG, Skotland T, Sandvig K. 2011. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 6, 176-185.
- Jaskulska A, **Krokosz A.** Ślęzak A, Zimna K, Toloczko W. Kwasowość wód wybranych stawów i cieków wodnych Karkonoskiego Parku Narodowego. *Studencka Naukowa Akcja Ekologiczna ZSP „Karkonosze '89”*; Warszawa 1990. **NR 104.**
- Kam NWS, Liu Z, Dai HJ. 2006. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* 118, 591-595.
- Klajnert, B., Sadowska, M. and Bryszewska, M. 2004. The effect of polyamidoamine dendrimers on human erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity. *Bioelectrochemistry* 65, 23-26.
- Komorowska M., **Krokosz A.**, Szweda-Lewandowska Z. 2007. Radiation damage to human erythrocytes: Influence of the composition of medium. *Radiat. Phys. Chem.*, 76(10), 1587-1593.
- Komorowska M., **Krokosz A.**, Szweda-Lewandowska Z. 2008. Erratum to: Radiation damage to human erythrocytes: Influence of the composition of medium. *Radiat. Phys. Chem.*, 77(4), 456.
- Konings, A.W.T., 1979. Dose-rate effects in biomembranes. *J. Radiat. Res.* 20, 259-263.
- Koufen, P., Brdicka, D., Stark, G., 2000. Inverse dose-rate effects at the level of proteins observed in the presence of lipids. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 625-631.
- Koziczak R, Gonciarz M, **Krokosz A.**, Szweda-Lewandowska Z. 2003. The Influence of Split Doses of gamma-Radiation on Human Erythrocytes. *J Radiat Res.* 44(3), 217-222.
- Koziczak R, **Krokosz A.**, Szweda-Lewandowska Z. 1999. Effect of dose-rate and dose fractionation on radiation-induced hemolysis of human erythrocytes. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 47(5), 865-872. continued as IUBMB Life.

- Krantz A. 1997. Red cell-mediated therapy: opportunities and challenges. *Blood Cells Mol. Dis.* 23. 58–68.
- Krokosz A.**, Grebowski J, Rodacka A, Pasternak B, Puchala M. 2013b. The effect of fullereneol C₆₀(OH)₃₀ on alcohol dehydrogenase activity irradiated with X-rays. *Rad Phys Chem.* after revision.
- Krokosz A.**, Grebowski J, Rodacka A, Szweda-Lewandowska Z, Puchala M. 2013a. Can melatonin delay oxidative damage of human erythrocytes during prolonged incubation? *Adv Med Sci.* 58(1):134-42.
- Krokosz A.**, Rodacka A, Szweda-Lewandowska Z, Puchala M. Wpływ wybranych alkoholi na uszkodzenia erytrocytów człowieka inicjowane RFT. w monografii „Błony Biologiczne”, red. J. Gabrielska i P. Misiak. 2008. 225-228.
- Krokosz A.**, Szweda-Lewandowska Z. 1996. Prehemolytic changes in human erythrocyte membranes induced by gamma radiation under air and nitrous oxide - *Curr. Top. Biophys.* 20(2), 154-157.
- Krokosz A.**, Szweda-Lewandowska Z. 1997. Protection of erythrocyte membrane lipids against oxidative damage caused by OH radicals - *Med. Sci. Res.* 25(5), 329-331. Chapman & Hall, ISSN: 0269-8951.
- Krokosz A.**, Szweda-Lewandowska Z. 2006. Induction of transient radioresistance in human erythrocytes. *Radiat. Phys. Chem.*, 75, 967-976.
- Krokosz A.** Fulereny w biologii. *Postępy Biochemii.* 2007. 53(1), 91-96.
- Krokosz A.** The effect of hypochlorite on human erythrocytes pretreated with x-radiation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2003. 8 (1), 215-219.
- Krokosz A.**, Komorowska M., Szweda-Lewandowska Z. 2008. Radiation damage to human erythrocytes. Relative contribution of hydroxyl and chloride radicals in N₂O-saturated buffers. *Radiat. Phys. Chem.*, 77(6), 775-780.
- Krokosz A.**, Koziczak R., Gonciarz M. and Szweda-Lewandowska Z. Study of the effect of dose-rate on radiation-induced damage to human erythrocytes. *Radiat. Phys. Chem.*, 2006. 75. 98-105.
- Krokosz A.**, Szweda-Lewandowska Z. Changes in the activity of acetylcholinesterase and Na,K-ATPase in human erythrocytes irradiated with X-rays. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2005. 10, 471-478.
- Mesquita R., Goncalves, M.I. Dias, S. Sargento, L. Saldanha, C. Martins e Silva J. 1999. Ethanol and erythrocyte membrane interactions: a hemorheologic perspective. *Clin. Microcirc.*, 21, 95-98.
- Miura, Y., Abe, K., Urano, S., Furuse, T., Noda, Y., Tatsumi, K. and Suzuki, S. 2002. Adaptive response and the influence of ageing: effects of low-dose irradiation on cell growth of cultured glial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 78, 913-921.
- Monticelli L, Salonen E, Ke PC, Vattulainen I. 2009. Effects of carbon nanoparticles on lipid membranes: a molecular simulation perspective. *Soft Matter* 5, 4433–4445.
- Mozzanti L, Rabini RA, Biagini G, Pugnali A, de Pirro R, Faloia E, Mancini V, Romanini C, Cester N. 1992. Changes in membrane fluidity and Na⁺/K⁺-ATPase activity during human trophoblast cell culture. *Eur. J. Biochem.* 206, 881–885.
- Park KH, Chhowalla M, Iqbal Z, Sesti F. 2003. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J. Biol. Chem.* 278, 50212–50216.
- Puchala M & **Krokosz A.** „Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami”, red. Z. Józwiak, G. Bartosz, PWN, 2005, 2007, 2008, 2012 – podrozdziały 4.3, 7.2.1, 7.2.2, 10.7.1.
- Pullar, J.M., Vissers, M.C., Winterbourn CC. 2000. Living with a killer: The effects of hypochlorous acid on mammalian cells. *IUBMB Life* 50, 256-266.
- Qiao R, Roberts AP, Mount AS, Klaine SJ, Ke PC. 2007. Translocation of C60 and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Lett.* 7, 614–619.
- Rinalducci S, Ferru E, Blasi B, Turrini F, Zolla L. 2012. Oxidative stress and caspase-mediated fragmentation of cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 during blood storage. *Blood Transfus.* 10 (Suppl. 2), 55–62.
- Roberts JE, Wielgus AR, Boyes WK, Andley U, Chignell CF. 2008. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 228(1): 49-58.
- Rodacka A, Serafin E, Bubiński M, **Krokosz A.**, Puchala M. 2012. The influence of oxygen on radiation-induced structural and functional changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Rad Phys Chem.* 81: 807–815.

- Saran M, Bertram H, Bors W, Czapski G. 1993. On the cytotoxicity of irradiated media. To what extent are stable products of radical chain reactions in physiological saline responsible for cell death? *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 311–318.
- Saran M, Bors W. 1997. Radiation chemistry of physiological saline reinvestigated. Evidence that chloride-derived intermediates play a key role in cytotoxicity. *Radiat. Res.* 147, 70–77.
- Seigneuret M, Devaux PF. 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3751–3755.
- Shimizu, K.; Kubota, R.; Kobayashi, N.; Tahara, M.; Sugimoto, N.; Nishimura, T.; Ikarashi, Y. 2013. Cytotoxic Effects of Hydroxylated Fullerenes in Three Types of Liver Cells. *Materials*, 6, 2713-2722.
- Shinitzky, M. Barenholz, Y. 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* 515, 367–394.
- Short, S.C. Woodcock, M., Marples, B. and Joiner, M.C. 2003. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 99-105.
- Sosnowska B, Huras B, **Krokosz A**, Bukowska B. 2013. The effect of bromfenivphos, its impurities and chlorfenivphos on acetylcholinesterase activity. *Int J Biol Macromol.* 57C:38-44.
- Soszynski, M., Filipiak, A., Bartosz, G. and Gebicki, J.M. 1996. Effect of amino acid peroxides on the erythrocyte. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 45-51.
- Stark, G., 1991. The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1071, 103–122.
- Su Y, Xu JY, Shen P, Li J, Wang L, Li Q, Li W, Xu GT, Fan C, Huang Q. 2010. Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullereneol in different cell lines. *Toxicology* 269, 155–159.
- Szweda-Lewandowska Z, **Krokosz A**, Gonciarz M, Zajackowska W, Puchala M. 2003. Damage to Human Erythrocytes by Radiation-generated HO[•] Radicals: Molecular Changes in Erythrocyte Membranes - *Free Radical Research*, 37(10), 1137-1143.
- Szweda-Lewandowska Z, **Krokosz A**, Zajackowska W, Puchala M. 1998. The interaction of alcohol peroxy radicals with human oxyhemoglobin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44(5), 971-978. continued as IUBMB Life.
- Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Hardeland R, Poeggeler B, Reiter RJ. Interactions between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J Pineal Res.* 2005 Sep;39(2):185-94.
- Tyulina, OV, Prokopieva, YD, Boldyrev, AA, Johnson, P. 2006. Erythrocyte and plasma protein modification in alcoholism: A possible role of acetaldehyde. *Biochem. Biophys Acta.* 1762, 558-563.
- Ueng TH, Kang JJ, Wang HW, Cheng YW, Chiang LY. 1997. Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullereneol, a polyhydroxylated fullerene C60. *Toxicol. Lett.* 93, 29–37.
- Vasic V, Momc T, Petkovic M, Krstic D. 2008. Na⁺.K⁺-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds. *Sensors* 8, 8321–8360.
- Vral, A., Thierens, H., deRidder, L., 1992. Study of dose-rate and split-dose effects on the in vitro micronucleus yield in human lymphocytes exposed to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 61, 777–784.
- Wang S, Hu P, Zhang JM, Jiang H, Zhu SZ. 2005. Novel and efficient synthesis of water-soluble [60]fullereneol by solvent-free reaction. *Synth. Commun.* 35, 1803–1808.
- Wells, R.L., Bedford, J.S., 1983. Dose-rate effects in mammalian cells. IV repairable and non repairable damage in non cycling C3H 10T1/2 cells. *Radiat. Res.* 94, 105–134.
- Wielgus AR, Zhao B, Chignell CF, Hu DN, Roberts JE. 2010. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human retinal pigment epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 242(1): 79-90.
- Wouters, B.G., Sy, A.M. and Skarsgard, L.D. 1996. Low-dose hypersensitivity and increased radioresistance in a panel of human tumor cell lines with different radiosensitivity. *Radiat. Res.* 146, 399-413.

Xiao L, Aoshima H, Saitoh Y, Miwa N. 2010. Fullerene-polyvinylpyrrolidone clathrate localizes in the cytoplasm to prevent ultraviolet-A ray-induced DNA-fragmentation and activation of the transcriptional factor NF-kappaB, *J. Cell. Biochem.* 111, 955-966.

Ximenes VF, Pessoa AS, Padovan CZ, et al. 2009. Oxidation of melatonin by AAPH-derived peroxy radicals: evidence of a pro-oxidant effect of melatonin. *Biochim Biophys Acta*; 1790: 787-792.

Yu SP. 2003. Na(+), K(+)-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death, *Biochem. Pharmacol.* 66, 1601-1609.

Zaborowski, A. and Szweda-Lewandowska, Z. 1997. The influence of dose fractionation on radiation-induced haemolysis of human erythrocytes. *Cell Biol. Int.* 21, 559-563.

Zavodnik, I.B, Lapshina E.A., Zavodnik L.B., Bartosz G., Soszynski M., Bryszewska, M. 2001. Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 363-369.

Łódź, 20.09.2013 r.

Anita Krokosz