

Dr Anna Maria Pieniżek

# **AUTOREFERAT**

**Katedra Biofizyki Molekularnej  
Instytut Biofizyki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki**

Łódź, wrzesień 2018

1. **Imię i Nazwisko** Anna Maria Pieniążek
  
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**
  - Doktor nauk biologicznych – dyscyplina: biofizyka - Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 25.01.2005.  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badanie mechanizmów uszkodzenia białek osocza i erytrocytów w przewlekłej niewydolności nerek”  
Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński
  - Magister biologii – dyscyplina biofizyka -Wydział Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 30.06.1999.  
Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ karbamylicacji białek na strukturę komponentów erytrocytów”  
Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński
  
3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**
  - październik 2016 – obecnie - Katedra Biofizyki Molekularnej, Zakład Badań Struktur Biopolimerów, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź (adiunkt)
  - marzec 2007 – wrzesień 2016 - Katedra Termobiologii (obecnie Katedra Biofizyki Medycznej), Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź (adiunkt)
  - wrzesień 2005 – luty 2007 - Katedra Inżynierii Środowiska, Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska Politechniki Łódzkiej, Al. Politechniki 6, 90-924 Łódź (adiunkt)
  - październik 2000 – grudzień 2004 - Uczestnik Studium Doktoranckiego Cytogenetyki, Genetyki Molekularnej i Radiobiologii
  - wrzesień 1999 – grudzień 1999 - Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/14, 90-237 Łódź (starszy referent biologii)

**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**

**Uszkodzenia wybranych elementów morfotycznych krwi i składników osocza u chorych z przewlekłą chorobą nerek poddawanych hemodializom oraz w badaniach modelowych**

**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

- Sumaryczny wskaźnik oddziaływania (IF): 19,297
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW (2018): 171
- Liczba cytowań (Web of Science Core Collection, wrzesień 2018): 4
- bez autocytowań: 2

1. **Pieniążek A**, Gwozdziński K, Czepas J. EPR study of erythrocyte properties after in vitro treatment with urea and hydrogen peroxide. *International Journal of Scientific Research*, 2014, 3(9), 20–23, IF 1,865\*; MNiSW 1 pkt.
2. **Pieniążek A**, Gwozdziński K. Changes in the conformational state of hemoglobin in hemodialysed patients with chronic renal failure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, 2015:783073, IF 4,492; MNiSW 25 pkt.
3. **Pieniążek A**, Gwozdziński K. Karbamyłacja białek – mechanizm, przyczyny i skutki. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)*. 2016, 70, 514–521, IF 0,690; MNiSW 15 pkt.
4. **Pieniążek A**, Gwozdziński K. Changes in lymphocytes properties after employment of combination of carbamylation and oxidative stress, an in vitro study. *Toxicology in vitro*. 2016, 34, 105–112, IF 2,866; MNiSW 30 pkt.
5. **Pieniążek A**, Gwozdziński K. Carbamylation and oxidation of proteins lead to apoptotic death of lymphocytes. *Chemico-Biological Interaction*. 2017, 270, 24–32, IF 3,143; MNiSW 30 pkt.

6. **Pieniążek A**, Gwozdziński L, Zbrog Z, Gwozdziński K. Alterations in conformational state of albumin in plasma in chronic hemodialyzed patients. PLoS One. 2018, 13, e0192268, IF 2,809; MNiSW 35 pkt.
7. **Pieniążek A**, Gwozdziński L, Hikisz P, Gwozdziński K. Indoxyl sulfate generates free radicals, decreases antioxidant defense and leads to damage to mononuclear blood cells. Chemical Research in Toxicology. 2018, DOI: 10.1021/acs.chemrestox.8b00065, IF 3,432; MNiSW 35 pkt.

Informacje dotyczące mojego wkładu i wkładu współautorów w powstawanie poszczególnych prac zawarte są w załącznikach 3 (wykaz opublikowanych prac naukowych i osiągnięć naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki) i 5 (oświadczenia współautorów prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego).

\* - dane ze strony tytułowej numeru czasopisma ISSN No. 2277 – 8179

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

Podstawę rozprawy habilitacyjnej stanowi sześć oryginalnych prac badawczych i jedna praca przeglądowa, opublikowanych w latach 2014-2018. Wyniki tych prac wzbogacają i uzupełniają aktualny stan wiedzy na temat udziału toksyn mocznicowych w uszkodzeniach białek i lipidów komórek krwi oraz osocza osób z przewlekłą chorobą nerek.

Wśród chorób cywilizacyjnych XXI wieku, oprócz zaburzeń sercowo-naczyniowych, nadciśnienia tętniczego, otyłości i cukrzycy, od niedawna wymienia się także przewlekłą chorobę nerek (PChN). Obecna definicja tej choroby charakteryzuje ją jako wieloobjawowy zespół chorobowy powstający na skutek trwałego uszkodzenia lub zmniejszenia liczby czynnych nefronów, które mogą być niszczone przez różnorodne procesy chorobowe toczące się w mięszu nerek. W zależności od stopnia przesączania kłębuszkowego eGFR (estimated glomerular filtration rate) wyróżnia się 5 stadiów choroby. Za wartość graniczną przesączania kłębuszkowego, poniżej której można mówić o niewydolności nerek, przyjęto dość umownie 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, utrzymującą się co najmniej przez 3 miesiące (Levey i Coresh 2012).

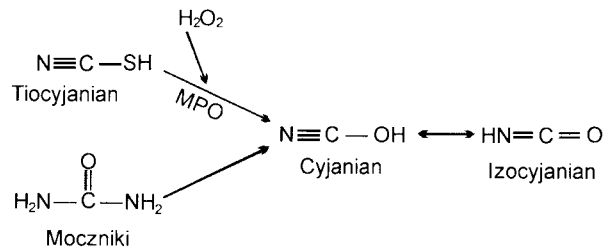
Leczenie przewlekłej choroby nerek jest procesem wielokierunkowym, polegającym w pierwszych stadiach na zahamowaniu jej postępu i, w miarę możliwości, wyeliminowaniu przyczyn odpowiedzialnych za jej powstawanie. W końcowych stadiach tej choroby, kiedy upośledzenie funkcji nerek jest bardzo duże, u chorych wprowadza się terapię nerkozastępczą w postaci hemodializ i dializ otrzewnowych oraz transplantację nerek.

Hemodializa jest jedną z najczęściej podejmowanych terapii u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Jej podstawowym celem jest utrzymanie chorego przy życiu i zachowanie jego możliwie najlepszej jakości. Podczas hemodializy z organizmu usuwane są produkty przemiany materii, które ze względu na uszkodzenie nerek nie są wydalane wraz z moczem.

Związki chemiczne, które nie są usuwane z organizmu, a mają na niego negatywny wpływ, zwane są toksynami mocznicowymi. Jednym z ważniejszych toksycznych efektów działania tych związków są uszkodzenia układu sercowo-naczyniowego. Klasyfikacja toksyn mocznicowych opiera się na ich właściwościach fizykochemicznych, wpływających na zdolność usuwania z organizmu podczas dializy. Wyróżnia się trzy grupy toksyn:

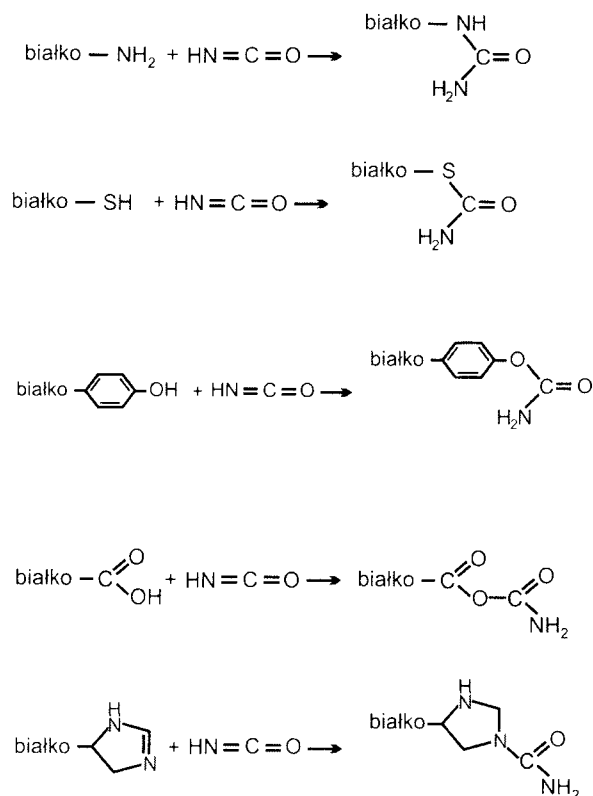
- w pierwszej grupie znajduje się ok. 45 związków o małych masach cząsteczkowych dobrze rozpuszczalnych w wodzie;
- drugą grupę stanowi ok. 25 związków wiążących się z białkami;
- w trzeciej grupie toksyn mocznicowych znajdują się związki, których masa cząsteczkowa waha się od 555 do 32000 (w większości peptydy) (Vanholder i wsp. 2003).

Do pierwszej grupy toksyn mocznicowych należy mocznik, którego stężenie w osoczu osób zdrowych wynosi około 6-7 mmol/L, natomiast u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek poddawanych hemodializom jego średni poziom to  $38 \pm 18$  mmol/L (Malyszko et al., 2006; Vanholder i wsp. 2003). Oznacza to, że poziom mocznika u pacjentów z PChN wzrasta 5-6 - krotnie w porównaniu do osób zdrowych. Produktem metabolizmu mocznika w organizmie może być cyjanian. Oba związki występują ze sobą w równowadze 99:1. Dalsze przemiany cyjanianu mogą prowadzić do powstania wysoce reaktywnego kwasu izocyjanowego, który wiąże się z białkami, prowadząc do ich karbamylicacji (Rys. 1) (4b3). Proces ten prowadzi do tworzenia w białkach lub w aminokwasach grup „karbamoilowych” (-CONH<sub>2</sub>).



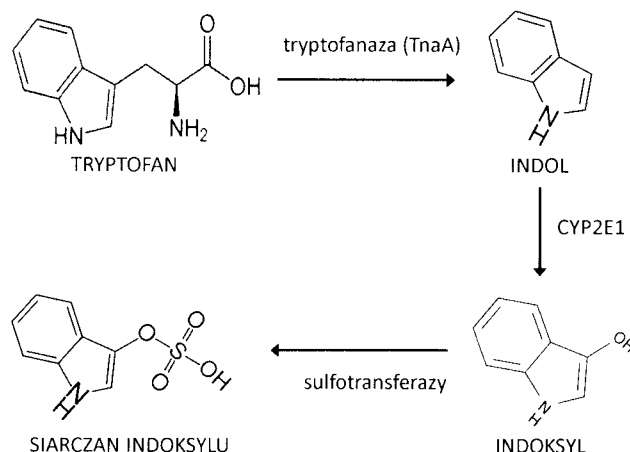
Rys. 1. Drogi powstawania kwasu izocyjanowego w warunkach fizjologicznych (4b3).

Karbamylacji ulegają grupy aminowe, tiolowe, karboksylowe, hydroksylowe, fenolowe i imidazolowe białek oraz wolnych aminokwasów (Rys. 2). Grupy tiolowe i fenolowe wykazują najwyższą reaktywność w stosunku do kwasu izocyjanowego, jednak są to reakcje odwracalne. Z kolei grupy aminowe w reakcji z kwasem izocyjanowym tworzą trwałe produkty, a szybkość ich reakcji zależy od lokalizacji grup aminowych w białku. Takie modyfikacje białek mogą prowadzić do utraty ich struktury i funkcji.



Rys. 2. Schemat karbamylacji grup aminowych, tiolowych, hydroksylowych, fenolowych, karboksylowych i imidazolowych białek (4b3).

Do drugiej grupy toksyn zakwalifikowano związki wiążące się z białkami. W tej grupie znajduje się między innymi siarczan indoksyłu, który jest metabolitem tryptofanu pochodzącym z indolu (Rys. 3) (Vanholder i wsp. 2003).



Rys. 3 Szlak metabolizmu tryptofanu prowadzący do powstania siarczanu indoksyłu

Siarczan indoksyłu jest słabo usuwany przez konwencjonalną dializę i stanowi szczególnie ryzyko przyspieszonej miażdżycy u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (Gao i wsp., 2015). Średnie całkowite stężenie IS w surowicy u pacjentów z PChN wynosi około  $23,2 \pm 13,0$  mg/L, i jest kilkadziesiąt razy wyższe w porównaniu do poziomu obserwowanego u osób zdrowych ( $0,54 \pm 0,29$  mg/L) (Vanholder i wsp. 2003). Jednakże stężenie wolnego siarczanu indoksyłu w osoczu jest znacząco mniejsze ponieważ w 90% jest on związany z albuminą. Ze względu na wpływ siarczanu indoksyłu na różne typy komórek prowadzący do powstawania reaktywnych form tlenu, takich jak nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy i anion ponadtlenkowy, może on przyczyniać się do utleniania lipidów, białek i uszkodzeń DNA. Zaobserwowano korelację pomiędzy poziomem IS a stopniem niewydolności nerek u pacjentów. Wykazano, że Siarczan indoksyłu stymuluje postęp przewlekłej choroby nerek, co wiąże się prawdopodobnie ze zwiększonym stresem oksydacyjnym w mięśniu sercowym i naczyniach krwionośnych (Gao i wsp., 2017).

Podstawą wielu chorób jest stres oksydacyjny. W publikacjach naukowych sugeruje się, że reaktywne formy tlenu (RFT) odgrywają kluczową rolę w patofizjologii przewlekłej choroby nerek. U pacjentów poddawanych regularnym hemodializom proces powstawania RFT może być jeszcze dodatkowo nasilony z powodu kontaktu krwi z błoną dializacyjną

o niskiej biozgodności. Skutkiem reakcji RFT z białkami i lipidami czy kwasami nukleinowymi jest ich utlenianie, co może prowadzić między innymi do utraty ich funkcji. Niejednokrotnie wykazano, że przewlekła choroba nerek charakteryzuje się obniżoną aktywnością enzymów przeciwutleniających i utratą przeciwutleniaczy o małej masie cząsteczkowej (Clermont i wsp., 2000; Pieniążek i wsp., 2009; Aziz i wsp., 2016). Ponieważ płyny pozakomórkowe zawierają stosunkowo niewielkie ilości enzymów przeciwutleniających, to dodatkowe funkcje przeciwutleniające może pełnić albumina, chroniąc składniki osocza przed ich utlenianiem (Mera i wsp., 2005).

Albumina jest białkiem globularnym o masie cząsteczkowej 67 tys. (609 reszt aminokwasowych). Zawiera w dużej mierze aminokwasy o charakterze kwaśnym, co determinuje jej ujemny ładunek. Do fundamentalnych funkcji tego białka należy utrzymanie ciśnienia onkotycznego, wiązanie i transport różnych substancji oraz pełnienie roli przeciwutleniacza. Białko to zawiera jedną resztę cysteinową (Cys-34) w formie zredukowanej, zdolną do tiolowania, nitrozytacji i utleniania (Garcia-Martinez i wsp., 2013). U osób z przewlekłą chorobą nerek w wyniku działania kompleksowego wielu toksyn mocznicowych i stresu oksydacyjnego dochodzi jednak do różnych modyfikacji białek i lipidów.

**Celem pracy było określenie stopnia uszkodzeń składników krwi u chorych z przewlekłą chorobą nerek oraz składników krwi poddanych działaniu toksyn mocznicowych i stresu oksydacyjnego w warunkach *in vitro*.**

Podjęte działania badawcze polegały na:

- Ocenie wpływu obecności toksyn mocznicowych na białka hemolizatu i albuminę pochodzących od chorych z przewlekłą chorobą nerek, poddawanych regularnym hemodializom.
- Określeniu udziału mocznika i stresu oksydacyjnego w uszkodzeniach białek erytrocytów
- Ocenie wpływu karbamylacji białek i stresu oksydacyjnego na własności strukturalne i funkcjonalne jednojądrzastych komórek krwi
- Ocenie udziału siarczanu indoksyłu w generowaniu stresu oksydacyjnego w jednojądrzastych komórek krwi



Ocena uszkodzeń erytrocytów i osocza pochodzących od chorych z PChN oraz od osób zdrowych poddanych działaniu mocznika.

Przy użyciu znaczników spinowych techniką elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oceniono stan białek wnętrza erytrocytów, które pochodziły od osób z przewlekłą chorobą nerek poddawanych hemodializom. Znacznik maleimidowy (MSL) swobodnie migruje do wnętrza komórek, gdzie wiąże się z grupami tiolowymi (głównie z glutationem), a sygnał EPR pozwala ocenić jego ruchliwość w cytoplazmie. Wykazano, że u pacjentów przed rozpoczęciem hemodializy i w pierwszej godzinie jej trwania ruchliwość tego znacznika jest o wiele niższa w porównaniu do wartości uzyskanych w erytrocytach osób zdrowych (4b2). Obserwacje te mogą świadczyć między innymi o zmianach lepkości wnętrza erytrocytów. Zaburzenia lepkości erytroplazmy podczas hemodializy mogą być jednym ze skutków stresu oksydacyjnego wywołanego tym zabiegiem. Wykazano, że bezpośredni kontakt krwi z błoną dializacyjną prowadzi do aktywacji neutrofilii, monocytów oraz płytek krwi, co prowadzi do wybuchu tlenowego i generowania stresu oksydacyjnego. Dowiedziono, że we krwi osób poddawanych hemodializom w 15-20 minucie od jej rozpoczęcia znacząco wzrasta poziom reaktywnych form tlenu oraz produktów utleniania białek i lipidów (Himmelfarb i wsp., 1991; Gwoździński i Janicka 1995). Uzyskane wyniki przyczyniły się do poszerzenia badań dotyczących białek wnętrza erytrocytów pochodzących od pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Hemolizat od osób z PChN poddano rozdziałowi na przy użyciu chromatografii jonowymiennej uzyskując trzy frakcje białkowe (4b2). Analiza elektroforetyczna otrzymanych frakcji pozwoliła określić, że pierwszą frakcję stanowiły białka niehemowe, drugą hemoglobina A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) a trzecią hemoglobina A (HbA). Przy użyciu znacznika maleimidowego w technice EPR stwierdzono znaczący statystycznie wzrost stopnia jego unieruchomienia w hemolizacie pochodzącym od pacjentów z PChN po hemodializie w porównaniu do hemolizatu pozyskanego od pacjentów zdrowych (4b2). W pełnym hemolizacie przed hemodializą nie obserwowano znaczących zmian w porównaniu do grupy kontrolnej. Ten sam parametr został oznaczony w trzech wyizolowanych z hemolizatu frakcjach białkowych. Znaczący wzrost unieruchomienia znacznika maleimidowego związanego z łańcuchami globiny HbA<sub>1c</sub> i HbA obserwowano zarówno przed hemodializą jak i po jej zakończeniu w porównaniu do kontroli. Co więcej,

wzrost tego parametru w HbA osób z PChN był prawie dwukrotnie wyższy aniżeli w przypadku HbA pochodzącej od osób zdrowych (4b2). Z drugiej strony, stopień unieruchomienia znacznika maleimidowego związanego z frakcją białek niehemowych pochodzących od osób z PChN przed hemodializą znacząco obniżał się w porównaniu do wartości otrzymanych dla grupy kontrolnej, a po zabiegu jego wartość była porównywalna z kontrolą (4b2). Wzrost rotacyjnego czasu korelacji MSL związanego z białkiem może świadczyć o ograniczonej rotacji tego znacznika, a tym samym o zmianach zachodzących w strukturze trzeciorzędowej badanego polipeptydu. Uzyskane rezultaty korelują z innymi badaniami, w których wykazano, że w hemoglobinie utlenianie cysteiny oraz oksydacyjne modyfikacje tryptofanu i metioniny prowadzą do utraty  $\alpha$ -helikalnej struktury łańcucha  $\beta$ -globiny (Jia i wsp., 2007). Produktami utleniania reszt cysteinowych w  $\beta$  Cys93 i  $\beta$  Cys112 w hemoglobinie mogą być: kwas sulfenowy, sulfinowy i kwas sulfonowy lub inne produkty blokujące wolne grupy tiolowe. Efektem takich reakcji może być utrata grup tiolowych w hemoglobinie. Przeprowadzone badania wskazują na istotny spadek poziomu grup -SH w hemolizacie po hemodializie, jak również we wszystkich otrzymanych frakcjach białkowych, zarówno przed jak i po hemodializie (4b2). Możliwe jest, że spadek poziomu grup tiolowych oraz zmiany w strukturze hemoglobin i innych białek u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek po hemodializie są wynikiem ich utleniania z udziałem reaktywnych form tlenu generowanych podczas dializy.

W prawidłowych komórkach, pochodzących od zdrowych dawców, w wyniku działania systemu przeciwutleniającego enzymatycznego i nieenzymatycznego zachowana jest równowaga pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu i ich detoksykacją. We krwi pacjentów z PChN aktywność systemu przeciwutleniającego jest obniżona w stosunku do obserwowanego u osób zdrowych (Clermont i wsp., 2000; Pieniążek i wsp., 2009; Aziz i wsp., 2016).

W osoczu osób chorych poddawanych hemodializom obserwowano znaczący wzrost poziomu wolnych grup tiolowych (Clermont i wsp., 2000; Pieniążek i wsp., 2009). Wśród toksyn mocznicowych wiążących się z białkami znajduje się homocysteina. U osób z przewlekłą chorobą nerek obserwuje się około 5 –krotnie wyższe jej stężenie niż u osób zdrowych (Vanholder i wsp., 2003). Ze względu na wiązanie się homocysteiny z białkami jej usuwanie z organizmu może być utrudnione. Z drugiej strony to właśnie homocysteina

może skutkować pozornym podwyższeniem się poziomu grup tiolowych w osoczu osób po hemodializie. W osoczu osób z przewlekłą chorobą nerek przed hemodializą obserwowano znacząco wyższe stężenie zarówno nadtlenków jodki i grup karbonylowych w porównaniu do wartości obserwowanych w osoczu osób zdrowych (Pieniążek i wsp., 2009). Poziom obu tych parametrów istotnie wzrastał po zabiegu hemodializy w stosunku do wartości obserwowanych przed zabiegiem.

Uzyskane wyniki badań hemolizatu i osocza od osób z przewlekłą chorobą nerek wykazały zmiany zachodzące w białkach w wyniku działania wszystkich toksyn mocznicowych razem. Kolejnym etapem badań było określenie udziału mocznika i nadtlenku wodoru na stopień modyfikacji błony komórkowej erytrocytów i białek hemolizatu (*in vitro*). Pełną krew pochodzącą od zdrowych dawców inkubowano z mocznikiem (35 mmol/L) lub/i z nadtlenkiem wodoru (50  $\mu$ mol/L). Pomiar płynności błony erytrocytów wykazał jej upłynnienie w wyniku działania w/w związków, zarówno w regionie polarnym kwasów tłuszczowych, jak i na głębokości 12-tego atomu węgla łańcucha węglowodorowego znacznika spinowego. Największe zmiany w płynności dwuwarstwy lipidowej zaobserwowano po ekspozycji komórek na działanie kombinacji mocznika i nadtlenku wodoru (**4b1**). Badania stanu konformacyjnego białek błonowych erytrocytów również wykazały istotny spadek stopnia unieruchomienia znacznika jodoacetamidowego (ISL) w białkach w porównaniu do wartości kontrolnych (**4b1**). Otrzymane wyniki sugerują, że zmiany w płynności błony mogą być wynikiem utleniania lipidów lub/i białek i zmian w oddziaływaniach lipid-białko, jak też karbamylowania lipidów i białek. I mocznik, i nadtlenek wodoru ze względu na niewielką masę cząsteczkową transportowane są przez błonę komórkową na zasadzie dyfuzji prostej. Dodatkowo rozluźnienie dwuwarstwy białkowo - lipidowej w wyniku działania mocznika i nadtlenku wodoru ułatwia ich migrację do wnętrza erytrocytu. Stąd też w kolejnym etapie badań dokonano oceny stanu konformacyjnego białek hemolizatu przy użyciu znaczników spinowych. Wykazano, że kombinacja mocznika i nadtlenku wodoru powodowała spadek stopnia unieruchomienia znacznika maleimidowego (MSL), przyłączonego do białek wnętrza erytrocytów w porównaniu do kontroli (**4b1**). Dla znacznika ISL obserwowano jedynie nieznaczne rozluźnienie struktury białek hemolizatu po ich inkubacji z mocznikiem i nadtlenkiem wodoru. Przeprowadzone badania sugerują, że ekspozycja komórek na działanie

pojedynczych toksyn mocznicowych może przyczyniać się do modyfikacji struktury białek i lipidów. Obserwacje te mogą być wynikiem krótkotrwałego działania mocznika (24 godz.), ale mogą również być spowodowane brakiem innych toksyn mocznicowych, które również odgrywają ważną rolę w przewlekłej niewydolności nerek. Mimo to uzyskane dane dostarczają dowodów na temat mechanizmów uszkodzenia krwinek czerwonych *in vivo*, jakie zachodzą pod wpływem podwyższonego poziomu mocznika i stresu oksydacyjnego u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek poddawanych hemodializie.

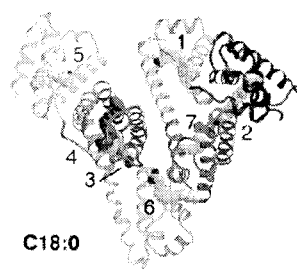
#### Ocena stanu strukturalnego i funkcjonalnego albuminy pochodzącej od osób z przewlekłą chorobą nerek

Otrzymane wyniki badań dotyczących zmian parametrów osocza pochodzącego od osób z przewlekłą chorobą nerek poddawanych hemodializom poprowadziły do bardziej szczegółowego określenia zmian stanu ważnego białka osocza, jakim jest albumina. Zastosowanie znaczników fluorescencyjnych, pozwoliło na zbadanie stanu konformacyjnego różnych regionów w obrębie cząsteczki tego białka (ANS, bis-ANS, piren, pirenomaleimid oraz izotiocyjanian fluoresceiny). Przeprowadzone badania albuminy wyizolowanej od chorych z przewlekłą chorobą nerek potwierdziły hipotezę badawczą mówiącą o dużych zmianach strukturalnych tego białka wynikających z obecności toksyn mocznicowych oraz reaktywnych form tlenu (Pieniążek i wsp., 2009). Wielokrotne analizy potwierdziły, że albumina odgrywa kluczową rolę w neutralizacji reaktywnych form tlenu w osoczu (Roche i wsp., 2008; Taverna i wsp., 2013). W normalnych warunkach fizjologicznych okres półtrwania albuminy wynosi około 20 dni. W tym czasie jest ona trwale narażona na działanie reaktywnych form tlenu we krwi. Wykazano, że ponad 70% reaktywnych form tlenu w osoczu jest neutralizowanych przez to białko (Bourdon i Blache, 2001).

Celem kolejnego etapu badań było określenie podatności albuminy pochodzącej od pacjentów z PChN na utlenianie przed hemodializą i po jej zakończeniu w porównaniu do właściwości tego białka u osób zdrowych. Albuminę wyizolowaną od pacjentów poddawano działaniu dwóch utleniaczy - nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) lub tertbutylo - wodoronadtlenku (t-BOOH). Oba utleniacze stosowane były w molowym stosunku 1:1 do albuminy i nie utleniały wszystkich tioli w białku. Na podstawie doniesień literaturowych oszacowano, że zastosowane stężenia 100  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  lub t-BOOH utlenia ok. 55% tioli

w albuminie (Carballal i wsp., 2003). Wykazano, że poziom grup tiolowych w albuminie w czasie zabiegu hemodializy znacząco spadał, a ich stężenie przed hemodializą było porównywalne z obserwowanym u osób zdrowych (4b6). Przypuszcza się, że obniżenie poziomu grup tiolowych wynika ze wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu podczas hemodializy oraz z obniżenia potencjału przeciwutleniającego. Ekspozycja albuminy pochodzącej od pacjentów z PChN na działanie wybranych utleniaczy powodowała dalszy spadek poziomu grup tiolowych w białku, t-BOOH indukował większe zmiany aniżeli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4b6). Wyższa skuteczność t-BOOH w utlenianiu grup tiolowych jest najprawdopodobniej związana z jego większą hydrofobowością w porównaniu do nadtlenu wodoru. Dzięki temu t-BOOH łatwiej wnika w hydrofobową kieszeń o szerokości 1 nm, w której znajduje się cys-34 (Jakubowski, 2013). Otrzymane wyniki wydają się wskazywać, że wstępne utlenianie (*in vivo*) albuminy u pacjentów poddawanych hemodializie powoduje zwiększoną wrażliwość na jej utlenianie w warunkach *in vitro*. Przy użyciu metody znakowania spinowego badano również środowisko w miejscu wiązania znaczników (Cys34), a także regiony hydrofobowe w białku wiążące kwasy tłuszczowe. Pomimo, że znacznik maleimidowy (MSL) i jodoacetamidowy (ISL) reagują z grupą tiolową w Cys34, widma EPR wykazały różnice w stopniu ich unieruchomienia w miejscu wiązania. W albuminie pochodzącej od zdrowych pacjentów poddanej działaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lub t-BOOH obserwowano znaczące statystycznie zmiany konformacyjne (4b6). Wyższą skuteczność w modyfikacji struktury białka pochodzącego od zdrowych pacjentów wykazał t-BOOH. Oba utleniacze miały natomiast niewielki wpływ na strukturę albuminy pochodzącej od osób z przewlekłą chorobą nerek. Porównanie struktury albuminy w miejscu wiązania MSL i ISL pochodzącej od osób zdrowych i pacjentów z PChN nie wykazało znaczących zmian (4b6).

Zdecydowanie inaczej przedstawiały się wyniki badań albuminy przeprowadzone z zastosowaniem kwasu 16-doksylostearynowego wiążącego się do miejsc hydrofobowych w białku. Jedną z funkcji albuminy jest transport kwasów tłuszczowych we krwi. Analiza krystalograficzna dowiodła, że albumina zawiera siedem miejsc wiążących dla średnio- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych (Rys. 4) (Bhattacharya i wsp., 2000). Wykazano, że zastosowany do badań kwas 16-doksylostearynowy jest wysoce specyficzny w badaniach struktury albuminy (Pavićević i wsp., 2014).



Rys. 4. Struktura krystaliczna albuminy surowicy ludzkiej skompleksowanej z cząsteczkami kwasu stearynowego (Bhattacharya i wsp., 2000).

Obserwowano silne zmiany konformacyjne w albuminie pochodzącej od osób zdrowych poddanej działaniu  $H_2O_2$  lub t-BOOH (4b6). Jednakże w białku znakowanym kwasem 16-doksylosterarynowym większe zmiany obserwowano po jego ekspozycji na działanie nadtlenku wodoru aniżeli t-BOOH. Efekt ten był odwrotny dla albuminy znakowanej MSL lub ISL. Dla albuminy pochodzącej od pacjentów przed hemodializą i po jej zakończeniu, znakowanej 16-DS, również obserwowano istotne zmiany stanu konformacyjnego w porównaniu do kontroli (4b6). Natomiast utlenianie albuminy pochodzącej od pacjentów z PChN nie powodowało dalszych zmian strukturalnych białka w regionie wiązania kwasu 16-doksylostearynowego.

Uzyskane wyniki badań odzwierciedlają zmiany konformacyjne albuminy zachodzące w dwóch obszarach wiązania znaczników spinowych. Pierwszy obszar dotyczy modyfikacji w mikrośrodowisku Cys34, a drugi związany jest z trzema głównymi miejscami odpowiedzialnymi za wiązanie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [Lys 351, Lys 475 i Arg 117 (domena IA, IB, IIB)]. Analiza otrzymanych wyników badań wykazała silny wpływ zastosowanych utleniaczy na strukturę albuminy pochodzącej od osób zdrowych. Ponadto wyniki eksperymentów wskazują, że albumina pochodząca od osób z przewlekłą chorobą nerek jest wysoce zmodyfikowana w warunkach *in vivo*, a tym samym jest mniej podatna na utlenianie prowadzone w warunkach *in vitro*.

#### Zmiany właściwości jednojądrzastych komórek krwi ekspozowanych na procesy karbamylicji i stresu oksydacyjnego

Reakcje cyjanianu z cząsteczkami biologicznie czynnymi (aminokwasami, białkami, lipidami itp.) prowadzi do modyfikacji ich struktury i funkcji (Jaisson i wsp., 2011). Podobnie

stres oksydacyjny zmienia strukturę i funkcje biologiczne utlenianych cząsteczek. Oba te procesy obserwowane są w przebiegu wielu chorób, między innymi chorób sercowo - naczyniowych, miażdżycy czy przewlekłej chorobie nerek (Himmelfarb i wsp., 2000; Pieniążek i wsp., 2009; Jaisson i wsp., 2011).

Wykonane badania działania cyjanianu sodu na jednojądrzaste komórki krwi nie wykazały żadnego wpływu na ich przeżywalność do stężenia 2 mmol/L (**4b4**). Należy zauważyć, że fizjologiczne stężenie cyjanianu u osób zdrowych wynosi około 50 nmol/L, a u osób z przewlekłą chorobą nerek jego poziom wynosi ok. 150 nmol/L (Nilsson i wsp., 1996; **4b3**). Można więc przypuszczać, że *in vivo* cyjanian nie ma wpływu na przeżywalność tych komórek. Niezwykle istotnym wydawało się jednak określenie wpływu połączonego działania karbamylicacji białek i stresu oksydacyjnego na jednojądrzaste komórki krwi. W tym celu poddawano je działaniu cyjanianu sodu i nadtlenu wodoru i oceniano poziom nieenzymatycznego potencjału przeciwutleniającego. Obserwowano znaczący spadek tego parametru po inkubacji komórek z cyjanianem lub nadtlaniem wodoru oraz po zastosowaniu ich kombinacji (**4b4**). Zgodnie z oczekiwaniami najbardziej obniżał się poziom potencjału przeciwutleniającego w komórkach poddanych działaniu nadtlenu wodoru. Nie mniej jednak działanie samego cyjanianu oraz jego połączonego działania z nadtlaniem wodoru również skutkowało znacznym wyczerpywaniem się przeciwutleniaczy o małych masach cząsteczkowych w komórkach. Dodatkowo w komórkach, które były poddane działaniu cyjanianu i/lub nadtlenu wodoru zauważono spadek stężenia zredukowanego glutationu oraz poziomu grup tiolowych (**4b4**). Przypuszcza się więc, że obniżenie zdolności przeciwutleniającej komórek może być spowodowane między innymi utratą części zredukowanego glutationu i innych tioli. Redukcja potencjału przeciwutleniającego w komórkach po ich inkubacji z kombinacją cyjanianu i nadtlenu wodoru była mniejsza niż po zastosowaniu samego nadtlenu wodoru. Taki wynik może świadczyć o tym, że karbamylowane przeciwutleniacze o małych masach cząsteczkowych są bardziej odporne na działanie nadtlenu wodoru. U pacjentów z PChN odnotowano istotnie wyższy potencjał przeciwutleniający osocza przed hemodializą w porównaniu do poziomu u osób zdrowych (Pieniążek i wsp., 2002; Clermont i wsp., 2000). Zjawisko to przypuszczalnie wyjaśnia wyższe stężenie kwasu moczowego w osoczu osób z przewlekłą chorobą nerek w porównaniu do jego poziomu u osób zdrowych (Vanholder i wsp. 2003).

Natomiast obniżenie się poziomu grup tiolowych w komórkach po inkubacji z kombinacją cyjanianu i nadtlenu wodoru może być spowodowane ich utlenianiem przez nadtlenuk wodoru lub/i karbamyłacją w wyniku reakcji z cyjanianem.

Na skutek utleniania białek i lipidów możliwe jest powstawanie nadtlenuków. Podwyższony poziom nadtlenuków był zauważalny jedynie po inkubacji komórek z nadtlenukiem wodoru, natomiast w komórkach ekspozycyjnych na działanie cyjanianu oraz połączonego działania cyjanianu i nadtlenu wodoru poziom nadtlenuków nie zmieniał się w stosunku do kontroli (**4b4**). Wyniki tych obserwacji mogą świadczyć o odporności karbamyłowanych białek i lipidów na procesy utleniania. W pracy zbadano również wpływ karbamyłowania, utleniania oraz kombinacji obu procesów na właściwości błony plazmatycznej limfocytów. Żaden z wyżej wymienionych procesów nie miał wpływu na płynność lipidów błonowych w ich polarnym regionie (**4b4**). Zmiany płynności obserwowano natomiast na głębokości 12-tego i 16-tego atomu węgla łańcuchów węglowodorowych kwasów tłuszczowych. Zarówno proces karbamyłacji jak i utlenianie powodowały znaczący wzrost unieruchomienia znacznika spinowego. Ponadto połączone działanie obu procesów potęgowało wzrost płynności błony plazmatycznej na głębokości 12- i 16-tego atomu węgla łańcucha węglowodorowego. Zmiany płynności błony plazmatycznej mogą być konsekwencją karbamyłacji białek błonowych lub też wynikać z interakcji pomiędzy zmodyfikowanymi cząsteczkami białek i lipidów. W większości prac wskazywano, że proces karbamyłacji dotyczy białek i wolnych aminokwasów. Jednak zasugerowano, że karbamyłacja przypuszczalnie dotyczy również innych niebiałkowych cząsteczek zawierających pierwszorzędną grupę aminową. Do takich cząsteczek należą fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanoloamina obecne w błonie plazmatycznej komórek (Trepanier and Thibert, 1996). Na wzrost płynności błony komórkowej wpływa również proces utleniania lipidów. Wprawdzie w dokonanych badaniach nie obserwowano wzrostu stężenia nadtlenuków (produktów utleniania lipidów), jednak procesy utleniania białek i lipidów są w stanie również prowadzić do ich fragmentacji i/lub agregacji oraz sieciowania lipidów i interakcji białek z lipidami, które w efekcie mogą powodować zmiany płynności błon plazmatycznych.

Jak opisano we wstępie, karbamyłacji ulegają grupy aminowe, tiolowe, hydroksylowe, fenolowe, karboksylowe i imidazolowe białek. W białkach jednojądrzastych komórek krwi



poddanych działaniu cyjanianu i/lub nadtlenu wodoru określono poziom grup aminowych. Wykazano, że cyjanian powodował ich znaczny spadek w białkach (**4b5**). Może to dowodzić karbamyłacji grup aminowych z wytworzeniem pochodnych karbamoilowych. Reakcje grup aminowych z cyjanianem tworzą trwałe produkty - w przeciwieństwie do produktów powstających w wyniku reakcji cyjanianu z grupami tiolowymi (**4b3**). Z kolei w komórkach inkubowanych jedynie z nadtlaniem wodoru nie obserwowano istotnych zmian poziomu grup aminowych. Prawdopodobnie świadczy to o tym, że nadtlenek wodoru nie reagował z grupami aminowymi.

W następstwie utleniania białek mogą na nich powstawać grupy karbonylowe. Zgodnie z oczekiwaniami w komórkach inkubowanych z nadtlaniem wodoru odnotowano istotnie podwyższony ich poziom (**4b5**). Ponadto połączone działanie cyjanianu i nadtlenu wodoru przyczyniało się do nieznacznego wzrostu grup karbonylowych w białkach. Otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania poziomu grup karbonylowych w osoczu pacjentów z przewlekłą chorobą nerek poddawanych hemodializom, świadczące o obecności stresu oksydacyjnego u chorych i o jego nasileniu podczas hemodializy (Pieniążek i wsp., 2009).

Biorąc pod uwagę modyfikacje białek i zmianę płynności błony plazmatycznej jednojądrzastych komórek krwi pod wpływem połączonego działania cyjanianu i nadtlenu wodoru zasadnym było określenie ich wpływu na potencjał mitochondrialny oraz indukcję procesu apoptozy. Zmiany morfologiczne i biochemiczne mogą przyczyniać się do indukcji procesu apoptozy w celu eliminacji uszkodzonych komórek. W indukcji apoptozy w komórkach bardzo ważną rolę odgrywają mitochondria. Wykazano, że depolaryzacja błony mitochondrialnej przez utleniacze prowadzi do utraty potencjału mitochondrialnego, zmiany jej przepuszczalności i uwolnienia jonów wapnia, a w konsekwencji do śmierci komórki.

Potencjał mitochondrialny w komórkach poddanych działaniu cyjanianu i/lub nadtlenu wodoru mierzony był bezpośrednio po inkubacji oraz 30, 60 i 150 min po jej zakończeniu (**4b5**). Niezależnie od czasu obserwowano statystycznie istotny spadek potencjału mitochondrialnego w komórkach inkubowanych z kombinacją cyjanianu i nadtlenu wodoru względem komórek kontrolnych. Inkubacja komórek z samym cyjanianem spowodowała znaczny spadek potencjału mitochondrialnego komórek w stosunku do kontroli po 30 i 150 minutach od jej zakończenia.

Indukcja procesu apoptozy związana jest z aktywacją kaspaz odpowiedzialnych za jej przebieg. Uzyskane w trakcie badań wyniki wskazują na brak znaczącej zmiany aktywności kaspaz -6 i -8 w komórkach traktowanych cyjanianem, nadtlaniem wodoru lub ich kombinacją (**4b5**). Z drugiej strony, proces karbamylicacji oraz stres oksydacyjny powodowały istotny wzrost aktywności kaspaz -2, -3 i -9 w limfocytach (**4b5**). Enzymy te były silnie aktywowane przez nadtlanie wodoru, a nieco słabiej przez cyjanian. Zwiększenie aktywności kaspazy-2 obejmuje aktywację mitochondrialnego szlaku apoptotycznego i wydaje się być niezależne od kaspazy-8. Z kolei kaspaza-9 jest aktywowana przez apoptosomy zawierające kompleks cytochromu c (cyt c), Apaf-1 (czynniki 1 aktywujący proteazy apoptotyczne) i pro-kaspazy-9 (Marek, 2013). Cyt c jest uwalniany z mitochondriów do cytosolu podczas utraty potencjału błonowego.

Oznaczenie aktywności kaspazy-3 jest dobrym wskaźnikiem procesu apoptozy, ponieważ stanowi punkt zbiorczy dla zależnych i niezależnych od mitochondriów szlaków w śmierci komórek będących na drodze apoptozy. Przeprowadzone badania wykazały wzrost aktywności tego enzymu w komórkach poddanych działaniu nadtlenu wodoru oraz kombinacji cyjanianu z nadtlaniem wodoru (**4b5**). Otrzymane wyniki badań aktywności kaspaz w jednojądrzastych komórkach krwi były zgodne z wynikami uzyskanymi przez Yang i Chang, którzy zaobserwowali, że apoptoza indukowana cyjanianem w linii komórkowej HCT 116 odbywa się między innymi przez aktywację kaspazy-3 (Yang i Chang, 2014).

Wewnętrzny szlak apoptozy wiąże się również z uszkodzeniami DNA, polegającymi między innymi na podwójnych i pojedynczych jego pęknięciach. W komórkach poddanych działaniu cyjanianu lub/i nadtlenu wodoru potwierdzono znaczący wzrost poziomu uszkodzonego DNA w ogonie komety (**4b5**). Wyniki wykonanych badań przypuszczalnie świadczą o tym, że zarówno karbamylicacja jak i utlenianie powodują zmiany w strukturze białek, co w konsekwencji może prowadzić do utraty ich funkcji biologicznych i eliminacji komórek z krwiobiegu poprzez apoptozę.

### Ocena udziału siarczanu indoksyli w generowaniu stresu oksydacyjnego w jednojądrzastych komórkach krwi

Siarczan indoksyli jako metabolit tryptofanu gromadzony jest w organizmie pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w bardzo dużych ilościach. Jego poziom we krwi pacjentów może być ponad 85 razy wyższy aniżeli u osób zdrowych (Vanholder i wsp. 2003). W kilku publikacjach opisano, że w przypadku przewlekłej choroby nerek, wysoki poziom IS indukuje wzrost wytwarzania ROS i zaburzenia układu antyoksydacyjnego w różnych typach komórek, przyczyniając się do postępu choroby (Niwa, 2010; Cruz i wsp., 2014). Jednakże, pomimo tego, że IS jest dobrze znaną toksyną mocznicową nadal niewiele wiadomo na temat jej wpływu na komórki krwi.

Przeprowadzone badania wykazały, że siarczan indoksyli w stężeniach 0,2 lub 1,0 mmol/L nie miał wpływu na przeżywalność ludzkich jednojądrzastych komórek krwi (4b7). Wymienione powyżej stężenia IS zostały opisane w literaturze jako średni i maksymalny poziom obserwowany u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (Vanholder i wsp. 2003). Znaczący spadek przeżywalności komórek obserwowano dopiero po traktowaniu komórek siarczanem indoksyli w stężeniach 5 mmol/L i więcej. W kolejnym etapie badań dokonano oceny poziomu reaktywnych form tlenu i azotu w komórkach po inkubacji z siarczanem indoksyli w stężeniu 0,2 i 1,0 mmol/L przy użyciu trzech sond fluorescencyjnych (H<sub>2</sub>DCF-DA, DHE, DAF-FM). Sonda H<sub>2</sub>DCF-DA jest niespecyficznym wskaźnikiem reagującym nie tylko z nadtlenkiem wodoru, ale także z innymi reaktywnymi formami tlenu wewnątrz komórek. Uzyskane wyniki wskazują, że po 24 godzinach inkubacji komórek z siarczanem indoksyli (1 mmol/L) poziom reaktywnych form tlenu znacznie wzrósł w porównaniu do kontroli. Jednak stężenie 0,2 mmol/L IS nie zmieniało poziomu nadtlenku wodoru w jednojądrzastych komórkach krwi w porównaniu do kontroli. Przy użyciu dihydroetydyny (DHE) zaobserwowano również znaczący wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w jednojądrzastych komórkach krwi traktowanych siarczanem indoksyli w porównaniu do jego poziomu w komórkach kontrolnych. Co więcej wzrostowi tworzenia anionów ponadtlenkowych towarzyszyła znacząco wyższa aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w badanych komórkach krwi po inkubacji z IS w obu wybranych stężeniach (4b7). W komórkach inkubowanych z siarczanem indoksyli wykazano wzrost natężenia fluorescencji sondy DAF-FM, odzwierciedlający wzrost poziomu tlenu azotu, w porównaniu

do wartości obserwowanych w kontroli. Wzrost produkcji reaktywnych form tlenu indukowanych siarczanem indoksyłu obserwowano również przy użyciu H<sub>2</sub>DCF-DA w neutrofilach przez Cruz i współpracowników (2014). Autorzy tej pracy nie wykazali jednak znaczących różnic w poziomie tlenku azotu w neutrofilach po ich inkubacji z siarczanem indoksyłu. Sugeruje się że, siarczan indoksyłu przez hamowanie szlaku zależnego od Nrf2 zmniejsza aktywność enzymatyczną oksygenazy hemowej (HO-1), a to jest jednym z czynników powodujących wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (Bolati i wsp., 2013). Ponadto, siarczan indoksyłu może aktywować oksydazę NADPH wywołując wzrost wewnątrzkomórkowego wytwarzania reaktywnych form tlenu. Potwierdzeniem wzrostu stresu oksydacyjnego może być obserwowany spadek całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w jednojądrzastych komórkach krwi po ich inkubacji z siarczanem indoksyłu (4b7). W jednojądrzastych komórkach krwi poddanych działaniu siarczanu indoksyłu obserwowano również wzrost poziomu grup karbonylowych i nadtlenków powstających w wyniku utleniania białek i lipidów przez reaktywne formy tlenu (4b7). Przeprowadzone badania wykazały ponadto spadek poziomu zredukowanego glutationu po inkubacji komórek z siarczanem indoksyłu o około 10 % w porównaniu do poziomu w komórkach kontrolnych (4b7). Równolegle w jednojądrzastych komórkach krwi obserwowano zmniejszenie się poziomu grup tiolowych. Sugeruje się, że działanie prooksydacyjne siarczanu indoksyłu może być nasilone w wyniku hamowania wytwarzania glutationu, będącego głównym elementem nieenzymatycznego układu przeciwutleniającego w komórkach zapobiegającego utlenianiu grup tiolowych białek (Gelasco i wsp., 2006). Uzyskane wyniki pokazują, że siarczan indoksyłu indukuje stres oksydacyjny, modyfikując równowagę między mechanizmami pro i przeciwutleniającymi w jednojądrzastych komórkach krwi, powoduje zmniejszenie aktywności układu antyoksydacyjnego, zwiększa wytwarzanie reaktywnych form tlenu i prowadzi do uszkodzenia biomolekuł oraz zmienia ekspresję cytokin (TNF- $\alpha$ ) w komórki.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Obecność toksyn mocznicowych we krwi pacjentów z przewlekłą chorobą nerek powoduje zmiany w białkach hemolizatu i albuminie. Zabieg hemodializy pogłębia uszkodzenia materiału biologicznego.

2. Ekspozycja krwi na działanie podwyższonego stężenia mocznika ma wpływ na strukturę błony komórkowej erytrocytów i białek hemolizatu. Połączone działanie mocznika i nadtlenku wodoru nasila uszkodzenia badanych komponentów.
3. Albumina pochodząca od osób z przewlekłą chorobą nerek jest mniej podatna na utlenianie w warunkach *in vitro*.
4. Połączone działanie karbamylicacji i stresu oksydacyjnego prowadzi do modyfikacji białek i lipidów jednojądrzastych komórek krwi.
5. Karbamylicacja białek jednojądrzastych komórek krwi może indukować procesy apoptozy na szlaku mitochondrialnym.
6. Siarczan indoksyłu przyczynia się do oksydacyjnych uszkodzeń składników komórek

#### Literatura do pkt 4c

1. Aziz MA, Majeed GH, Diab KS, Al-Tamimi RJ. The association of oxidant-antioxidant status in patients with chronic renal failure. *Ren Fail.* 2016;38:20–6.
2. Bhattacharya AA, Grüne T, Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol.* 2000;303:721–32.
3. Bolati D, Shimizu H, Yisireyili M, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF- $\kappa$ B. *BMC Nephrol.* 2013,4,14:56.
4. Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal.* 2001;3:293–311.
5. Carballal S, Radi R, Kirk MC, Barnes S, Freeman BA, Alvarez B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry.* 2003;42:9906–14.
6. Clermont G, Lecour S, Lahet J, Siohan P, Vergely C, Chevet D, et al. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovasc Res.* 2000;47:618–23.
7. Cruz EF d., Cendoroglo M, Manfredi SR, Eugenia Canziani M, Quinto BMR, Grabulosa CC, Guimaraes-Souza NK, Peres AT, Carvalho JTG d., Batista MC, Dalboni MA. Effect of Indoxyl Sulfate on Oxidative Stress, Apoptosis, and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Leukocytes. *ISRN Oxidative Medicine* 2014, 1–7.
8. Gao H, Liu S. Role of uremic toxin indoxyl sulfate in the progression of cardiovascular disease. *Life Sci.* 2017, 185:23-29.
9. Garcia-Martinez R, Caraceni P, Bernardi M, Gines P, Arroyo V, Jalan R. Albumin: pathophysiologic basis of its role in the treatment of cirrhosis and its complications. *Hepatology.* 2013;58:1836–46.
10. Gelasco AK, Raymond JR. Indoxyl sulfate induces complex redox alterations in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006, 290:F1551–8.

11. Gwozdziński K, Janicka M. Oxygen free radicals and red blood cell damage in acute renal failure. *Biochem Soc Trans.* 1995;23:635S.
12. Himmelfarb J, Lazarus JM, Hakim R. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *Am J Kidney Dis.* 1991;17:271–6.
13. Himmelfarb J, McMonagle E, McMennamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* 2000;58:2571–8.
14. Jaisson S, Pietrement C, Gillery P. Carbamylation-derived products: bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis. *Clin Chem.* 2011;57:1499–505.
15. Jakubowski H. S-homocysteinylated proteins. [in.] *Homocysteine in Protein Structure/Function and Human Disease.* Jakubowski H.[ed.]. Springer 2013;pp.121-135.
16. Jia Y, Buehler PW, Boykins RA, Venable RM, Alayash AI. Structural basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin: a novel oxidative pathway. *J Biol Chem.* 2007;282:4894–907.
17. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet.* 2012;379:165–80.
18. Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Mysliwiec M. Hepcidin, iron status, and renal function in chronic renal failure, kidney transplantation, and hemodialysis. *Am J Hematol.* 2006;81:832–7.
19. Marek Ł. Rola apoptozomu w aktywacji prokaspazy 9. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2013;67:54–64.
20. Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Otagiri M. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:1322–8.
21. Nilsson L, Lundquist P, Kågedal B, Larsson R. Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure. *Clin Chem.* 1996;42:482–3.
22. Niwa T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. *Nagoya J Med Sci.* 2010;72:1-11.
23. Pavićević AA, Popović-Bijelić AD, Mojović MD, Šušnjar SV, Bačić GG. Binding of doxyl stearic spin labels to human serum albumin: an EPR study. *J Phys Chem B.* 2014;118:10898–905.
24. Pieniązek A, Brzeszczynska J, Kruszynska I, Gwozdziński K. Investigation of albumin properties in patients with chronic renal failure. *Free Radic Res.* 2009;43:1008–1018.
25. Pieniązek A, Bujak S, Gwozdziński K. Changes in reducing ability of blood plasma in chronic renal patients during hemodialysis. IX Biennial Meeting of the Society for Free radical Research International. 2002;681-684.
26. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008;582:1783–7.
27. Taverna M, Marie A-L, Mira J-P, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care.* 2013;3:4.
28. Trepanier DJ, Thibert RJ. Carbamylation of erythrocyte membrane aminophospholipids: an in vitro and in vivo study. *Clin Biochem.* 1996;29:333–45.
29. Vanholder R, Smet R de, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003;63:1934–43.

30. Yang EJ, Chang JH, TNF- $\alpha$  regulates potassium cyanate-induced apoptosis via NF- $\kappa$ B activation in HCT 116 cells, *Biomed. Sci. Lett.* 2014;20:32-38.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora we wrześniu 2005 r. podjęłam pracę na etacie adiunkta w Katedrze Inżynierii Środowiska, Wydziału Architektury, Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Łódzkiej. W początkowym okresie tej pracy moim głównym zadaniem było opracowanie i przygotowanie ćwiczeń laboratoryjnych z podstaw chemii analitycznej oraz biologii dla studentów I roku Inżynierii Środowiska, które realizowałam pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Wojciechowskiego oraz dr hab. Macieja Urbaniaka. Ponadto w kolejnym roku akademickim zostałam zobligowana do przygotowania i poprowadzenia wykładu kursowego z biologii dla studentów Inżynierii Środowiska. Przygotowanie w/w zajęć wymagało ode mnie zapoznania się z tematyką i metodyką badań prowadzonych na kierunku Inżynieria Środowiska PŁ. Ponadto opracowanie, przygotowanie a następnie prowadzenie w/w zajęć pozwoliło na ukształtowanie moich umiejętności dydaktycznych. Podczas pracy w PŁ brałam również udział w przygotowaniu projektu badawczego mającego na celu badanie czystości wód opadowych łódzkiej sieci kanalizacyjnej w różnych jej punktach. Zadanie to zakończyłam na etapie przygotowania projektu, ponieważ w marcu 2007 r. podjęłam pracę na etacie adiunkta w Katedrze Biofizyki Medycznej (wówczas Katedrze Termobiologii) Uniwersytetu Łódzkiego.

Po rozpoczęciu pracy w Katedrze Biofizyki Medycznej UŁ zostałam włączona jako wykonawca do realizacji projektu badawczego pod tytułem „Współdziałanie antyutleniaczy z lekami przeciwnowotworowymi w obniżaniu ich kardiotoksyczności w chemioterapii raka piersi” finansowanego przez MNiSW (Grant N 401 2337). Hipoteza badawcza tego projektu zakładała, że wybrane nitroksydy (pirolin, pirolid) oraz flawonoidy (kwercetyna, epigalokatechina) będą ograniczały kardiotoksyczność leków przeciwnowotworowych stosowanych w leczeniu raka sutka. W ramach tego projektu podjęto również badania mające na celu określenie czy wybrane przeciwutleniacze będą miały działanie ochronne na składniki osocza i komórki wątroby. Otrzymane wyniki wskazują na hepatotoksyczne działanie doksorubicyny i taksanów (paklitakselu i docetakselu) w doświadczalnym modelu szczurzym *in vivo*. Połączenie doksorubicyny z którymkolwiek z taksanów prowadziło

do większych zmian w badanych parametrach stresu oksydacyjnego w porównaniu do leczenia gdzie leki podawane były pojedynczo. Z kolei badania osocza pobranego od szczurów z wyidukowanym nowotworem sutka, a następnie poddanych leczeniu kombinacją leków (doksorubicyna i docetaksel) w połączeniu z nitroksydem (pirolin) lub flawonoidom (kwercetyna) wykazały ochronne działanie tych ostatnich na uszkodzenia oksydacyjne spowodowane działaniem leków przeciwnowotworowych. W ramach tego projektu prowadziłam również badania *in vitro* wpływu w/w leków przeciwnowotworowych i ich kombinacji z nitroksydami na komórki raka sutka linii MCF-7. Realizowane w tym projekcie prace badawcze z moim udziałem zostały opublikowane w trzech pracach doświadczalnych (Tabaczar i wsp., 2012; Pieniżek i wsp., 2013; Tabaczar i wsp., 2013) oraz zaprezentowane w formie komunikatów na 19 naukowych konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Do głównych moich zainteresowań naukowych należą zagadnienia związane ze stresem oksydacyjnym oraz związane z nim uszkodzenia białek i lipidów komórkowych. Zagadnieniem związanym za tą tematyką były badania wpływu wysiłku fizycznego na strukturę erytrocytów i wybrane parametry osocza u młodych, nietreningujących mężczyzn. Badania te realizowałam w ramach grantu pt: „Czy próby wysiłkowe mogą indukować zmiany w strukturze erytrocytów oraz w wybranych parametrach osocza człowieka”, finansowanego przez MNiSW (N 404 1017 33), którego byłam wykonawcą. Do realizacji celów tego projektu stosowano intensywny, ale krótkotrwały wysiłek fizyczny młodych mężczyzn, jako model fizjologicznego modulatora indukującego stres oksydacyjny. Uzyskane wyniki badań wykazały znaczący spadek płynności lipidów błonowych w jej polarnym regionie, zmiany w stanie konformacyjnym białek błonowych erytrocytów oraz białek hemolizatu, głównie hemoglobiny po wysiłku. Z kolei w osoczu osób poddawanych wysiłkowi fizycznemu obserwowano znaczący wzrost potencjału przeciwutleniającego. Ponadto przeprowadzono badania frakcji erytrocytów różniących się czasem występowania w krwiobiegu (tzw. erytrocyty młode, w średnim wieku i stare) u mężczyzn poddanych wysiłkowi fizycznemu. Najstarsze erytrocyty były najbardziej wrażliwe na zmiany parametrów stresu oksydacyjnego indukowanego wysiłkiem fizycznym. Analiza całości przeprowadzonych badań wskazywała, że pojedynczy intensywny wysiłek fizyczny może wywoływać łagodny stres oksydacyjny odzwierciedlający się w zmianach konformacyjnych białek, utlenianiu białek



i lipidów. Jednocześnie wykazano, że krótkotrwały wysiłek może prowadzić do mobilizacji defensywnych systemów przeciwutleniających we krwi. Wykonanie badań związanych z tym projektem i zdobyta wówczas wiedza pozwoliła na poszerzenie tego zagadnienia i realizację kolejnego projektu badawczego pod tytułem „Wpływ próby wysiłkowej na zmiany w strukturze erytrocytów oraz wybranych parametrów osocza krwi u mężczyzn z chorobą niedokrwienną serca poddanych rehabilitacji kardiologicznej” finansowanego przez MNiSW (N 404 1784 40). Rehabilitacja kardiologiczna pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, po przebytych incydentach kardiologicznych ma na celu poprawienie sprawności fizycznej, ogólnego stanu funkcjonowania organizmu oraz zmniejszenia ryzyka ponownych zawałów mięśnia sercowego. Nie mniej jednak, wpływ rehabilitacji na parametry stresu oksydacyjnego we krwi pacjentów pozostaje nie do końca jasny. Celem badań było określenie wpływu rehabilitacji kardiologicznej na parametry stresu oksydacyjnego w erytrocytach oraz osoczu pacjentów po interwencjach kardiologicznych. Badania prowadzono na grupie mężczyzn pozostających pod opieką lekarza przed przystąpieniem do rehabilitacji oraz po jej zakończeniu. Porównanie płynności lipidów błonowych oraz stanu konformacyjnego białek błonowych i hemoglobiny nie wykazało znaczących statystycznie różnic w erytrocytach pacjentów przed rehabilitacją i po jej zakończeniu. W hemolizacie stwierdzono natomiast nieznaczny wzrost poziomu askorbinianu i zredukowanego glutationu po zakończeniu rehabilitacji. Z kolei w osoczu osób poddawanych rehabilitacji, po jej zakończeniu obserwowano znaczący wzrost poziomu askorbinianu oraz wzrost całkowitego potencjału przeciwutleniającego. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że proces rehabilitacji kardiologicznej pacjentów po przebytych zawałach mięśnia sercowego przyczynił się do poprawy parametrów biochemicznych i morfologicznych krwi pacjentów. Ponadto wykazano spadek parametrów stresu oksydacyjnego. Zmiany te mogą przyczynić się do zwiększenia właściwości funkcjonalnych serca oraz poprawy sprawności fizycznej pacjentów. Tym samym, niewymiernym efektem przebytej rehabilitacji mogą być lepsze rokowania zdrowotne dla pacjentów po przebytych zawałach mięśnia sercowego. Realizowane w ramach tych dwóch projektów badania zostały opublikowane w postaci pięciu publikacji doświadczalnych (Brzeszczyńska i wsp., 2008; Gwoździński i wsp., 2013; Gwoździński i wsp., 2013; Gwoździński i wsp., 2016; Gwoździński

i wsp., 2017) oraz zaprezentowane w postaci komunikatów na 16 konferencjach o zasięgu międzynarodowym.

Od grudnia 2012 r. do grudnia 2013 r. brałam udział w realizacji projektu współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013 (projekt pod nazwą „WROVASC – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej” – „Wpływ promieniowania NIR na komórki jednojądrzaste krwi obwodowej człowieka”). Badania dotyczyły oznaczenia stopnia destrukcji limfocytów ludzkich poddanych działaniu promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni. Wykazano, iż dawka promieniowania NIR o energii 2,2 J, była najbardziej bezpieczna dla napromieniowywanych komórek, gdyż nie powodowała zmian w ich przeżywalności, nie uszkadzała ich błony plazmatycznej, DNA i organelli komórkowych (mitochondriów i lizosomów), nie zaburzała produkcji ATP, nie zakłóciła wydajności fosforylacji oksydacyjnej, nie powodowała zmian potencjału mitochondrialnego i wycieku cytochromu c z mitochondriów, nie generowała reaktywnych form tlenu i azotu, jak również nie indukowała apoptozy/nekrozy. Większe dawki promieniowania NIR (6,6 oraz 13,2 J) powodowały natomiast zmiany niektórych z badanych parametrów. Wartości tych parametrów wracały jednak do poziomów kontrolnych w ciągu następnych 24 godz. po napromieniowaniu. Przeprowadzone wieloparametrowe badania pozwoliły na sformułowanie ogólnego wniosku, że niskie dawki promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni nie wykazały destrukcyjnego wpływu na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Obecnie przygotowywana jest publikacja z przeprowadzonych badań.

W kręgu moich zainteresowań już od czasów studiów magisterskich są również badania związane z oceną czystości wód jezior położonych w północnej części Polski, na terenie Borów Tucholskich. Całokształt walorów przyrodniczych i hydrologicznych tego terenu przyczynił się do powstania w 2010 roku Rezerwatu Biosfery Bory Tucholskie wpisanego na listę rezerwatów biosfery UNESCO. Od roku 1998 do chwili obecnej wchodzę w skład zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Krzysztofa Gwoździńskiego zajmującego się tą tematyką. Ocena parametrów czystości wód z wybranych jezior prowadzona jest dwukrotnie w ciągu roku; podczas wiosennego mieszania się wód (marzec/kwiecień) oraz podczas stagnacji letniej (sierpień). Klasyfikacja jezior pod względem czystości wód

dokonywana jest na podstawie standardowych parametrów fizykochemicznych określonych przez Państwową Inspekcję Ochrony Środowiska w oparciu o aktualne Normy Polskie dotyczące czystości wód powierzchniowych. W wybranych wodach jeziornych wykonywane są również oznaczenia poziomu metali alkalicznych i przejściowych. Dotychczas badaniami zostały objęte wszystkie jeziora na terenie Parku Narodowego „Bory Tucholskie”, znaczna część jezior z terenu Zaborskiego Parku Krajobrazowego, Wdzydzkiego Parku Krajobrazowego oraz wiele jezior położonych w ich otulinie (w sumie około 100 jezior). Wśród nich dominują zbiorniki należące do drugiej i trzeciej klasy czystości, ale są również jeziora zakwalifikowane do pierwszej klasy czystości. Niejednokrotnie badania opublikowane przez nasz zespół są jedynymi jakie prowadzono na tym terenie. W zawiązku z tym wyniki przez nas uzyskane są często cytowane w licznych monografiach i opracowaniach innych autorów. Rezultaty badań czystości jezior przeprowadzone z moim udziałem opublikowano do tej pory w 1 publikacji w czasopiśmie z listy A MNiSW (Polish Journal of Environmental Studies) oraz w 13 pracach monograficznych (wymienione poniżej). Między innymi z zakresu tych badań zespół otrzymał w 2003 roku nagrodę zespołową II stopnia Rektora Uniwersytetu Łódzkiego. Ponadto intensywna działalność naszego zespołu badawczego na terenie Borów Tucholskich przyczyniła się do zorganizowania przez nas cyklu konferencji naukowych pt. „Bory Tucholskie – zasoby i ich ochrona”.

Moje obecne zainteresowania oraz dalsze plany naukowe skupiają się głównie na tematyce związanej z badaniami wpływu toksyn mocznicowych wiążących się z białkami na strukturę i funkcjonowanie komórek krwi. Do tej pory podjęte zostały badania udziału siarczanu indoksyłu w generowaniu stresu oksydacyjnego w jednojądrzastych komórkach krwi. Doniesienia literaturowe dotyczące badań tej toksyny (głównie *in vivo*) wskazują, że może ona w znaczący sposób przyczyniać się do progresji przewlekłej choroby nerek. Jednak jak sugeruje wiele doniesień badania *in vivo* nie pozwalają określić mechanizmu działania tylko tej jednej toksyny ze względu na możliwe interakcje pomiędzy innymi związkami. Stąd też, moje najbliższe plany badawcze związane są z podjęciem próby wyjaśnienia mechanizmów działania toksyn mocznicowych wiążących się z białkami w komórkach krwi w badaniach *in vitro*.

### Literatura do pkt 5

8. Brzeszczynska J, **Pieniążek A**, Gwozdziński L, Gwozdziński K, Jegier A. Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism* 2008;33:1223–1231.
1. Gwoździński K, Gonciarz M, Grzelak A, Kowalczyk A, Kilańczyk E, **Pieniążek A**, Sztiller M. Ocena czystości wód wybranych jezior na terenie Borów Tucholskich. *Bory Tucholskie -Ochrona Biosfery, Uniwersytet Łódzki*, 1998;31–42.
2. Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, **Pieniążek A**, Sztiller M. Klasy czystości wybranych jezior na terenie Parku Narodowego Bory Tucholskie. [w:] *Bory Tucholskie -zasoby i ich ochrona*, K. Gwoździński [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2001;126–138.
3. Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, **Pieniążek A**, Sztiller M. Określenie jakości wód jezior położonych na terenach północnej i wschodniej granicy Parku Narodowego Bory Tucholskie. [w:] *Bory Tucholskie -zasoby i ich ochrona*, K. Gwoździński [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2001;139–151.
4. Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, **Pieniążek A**, Sztiller M. Klasyfikacja czystości wód Strugi Siedmiu Jezior. [w:] *Bory Tucholskie -zasoby i ich ochrona*, K. Gwoździński [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2001;152–164.
5. Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, **Pieniążek A**, Sztiller M. Ocena stanu czystości jezior środkowo-północnej części Parku Narodowego Bory Tucholskie. [w:] *Diagnostyka stanu środowiska. Metody badawcze-prognozy*. Wydawnictwo Uczelniane Akademia Techniczno-Rolnicza Bydgoszcz 2002;73–82.
6. Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, **Pieniążek A**, Sztiller M. Badania fizykochemiczne wód Jeziora Gardliczno Duże oraz Jeziora Zmarłe na terenie Zaborskiego Parku Krajobrazowego, Zaborski Park Krajobrazowy, Charzykowy 2002.
7. Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, **Pieniążek A**, Sztiller M. Badania fizykochemiczne wód jezior położonych w północno-zachodniej części Zaborskiego Parku Krajobrazowego. [w:] *Bory Tucholskie -zasoby i ich ochrona II*, K. Gwoździński [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2003;23–32.
8. Gwoździński K, Gonciarz M, Kowalczyk A, Kilańczyk E, **Pieniążek A**, Sztiller M. Klasy czystości wód wybranych jezior Zaborskiego Parku Krajobrazowego. [w:] *Bory Tucholskie-zasoby i ich ochrona II*, K. Gwoździński [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2003;33–47.
9. Gwoździński K, Gonciarz-Wach M, Bujak S, Kilańczyk E, **Pieniążek A**. Czystość Jezior położonych w północnej części Zaborskiego Parku Krajobrazowego. [w:] *Bory Tucholskie -zasoby i ich ochrona III*, K. Gwoździński [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2005;165–180.
10. Gwoździński K, Mazur J, Kilańczyk E, **Pieniążek A**. Metals in water of selected lakes in the central and the northern part of Zaborski Landscape Park. *Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 2004;11:1075–1082.
11. Gwozdziński K, Mazur J, **Pieniążek A**. Concentration of metals in water of unmonitored lakes near a Landscape Polish Journal of Environmental Studies. 2014;23:1317–1321.

12. Gwoździński K, Mazur J, **Pieniążek A**. Poziom metali alkalicznych i ciężkich w wodach jezior Zaborskiego Parku Krajobrazowego. [w:] Bory Tucholskie -zasoby i ich ochrona II, K. Gwoździński [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2003;49–55.
13. Gwozdziński K, **Pieniążek A**, Brzeszczynska J, Tabaczar S, Jegier A. Alterations in red blood cells and plasma properties after acute single bout of exercise. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:168376.
14. Gwoździński K, **Pieniążek A**, Czepas J, Brzeszczyńska J, Jegier A, Pawlicki L. Cardiac rehabilitation improves the blood plasma properties of cardiac patients. *Experimental Biology and Medicine*. 2016;241:1997–2006,
15. Gwozdziński K, **Pieniążek A**, Czepas J, Brzeszczynska J, Jegier A. Changes in properties of red blood cells after single exercise bout before and after cardiac rehabilitation. 10th International Congress on Coronary artery-disease. Florence, Italy, 2013;151–153.
16. Gwoździński K, **Pieniążek A**, Kilańczyk E. Ocena fizykochemiczna stanu wód jezior położonych poniżej południowo- zachodniej granicy Wdzydzkiego Parku Krajobrazowego „Bory Tucholskie i inne obszary leśne” pod redakcją Krzysztofa Gwoździńskiego Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2015;79.
17. Gwozdziński K, **Pieniążek A**, Tabaczar S, Jegier A, Brzeszczynska J. Investigation of oxidative stress parameters in different lifespan erythrocyte fractions in young untrained men after acute exercise. *Experimental Physiology*. 2017;102:190–201.
18. Gwoździński K, **Pieniążek A**. Metale ciężkie w środowisku wodnym. „Bory Tucholskie i inne obszary leśne” pod redakcją Krzysztofa Gwoździńskiego Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2015, 161.
19. **Pieniążek A**, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwozdziński K, Koceva-Chyla A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Advances in Medical Sciences*. 2013;58:104–111.
20. Tabaczar S, Koceva-Chyla A, Czepas J, **Pieniążek A**, Piasecka-Zelga J, Gwozdziński K. Nitroxide pirolin reduces oxidative stress generated by doxorubicin and docetaxel in blood plasma of rats bearing mammary tumor. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2012;63:153–63.
21. Tabaczar S, **Pieniążek A**, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwozdziński K, Koceva-Chyla A. Quercetin attenuates oxidative stress in the blood plasma of rats bearing DMBA-induced mammary cancer and treated with a combination of doxorubicin and docetaxel. *General Physiology and Biophysics*. 2013;32:535-43.

| <b>Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora</b> |                   |                    |                                    |              |
|---|-------------------|--------------------|------------------------------------|--------------|
|   | Liczba publikacji | Liczba komunikatów | IF                                 | Punkty MNiSW |
| Publikacje w czasopismach z IF                                    | 3                 |                    | 5,584                              | 75           |
| Publikacje bez IF   | 15                |                    | -                                  | 70           |
| Komunikaty konferencyjne  |                   | 20                 |                                    |              |
| Komunikaty konferencyjne opublikowane w czasopismach z IF         |                   | 2                  | 11,066*                            |              |
| <b>Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</b>     |                   |                    |                                    |              |
| Publikacje w czasopismach z IF                                    | 22                |                    | 48,166                             | 535          |
| Publikacje bez IF   | 7                 |                    | -                                  | 36           |
| Komunikaty konferencyjne  |                   | 51                 |                                    |              |
| Komunikaty konferencyjne opublikowane w czasopismach z IF         |                   | 6                  | 18,209*                            |              |
| <b>Sumaryczny dorobek naukowy</b>                                 | <b>47</b>         | <b>79</b>          | <b>53,750</b><br><b>(83,025)**</b> | <b>716</b>   |

\*- IF czasopism; \*\*publikacje + komunikaty konferencyjne

14.09.2018  
Pieniążek