

Załącznik nr 2
do wniosku z dnia 08.02.2016 r.
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

dr Katarzyna Knapczyk-Stwora

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

AUTOREFERAT

Kraków 2016

1. Imię i nazwisko

Katarzyna Knapczyk-Stwora

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Magister biologii, stopień uzyskany w 2005 roku, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, na podstawie pracy magisterskiej pt. *Immunohistochemiczna lokalizacja dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej w jajniku ciężarnej świni*, promotor: Prof. dr hab. Maria Słomczyńska, recenzent: Prof. dr hab. Maria Szottys (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie).

Doktor nauk biologicznych, stopień uzyskany w 2009 roku, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. *Znaczenie estrogenów i wczesnych etapów steroidogenezy w układach reprodukcyjnych rozwijającego się płodu i ciężarnej świni*, promotor: Prof. dr hab. Maria Słomczyńska, recenzenci: Prof. dr hab. Maria Szottys (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie), Prof. dr hab. Renata Ciereszko (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1 marzec 2009 – 30 wrzesień 2011

asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

1 październik 2011 – do chwili obecnej

adiunkt naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

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.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Rozwój płodowych gonad świni w warunkach ograniczonego działania androgenów

4.2. Autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania

Impact factor (IF) podano według Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania pracy; punkty MNiSW według wykazu czasopism naukowych (lista A) opublikowanego przez MNiSW 31 grudnia 2015; liczbę cytowań według ISI Web od Science (z 05.02.2016).

1. **Knapczyk-Stwora K**, Durlej-Grzesiak M, Ciereszko RE, Koziorowski M, Słomczyńska M. (2013) Antiandrogen flutamide affects folliculogenesis during fetal development in pigs. *Reproduction*. 145(3): 265-276.

*IF*₂₀₁₃: 3,262

*Punkty MNiSW*₂₀₁₅: 35

Liczba cytowań: 7

Liczba cytowań bez autocytowań: 1

2. **Knapczyk-Stwora K**, Grzesiak M, Duda M, Koziorowski M, Slomczynska M. (2013) Effect of flutamide on folliculogenesis in the fetal porcine ovary – regulation by Kit Ligand/c-Kit and IGF1/IGF1R systems. *Anim Reprod Sci.* 142(3-4): 160-167.

IF₂₀₁₃: 1,581

Punkty MNiSW₂₀₁₅: 30

Liczba cytowań: 6

Liczba cytowań bez autocytowań: 3

3. **Knapczyk-Stwora K**, Grzesiak M, Slomczynska M. (2013) In utero exposure to anti-androgen flutamide influences connexin 43 and β -catenin expression in the porcine fetal gonads. *Domest Anim Endocrinol.* 44(4): 185-194.

IF₂₀₁₃: 1,783

Punkty MNiSW₂₀₁₅: 30

Liczba cytowań: 5

Liczba cytowań bez autocytowań: 2

4. **Knapczyk-Stwora K**, Grzesiak M, Slomczynska M. (2014) Altered expression of 3 β -HSD, CYP17 and 17 β -HSD in the fetal porcine gonads in response to antiandrogen flutamide exposure. *Reprod Domest Anim.* 49(5): 725-733.

IF₂₀₁₄: 1,515

Punkty MNiSW₂₀₁₅: 25

Liczba cytowań: 1

Liczba cytowań bez autocytowań: 0

5. **Knapczyk-Stwora K**, Belej A, Grzesiak M, Slomczynska M. (2015) Effect of gestational antiandrogen treatment on Dicer1 expression in the porcine fetal gonads. *Acta Histochem.* 117: 725-731.

IF₂₀₁₅: 1,714

Punkty MNiSW₂₀₁₅: 15

Liczba cytowań: 0

Liczba cytowań bez autocytowań: 0

Sumaryczny IF prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe wynosi 9,855, suma punktów MNiSW: 135, liczba cytowań: 19, liczba cytowań bez autocytowań: 6.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągnięć wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Prawidłowy rozwój gonad w okresie prenatalnym jest kluczowy dla zapewnienia płodności, a tym samym sukcesu reprodukcyjnego gatunku. Zarówno rozwój męskiego jak i żeńskiego układu rozrodczego jest bardzo precyzyjnie regulowany przez wiele czynników, także hormonalnych. Wśród hormonów steroidowych centralną rolę odgrywają androgeny, które wywierając swój efekt

biologiczny poprzez interakcję z receptorem androgenowym (AR), regulują rozwój i wiele innych aspektów normalnego funkcjonowania męskiego układu rozrodczego. Co ciekawe, prowadzone w ostatnim czasie intensywne badania na jajnikach naczelnych podkreślają również istotny udział androgenów w regulacji wczesnych etapów folikulogenezy (*Gervásio i wsp. 2014*). Ponadto szereg badań wskazuje na istnienie powiązań pomiędzy zaburzeniami obserwowanymi w dorosłym życiu a nieprawidłową ekspozycją na steroidy w okresie rozwoju płodowego (*Padmanabhan i Veiga-Lopez 2011*). Równowaga hormonalna w okresie prenatalnym, a tym samym kontrola i regulacja hormonalna, może być zakłócona przez występujące w środowisku związki o aktywności anty-androgennej lub androgennej, które mogą wpływać na procesy zależne od androgenów. Z tego powodu zastosowanie modeli zwierzęcych służących do oceny skutków niedoboru jak i nadmiaru androgenów pozwala na precyzyjne określenie wpływu tych hormonów na rozwój i funkcjonowanie gonad, a w konsekwencji na płodność. Bardzo niewiele tego typu badań prowadzi się na zwierzętach gospodarskich, a w szczególności na świniami. W świetle ostatnich doniesień, świnia dzięki szczególnemu podobieństwu do człowieka pod względem anatomicznym i fizjologicznym uznawana jest za najbardziej odpowiedni model badawczy stosowany w badaniach biomedycznych (*Bendixen i wsp. 2010*). Ponadto wykorzystywana jest jako model w ocenie skutków ekspozycji na ksenobiotyki i zanieczyszczenia środowiska (*Kuzmuk i Schook 2011*). Powyższe dane stanowiły inspirację do podjęcia przeze mnie badań dotyczących zaburzeń rozwoju płodowych gonad świni w warunkach ograniczonego dostępu androgenów. Uważam, że problem ten wydaje się szczególnie istotny w świetle doniesień o wzrastającym narażeniu na obecne w środowisku związki o działaniu anty-androgennym. Pomimo, iż wiele związków zaburzających procesy endokrynne zostało wycofanych z użytku, ze względu na niebezpieczne dla zdrowia skutki, nowe związki należące do tej grupy są skutecznie wprowadzane i stosowane w wielu dziedzinach gospodarki.

W okresie życia płodowego, zarówno podczas rozwoju jąder jak i jajników, można wyróżnić okresy krytyczne, które determinują prawidłowe funkcjonowanie gonad po uzyskaniu dojrzałości płciowej. U świni różnicowanie męskiego układu rozrodczego rozpoczyna się około 26 dnia po zapłodnieniu i związane jest z różnicowaniem komórek Sertoliego z prekursorowych komórek somatycznych oraz z tworzeniem sznurów płciowych. Wkrótce potem płodowe komórki Leydiga rozpoczynają produkcję androgenów, które inicjują rozwój męskiego fenotypu (*McCoard i wsp. 2002*). W przypadku braku androgenów, w 33 dniu ciąży rozpoczyna się różnicowanie gonady żeńskiej, a morfologicznie zróżnicowany jajnik jest już obserwowany około 44 dnia po zapłodnieniu (*McCoard i wsp. 2001*). U świni, podobnie jak u większości ssaków, folikulogeneza rozpoczyna się już w okresie płodowym i jest kontynuowana, aż do wygaśnięcia czynności jajników, co jest jednoznaczne z zakończeniem okresu rozrodczego samicy. Pierwsze pęcherzyki pierwotne można zaobserwować w 56 dniu po

zapłodnieniu. Jednak proces ich intensywnego tworzenia, a tym samym utworzenie puli pęcherzyków pierwotnych, jak również tranzycja tych pęcherzyków do stadium pierwszorzędowego, mają miejsce pod koniec życia prenatalnego oraz w okresie neonatalnym (*Bielanska-Osuchowska 2006*). Prowadzone dotychczas w naszym Zespole badania wykazały obecność receptorów androgenowych w płodowych gonadach świni (*Burek i wsp. 2007*), co wskazuje, że są one tkanką docelową dla tych hormonów. **Dlatego też hipoteza badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe zakładała, że ograniczony dostęp do androgenów, w krytycznych dla rozwoju gonad okresach życia płodowego, może wpływać na ekspresję genów zależnych od androgenów, które są zaangażowane w rozwój i funkcjonowanie płodowych jąder i jajników.** W celu doświadczalnego ograniczenia działania androgenów został użyty niesteroidowy anty-androgen, flutamid, który wiąże się z AR i hamuje zależną od AR aktywność transkrypcyjną, zakłócając tym samym działanie endogennych androgenów (*Tevell i wsp. 2006*). Ciężarne lochy otrzymywały podskórne iniekcje flutamidu (w dawce 50 mg/kg masy ciała, codziennie przez 7 kolejnych dni) między dniem 43 a 49 po zapłodnieniu (GD50), dniem 83 a 89 po zapłodnieniu (GD90) lub dniem 101 a 107 po zapłodnieniu (GD108). Dla każdej grupy poddanej działaniu flutamidu przygotowano grupę kontrolną, której w tym samym okresie co flutamid, podawano podskórnie sam nośnik (olej kukurydziany). Następnego dnia po zakończeniu iniekcji flutamidu, czyli odpowiednio w dniu 50 (GD50), 90 (GD90) i 108 (GD108) ciąży, podczas histerektomii usunięto macicę wraz z płodami, z których wyizolowano gonady. Tym sposobem, w płodowych gonadach, badano natychmiastowe skutki ograniczonego działania androgenów. Okres podawania flutamidu w płodach męskich pokrywał się z czasem niezależnej od przysadki proliferacji płodowych komórek Leydiga (GD50) oraz z czasem zależnej od przysadki kolejnej fali proliferacji i różnicowania komórek Leydiga (GD90 i GD108) (*Van Vorstenbosch i wsp. 1984*). Ponadto, pod koniec ciąży w gonadzie męskiej ma miejsce szczyt proliferacji komórek Sertoliego (*McCoard i wsp. 2003*). Z kolei w płodowych jajnikach okresy podawania flutamidu pokrywały się z czasem tworzenia gniazd komórek płciowych (GD50), tworzenia pęcherzyków pierwotnych (GD90) oraz ich tranzycji do stadium pęcherzyka pierwszorzędowego (GD108) (*Bielanska-Osuchowska 2006*). Spośród wielu czynników regulujących rozwój i funkcjonowanie płodowych gonad świni moją uwagę skupiły szczególnie te, które są związane z procesem tworzenia pęcherzyków pierwotnych i ich tranzycją do pęcherzyków pierwszorzędowych oraz oddziaływaniami międzykomórkowymi. W swoich badaniach skoncentrowałam się również na enzymach zaangażowanych w syntezę androgenów jak również w dojrzewanie mikroRNA, niezwykle ważnych cząsteczek niekodującego RNA, które biorą udział w regulacji ekspresji genów podczas rozwoju.

Androgeny są zaangażowane w regulację ekspresji wielu genów kontrolujących krytyczne dla płodności żeńskiej, wczesne etapy folikulogenezy (*Nightingale i wsp. 2003*), które obejmują ustalenie

spoczynkowej puli pęcherzyków pierwotnych oraz ich tranzycję do pęcherzyków pierwszorzędowych. Potencjał rozrodczy samicy jest bowiem determinowany przez wielkość powstałej podczas życia płodowego puli pęcherzyków oraz tempo w jakim te pęcherzyki zaczną się rozwijać, zaś zaburzona koordynacja tych procesów może prowadzić do nieprawidłowości związanych z rozrodem (*Skinner 2005*). Dlatego też istotną wydała się odpowiedź na pytanie, czy niedobór androgenów w okresie prenatalnym wpływa na ekspresję genów androgenozależnych i w konsekwencji zaburza folikulogenezę u świni. Problem ten stał się przedmiotem rozważań pierwszej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego. Analizując uzyskane wyniki, przede wszystkim zaobserwowano mniejszą liczbę pęcherzyków jajnikowych po zastosowaniu flutamidu, co wskazywało, że ograniczone działanie androgenów skutkuje opóźnieniem procesu folikulogenezы w płodowych jajnikach świni (***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, pozycja 1***). Powszechnie wiadomo, że proces formowania pęcherzyków pierwotnych jest związany z apoptozą losowych oocytów w gniazdach, która ułatwia wnikanie komórek somatycznych, prekursorowych dla komórek ziarnistych i rozpad gniazd. Zatem w celu wyjaśnienia obserwowanych zaburzeń zbadalam proliferację i apoptozę oogoniów/oocytów w gniazdach, jak również ekspresję czynnika martwicy nowotworowej α (TNF α), uznawanego za podstawowy czynnik indukujący apoptozę oocytów i regulujący proces rozpadu gniazd. W efekcie wykazałam wyższy procent komórek apoptotycznych po zastosowaniu flutamidu w grupie GD50 i GD90, a w grupie GD108 ten procent był niższy. Wyniki te były zgodne z obserwowanymi zmianami ekspresji TNF α na poziomie mRNA. Z kolei analiza proliferacji wykazała wyższą ekspresję markera proliferacji Ki-67, a tym samym wzrost proliferacji, po zastosowaniu flutamidu w grupach GD50 i GD108, podczas gdy w grupie GD90 zaobserwowano spadek proliferacji. W oparciu o uzyskane wyniki stwierdziłam, że niedobór androgenów w okresie ciąży zakłóca równowagę pomiędzy apoptozą i proliferacją w płodowym jajniku świni, co może opóźnić rozpad gniazd i tworzenie pęcherzyków pierwotnych (***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, pozycja 1***). Ponadto po zastosowaniu flutamidu w grupie z dnia 50 po zapłodnieniu, wykazałam wzrost ekspresji E-kadheryny. W tym okresie w korze jajnika świni obecne są jedynie gniazda oogoniów/oocytów, a obserwowany wzrost ekspresji E-kadheryny może utrudniać proces ich rozpadu. Wyniki te są szczególnie interesujące, gdyż sugeruje się, że spadek ekspresji E-kadheryny pełni decydującą rolę w formowaniu pęcherzyków pierwotnych. Powyższe wyniki wskazują, że ograniczone działanie androgenów w środkowym i późnym okresie ciąży zaburza ekspresję genów zaangażowanych we wczesne etapy folikulogenezы, prowadząc tym samym do jej opóźnienia (***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, pozycja 1***). W świetle tych badań pojawiło się kolejne pytanie, czy zastosowanie anty-androgenu wpływa również na tranzycję pęcherzyków pierwotnych do stadium pęcherzyka pierwszorzędowego w płodowym jajniku świni.

Proces tranzycji pęcherzyków pierwotnych do pierwszorzędowych jest regulowany przez szereg czynników wzrostu i cytokin. Badania prowadzone na myszach wykazały, że wejście pęcherzyków na drogę wzrostu jest między innymi uzależnione od prawidłowej interakcji pomiędzy czynnikiem Kit a jego receptorem (c-Kit) (*Driancourt i wsp. 2000*). Co więcej, badania dowodzą, że regulacja czynnika Kit przez androgeny jest jednym z elementów kaskady sygnalizacyjnej kontrolującej folikulogenezę (*Shiina i wsp. 2006*). Kolejną, zależną od androgenów, parą ligand-receptor, której oddziaływanie jest niezwykle ważne w regulacji wzrostu pęcherzyka pierwotnego, jest insulinowy czynnik wzrostu 1 (IGF1) oraz jego receptor (IGF1R) (*Qu i wsp. 2000*). Dlatego też przedmiotem następnej pracy było zbadanie wpływu ograniczonego dostępu do androgenów na proces tranzycji pęcherzyków pierwotnych w płodowym jajniku świni poprzez analizę ekspresji KL, c-Kit, IGF1 i IGF1R. Na szczególną uwagę zasługują wyniki analizy morfologicznej, które wykazały większą ilość pęcherzyków pierwotnych, w stosunku do pierwszorzędowych, w jajnikach pochodzących od płodów poddanych działaniu flutamidu w końcowym okresie ciąży (grupy GD90 i GD108) (***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, pozycja 2***). Obserwacje te potwierdziły nasze przypuszczenia o opóźnieniu folikulogenezy po zastosowaniu anty-androgenu. Ponadto podanie flutamidu skutkowało zmianami w ekspresji KL, c-Kit, IGF1 i IGF1R na poziomie mRNA oraz zmniejszeniem intensywności barwienia immunohistochemicznego na obecność c-Kit i IGF1R (***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, pozycja 2***). W oparciu o uzyskane wyniki stwierdziłam, że niedobór androgenów w końcowym okresie ciąży zaburza ekspresję zarówno układu KL/c-Kit jak i IGF1/IGF1R, co może prowadzić do zahamowania tranzycji, a tym samym do opóźnionej folikulogenezy w płodowym jajniku świni. Podsumowując, rezultaty obu powyżej opisanych prac wnoszą nowe informacje dotyczące, jak dotąd słabo opisanej, roli androgenów w procesie folikulogenezy w płodowym jajniku świni.

W utrzymaniu właściwej homeostazy tkankowej niezwykle ważna jest komunikacja międzykomórkowa, a prawidłowe interakcje między sąsiadującymi komórkami za pośrednictwem złącz szczelinowych są niezbędne w regulacji rozwoju gonad oraz w kontroli oogenezy i spermatogenezy. Prowadzone dotychczas w naszym Zespole badania wykazały obecność koneksyny 43 (Cx43), jednego z głównych białek budujących złącza szczelinowe, w płodowych gonadach świni, co sugeruje jej znaczenie zarówno w regulacji funkcji jądra, jak również wczesnych etapów folikulogenezy w okresie prenatalnym (*Knapczyk-Stwora i wsp. 2013*). Poza złączami szczelinowymi kluczową rolę w utrzymaniu integralności tkanki i prawidłowej transdukcji sygnału odgrywa również adhezja komórkowa. Jednym z głównych białek adhezyjnych jest β -katenina, która łącząc kadherine z elementami cytoszkieletu jest zaangażowana w regulację adhezji komórkowej, przekazywanie sygnału, ale również może współdziałać z Cx43 (*Ai i wsp. 2000*). Biorąc pod uwagę fakt, że zarówno

ekspresja Cx43 jak i β -kateniny może być regulowana przez androgeny, w dalszych badaniach poddałam weryfikacji hipotezę dotyczącą wpływu ograniczonego działania androgenów w późnym okresie ciąży na ekspresję tych białek w płodowych jądrach i jajnikach świni. W swojej pracy wykazałam po raz pierwszy ekspresję β -kateniny w płodowych gonadach świni w 90 i 108 dniu po zapłodnieniu (*Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, pozycja 3*). Analiza rozmieszczenia tego białka w płodach męskich wskazuje na jego lokalizację w obrębie kanalików jądrowych, w błonie komórek Sertoliego i komórek germinalnych, oraz w niewielkim stopniu w błonie komórek Leydiga. Lokalizacja zarówno Cx43 jak i β -kateniny w płodowych komórkach Leydiga sugeruje współdziałanie tych białek w utrzymaniu właściwej komunikacji międzykomórkowej. Z kolei w płodowym jajniku β -kateninę zlokalizowano w komórkach płciowych w obrębie gniazd oraz w błonie oocyty i komórek ziarnistych tworzących się pęcherzyków. Podobnie jak w przypadku płodowych komórek Leydiga, jednoczesna obecność Cx43 i β -kateniny w komórkach ziarnistych tworzącego się pęcherzyka, może wskazywać na współdziałanie tych białek w interakcji międzykomórkowej na wczesnych etapach folikulogenezy u świni. Co więcej, błonowa immunolokalizacja β -kateniny w badanych strukturach sugeruje raczej jej udział w adhezji komórkowej niż w transdukcji sygnału. Równocześnie wykazałam, że ekspozycja na anty-androgen w późnym okresie ciąży prowadziła do spadku ekspresji Cx43 i β -kateniny w płodowych gonadach świni. Wyjątek stanowiły jajniki z grupy GD108, w których po zastosowaniu flutamidu wykazano wzrost ekspresji Cx43. W oparciu o uzyskane wyniki stwierdziłam, że obserwowane wskutek ograniczonego działania androgenów zmiany w ekspresji Cx43 i β -kateniny w późnym okresie prenatalnym mogą zaburzać oddziaływania międzykomórkowe w płodowych gonadach świni, a w konsekwencji zakłócać funkcje płodowych komórek Leydiga oraz prawidłowe formowanie się pęcherzyków pierwotnych (*Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, pozycja 3*). Rezultaty tych badań poszerzają znacząco wiedzę na temat mechanizmu działania anty-androgenów w płodowych gonadach.

Coraz więcej badań wskazuje, że ekspresja enzymów zaangażowanych w syntezę steroidów może być modulowana przez same hormony steroidowe. Doświadczenia przeprowadzone na mysich komórkach Leydiga wykazały hamujący wpływ androgenów na ekspresję dehydrogenazy Δ^5 - Δ^4 -izomerazy 3β -hydroksysteroidowej (3β -HSD) oraz cytochromu P450 17α -hydroksylazy/ $17,20$ -liazy (*Stalvey i Clavey 1992, Burgos-Trinidad i wsp. 1997*). Co więcej, zaburzenie każdego z etapów steroidogenezy może przyczynić się do dysfunkcji układu rozrodczego, prowadzących w konsekwencji do zaburzeń płodności (*Hu et al. 2009*). Z tego powodu, w kolejnym etapie badań podjęłam się sprawdzenia czy ograniczony dostęp do androgenów w końcowych etapach ciąży skutkuje zmianami w ekspresji kluczowych enzymów zaangażowanych w biosyntezę androgenów w płodowych

gonadach świni. W celu wyjaśnienia tego zagadnienia, przeanalizowałam ekspresję i/lub immunolokalizację 3β -HSD, CYP17 oraz dehydrogenazy 17β -hydroksysteroidowej (17β -HSD) w jajnikach i jądrach płodów poddanych działaniu flutamidu w późnym okresie prenatalnym. Przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym wykazałam wzrost ekspresji 3β -HSD i CYP17 w płodowych jądrach w grupie GD90, natomiast w grupie GD108 obserwowałam spadek ekspresji 3β -HSD i 17β -HSD3, a wzrost ekspresji CYP17. Zarówno CYP17 jak i 17β -HSD3 zlokalizowane były w płodowych komórkach Leydiga. Po zastosowaniu anty-androgenu wykazałam wzrost intensywności reakcji immunohistochemicznej w obu badanych grupach (GD90 i GD108), podczas gdy intensywność barwienia dla 17β -HSD3 była niższa w grupie GD108 (*Knapczyk-Stwora i wsp. 2014, pozycja 4*). Obserwacje te wskazują, że występujące w środowisku związki o aktywności anty-androgennej mogą bezpośrednio wpływać na ekspresję enzymów zaangażowanych w biosyntezę androgenów, które są niezbędne do prawidłowej spermatogenezy, a tym samym płodności. Ponadto w swojej pracy wykazałam po raz pierwszy ekspresję mRNA dla 3β -HSD i 17β -HSD1 oraz immunolokalizację 3β -HSD w płodowym jajniku świni. Co więcej, zastosowanie anty-androgenu skutkowało wzrostem ilości transkryptu dla 3β -HSD, a spadkiem dla CYP17 i 17β -HSD1 w grupie GD90. Z kolei po zastosowaniu flutamidu w grupie GD108 obserwowano spadek ekspresji 3β -HSD, a wzrost CYP17. Enzym 3β -HSD zlokalizowano w komórkach ziarnistych tworzących się pęcherzyków jajnikowych. Po zastosowaniu flutamidu obserwowano następujące zmiany w intensywności reakcji immunohistochemicznej: wzrost intensywności barwienia dla 3β -HSD w grupie GD90, a dla CYP17 w grupie GD108. Otrzymane rezultaty wskazują, że w płodowym jajniku świni, podobnie jak w płodowym jądrze, androgeny mogą kontrolować ekspresję 3β -HSD i CYP17, jednak regulacja ta różni się w zależności od etapu rozwoju płodowego (*Knapczyk-Stwora i wsp. 2014, pozycja 4*). Wyniki te w większym stopniu podkreślają istotną rolę androgenów podczas rozwoju płodowego świni i wskazują, że hormony te mogą modulować ekspresję enzymów zaangażowanych w ich biosyntezę.

W ostatnim czasie szczególną uwagę poświęca się cząsteczkom mikroRNA (miRNA), które obecnie uważane są za jeden z najważniejszych potranskrypcyjnych regulatorów ekspresji genów, pełniących rolę w niemal wszystkich procesach biologicznych w organizmie. Różnorodność genów regulowanych przez miRNA sprawia, że cząsteczki te mają znaczenie w kontroli proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek, jak również kontroli rozwoju i funkcjonowania układu rozrodczego (*Carletti and Christenson 2009, Ran et al. 2014*). Proces biogenezy i dojrzewania miRNA jest wieloetapowy i katalizowany między innymi przez należącą do RNaz typu III rybonukleazę Dicer1 (*Murchison and Hannon, 2004*). Najnowsze doniesienia wskazują, że hormony steroidowe wpływając na biosyntezę kluczowych komponentów biogenezy miRNA mogą regulować dojrzewanie tych cząsteczek.

Przeprowadzone *in vitro* badania na liniach komórkowych nowotworu prostaty wykazały, że androgeny mogą zwiększać ekspresję genów związanych z syntezą miRNA, w tym również enzymu Dicer1 (Mo et al., 2013). Można zatem przypuszczać, że przynajmniej częściowo, opisane powyżej zmiany w ekspresji genów w warunkach ograniczonego działania androgenów mogą być związane z zaburzoną biogenezą miRNA. Dlatego też celem ostatniej pracy, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego, było zbadanie czy prenatalna ekspozycja na flutamid w środkowym i końcowym okresie ciąży wpływa na ekspresję enzymu Dicer1 w płodowych gonadach świni. Jak wykazano, prenatalna ekspozycja na anty-androgen skutkowała zmienioną ekspresją Dicer1 na poziomie mRNA w płodowych jądrach we wszystkich badanych grupach (GD50, GD90 i GD108), z kolei w płodowych jajnikach tylko w grupach GD50 i GD90. Obserwacje te wskazują, że androgeny mogą być zaangażowane w kontrolę ekspresji Dicer1 w płodowych gonadach świni, co może wpływać na biogenezę miRNA, a w konsekwencji na potranskrypcyjną regulację ekspresję genów (**Knapczyk-Stwora i wsp. 2015, pozycja 5**). Ponadto, po raz pierwszy wykazałam ekspresję i komórkową lokalizację enzymu Dicer1 w płodowych gonadach świni. Reakcja immunohistochemiczna pozwoliła na zlokalizowanie Dicer1 w cytoplazmie płodowych komórek Leydiga, podczas gdy w płodowym jajniku enzym ten był obecny w cytoplazmie oogoniów, oocytów i komórek ziarnistych tworzących się pęcherzyków (**Knapczyk-Stwora i wsp. 2015, pozycja 5**). W celu pełnego zrozumienia zaburzeń związanych z ograniczonym działaniem androgenów w okresie prenatalnym niezbędne są dalsze badania prowadzące do identyfikacji specyficznych miRNA, które są zaangażowane w rozwój i funkcjonowanie płodowych gonad świni.

Podsumowując, wyniki badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe podkreślają szczególną rolę androgenów w płodowych gonadach świni. Warto zauważyć, że w wielu przypadkach efekt działania anty-androgenu na ekspresję badanych genów różnił się w zależności od okresu narażenia, co wskazuje, że wrażliwość płodowych gonad na egzogenne anty-androgeny jest uwarunkowana etapem rozwoju. **Otrzymane przeze mnie wyniki przy użyciu przedstawionego modelu badawczego wykazały, że anty-androgeny mogą być jednym z czynników zaburzających funkcjonowanie płodowych jąder i wczesnych etapów folikulogenezy.** Co więcej, wyniki te zwracają uwagę na potrzebę monitorowania obecnych w środowisku anty-androgenów, które zaburzając działanie endogennych androgenów, mogą negatywnie wpływać na rozwój płodowych gonad, a w konsekwencji na płodność.

4.4. Dalsze plany badawcze

Mając na uwadze wykazany w powyższych badaniach wpływ prenatalnego podania anty-androgenu na rozwój pęcherzyka jajnikowego, celem naukowym kolejnego projektu będzie wyjaśnienie czy i w

jaki sposób narażenie na wybrane czynniki o aktywności hormonalnej w okresie neonatalnym wpływa na wczesne etapy folikulogenezy u świni. Odpowiedź na to pytanie będzie możliwa dzięki przeprowadzeniu badań w ramach projektu NCN zatytułowanego „Molekularne aspekty działania związków o aktywności hormonalnej na proces folikulogenezy w neonatalnym jajniku świni” (OPUS 9, numer projektu 2015/17/B/NZ9/01457), którego jestem wykonawcą. Równocześnie, biorąc pod uwagę fakt, że niezakłócony rozwój jajnika w okresie prenatalnym i neonatalnym jest krytyczny dla sukcesu reprodukcyjnego, rodzi się pytanie o długotrwałe skutki narażenia na związki o działaniu hormonalnym, wpływające na funkcje rozrodcze organizmu w okresie dojrzałości płciowej. Z tego względu, w kolejnym etapie badań planuję określić czy nadmiar lub niedobór androgenów lub estrogenów w okresie neonatalnym może wpływać na procesy regulujące folikulogenezę i funkcjonowanie ciała żółtego (produkcję steroidów i epigenetyczne zmiany kontrolujące ekspresję genów) w jajniku dojrzałej płciowo świni.

4.5. Literatura

Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM, Fishman GI. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 2000; 105: 161-171.

Bendixen E, Danielsen M, Larsen K, Bendixen C. Advances in porcine genomics – a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Brief Funct Genomics.* 2010; 9(3): 208-219.

Bielanska-Osuchowska Z. Oogenesis in pig ovaries during prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reprod Biol.* 2006; 6: 161-193.

Burek M, Duda M, Knapczyk K, Koziorowski M, Slomczynska M. Tissue-specific distribution of the androgen receptor (AR) in the porcine fetus. *Acta Histochem.* 2007; 109: 358-365.

Burgos-Trinidad M, Youngblood GL, Maroto MR, Scheller A, Robins DM, Payne AH. Repression of cAMP induced expression of the mouse P450 17 α -hydroxylase/C17–20 lyase gene (*Cyp17*) by androgens. *Mol Endocrinol.* 1997; 11: 87-96.

Carletti MZ, Christenson LK. MicroRNA in the ovary and female reproductive tract. *J Anim Sci.* 2009; 87(Suppl. 14): E29-38.

Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod.* 2000; 5: 143-152.

Gervásio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sá MF, Rosa-E-Silva AC. The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstet Gynecol.* 2014; 2014: 818010.

Hu GX, Lian QQ, Ge RS, Hardy DO, Li XK. Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrin Metab.* 2009; 20: 139-145.

Knapczyk-Stwora K, Durliej-Grzesiak M, Duda M, Slomczynska M. Expression of connexin 43 in the porcine fetal gonads during development. *Reprod Domest Anim.* 2013; 48: 272-277.

- Kuzmuk** KN, Schook LB. Pigs as a model for biomedical sciences. [w] *The Genetics of the Pig*, Vol. 2 (red. Rothschild MF, Ruvinsky A) 426-444 (CAB International, 2011).
- McCoard** SA, Lunstra DD, Wise TH, Ford JJ. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. *Biol Reprod.* 2001; 64(2): 689-695.
- McCoard** SA, Wise TH, Ford JJ. Expression levels of Mullerian-inhibiting substance, GATA4 and 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450 during embryonic gonadal development in two diverse breeds of swine. *J Endocrinol.* 2002; 175(2): 365-374.
- McCoard** SA, Wise TH, Lunstra DD, Ford JJ. Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *J Endocrinol.* 2003; 178: 395-403.
- Mo** W, Zhang J, Li X, Meng D, Gao Y, Yang S, Wan X, Zhou C, Guo F, Huang Y, Amente S, Avvedimento EV, Xie Y, Li Y. Identification of novel AR-targeted microRNAs mediating androgen signalling through critical pathways to regulate cell viability in prostate cancer. *PLoS ONE.* 2013; 8(2): e56592.
- Murchison** EP, Hannon GJ. MiRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16: 223-229.
- Nightingale** J, Chaudhary KS, Abel PD, Stubbs AP, Romanska HM, Mitchell SE, Stamp GWH, Lalani EN. Ligand activation of the androgen receptor downregulates E-cadherin-mediated cell adhesion and promotes apoptosis of prostatic cancer cells. *Neoplasia* 2003; 5: 347-361.
- Padmanabhan** V, Veiga-Lopez A. Developmental origin of reproductive and metabolic dysfunctions: androgenic versus estrogenic reprogramming. *Semin Reprod Med.* 2011; 29(3): 173-186.
- Qu** J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in human follicles. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6: 137-145.
- Ran** M, Chen B, Yin J, Yang A, Jiang M. Advances in miRNA research related to testis development and spermatogenesis. *Yi Chuan.* 2014; 36(7): 646-654.
- Shiina** H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 224-229.
- Skinner** MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(5): 461-471.
- Stalvey** JR, Clavey SM. Evidence that testosterone regulates Leydig cell 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity by a trans-acting factor distal to the androgen receptor. *J Androl.* 1992; 13: 93-99.
- Tevell** A, Lennernas H, Jonsson M, Norlin M, Lennernas B, Bondesson U, Hedeland M. Flutamide metabolism in four different species in vitro and identification of flutamide metabolites in human patient urine by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* 2006, 34: 982-992.
- Van Vorstenbosch** CJ, Colenbrander B, Wensing CJ. Leydig cell development in the pig testis during the late fetal and early postnatal period: an electron microscopic study with attention to the influence of fetal decapitation. *Am J Anat.* 1984; 169: 121-136.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Główny obszar moich zainteresowań badawczych jest związany z hormonalną regulacją żeńskiego układu rozrodczego, a szczególnie udziałem androgenów w rozwoju i funkcjonowaniu gonad świni. W trakcie IV roku studiów magisterskich na kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie związałam się z kierowanym przez Prof. dr hab. Barbarę Bilińską Zakładem Endokrynologii Instytutu Zoologii UJ, w którym obecnie jestem zatrudniona. Brałam wówczas udział w pracach nad ekspresją enzymu zaangażowanego w biosyntezę progesteronu, 3 β -HSD, w jajniku ciężarnej świni. Wyniki tych badań wykazały różnice w ekspresji 3 β -HSD w pęcherzykach jajnikowych pochodzących od svin cyklujących i ciężarnych, jak również różnice w immunolokalizacji tego enzymu w ciałkach żółtych pochodzących z różnych dni ciąży. Badania te były prowadzone pod kierunkiem mojego promotora, Prof. dr hab. Marii Słomczyńskiej, a ich rezultatem była praca magisterska zatytułowana „Immunohistochemiczna lokalizacja dehydrogenazy Δ^5 -3 β -hydroksysteroidowej w jajniku ciężarnej świni” oraz publikacja uzyskanych wyników w formie oryginalnej pracy badawczej: ***Knapczyk i wsp. 2007, poz. II.A.3.***

W trakcie realizacji mojej pracy magisterskiej zostałam włączona również w badania prowadzone przez mojego promotora, a dotyczące ekspresji receptora androgenowego w układzie reprodukcyjnym płodów i ciężarnej świni. Analizy te wymagały opanowania przeze mnie nowych metod, między innymi metody izolacji RNA, reakcji RT-PCR (reakcji PCR z odwrotną transkrypcją) oraz immunohistochemii. Rezultatem tych badań było wykazanie obecności receptora androgenowego zarówno w płodowych jądrach i jajnikach, jak i w jajniku i macicy ciężarnej świni, co wskazuje na udział androgenów w regulacji funkcji płodowych gonad oraz jajników i macicy w okresie ciąży. W wyniku udziału w realizacji tych badań jestem współautorką trzech publikacji: ***Słomczyńska i wsp. 2006, poz. II.A.1; Burek i wsp. 2007, poz. II.A.2; Słomczyńska i wsp. 2008, poz. II.A.5.*** Pragnę podkreślić, że uzyskanie materiału od ciężarnych svin było możliwe dzięki nawiązaniu współpracy Prof. dr hab. Marii Słomczyńskiej z Prof. dr hab. Markiem Koziorowskim z Pozawydziałowego Zamiejscowego Instytutu Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych Uniwersytetu Rzeszowskiego, dzięki której możliwa była realizacja mojej pracy magisterskiej, doktorskiej, jak i późniejszych badań dotyczących funkcjonowania płodowych gonad i układu rozrodczego ciężarnej świni w warunkach ograniczonego działania androgenów.

W latach 2005-2009, jako doktorantka Zakładu Endokrynologii UJ, prowadziłam badania nad znaczeniem estrogenów i wczesnych etapów steroidogenezy w układzie reprodukcyjnym rozwijającego się płodu i ciężarnej świni. Badania te prowadzone były w ramach dwóch projektów

BW, przyznawanych jako granty wewnętrzne Wydziału BiNoZ UJ, finansowanych ze środków na działalność statutową MNiSW oraz grantu promotorskiego MNiSW (KBN) zatytułowanego „*Znaczenie estrogenów i wczesnych etapów steroidogenezy w układach reprodukcyjnych rozwijającego się płodu i ciężarnej świni*” (N303 01832/0931), przyznanego mi na lata 2007-2009. Prowadząc te badania wykazałam obecność obu typów receptora estrogenowego (ER α i ER β) w jajniku ciężarnej świni, co sugerowało, że estrogeny mogą regulować jego funkcje w okresie ciąży. Ponadto analiza rozmieszczenia ER α i ER β w macicy ciężarnej świni obrazowała dynamiczne zmiany zachodzące w jej strukturze podczas ciąży. ER β był dominującym typem receptora estrogenowego w płodowym jądrze, jajniku i macicy, a obecność obu typów receptora estrogenowego sugerowała wpływ estrogenów na rozwijający się układ rozrodczy świni. Z kolei obecność 3 β -HSD w płodowych gonadach wskazywała, że są one miejscem syntezy hormonów steroidowych. Wyniki tych badań prezentowałam na konferencjach krajowych i zagranicznych (m.in. na *XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików* w Starych Jabłonkach w 2006 roku, *I Zimowej Szkole Towarzystwa Biologii Rozrodu* w Zakopanem w 2007 roku oraz *The Society for Reproduction and Fertility Conference and Exhibition* w Edynburgu, w Szkocji w 2008 roku) i opublikowałam w renomowanych czasopismach naukowych: ***Knapczyk i wsp. 2008, poz. II.A.6***; ***Knapczyk i wsp. 2008, poz. II.A.7***; ***Knapczyk-Stwora i wsp. 2011, poz. II.A.11***. Stanowiły one też przedmiot mojej rozprawy doktorskiej pt. *Znaczenie estrogenów i wczesnych etapów steroidogenezy w układach reprodukcyjnych rozwijającego się płodu i ciężarnej świni*, przygotowanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Marii Słomczyńskiej. Równoległe z prowadzeniem badań dotyczących mojej pracy doktorskiej, brałam również udział w badaniach dotyczących ekspresji receptora androgenowego i enzymów szlaku steroidogenezy w jajniku nornicy rudej oraz wpływu transferyny na aktywność enzymu aromatazy w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni. Wynikiem tych prac było współautorstwo trzech oryginalnych publikacjach naukowych: ***Galas i wsp. 2007, poz. II.A.4***; ***Durlej i wsp. 2008, poz. II.A.8***; ***Galas i wsp. 2012, poz. II.A.23***. Ponadto w czasie studiów doktoranckich odbyłam dwutygodniowy staż w Katedrze Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (styczeń 2006), gdzie wykonałam półilościową ocenę intensywności zabarwienia tkanek analizowanych immunohistochemicznie. W roku 2007 byłam laureatką Stypendium z Funduszu im. Adama Krzyżanowskiego dla doktorantów UJ wyróżniających się w pracy naukowej i dydaktycznej. Publiczna obrona mojej pracy doktorskiej odbyła się 19 stycznia 2009 roku, a stopień doktora nauk biologicznych został mi nadany decyzją Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ 20 stycznia 2009. Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem uzyskując Dyplom Uznania za wybitną rozprawę doktorską od Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, w marcu 2009 roku, zostałam zatrudniona w Zakładzie Endokrynologii w Instytucie Zoologii UJ, początkowo na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego, a od października 2011 roku na stanowisku adiunkta. W 2009 roku odbyłam półroczny podoktorski staż naukowy w University of Texas Health Science Center (San Antonio, USA) na wydziale Molecular Medicine, gdzie brałam udział w badaniach nad znaczeniem mikroRNA w nowotworze prostaty oraz metylacją receptora androgenowego, co wymagało opanowania nowych technik badawczych. Miałam tam możliwość zapoznania się z techniką prowadzenia hodowli linii komórkowych ludzkiego nowotworu prostaty oraz mysich embrionalnych komórek macierzystych, a także wykonywałam molekularne klonowanie, izolację plazmidów, transfekcje, izolację mikroRNA ze skrawków parafinowych nowotworu prostaty w różnych stadiach rozwoju oraz analizę RNA przy użyciu metody real-time PCR. Wyniki prowadzonych przeze mnie badań dotyczących metylacji receptora androgenowego zostały przedstawione na konferencji Endo 2010 w San Diego (USA) oraz opublikowane (**Ko i wsp. 2011, poz. II.A.16**).

Po powrocie skupiłam się na kontynuacji badań na materiale pozyskanym od ciężarnych świń, które pozwoliły na wykazanie w jajniku ciężarnej świni oraz w płodowych gonadach, obecności kolejnego enzymu zaangażowanego w biosyntezę hormonów steroidowych - cytochromu P450 17 α -hydroksylazy/17,20-liazy. Ponadto wykazałam obecność na poziomie mRNA i białka koneksyny 43 (Cx43) w płodowych gonadach świni w 50, 70 i 90 dniu ciąży, co wskazywało na rolę komunikacji międzykomórkowej w kontroli funkcjonowania płodowego jądra oraz początkowych etapów rozwoju pęcherzyka jajnikowego. Wyniki te opublikowałam w dwóch oryginalnych pracach badawczych: **Knapczyk-Stwora i wsp. 2011, poz. II.A.18** i **Knapczyk-Stwora i wsp. 2012, poz. II.A.24**.

Powszechnie wiadomo, że w rozwoju płodowym ssaków hormony steroidowe zaangażowane są w różnicowanie wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych. Zarówno niedobór jak i nadmiar hormonów steroidowych podczas ciąży jest przyczyną zaburzeń związanych z rozrodem u dorosłych samców i samic. Dlatego czynniki środowiskowe o właściwościach anty-androgennych, bądź też androgennych mogą poprzez połączenie z receptorem androgenowym, wpływać, a często zaburzać funkcje androgenów w układzie rozrodczym. Badania w ramach grantu MNiSW kierowanego przez Prof. dr hab. Barbarę Bilińską, realizowanego w latach 2009-2011, którego byłam wykonawcą, dotyczyły wpływu prenatalnego podawania antyandrogenu flutamidu na komunikację międzykomórkową w żeńskim i męskim układzie rozrodczym świni (N303 339835). Pozwoliły one na częściowe poznanie skutków zablokowania działania androgenów w okresie prenatalnym, neonatalnym i postnatalnym na funkcjonowanie zarówno żeńskiego, jak i męskiego układu rozrodczego świni. Rezultatem tych badań było wykazanie istotnego wpływu androgenów na

ekspresję zaangażowanej w połączenia międzykomórkowe Cx43 w jądrze i jajniku świni. Ponadto po zastosowaniu flutamidu w okresie prenatalnym i neonatalnym obserwowano zaburzoną ekspresję Cx43 w gonadach świń przed i po osiągnięciu dojrzałości płciowej. Wyniki te zostały zaprezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach oraz opublikowane w formie cyklu oryginalnych prac badawczych, w których jestem współautorem: **Kopera i wsp. 2010, poz. II.A.10; Durlej i wsp. 2011, poz. II.A.12; Durlej i wsp. 2011, poz. II.A.15; Kopera i wsp. 2011, poz. II.A.17**. Materiał zebrany w ramach w/w grantu umożliwił również przeprowadzenie dodatkowych badań nad rolą androgenów w żeńskim układzie rozrodczym. Wykazaliśmy, że prenatalna ekspozycja na anty-androgen wpływa na rozwój macicy u neonatalnych i 3-miesięcznych świń, co może zaburzać jej funkcjonowanie w okresie dojrzałości płciowej. Wyniki te zostały opublikowane w formie oryginalnej pracy badawczej (**Knapczyk-Stwora i wsp. 2011, poz. II.A.13**). Ponadto zbadano skutki prenatalnej i neonatalnej ekspozycji na flutamid w jajnikach świni i wykazano wpływ anty-androgenu na ekspresję receptora FSH w jajnikach zwierząt neonatalnych, podczas gdy w jajniku świni dojrzałej płciowo flutamid wpływał na równowagę między apoptozą i proliferacją w dużych pęcherzykach antralnych, syntezę 17 β -estradiolu oraz ekspresję akwaporyny 5. Efektem tych prac była publikacja wyników w czterech oryginalnych pracach badawczych, których jestem współautorem: **Durlej i wsp. 2011, poz. II.A.14; Durlej i wsp. 2012, poz. II.A.21; Grzesiak i wsp. 2012, poz. II.A.22; Grzesiak i wsp. 2016, poz. II.A.33**.

Główny nurt moich prac badawczych prowadzonych po uzyskaniu stopnia doktora dotyczył efektu prenatalnego narażenia na anty-androgeny w płodowych gonadach świni. Większość tych badań stanowi podstawę osiągnięcia naukowego prezentowanego w pierwszej części autoreferatu. Znaczną ich część realizowałam jako główny wykonawca w projekcie kierowanym przez Prof. dr hab. Marię Słomczyńską (*Molekularne podstawy rozwoju jajnika świni po zastosowaniu antyandrogenu (flutamidu) w okresie życia płodowego*, grant MNiSW, N303 596539) oraz w ramach kierowanego przeze mnie projektu MNiSW *Iuventus Plus* pt. „*Wpływ antyandrogenu (flutamidu) na ekspresję wybranych białek połączeń szczelinowych oraz enzymów szlaku steroidogenezy w płodowych gonadach świni*” (IP2011 024571). Poza omówionymi wynikami, zamieszczonymi w publikacjach włączonych w osiągnięcie naukowe, wykazano, że ograniczone przy użyciu flutamidu działanie androgenów w okresie prenatalnym prowadziło do zaburzonej ekspresji czynników należących do superrodziny transformującego czynnika wzrostu typu β oraz ich receptorów. Uzyskane rezultaty mogą tłumaczyć, przynajmniej częściowo, opóźniony proces tworzenia pęcherzyków pierwotnych w płodowym jajniku świni i podkreślają znaczący udział androgenów w regulacji wczesnych etapów folikulogenezy (**Knapczyk-Stwora i wsp. 2014, poz. II.A.30**). Równocześnie w czasopiśmie „Postępy Biologii Komórki” opublikowałam artykuł przeglądowy, w którym podsumowałam ówczesny stan

wiedzy na temat wpływu androgenów i estrogenów na rozwój płodowych gonad świni, z uwzględnieniem możliwej roli występujących w środowisku związków zaburzających działanie endogennych hormonów (***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, poz. II.A.34***).

Jednocześnie byłam wykonawcą dwóch projektów badawczych: *Genomowe i pozagenomowe działanie androgenów w pęcherzyku jajnikowym świni - badania in vitro* (grant MNiSW, N303 538838, kierownik dr hab. Małgorzata Duda) oraz *Molekularne podstawy funkcjonowania ciała żółtego ciążowego świni w warunkach doświadczalnego ograniczenia działania androgenów – badania in vivo* (grant NCN, SONATA, 2011/03/D/NZ4/00303, kierownik dr Małgorzata Grzesiak). W ramach pierwszego projektu byłam zaangażowana w badania *in vitro* nad znaczeniem androgenów w procesie apoptozy i ekspresji receptora androgenowego w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni jak również w ekspresji enzymów szlaku steroidogenezy w organotypowych hodowlach pęcherzyka jajnikowego. Uzyskane wyniki z zastosowaniem 2-hydroksyflutamidu, jako modelowego antyandrogenu dowiodły, że androgeny odgrywają rolę w apoptozie komórek ziarnistych podczas atrezji pęcherzyka jajnikowego oraz wpływają na ekspresję receptora androgenowego i aktywność enzymów zaangażowanych w steroidogenezę w pęcherzyku jajnikowym świni. Efektem mojego udziału w tych badaniach jest współautorstwo trzech prac oryginalnych: ***Duda i wsp. 2012, poz. II.A.20; Duda i wsp. 2013, poz. II.A.25; Duda i wsp. 2014, poz. II.A.28***. Z kolei w ramach drugiego projektu brałam udział w pracach dotyczących funkcjonowania ciążowego ciała żółtego świni w warunkach ograniczonego działania androgenów. Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę, że androgeny są zaangażowane w regulację funkcji ciała żółtego świni w środkowym i późnym okresie ciąży. Badania z użyciem flutamidu wykazały, że ograniczony dostęp do androgenów w okresie ciąży prowadzi do dysfunkcji ciała żółtego manifestującej się spadkiem syntezy progesteronu, szczególnie pod koniec ciąży i w okresie okołoporodowym. Obserwowany spadek syntezy progesteronu w tym okresie spowodowany był zaburzoną ekspresją enzymów zaangażowanych w jego syntezę w komórkach lutealnych. Jest to szczególnie istotne, gdyż ciało żółte u świni jest głównym źródłem progesteronu przez cały okres ciąży. Ponadto niedobór androgenów w środkowym i późnym okresie ciąży prowadził do zmian w produkcji androstendionu, testosteronu i estronu w komórkach lutealnych świni. Nasze badania wykazały również, że zastosowanie flutamidu zaburzało ekspresję β -kateniny i jej interakcję z E-kadheryną, co dowodzi, że androgeny działając poprzez receptor androgenowy są ważnym regulatorem oddziaływań międzykomórkowych w ciałku żółtym ciążowym świni. Efektem mojego udziału w tych badaniach jest współautorstwo trzech prac oryginalnych: ***Grzesiak i wsp. 2014, poz. II.A.27; Grzesiak i wsp. 2014, poz. II.A.29; Grzesiak i wsp. 2015, poz. II.A.32***.

Równocześnie brałam również udział w badaniach nad immunolokalizacją receptora androgenowego i enzymów steroidogenezy w jajnikach niedojrzałych płciowo szczurów oraz w komórkach ziarnistych wzgórka jajonośnego szczurów dojrzałych płciowo (*Szołtys i wsp. 2010, poz. II.A.9; Galas i wsp. 2012, poz. II.A.19*). Byłam też zaangażowana w prace dotyczące wpływu flutamidu na ekspresję enzymu dehydrogenazy 20 α -hydroksysteroidowej w łożysku świni oraz na ekspresję Cx43 w łożysku i macicy świni w okresie ciąży (*Grzesiak i wsp. 2014, poz. II.A.26; Wieciech i wsp. 2014, poz. II.A.31*). Poza pracami eksperymentalnymi jestem też współautorką pracy przeglądowej podsumowującej aktualną wiedzę na temat ekspresji oraz fizjologicznej roli dehydrogenazy 20 α -hydroksysteroidowej w tkankach matki oraz płodu podczas ciąży (*Grzesiak i wsp. 2014, poz. II.A.35*). W ramach współpracy z Katedrą Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, brałam udział w badaniach nad wpływem mikotoksykozy zearaleonowej na obecność receptorów estrogenowych w jajnikach niedojrzałych płciowo suk. Wyniki tej współpracy zostały zaprezentowane podczas konferencji naukowej Farmakologiczne i Toksykologiczne Aspekty Działania Ksenobiotyków w Olsztynie w 2010 roku. Z kolei w ramach współpracy z Zakładem Fizjologii i Toksykologii Rozrodu UJ badałam immunolokalizację apeliny w pęcherzykach jajnikowych świni. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane podczas The Society for Experimental Biology's (SEB) Annual Main Meeting w Pradze w 2015 roku oraz IV Zimowej szkoły TBR w Zakopanem w lutym tego roku. Aktualnie biorę udział w badaniach, realizowanych w ramach projektu luventus Plus (*Określenie udziału procesów apoptozy i autofagii w regresji ciała żółtego ciążowego świni – wpływ ograniczonego działania androgenów*, numer projektu IP2014 014373) kierowanego przez dr Małgorzatę Grzesiak, projektu NCN Opus (*Molekularne podstawy wczesnych etapów folikulogenezy u świni: aspekty komórkowe i biotechnologiczne - badania in vitro*) kierowanego przez dr hab. Małgorzatę Dudę oraz projektu NCN Opus (*Molekularne aspekty działania związków o aktywności hormonalnej na proces folikulogenezy w neonatalnym jajniku świni*, numer projektu 2015/17/B/NZ9/01457) kierowanego przez Prof. dr hab. Marię Słomczyńską.

Podsumowując, moja praca naukowa została wyróżniona czterokrotnie nagrodą JM Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego. Byłam kierownikiem 1 projektu MNiSW („luventus Plus”) i wykonawcą w 5 projektach krajowych. Kierowałam też 3 projektami finansowanymi ze środków MNiSW na działalność statutową (tzw. granty wewnętrzne Wydziału BiNoZ UJ). Obecnie jestem kierownikiem projektu finansowanego ze środków MNiSW na działalność statutową i wykonawcą w jednym projekcie MNiSW („luventus Plus”) i dwóch projektach NCN (Opus). Wyniki moich dotychczasowych badań zostały opublikowane w 38 pracach oryginalnych w czasopismach z listy Journal Citation Reports (Lista A MNiSW), jak również w 2 polskojęzycznych pracach przeglądowych. Ponadto wyniki moich badań zostały zaprezentowane w postaci 74 doniesień na konferencjach krajowych i

zagranicznych. Łączny Impact Factor moich publikacji według bazy Web of Science (zgodnie z rokiem ukazania się publikacji) wynosi 63,762; łączna punktacja wg wykazu czasopism naukowych MNiSW (z 31.12.2015) wynosi 870 pkt; Indeks cytacji (bez autocytowań) wynosi 173; a Indeks Hirscha równy jest 9 (dane z 05.02.2016).

Od 2009 roku jestem recenzentką prac nadsyłanych do redakcji międzynarodowych czasopism naukowych (Reproductive Biology, Molecular and Cellular Endocrinology, General and Comparative Endocrinology, Histology and Histopathology, Systems Biology in Reproductive Medicine, International Journal of Endocrinology, Reproduction in Domestic Animals). Zrecenzowałam łącznie 10 manuskryptów. Jestem lub byłam również członkiem towarzystw naukowych: Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR), Komisji Endokrynologii przy Komitecie Biologii Rozrodu PAN i Europejskiego towarzystwa Endokrynologicznego (ESE).

Poza pracą naukową jestem również zaangażowana w pracę dydaktyczną. Od roku 2005 prowadzę zajęcia dydaktyczne w pełnym wymiarze pensum ze studentami kierunku biologia Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ, zaś od roku 2012 prowadzę zajęcia dla kierunku weterynaria Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR. W ramach pensum dydaktycznego na macierzystym Wydziale prowadzę zajęcia z kursów: Fizjologia Zwierząt dla studentów III roku kierunku biologia studiów I stopnia oraz Endokrynologia Ogólna i Fizjologiczne Techniki Badań dla studentów kierunku biologia studiów II stopnia. W roku akademickim 2009/2010 prowadziłam zajęcia z kursu Fizjologia Zwierząt dla kierunku biologia WBiNoZ na studiach niestacjonarnych. Dla studentów I roku kierunku weterynaria prowadzę zajęcia z kursu Biologia. Byłam promotorem 5 zakończonych prac licencjackich i 1 magisterskiej. Aktualnie jestem promotorem 2 prac licencjackich i 2 prac magisterskich.

W ramach działalności organizacyjnej na Uniwersytecie Jagiellońskim pełnię funkcję doradcy studentów I i II roku biologii UJ na studiach I stopnia oraz jestem przedstawicielem niesamodzielnych pracowników naukowych w Radzie Instytutu Zoologii UJ oraz w Radzie Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ. Moja działalność popularyzatorska polega głównie na zaangażowaniu w promocję nauki i Wydziału poprzez aktywny udział w Festiwalu Nauki, Małopolskiej Nocy Naukowców i Nocy Biologów. Prowadziłam również warsztaty dla uczniów klas II z II Liceum im. Króla Jana III Sobieskiego w Krakowie, a w 2013 roku wygłosiłam wykład na zebraniu naukowym Olsztyńskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego.

Katarzyna Knapczyk-Stwora