

Załącznik 2
do wniosku z dnia 25.05.2016 r.
o przeprowadzeniu postępowania habilitacyjnego

DR AGNIESZKA RAK

WYDZIAŁ BIOLOGII I NAUK O ZIEMI, UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

AUTOREFERAT

KRAKÓW 2016

1. IMIĘ I NAZWISKO

Agnieszka Rak

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

Magister biologii, studia ukończone w 2005 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (WBiNoZ), Uniwersytetu Jagiellońskiego (UJ) w Krakowie, na podstawie pracy magisterskiej: *„Wpływ leptyny na GH i IGF stymulowaną steroidogenezę i proliferację komórek pęcherzyka”*.

Promotor pracy magisterskiej: prof. dr hab. Ewa Gregoraszczyk.

Recenzent: prof. dr hab. Stanisława Stokłosowa.

Doktor nauk biologicznych, tytuł uzyskany w 2008 roku na WBiNoZ, UJ w Krakowie, na podstawie rozprawy doktorskiej: *„Rola greliny w regulacji funkcji jajnika”*.

Promotor w przewodzie doktorskim: prof. dr hab. Ewa Gregoraszczyk.

Recenzenci w przewodzie doktorskim: prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec.

prof. dr hab. Krzysztof Nowak.

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

01.03.2009 – 28.02.2011 asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii, WBiNoZ, UJ w Krakowie.

01.02.2011 – do chwili obecnej adiunkt naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii, WBiNoZ, UJ 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.):

A). TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Rezystyna nowym regulatorem funkcji pęcherzyka jajnikowego świni.

B). AUTORZY, TYTUŁ PUBLIKACJI, NAZWA WYDAWNICTWA, ROK WYDANIA

1. **A Rak-Mardyła**, M Durak, EL Gregoraszczyk. Effects of resistin on porcine ovarian follicle steroidogenesis in prepubertal animals: an *in vitro* study, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2013, 11: 45.

Impact Factor₂₀₁₃: 2.409; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 25; liczba cytacji: 6

2. **A Rak-Mardyła**, M Duda, EL Gregoraszczyk. A Role for Resistin in the Ovary During the Estrous Cycle, *Hormone and Metabolic Research*, 2014, 46 (7) 493-8.

Impact Factor₂₀₁₄: 2.147; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 20; liczba cytacji: 1

3. **A Rak**, E Drwal, A Karpeta, E Gregoraszczyk. Regulatory Role of Gonadotropins and Local Factors Produced by Ovarian Follicles on *In Vitro* Resistin Expression and Action on Porcine Follicular Steroidogenesis, *Biology of Reproduction*, 2015, 92 (6) 142, 1-14.

Impact Factor₂₀₁₅: 3.451; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 40; liczba cytacji: 2

4. **A Rak-Mardyła**, E Drwal. *In vitro* interaction between resistin and peroxisome proliferator activated receptor gamma γ in porcine ovarian follicles, *Reproduction, Fertility and Development*, 2016, 28 (3) 357-368.

Impact Factor₂₀₁₆: 2.400; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 30; liczba cytacji: 2

5. **A Rak**, E Drwal, A Wróbel, EL Gregoraszczyk. Resistin is a survival factor for porcine ovarian follicular cells, *Reproduction*, 2015, 150 (4) 343-355.

Impact Factor₂₀₁₅: 3.174; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 35; liczba cytacji: 0

SUMARYCZNY WSPÓŁCZYNNIK WPŁYWU IF PODANO WEDŁUG JCR ZGODNIE Z ROKIEM OPUBLIKOWANIA PRAC: **13.581**
PUNKTY MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO (MNI SW) WEDŁUG KOMUNIKATU Z DNIA 23.12.2015: **150**
LICZBA CYTACJI WEDŁUG WEB OF SCIENCE Z DNIA 24.05.2016 : **11**

WE WSZYSTKICH WW. PUBLIKACJACH JESTEM AUTOREM KORESPONDENCYJNYM.

c) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Podstawę rozprawy habilitacyjnej tworzy cykl pięciu oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2013 – 2016, które stanowią uzupełnienie obecnego stanu wiedzy na temat roli adipokin w regulacji hormonalnej komórek jajnika. Przedstawione do oceny dorobku w postępowaniu habilitacyjnym prace są wynikiem pracy naukowej w ramach kierowanych przeze mnie czterech projektów badawczych realizowanych w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii, WBiNoZ UJ.

Tkanka tłuszczowa od początku lat osiemdziesiątych XX wieku uznana jest za aktywny organ endokryny syntetyzujący liczne, biologicznie czynne peptydy zwane adipokinami, które działają w obrębie tkanki tłuszczowej oraz na odległe narządy i tkanki. Przykładami adipokin są m.in. leptyna, adiponektyna, chemeryna, apelina, waspina, wisfatyna, oraz odkryta przez trzy niezależne grupy badawcze **rezystyna**. Steppan i współ. (2001a) zidentyfikowali rezystynę podczas badań nad grupą leków hiperglikemizujących tzw. tiazolidinedionów (TZDs, ang. *thiazolidinediones*). Zespół Kim i współ. (2001) opisali rezystynę jako adipokinę, wytwarzaną przez komórki tkanki tłuszczowej wprowadzając określenie ADSF (ang. *adipocyte tissue – specific secretory factor*, czynnik wydzielniczy specyficzny dla adipocytów). Natomiast Holcomb i współ. (2000) wykazali podobieństwo rezystyny do cząsteczek obecnych w miejscach stanu zapalnego FIZZ1 i określili ją jako FIZZ3 (ang. *found in inflammatory zones*). Nazwa tej adipokiny wynika z jej związku z insulinoopornością tkanek (*insulin resistance*). Rezystyna podobnie jak RELM- α , RELM- β oraz RELM- γ należy do białek bogatych w cysteinę, określanych jako RELMs (ang. *resistin-like molecules*, cząsteczki podobne do rezystyny). Ludzka rezystyna jest hormonem peptydowym o masie cząsteczkowej 12,5 kDa, zbudowanym ze 108 aminokwasów (Steppan i współ. 2001b). Rezystyna występuje we krwi w postaci trimerów i heksamerów, z przewagą heksamerów, które stanowią 80 – 90%. Poziom tego peptydu w surowicy krwi ludzi wynosi 7 – 14 ng/ml natomiast u gryzoni 36 – 43 ng/ml (Azuma i współ. 2003). Ekspresja genu *RETN* jest tkankowo-specyficzna i zachodzi głównie w tkance tłuszczowej. Badania Faina i współ. (2003) wykazały, że tylko 2% tego białka wydzielają adipocyty, większość hormonu wytwarzają inne komórki budujące ludzką tkankę tłuszczową, które nie są bezpośrednio odpowiedzialne za magazynowanie lipidów. Ostatnie badania wykazały również obecność mRNA rezystyny w monocytach, makrofagach, jelitach, szpiku kostnym, płucach, nadnerczach, nerkach, mięśniach, komórkach wysp trzustkowych, jądrze oraz łożysku (Nohira i współ. 2004). Wyższe stężenie rezystyny zaobserwowano u myszy otyłych zarówno w surowicy, jak i w tkance tłuszczowej, w porównaniu ze szczupłymi osobnikami (Qian i współ. 2003). Synteza tego białka indukowana jest podczas adipogenezy (McTernan i współ. 2002). Do tej pory nie wykazano właściwego receptora

dla rezystyny, jednak badania ostatnich lat wskazują, że hormon ten może być aktywowany w różnych komórkach po związaniu z takimi molekułami jak: Δ DCN (*decorin lacking the glycanation site*), ROR1 (*tyrosine kinase-like orphan receptor*), TLR4 (ang. *Toll-like receptor-4*), CAP1 (ang. *adenylyl cyclase-associated protein 1*) czy receptor PPAR γ (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor γ* , receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów typ γ). Wciąż nie wiele jest danych literaturowych na temat mechanizmu działania rezystyny w organizmie. Główną rolę jaką przypisuje się rezystynie jest udział w rozwoju insulinooporności, procesach zapalnych związanych z otyłością, cukrzycą typu 2 oraz metabolizmie glukozy.

Liczne badania ostatnich lat wskazują na udział hormonów metabolicznych m.in. insuliny, greliny, hormonów tarczycy, hormonu wzrostu oraz adipokin w regulacji funkcjonowania układu rozrodczego samic. Autorzy sugerują ich działanie poprzez oddziaływanie na oś podwzgórze – przysadka – jajnik jak również bezpośrednio na poziomie jajnika. Pęcherzyk jajnikowy jest cyklicznie zmieniającą się zarówno pod względem morfologii jak i funkcji jednostką jajnika. Główną rolę pęcherzyka jajnikowego jest stworzenie odpowiedniego środowiska dla wzrostu i dojrzewania oocytu, zdolnego do zapłodnienia i dalszego rozwoju, a tym samym zapewniającego przedłużenie gatunku. W komórkach pęcherzyka jajnikowego w procesie steroidogenezy produkowane są hormony płciowe: progesteron (P4), testosteron (T) i estradiol (E2), które odpowiadają za prawidłowy przebieg cyklu miesięcznego, rozwój, wzrost i dojrzewanie pęcherzyka jajnikowego, dojrzewanie komórki jajowej, jak również, gdy dojdzie już do poczęcia, za zagnieżdżenie się zarodka i jego dojrzewanie. Zaburzenia w produkcji hormonów steroidowych są przyczyną licznych patologii jajnika a w konsekwencji prowadzą do niepłodności. Obecnie wielu autorów podkreśla, że wzrost pęcherzyka, różnicowanie i jego endokrynną aktywność regulowana jest nie tylko przez gonadotropiny lecz przez wiele czynników produkowanych przez pęcherzyk. Czynniki te na drodze auto- i parakrynej oddziałują na komórki jajnika wpływając na procesy steroidogenezy, proliferacji czy apoptozy. Poza tym prawidłowe funkcjonowanie układu rozrodczego zależy także od odpowiedniego stanu energetycznego organizmu. Istnieje wiele danych na ten temat negatywnego wpływu otyłości na rozród samic. Nadmiar masy ciała jest przyczyną zaburzeń układu hormonalnego, prowadzi między innymi do nieregularnej owulacji, występowanie cykli bezowulacyjnych, zaniku miesiączki, powstawania cyst na jajnikach oraz wzmożonej produkcji testosteronu. Otyłość podwyższa także ryzyko rozwoju zespołu policystycznych jajników (PCOS), któremu najczęściej towarzyszą zaburzenia miesiączkowania, nadmiar produkcji androgenów, cykle bezowulacyjne oraz niepłodność. Dane literaturowe wskazują, że w surowicy kobiet otyłych obserwuje się znacznie podwyższony poziom takich adipokin jak leptyna, wisfatyna, waspina oraz rezystyna.

CELE NAUKOWE WW. PRAC

- ✓ zbadanie ekspresji genu i białka rezystyny w pęcherzyku jajnikowym w zależności od stadium jego rozwoju oraz stadium dojrzałości płciowej samic;
- ✓ określenie bezpośredniej roli rezystyny w procesie steroidogenezy komórek pęcherzyka jajnikowego;
- ✓ poznanie czynników regulujących ekspresję rezystyny oraz jej wpływ na proces steroidogenezy w pęcherzyku jajnikowym;
- ✓ wyjaśnienie interakcji pomiędzy rezystyną a receptorem PPAR γ w pęcherzyku jajnikowym;
- ✓ określenie roli rezystyny w regulacji proliferacji i apoptozy komórek pęcherzyka jajnikowego.

Do realizacji ww. celów wykorzystałam jajniki świń (*Polish Landrace, Large White*) pochodzące z rzeźni. Dzięki szczególnemu podobieństwu do człowieka w budowie anatomicznej narządów wewnętrznych i przebiegu procesów fizjologicznych świnia jest doskonałym modelem doświadczalnym do badania wielu różnych procesów fizjologicznych i patologicznych. Wyniki badań biomedycznych na świńskim modelu dotyczące między innymi otyłości, chorób układu krążenia, układu rozrodczego czy zaburzeniami hormonalnymi znalazły już zastosowanie w terapii chorób człowieka. Hodowle *in vitro* komórek pęcherzyka jajnikowego świnii stanowią doskonały model badawczy z zakresu fizjologii jajnika i z powodzeniem wykorzystywane są w badaniach prowadzonych w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu UJ od ponad 30 lat.

Przedstawiając wyniki moich badań należy podkreślić, że wykorzystując techniki real time PCR i analizę Western blot po raz pierwszy wykazałam ekspresję genu i białka rezystyny w pęcherzyku jajnikowym świń, wskazując na produkcję tego białka w komórkach pęcherzyka jajnikowego. W przypadku samic niedojrzałych płciowo zarówno ekspresja rezystyny w pęcherzykach jajnikowych jak i jej poziom w płynie pęcherzykowym wzrasta wraz ze wzrostem pęcherzyka, osiągając najwyższy poziom w dużych pęcherzykach jajnikowych. Ponadto zaobserwowałam iż ekspresja tego peptydu jest skorelowana z poziomem E2 oznaczonym w płynie pęcherzykowym (**Rak – Mardyła i współ. 2013, poz.1**). W świetle dostępnej literatury podobne rezultaty badań otrzymał Morash i współ. (2002) wskazując na podwyższoną ekspresję rezystyny w tkance tłuszczowej szczurów w okresie przed osiągnięciem dojrzałości płciowej, sugerując iż jest to istotny hormon w tym okresie rozwoju organizmu. Natomiast w przypadku samic dojrzałych płciowo zaobserwowałam, że ekspresja rezystyny w pęcherzyku jajnikowym utrzymuje się na stałym poziomie, niezależnie od wielkości pęcherzyka jajnikowego (**Rak – Mardyła i współ. 2014, poz.2**). Podobnie Chalvatzas i współ. (2009) wykazał, iż w trakcie cyklu menstruacyjnego w surowicy kobiet stężenie rezystyny utrzymuje się na stałym poziomie. We współpracy z dr hab. Małgorzatą Dudą z Zakładu Endokrynologii Instytutu Zoologii UJ wykazałam immunolokalizację rezystyny w cytoplazmie komórek warstwy ziarnistej

i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego w każdym stadium jego rozwoju (**Rak – Mardyła i współ. 2014, poz.2**). Rezultaty tych badań poszerzają znacząco wiedzę na temat hormonów białkowych produkowanych przez komórki pęcherzyka jajnikowego świń i stanowią uzupełnienie istniejącej wiedzy na temat jajnikowej ekspresji rezystyny wielu gatunków zwierząt. Do tej pory wykazano obecność genu i białka rezystyny w wielu strukturach jajnika krowy (Maillard i współ. 2011), szczura (Maillard i współ. 2011, Jones i współ. 2009), nietoperza (Singh i współ. 2015) oraz komórkach granulozy pęcherzyków przedowulacyjnych kobiet w trakcie zabiegu pozaustrojowego zapłodnienia (Niles i współ. 2012, Reverchon i współ. 2013). Powyższe wyniki badań zaprezentowałam na krajowych konferencjach: VI zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR) w Polańczyku (*załącznik 3, poz.II.K.3*) oraz Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego w Olsztynie (*załącznik 3, poz.II.K.4*). Badania te prowadziłam w ramach kierowanego przeze mnie grantu „*Udział rezystyny w regulacji funkcji jajnika*” (0343/PO1/2010/70) programu „*luventus Plus*” finansowanego przez MNiSW.

Biorąc pod uwagę wyniki powyższych badań w kolejnym etapie zdecydowałam się na określenie bezpośredniej roli rezystyny w funkcjonowaniu komórek pęcherzyka jajnikowego. Jednym z postawionych sobie zadań było sprawdzenie udziału rezystyny w regulacji procesu steroidogenezy. Wyniki moich badań wykazały, że w przypadku zwierząt niedojrzałych płciowo, rezystyna w zależności od zastosowanej dawki stymuluje sekrecję głównie P4, androstendionu (A4) i T poprzez wzrost ekspresji genu i białka dla kluczowych enzymów steroidogennych: cytochromu P450scc (CYP11A1), dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (3 β HSD), cytochromu P450c17 (CYP17A1) i dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej (17 β HSD) (**Rak – Mardyła i współ. 2013, poz.1**). Ponadto, rezultaty moich badań wskazują, że ekspresja receptora progesteronu (PR) oraz androgenowego (AR) w pęcherzyku jest podwyższona po podaniu rezystyny (**Rak i współ. 2015, poz.3**). Natomiast nie zaobserwowałam zmian w sekrecji E2 i ekspresji enzymu cytochromu P450 aromatazy (CYP19) jak również zmian w ekspresji receptora estrogenowego ER β (**Rak i współ. 2015, poz. 3**). Dawki użyte w badaniach odzwierciedlały poziom rezystyny w płynie pęcherzykowym jajnika świń (0.1 ng/ml), surowicy krwi ludzi w warunkach fizjologicznych (1-10 ng/ml) (Munir i współ. 2005, Asimakopoulos i współ. 2009) i patologicznych (100 ng/ml) (Skilton i współ. 2005). Podobne wyniki badań uzyskałam w przypadku hodowli *in vitro* pęcherzyków pochodzących od świń dojrzałych płciowo (**Rak – Mardyła i współ. 2014, poz.2**) wnioskując, iż wpływ rezystyny na sekrecję steroidów jajnikowych jest niezależny od wielkości pęcherzyka i statutu dojrzałości płciowej zwierząt. Rezultaty tych badań pokazały zwiększoną sekrecję głównie androgenów i ekspresję enzymów odpowiedzialnych za ich produkcję w pęcherzyku jajnikowym po podaniu rezystyny. Podobne obserwacje opublikował Munir i współ. 2005, który wykazał, że w hodowlach *in vitro* komórek

osłonki wewnętrznej ludzkich pęcherzyków jajnikowych rezystyna stymuluje produkcję androgenów poprzez wzrost ekspresji CYP17 i aktywności enzymatycznej 17 α -hydroksylazy (markerów hyperandrogenizmu u kobiet z PCOS), sugerując zaangażowanie rezystyny w patologię PCOS. Wzrost stężenia androgenów jajnikowych i nadnerczowych występuje również w przypadku otyłości, której często towarzyszy rozwój insulinoporności i licznych zaburzeń hormonalnych. Działanie rezystyny polega na zmniejszeniu wrażliwości tkanek na insulinę (wywołaniu insulinoporności), jednak w obecnej literaturze istnieją sprzeczne dane na temat roli rezystyny w patologii PCOS. Odmienne dane wpływu rezystyny na proces steroidogenezy obserwowano u innych gatunków zwierząt np. krowy czy szczura (Maillard i współ. 2011), co sugeruje iż działanie rezystyny w jajniku jest specyficzne gatunkowo i w dużej mierze zależy od modelu doświadczalnego i użytych dawek tego białka. Ponadto, brak jest danych na temat receptorów rezystyny i białek transportujących tę cząsteczkę, co utrudnia poznanie mechanizmów działania rezystyny na poziomie komórkowym. W swoich badaniach wykonałam analizę udziału receptora PPAR γ w regulacji steroidogenezy przez rezystynę. Receptory PPAR należą do rodziny receptorów jądrowych i zostały opisane po raz pierwszy w wątrobie myszy (Isseman i Green, 1990). Są to receptory ligando-zależne, które posiadają typową dla receptorów jądrowych budowę domenową i pełnią rolę czynników transkrypcyjnych (Mangelsdorf i Evans, 1995). Dotychczas scharakteryzowano trzy formy tego receptora: PPAR α , PPAR β i PPAR γ . Kodowane są one przez oddzielne geny mimo wysokiej zgodności na poziomie sekwencji aminokwasów oraz struktury przestrzennej białka. Różnią się również profilem ekspresji oraz aktywowane są przez różne ligandy wywołujące odmienne efekty biologiczne (Kliwer i współ. 1997, Schoppee i współ. 2002). W swoich badaniach po raz pierwszy wykazałam ekspresję wszystkich trzech izoform PPAR α , PPAR β i PPAR γ na poziomie genu i białka w małym, średnim i dużym pęcherzyku jajnikowym pochodzących od sówiń niedojrzałych i dojrzałych płciowo (**Rak - Mardyła i Drwal 2016, poz.4**). Wyniki te wskazują, że ekspresja izoform PPAR α i PPAR γ wzrasta wraz ze wzrostem pęcherzyka jajnikowego sówiń niedojrzałych płciowo, sugerując istotną rolę tych receptorów w dojrzewaniu pęcherzyka. Podobne rezultaty obserwował Long i współ. 2009 w komórkach warstwy ziarnistej neonatalnych szczurów. Najsilniejszą ekspresję zaobserwowałam w przypadku receptora PPAR γ w pęcherzykach zwierząt dojrzałych płciowo, dlatego też ta forma receptora została wybrana do badań interakcji z rezystyną. W swoich eksperymentach zaobserwowałam także, że ekspresja PPAR γ regulowana jest lokalnie przez rezystynę; po podaniu rezystyny ekspresja PPAR γ na poziomie genu i białka istotnie wzrasta głównie w średnim i dużym pęcherzyku (**Rak - Mardyła i Drwal 2016, poz.4**). PPAR γ jest kluczowym regulatorem funkcji jajnika. Receptor ten uczestniczy w różnicowaniu i proliferacji komórek pęcherzyka jajnikowego w kierunku komórek lutealnych, a także w procesie steroidogenezy czy folikulogenezie pęcherzyka jajnikowego (Komar 2005). W kolejnych eksperymentach używając selektywnego antagonisty PPAR γ – GW9662

wykazałam zaangażowanie tego receptora w steroidogenne działanie rezystyny na poziomie pęcherzyka jajnikowego (**Rak - Mardyła i Drwal 2016, poz.4**). Powyższe wyniki badań wnoszą istotną wiedzę na temat regulacji funkcji endokrynej komórek pęcherzyka jajnikowego oraz uzupełniają istniejący stan wiedzy na temat bezpośredniej roli adipokin na poziomie jajnika. Wyniki te zaprezentowałam na polskich (załącznik 3, poz.III.B.33, poz.III.B.34) i międzynarodowych konferencjach *European Congress of Endocrinology* w Kopenhadze (załącznik 3, poz.III.B.35) oraz *European Society for Domestic Animal Reproduction* w Bolonii (załącznik 3, poz.III.B.38). Badania te prowadziłam w ramach kierowanych przeze mnie grantów „Udział rezystyny w regulacji funkcji jajnika” (0343/PO1/2010/70) oraz „Zależny od receptora PPAR- γ mechanizm działania rezystyny w jajniku” (0047/IP1/2011/71) programu „luventus Plus” finansowanych przez MNiSW.

W dalszych badaniach skupiłam się na poznaniu czynników regulujących zarówno jajnikową ekspresję rezystyny jak również jej bezpośredni udział w procesie sekrecji hormonów steroidowych. Obecnie wiadomo, że ekspresja genu rezystyny regulowana jest przez wiele czynników między innymi TZDs, insulina, glukoza, glikokortykoidy, hormon wzrostu, hormony tarczycy, agoniści receptora β -adrenergicznego, cytokiny prozapalne oraz witamina A. W swoich badaniach wykazałam, że gonadotropiny: folikulotropina (FSH) i lutropina (LH) oraz hormony steroidowe: P4, T i E2 stymulują zarówno ekspresję rezystyny jak również sekrecję tego białka do medium hodowlanego (**Rak i współ. 2015, poz.3**). Otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi przedstawionymi na innych modelach doświadczalnych. Zespół Siawrys i Smolińska (2013) wykazały, że ekspresja mRNA leptyny w świńskich komórkach lutealnych regulowana jest przez LH, natomiast Wickham i współ. (2013) wykazał, że ekspresja receptora adiponektyny wzrasta po podaniu FSH w ludzkich komórkach warstwy ziarnistej. Z kolei, wyniki badań oceniających wpływ steroidów na ekspresję rezystyny są sprzeczne, w zależności od zastosowanego modelu doświadczalnego. Większość z nich przeprowadzono na mysich adipocytach. W swoich badaniach równocześnie odnotowałam, że czynnikami hamującymi ekspresję rezystyny w pęcherzyku jajnikowym jest insulinopodobny czynnik typu I (IGF-I) (**Rak i współ. 2015, poz.3**) oraz rosiglitazon czyli syntetyczny agonista receptora PPAR γ (**Rak - Mardyła i Drwal 2016, poz.4**). IGF-I odgrywa istotną rolę w regulacji steroidogenezy, folikulogenezy czy proliferacji świńskich komórek jajnikowych. W modelu doświadczalnym mysich adipocytów 3T3-L1 stwierdzono także, że IGF-I obniża ekspresję rezystyny i jej sekrecję działając poprzez receptor IGF-I (IGF-IR) (Chen i współ. 2005). Otrzymane przeze mnie wyniki są zgodne z pracą Nogueiras i współ. (2004) w której wykazano, że rosiglitazon hamował ekspresję rezystyny w badaniach *in vitro* i *in vivo* komórek jądra szczura. Rosiglitazon w praktyce medycznej jest lekiem stosowanym w leczeniu cukrzycy, należący do doustnych leków hipoglikemizujących (grupa TZDs) i może on również wpływać na zmiany w profilu hormonalnym komórek jajnika (załącznik 3, poz.

II.A.21, poz.III.B.37). W badaniach klinicznych wykazano, że podanie rosiglitazonu otyłym kobietom ze zdiagnozowanym zespołem PCOS istotnie obniżało poziom rezystyny w surowicy krwi (Munir i współ. 2007). Rezultaty moich badań po raz pierwszy wskazują, iż związek ten może regulować również ekspresję rezystyny na poziomie jajnika (**Rak - Mardyla i Drwal 2016, poz.4**). Otrzymane wyniki uzupełniają istniejący stan wiedzy na temat roli receptora PPAR γ w regulacji ekspresji tego peptydu. W dalszych badaniach skupiłam się na określeniu czy gonadotropiny i wybrane hormony jajnikowe regulują steroidogenne działanie rezystyny. Rezultaty tych badań wskazują, że rezystyna obniża stymulowaną zarówno gonadotropinami jak i IGF-I, P4 i T sekrecję steroidów poprzez zahamowanie ekspresji enzymów 3 β HSD, 17 β HSD i CYP19 (**Rak i współ. poz.3**). Wyniki tych badań stanowią znaczący wkład do istniejącej wiedzy na temat czynników regulujących ekspresję oraz funkcję rezystyny w organizmie. Podsumowując, zarówno gonadotropiny jak i hormony lokalnie produkowane w pęcherzyku nie tylko wpływają na prawidłowe funkcjonowanie komórek jajnika ale mają również znaczący wpływ na ekspresję i rolę rezystyny w pęcherzyku jajnikowym. Powyższe wyniki badań zaprezentowałam na VII zjeździe TBR w Toruniu (załącznik 3, poz.II.B.46) oraz międzynarodowej konferencji *Ovarian Club* w Paryżu (załącznik 3, poz.III.B.42). Badania te prowadziłam w ramach kierowanego przeze mnie projektu „Lokalna endokrynną funkcja rezystyny na poziomie jajnika” (2011/03/D/NZ4/00040) programu „Sonata” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).

Naturalnym procesem fizjologicznym zapewniającym homeostazę pęcherzyka jajnikowego oraz zabezpieczającym komórki przed ich nieprawidłowym funkcjonowaniem jest apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, która limituje ilość i rozwój pęcherzyków jajnikowych oraz regresję ciała żółtego. Przedstawiając wyniki moich badań dotyczących wpływu rezystyny na procesy apoptozy należy podkreślić, że po raz pierwszy opisałam molekularny mechanizm anty-apoptotycznego działania rezystyny w pęcherzyku jajnikowym. Do badań wykorzystałam unikatowy model *in vitro* komórek pęcherzyka jajnikowego świń hodowanych w kokulturze komórek warstwy ziarnistej i osłonki wewnętrznej. W badaniach tych wykazałam, że rezystyna w dawkach fizjologicznych (1 i 10 ng/ml) nie wpływa na proces proliferacji komórek pęcherzyka jajnikowego natomiast obniża proces apoptozy (**Rak i współ. 2015, poz.5**). Rezultaty badań wskazują, że rezystyna istotnie hamuje ekspresję wybranych genów pro-apoptotycznych: *FADD*, *FAS*, *BAX*, aktywność oraz ekspresję genu i białka kaspazy szlaku zewnątrzpochodnego (kaspaza 8), wewnątrzpochodnego (kaspaza 9) oraz wykonawczej kaspazy 3, wskazując na zaangażowanie obydwóch szlaków apoptozy. Największą i najbardziej poznaną grupą białek anty- i pro-apoptotycznych stanowią białka z rodziny Bcl-2/Bax. Wyniki moich badań wykazały, że rezystyna stymuluje ekspresję anty-apoptotycznego białka Bcl-2 obniżając ekspresję pro-apoptotycznego białka Bax. Potwierdzeniem

otrzymanych wyników były również eksperymenty w których wykazałam, że rezystyna obniża fragmentację DNA komórek pęcherzyka jajnikowego (**Rak i współ. 2015, poz.5**). Praca ta włączona w cykl stanowiący osiągnięcie naukowe wnosi nowe dane o roli rezystyny w komórkach pęcherzyka jajnikowego oraz wskazuje, iż rezystyna obniża istotnie proces apoptozy komórek pęcherzyka uruchamiając ścieżki sygnałowe MAPK/ERK1/2 (ang. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase1/2*), JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) i IP3/Akt (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) (**Rak i współ. 2015, poz.5**). Kinazy te odgrywają istotną rolę w regulacji procesów związanych ze wzrostem, metabolizmem, proliferacją i apoptozą komórek. Wyniki tej pracy stanowią znaczący wkład do istniejącej wiedzy na temat czynników regulujących proces apoptozy w jajniku. Nadal trwają liczne badania dotyczące dokładnej kontroli apoptozy w fizjologii pęcherzyka jajnikowego oraz wybranych sytuacjach klinicznych. Dokładne poznanie czynników indukujących i hamujących apoptozę w jajniku pozwala wydłużać funkcjonowanie gonad w aspekcie fizjologicznej steroidogenezy, a także wpłynąć na skuteczność leczenia licznych patologii jajnika. Powyższe wyniki badań zaprezentowałam na międzynarodowej konferencji *World Congress of Reproductive Biology* w Edynburgu (załącznik 3, poz.III.B.45). Badania te prowadziłam w ramach kierowanych przeze mnie projektów „Lokalna endokrynną funkcja rezystyny na poziomie jajnika” (2011/03/D/NZ4/00040) programu „Sonata” finansowanego przez NCN oraz grantu wewnętrznego Wydziału BiNoZ UJ: „Mechanizm działania rezystyny w pęcherzyku jajnikowym świni” (DS/MND/WBiNoZ/IZ/7/2013) finansowanego ze środków na działalność statutową MNiSW. Dodatkowo, efekty moich badań nad rolą rezystyny w funkcjonowaniu komórek jajnika opisałam także w dwóch pracach przeglądowych (załącznik 3, poz. II.A.26, poz. II.D.29) oraz stanowią część przygotowanego przez mnie rozdziału książkowego (załącznik 3, poz. II.E.1).

Podsumowując, prezentowane jako osiągnięcie naukowe prace mają charakter nowatorski i stanowią interesujący wkład do istniejącej wiedzy na temat regulacji hormonalnych pęcherzyka jajnikowego świni. W swoich pracach wykazałam, że rezystyna produkowana jest w komórkach pęcherzyka jajnikowego i jej ekspresja zmienia się w zależności od dojrzałości płciowej samic. W badaniach *in vitro* wykazałam, że rezystyna zmieniając steroidogenezę poprzez działanie głównie androgenne oraz obniżając proces apoptozy jest nowym regulatorem funkcji komórek pęcherzyka jajnikowego świni. Określiłam również czynniki regulujące zarówno ekspresję jak i funkcje steroidogenne rezystyny w pęcherzyku jajnikowym. W świetle doniesień literaturowych w tkance tłuszczowej świni otyłych i zaburzeniami metabolizmu zaobserwowano wysoką ekspresję rezystyny w porównaniu z grupą kontrolną (Chen i współ., 2004). Rezultaty tych badań stanowią znaczący wkład do aktualnych zagadnień związanych z obniżoną płodnością samic obserwowaną w przypadku zaburzeń metabolizmu i otyłości.

LITERATURA

- Steppan C, Bailey S, Bath S i współ. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001a, 409: 307-12.
- Kim K, Lee K, Monn Y, Sul H. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2001, 276: 11252-6.
- Holcomb I, Kabakoff R, Chan B I i współ. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*, 2000, 19: 4046-55.
- Steppan C, Brown E, Wright C I i współ. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001b, 98: 502-6.
- Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S I i współ. Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res*, 2003, 11: 997-1001.
- Fain J, Cheema P, Bahouth S, Lloyd Hiler M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 17: 300: 674-8.
- Nohira T, Nagao K, Kameyama K I i współ. Identification of an alternative splicing transcript for the resistin gene and distribution of its mRNA in human tissue. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151: 151-4.
- Qian H, Gingerich R, Mistry J. Differences in the expression pattern of resistin protein in the serum and adipose tissue of ob/ob mice. *Diabetes* 2003, 52: A86-A87.
- McTernan C, McTernan P, Harte A i współ. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet*, 2002, 359: 46-7.
- Morash B, Ur E, Wiesner G, Roy J, Wilkinson M. Pituitary resistin gene expression: effects of age, gender and obesity. *Neuroendocrinology*, 2004, 79: 149-56.
- Chalvatzas N, Dafopoulos K, Kosmos G i współ. Effect of ovarian hormones on serum adiponectin and resistin concentrations. *Fertil Steril* 2009, 91: 1189-94.
- Maillard V, Froment P, Rame C, Uzbekova S, Elis S, Dupont J. Expression and effect of resistin on bovine and rat granulosa cell steroidogenesis and proliferation. *Reproduction*, 2011, 141: 467-79.
- Jones A, Rodgers J, Antibus D, Knoop A, Bruot B, Marcinkiewicz J. Relative ovarian resistin expression on normal cycling rats and rats with cystic ovaries. *Biology of Reproduction*, 2009, 81: 532.
- Singh A, Suragani M, Ehtesham NZ, Krishna A. Localization of resistin and its possible roles in the ovary of a vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Steroids* 2015, 95: 17-23.
- Niles L, Lobb D, Kang N, Armstrong K. Resistin expression in human granulosa cells. *Endocrine*, 2012, 42: 742-45.
- Reverchon M, Cornuau M, Rame C, Guerif F, Royere D, Dupont J. Resistin decreases insulin-like growth factor I-induced steroid production and insulin-like growth factor I receptor signaling in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 2013, 199: 247-55.
- Munir I, Yen HW, Baruth T, Tarkowski R, Azziz R, Magoffin DA, Jakimiuk AJ. Resistin stimulation of 17 α -hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome. *J of Clin End&Metab*, 2005, 90: 4852-57.
- Asimakopoulos B, Milousis A, Gioka T I i współ. Serum pattern of circulating adipokines throughout the physiological menstrual cycle. *Endocrine Journal*, 2009, 56: 425-33.

Skilton M, Nakhla S, Sieveking D, Caterson I, Celermajer D. Pathophysiological levels of the obesity related peptides resistin and ghrelin increase adhesion molecule expression on human vascular endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005, 32(10): 839-44.

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990, 347: 645-49.

Mangelsdorf D, Evans R. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cells*, 1995, 83: 841-850.

Kliwer S, Sundseth S, Jones S I współ. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci* 1997, 94: 4318-23.

Schoppee P, Garmey J, Veldhuis J. Putative Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Impairs Androgen and Progesterone Biosynthesis in Primary Cultures of Porcine Theca Cells. *Biol. Reprod.* 2002, 66: 190-8.

Long M, Sairam M, Komar. Initiation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) in the rat ovary and the role of FSH. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7, 145.

Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005, 3: 1-14.

Siawrys G, Smolinska N. In vitro effects of luteinizing hormone, progesterone and oestradiol 17 β on leptin gene expression and leptin secretion by porcine luteal cells obtained in early pregnancy. *J Physiol*, 2013, 64: 513-20.

Wickham E, Tao T, Nestler J, McGee E. Activation of the receptor up regulates the type 2 adiponectin receptor in human granulosa cells. *J Assist Reprod Genet* 2013, 30:963-8.

Chen YH, Hung PF, Kao YH. IGF-I downregulates resistin gene expression and protein secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288:E1019-27.

Nogueiras R, Guslillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res*, 2003, 11:408-14.

Majuri A, Santaniemi M, Rautio K I współ. Rosiglitazone treatment increases plasma levels of adiponectin and decreases levels of resistin in overweight women with PCOS: a randomized placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol*, 2007, 156(2):263-9.

Chen XD, Lei T, Xia T, Gan L, Yang ZQ. Increased expression of resistin and tumour necrosis factor- α in pig adipose tissue as well as effect of feeding treatment on resistin and cAMP pathway. *Diabetes Obes Metab*, 2004, 6(4): 271-9.

D) OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH

Główny obszar moich zainteresowań naukowych, począwszy od studiów magisterskich, poprzez studia doktoranckie, po aktualne projekty realizowane w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii dotyczy fizjologii rozrodu a w szczególności endokrynologii rozrodu samic.

Osiągnięcia badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora:

Z Instytutem Zoologii UJ związałam się już w czasie studiów magisterskich na kierunku biologia, Wydziału BiNoZ UJ, wybierając na promotora mojej pracy magisterskiej Panią Profesor Ewę Gregoraszczyk, wtedy też zaczęłam interesować się szeroko pojętą regulacją hormonalną gonady

żeńskiej. Na początku czwartego roku rozpoczęłam badania w ramach projektu zamawianego pt. „*Ekspresja receptora leptyny (Ob-Rb) i udział tego hormonu w regulacji funkcji endokrynej jajnika świni*” (084/PO6/2202/3.1) koordynowanego w Zakładzie przez Panią Profesor Ewę Gregoraszczyk, które były ściśle związane z tematyką mojej pracy magisterskiej pt. „*Wpływ leptyny na GH i IGF stymulowaną steroidogenezę i proliferację komórek pęcherzyka*”. Dotyczyły one wpływu leptyny, hormonu regulującego pobieranie pokarmu a zarazem produktu genu otyłości, na czynność komórek jajnika świni. W badaniach tych wykazałam, że leptyna bezpośrednio stymuluje sekrecję E2 i hamuje proces apoptozy komórek pęcherzyka jajnikowego zwierząt niedojrzałych płciowo i może być ważnym czynnikiem regulującym dojrzewanie płciowe. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane na międzynarodowej konferencji (załącznik 3, poz.III.B.12) oraz opublikowane w formie pracy oryginalnej (załącznik 3, poz.II.A.1) i stanowiły również część pracy przeglądowej (załącznik 3, poz. II.D.28).

Pod kierunkiem Pani Profesor Gregoraszczyk rozpoczęłam w 2005 roku studia doktoranckie w Środowiskowym Studium Doktoranckim na WBiNoZ UJ. Tematyka moich badań była kontynuacją wcześniejszych zagadnień dotyczących regulacji funkcjonowania jajnika świni, ze szczególnym uwzględnieniem roli greliny, hormonu związanego z pobieraniem pokarmu i metabolizmem energetycznym, w bezpośrednim funkcjonowaniu komórek pęcherzyka jajnikowego. Badania te były realizowane w ramach grantu promotorskiego pt. „*Mechanizm działania greliny w jajniku*” (2748/B/PO1/2007/33) oraz grantów wewnętrznych WBiNoZ UJ: „*Wpływ greliny na steroidogenezę komórek pęcherzyka jajnikowego świni*” (BW/IZ/59/2006), „*Wpływ greliny na ekspresję białka kinazy ERK1/2*” (BW/IZ/8/2010), finansowanych ze środków na działalność statutową MNiSW. Korzystając ze współpracy Profesor Gregoraszczyk z zespołem Profesora Krzysztofa Nowaka z Zakładu Fizjologii i Biochemii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu uzyskałam po raz pierwszy wyniki oznaczenia ekspresji receptora dla greliny (GHSR-1a) w pęcherzyku jajnikowym metodą RT-PCR. Podczas wykonywania pracy doktorskiej opanowałam technikę hodowli komórek *in vitro*, techniki immunoenzymatyczne oraz analizę Western blot. Ponadto, prowadziłam analizę proliferacji i apoptozy komórek pęcherzyka jajnikowego świni. Wykorzystując hodowle kokultur komórek pęcherzyka jajnikowego świni, wykazałam bezpośrednie działanie greliny na poziomie jajnika wnosząc istotne elementy do wiedzy na temat lokalnej regulacji funkcji jajnika. Grelina przez stymulujący wpływ na proliferację komórek pęcherzyka jajnikowego oraz działanie anty-apoptotyczne a także bezpośrednie działanie na sekrecję steroidów ma modulujący wpływ na procesy steroidogenezy. Wyniki uzyskane w trakcie tych doświadczeń dotyczą bardzo aktualnych zagadnień związanych z narastającymi problemami funkcjonowania jajnika w warunkach nadmiernej podaży energii, czego konsekwencją są coraz częstsze problemy z niepłodnością żeńską wywołaną zaburzeniami metabolizmu energetycznego. Wyniki badań prezentowałam na konferencjach

krajowych (załącznik 3, poz.II.K.1, poz.II.B.14, poz.III.B.16, poz.III.B.18, poz.III.B.21) i zagranicznej (załącznik 3, poz.III.B.19) oraz opublikowałam w renomowanych czasopismach naukowych w formie pięciu oryginalnych publikacji (załącznik 3, poz.II.A.2, poz.II.A.5, poz.II.A.6, poz.II.A.7, poz.II.A.11). Stanowiły również przedmiot rozprawy doktorskiej pt. „*Rola greliny w regulacji funkcji jajnika*”, przygotowanej pod kierunkiem Profesor Ewy Gregoraszczuk. Publiczna obrona mojej rozprawy doktorskiej odbyła się 17 listopada 2008, a stopień doktora nauk biologicznych został mi nadany decyzją Rady WBiNoZ UJ 16 grudnia 2008. Rozprawa doktorska została wyróżniona nagrodą JM Rektora UJ.

Podczas studiów doktoranckich zostałam włączona w prowadzone w tym czasie w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu prace badawcze we współpracy z Zakładem Rozrodczości i Medycyny Sądowej w Oslo kierowanej przez Profesora Erika Ropstada (*Department of Reproduction and Forensic Medicine, Norwegian School of Veterinary Sciences, Oslo, Norwegia*) pt. „*Endocrine Disrupters (ED): Risk assessment for food quality and animal health*” (158849/110) dotyczące wpływu polibromowanych eterów difenyloowych (PBDE) oraz pestycydów chloroorganicznych (DDT i jego metabolitu p,p'DDE), egzogennych związków zaliczanych do substancji o aktywności hormonalnej tzw. „*endocrine disruptors chemicals*” (EDC) na funkcję jajnika. EDC mają zdolność wiązania się z receptorami hormonów steroidowych mogą naśladować lub hamować działanie endogennych hormonów. Biorąc pod uwagę fakt, iż jajnik jest aktywnym endokrynnie narządem jest on doskonałym modelem do badań mechanizmów działania różnych związków należących do grupy EDC. PBDE stosowane są jako syntetyczne addytywne uniepalniacze i dzięki temu znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle elektronicznym i elektrycznym (komputery, telewizory, sprzęt AGD), a także w przemyśle tekstylnym (tkaniny obciowe oraz dywany). Unia Europejska w 2004 roku zakazała używania dwóch z trzech powszechnie stosowanych mieszanin PBDE, Penta- oraz Octa-BDE. Pomimo wycofania z produkcji dwóch mieszanin handlowych, PBDE są dalej obecne w środowisku ponieważ charakteryzują się dużą trwałością. W ramach tych badań wykazałyśmy, że związki te zaburzają funkcję pęcherzyka jajnikowego świni, poprzez wpływ na proces steroidogenezy głównie sekrecję T i E2, nie wpływając na żywotność komórek oraz aktywność kaspazy 3 (załącznik 3, poz.II.A.4, poz.III.B.13, poz.II.B.15.)

Jednocześnie byłam wykonawcą w projekcie badawczym pt. „*Porównanie mechanizmów działania endo- i egzogennych estrogenów*” (1929/PO1/06/31) kierowanym przez Profesor Ewę Gregoraszczuk. Badania te miały na celu porównanie działania E2 oraz jego hydroksylowanych metabolitów (2-OH-E2 i 4-OH-E2) z działaniem polichlorowany bifenyli, konkretnie kongeneru PCB3 oraz jego hydroksylowanych metabolitów (4-OH-PCB3 i 3,4di-OH-PCB3) na wybrane parametry w linii komórkowej raka piersi MCF-7. W badaniach tych wspólnie z zespołem Profesor Anny Gasińskiej z Zakładu Radiobiologii Klinicznej Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej Curie oddziału

Krakowskiego oraz Profesor Gabrieli Ludewig z Uniwersytetu Iowa (USA) wykazałyśmy odmienne, mitogenne działanie badanych związków: endogenne estrogeny stymulują proliferację, natomiast egzogenne estrogeny nie wpływają na proliferację komórek MCF-7. Zaobserwowaliśmy jednak, że tylko metabolit 3,4di-OH-PCB3 hamuje proliferację komórek MCF-7 obniżając poziom kinaz ERK1/2. Natomiast we współpracy z dr inż. Michałem Bochenkiem z Instytutu Zootechniki w Krakowie określiliśmy wpływ badanych związków na proces apoptozy komórek MCF-7. Wyniki te wskazują, że anty-apoptotyczne działanie zarówno endogennych jak i egzogennych estrogenów odbywa się poprzez zahamowanie aktywności kaspazy 9, należącej do wewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy. W ramach tych badań jestem współautorką czterech publikacji (*załącznik 3, poz.II.A.3, poz.II.A.8, poz.II.A.9, poz.II.D.27*) oraz doniesień konferencyjnych (*załącznik 3, poz.III.B.20, poz.III.B.23, poz.III.B.24*). W tym czasie byłam również wykonawcą w projekcie Pani dr hab. Anny Wójtowicz „*Mechanizm działania DDT i jego metabolitów w komórkach łożyska ludzkiego*” (0671/PO5/2005/28). Badania te miały na celu wykazanie działania pestycydów takich jak DDT i jego metabolitów na funkcję łożyska. W ramach tego projektu uczestniczyłam w badaniach wpływu tych związków na ekspresję białka dla receptora AhR i enzymu aromatazy, poszerzając swój warsztat metod biochemicznych. W trakcie trwania studiów doktoranckich uczestniczyłam w kilku krajowych kursach dotyczących technik biologii molekularnej, hodowli komórkowej, cytometrii przepływowowej.

Osiągnięcia badawcze po uzyskaniu stopnia doktora:

Od 2009 roku jestem zatrudniona w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Katedry Fizjologii Zwierząt, Instytutu Zoologii UJ: początkowo na stanowisku asystenta, a od 2011 roku na stanowisku adiunkta. Główny nurt moich prac badawczych prowadzonych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora to kontynuacja badań związanych z rolą hormonów metabolicznych w regulacji funkcji rozrodczych samic.

GRELINA: W ramach dwóch kierowanych przeze mnie grantów wewnętrznych WBiNoZ UJ: „*Określenie ekspresji genu i białka greliny i jej receptora w pęcherzykach jajnikowych świń izolowanych ze zwierząt niedojrzałych i dojrzałych płciowo*” (DS/MND/WBiNoZ/IZ/6/2011) oraz „*Wpływ greliny na sekrecję hormonów płciowych i ekspresję enzymów steroidogenezy w pęcherzyku jajnikowym świń dojrzałych i niedojrzałych płciowo*” (DS/MND/WBiNoZ/IZ/8/2012), finansowanych ze środków na działalność statutową MNiSW zbadalam różnice w ekspresji i bezpośrednim działaniu greliny w jajniku świń niedojrzałych i dojrzałych płciowo. Ekspresja białka greliny i jej stężenie w płynie pęcherzykowym istotnie wzrasta wraz ze wzrostem pęcherzyka jajnikowego zarówno u zwierząt niedojrzałych jak i dojrzałych płciowo. Natomiast ekspresja genu i białka receptora greliny jest podwyższona w jajniku zwierząt dojrzałych płciowo (*załącznik 3, poz.II.A.18, poz.III.B.26*).

W swoich badaniach obserwowałam również negatywny wpływ greliny na podstawową oraz stymulowaną gonadotropinami sekrecję steroidów poprzez zahamowanie ekspresji białka enzymów 3 β HSD, 17 β HSD oraz CYP19 w pęcherzyku zwierząt dojrzałych płciowo, sugerując zależny od statutu dojrzałości płciowej efekt działania greliny (załącznik 3, poz.II.A.22, poz.II.K.6, poz.III.B.43, poz.III.B.44). Co więcej, interesujące wyniki badań otrzymałam prowadząc hodowle *in vitro* komórek ciała żółtego (CL) świń. W badaniach tych skupiłam się na określeniu roli greliny w regulacji CL, wskazując zwiększoną ekspresję zarówno genu jak i białka greliny w CL środkowej i późnej fazy lutealnej. Równocześnie zaobserwowałam, że grelina bezpośrednio obniża sekrecję P4 poprzez zahamowanie aktywności i ekspresji enzymu 3 β HSD (załącznik 3, poz.II.A.17, poz.III.B.25, poz.III.B.29). Rozszerzając swój warsztat metod hodowli *in vitro* prowadziłam również badania eksperymentalne wpływu greliny na różne parametry linii komórek łożyska JEG-3. W pracy tej wykazałam mitogenne i anty-apoptotyczne działanie greliny. Równocześnie zaobserwowałam zahamowanie sekrecji P4 bez wpływu na poziom gonadotropiny kosmówkowej (hCG), sugerując znaczący wpływ greliny na tworzenie komórek łożyska (załącznik 3, poz.II.A.12, poz.III.B.22). Podsumowując, wyniki przytoczonych prac nie tylko wyjaśniają mechanizmy zaburzeń endokrynych w komórkach jajnika czy łożyska ale stanowią istotny wkład i uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat roli greliny w organizmie. Podsumowanie powyższych wyników opisałam w pracy przeglądowej (załącznik 3, poz.II.A.25).

LEPTYNA: Równocześnie kontynuowałam badania nad poznaniem mechanizmu działania leptyny w komórkach pęcherzyka jajnikowego świń. Liczne doniesienia literaturowe wskazują powiązanie leptyny z otyłością i hyperandrogenizacją kobiet z PCOS (Panidis i współ. 2003). Jednocześnie zaobserwowano około 306% podwyższoną ekspresją leptyny u otyłych świń w porównaniu z grupą kontrolną (Ramsay i współ. 1998). Wyniki prowadzonych przez nas badań *in vitro* wykazały, że podanie leptyny w wysokich dawkach podnosi ekspresję głównie enzymów CYP11A1 i 17 β HSD czego rezultatem było zwiększenie sekrecji P4 i T w małych i średnich pęcherzykach pochodzących od zwierząt niedojrzałych i dojrzałych płciowo (załącznik 3, poz.II.A.19). Wynik tych badań wskazują, iż podwyższony poziom leptyny poprzez zmiany w profilu hormonalnym pęcherzyka może być przyczyną patologii jajnika np. tworzenia się cyst charakterystycznych między innymi dla zespołu PCOS. Powyższe wyniki badań spotkały się z dużym zainteresowaniem na międzynarodowej konferencji *European Congress of Endocrinology* we Florencji (załącznik 3, poz.III.B.30). W kolejnych badaniach skupiliśmy się na eksperymentach z selektywnym blokerem receptora leptyny SHLA (*super human leptin antagonist*). Najnowsze wyniki badań wskazują na możliwość aplikacji SHLA w terapii leczenia kacheksji, chorobach autoimmunologicznych czy nowotworach (Gertler i współ. 2013). Wykorzystując model hodowli *in vitro* świńskich pęcherzyków

jajnikowych wykazałyśmy, że SHLA obniża zarówno ekspresję receptora leptyny w pęcherzyku jak i poziom samej leptyny. Zaobserwowałyśmy także, że SHLA odwraca efekt działania leptyny w pęcherzyku, sugerując, że może być również brany pod uwagę jako czynnik terapeutyczny przy leczeniu patologii jajnika (*załącznik 3, poz.II.A.23, poz. III.B.40, poz.III.B.41*).

APELINA: Jako kierownik dwóch grantów wewnętrznych WBiNoZ UJ finansowanych ze środków na działalność statutową MNiSW: „*Ekspresja apeliny i jej receptora w pęcherzyku jajnikowym świń niedojrzałych i dojrzałych płciowo*” (DS/MND/WBiNoZ/IZ/5/2014) oraz „*Określenie ekspresji i roli apeliny w regulacji funkcji komórki ciała żółtego świni. Badania in vitro*” (DS/MND/WBiNoZ/IZ/5/2015) obecnie prowadzę badania nad rolą apeliny w funkcjonowaniu układu rozrodczego samic. Apelina jest obecnie szeroko badaną pod względem cukrzycy typu 2 i otyłości adipokiną, jednak ostatnie badania świadczą o obecności apeliny w tkankach rozrodczych samic. We współpracy z zespołem Profesor Marii Słomczyńskiej z Zakładu Endokrynologii Instytutu Zoologii UJ oraz dr Joëlle Dupont (*Université de Tours Haras Nationaux Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, Francja*) po raz pierwszy wykazałyśmy zarówno ekspresję genu i białka apeliny oraz jej receptora (APJ) jak również immunolokalizację obu białek w komórkach jajnika świni (*załącznik 3, poz.II.K.10, poz.III.B.48*), sugerując iż może być to kolejny hormon zaangażowany również w bezpośrednią funkcję jajnika. Obecnie w ramach kierowanego przez mnie projektu „*Poznanie roli adipokiny apeliny w funkcjonowaniu jajnika oraz płodności bydła i świni*” programu wymiany osobowej Polonium na lata 2016 – 2017 z zespołem dr Joëlle Dupont prowadzimy wspólne badania nad poznaniem molekularnych mechanizmów działania apeliny w komórkach jajnika krowy i świni.

Moje zainteresowania naukowe związane są również z tematyką i projektami realizowanymi w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii. Współpraca Profesor Gregoraszczyk z Profesorem Jerzym Falandyszem z Pracowni Chemii Środowiska i Ekotoksykologii, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego, zaowocowała badaniami nad heksachlorobenzenem (HCB) oraz pentachlorobenzenem (PeCB). Związki te należą do grupy chlorowanych węglowodorów i zgodnie z decyzją Rady Parlamentu Europejskiego 2455/2001/WE - od listopada 2001 roku funkcjonują jako priorytetowe substancje niebezpieczne. Wyniki wspólnych badań pozwoliły na stwierdzenie, że HCB i PeCB akumulują się w pęcherzyku jajnikowym świni oraz zaburzają homeostazę hormonalną jajnika na drodze zmian ekspresji głównych enzymów steroidogenezy. W kolejnych doświadczeniach wykazaliśmy również androgenne działanie komercyjnej mieszaniny chloronaftalenów: Halowax 1051. Wyniki tych badań zostały opublikowane w ramach dwóch prac oryginalnych (*załącznik 3, poz.II.A.13, poz.II.A.14*) i przedstawione na krajowej konferencji (*załącznik 3, poz.III.B.31*). Równocześnie wraz z doktorantami i magistrantami Zakładu kontynuowałam badania nad mechanizmem działania PBDE w jajniku. W kolejnych publikacjach wykazaliśmy, że w komórkach

pęcherzyka jajnikowego świnii kongenery PBDE (-47, -99 i -100) stymulują sekrecję T aktywując enzymy steroidogenne CYP17 i 17 β HSD oraz obniżają aktywność enzymu CYP19 (załącznik 3, poz.II.A.15, poz.III.B.27). Natomiast w badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach CL świnii wykazaliśmy, że PBDE głównie kongenery -47 i -99 stymulują sekrecję P4 poprzez wzrost ekspresji białka 3 β HSD. Dodatkowo związki te stymulują aktywność kaspazy 3, 8 i 9 stymulując proces apoptozy komórek CL (załącznik 3, poz.II.A.16, poz.III.B.28). Podsumowując, uzyskane wyniki wyjaśniają zaburzenia równowagi jajnikowych hormonów steroidowych pod wpływem szeroko występujących w środowisku EDC, co w konsekwencji ma negatywny wpływ na płodność samic. Obecnie wiadomo, że w krajach rozwiniętych zanieczyszczenie środowiska i współczesny styl życia, a co za tym idzie ekspozycja na szkodliwe substancje jest przyczyną problemów z płodnością.

Byłam również wykonawcą w kolejnym projekcie realizowanym w Zakładzie, kierowanym przez Profesor Gregoraszcuk „Określenie możliwości współdziałania bisfenolu A i leptyny na wybrane parametry związane z procesem progresji nowotworu jajnika” (0050/B/PO1/2010/38). W ramach tego projektu jestem współautorką jednej publikacji (załącznik 3, poz.II.A.20), której celem była analiza możliwości współdziałania bisfenolu A (BPA) i leptyny w procesie apoptozy komórek nowotworowych jajnika. BPA należy do grupy związków EDC i używany jest m.in. do produkcji papieru termicznego, opakowań żywności, wypełnień stomatologicznych oraz kosmetyków. BPA podobnie jak leptyna związany jest z otyłością. W badaniach tych wykorzystując jajnikową linię komórkową OVCAR – 3 wykazałyśmy, że leptyna i BPA współdziałają w hamowaniu ekspresji genu i białka dla kaspazy 3 uruchamiając odmienne ścieżki sygnalizacyjne. Aktywność kaspazy 3 regulowana przez leptynę odbywa się z udziałem czynnika transkrypcyjnego STAT-3, z kolei BPA hamuje aktywność oraz ekspresję kaspazy-3 poprzez szlak kinazy ERK1/2. Podsumowując, w prezentowanej pracy wykazałyśmy, że oba czynniki związane z otyłością – endogenne (leptyna) i egzogenne (BPA) mogą stymulować progresję raka jajnika poprzez zahamowanie procesu apoptozy tych komórek.

W ramach współpracy Profesor Gregoraszcuk z Centrum Onkologii w Krakowie byłam również wykonawcą badań dotyczących hodowli *in vitro* komórek nowotworu jajnika pobieranych chirurgicznie od kobiet po chemoterapii. Badania te miały na celu ustalenie metody hodowli komórek nowotworu jajnika i określenie który z obecnie stosowanych w chemoterapii leków jest najbardziej skuteczny. W ramach tej współpracy jestem współautorką jednej publikacji (załącznik 3, poz.II.A.24) oraz doniesienia konferencyjnego (załącznik 3, poz.III.B.17). Wyniki tych badań wydają się być interesujące ponieważ pozwalają w krótkim czasie określić skuteczność stosowanych obecnie chemioterapeutyków w przypadku indywidualnych pacjentek.

Obecnie jestem wykonawcą w dwóch projektach realizowanych w Zakładzie: „*Nowy mechanizm działania bisfenolu A i jego analogów w biologii raka jajnika*” (2013/09/B/NZ7/00405), który kierowany jest przez dr hab. Annę Ptak oraz „*Nowe molekularne mechanizmy działania mieszanin węglowodorów aromatycznych (WWA) w ludzkich komórkach granulocyty*” (2015/17/B/NZ7/02954) kierowanego przez prof. dr hab. Ewę Gregoraszczyk. Hipoteza badawcza pierwszego projektu zakłada, że zarówno BPA jak i jego bromowane oraz chlorowane pochodne poprzez zmianę ekspresji wybranych adipokin w komórkach nowotworu jajnika wpływają w sposób pośredni na proces progresji raka jajnika. Pierwsze wyniki badań wskazują na ekspresję głównie apelininy i chemeryny w liniach nowotworowych jajnika oraz ich stymulujący wpływ na proliferację tych komórek (*załącznik 3, poz.III.B.49, poz.III.B.50*). Uzyskane wyniki przyczynią się do poszerzenia wiedzy na temat roli adipokin w progresji raka jajnika, co wydaje się być istotne w świetle doniesień o wzrastającym występowaniu nowotworów osób otyłych. Natomiast główny cel naukowy drugiego projektu zakłada zbadanie wpływu mieszanin WWA na funkcje komórek granulocyty pęcherzyka jajnikowego kobiet poprzez określenie metabolizmu, proliferacji, apoptozy czy parametrów endokrynych tych komórek. We wstępnych badaniach określiliśmy akumulację 16 znacznikowych WWA w krwi kobiet wskazując na akumulację tych związków w organizmie. W świetle dostępnej literatury dotyczącej problemów z płodnością kobiet żyjących w środowisku zanieczyszczonym uzyskane w ramach projektu wyniki wydają się znaczące i interesujące.

W tym czasie uczestniczyłam w kilku krajowych i międzynarodowych kursach dotyczących technik biologii molekularnej, metod badania ekspresji genów i białek oraz wyciszania genów. Odebrałam także kilka miesięcznych staży naukowych między innymi w laboratorium Profesora Mathiasa Strowskiego w Uniwersytecie Medycznym Charité w Berlinie, laboratorium Medycyny Weterynaryjnej Profesor Gracy Ferreira Dias Uniwersytetu w Lizbonie oraz laboratorium Fizjologii Rozrodu Uniwersytetu w Okayama Profesora Kiyoshi Okudy, gdzie udoskonalałam swój warsztat metodyczny jak również nawiązałam współpracę dzięki której możemy prowadzić wspólne badania nad rolą adipokin w funkcjonowaniu układu rozrodczego innych gatunków zwierząt np. kłacz (*załącznik 3, poz.III.B.47*) czy bydła.

LITERATURA

Panidis D, Roussa D, Kourts A, Tsimas V, Papathanasiou K, Makedis G. Serum leptin levels in normal weight and overweight women with polycystic ovary syndrome. *Clin EXP Obstet Gynecol*, 2003, 30: 207-210.

Ramsay TG, Yan X, Morrison C. The obesity gene in swine: sequence Q14 and expression of porcine leptin. *J Anim Sci*, 1998,76: 484-490.

Gertler A, Solomon G. Leptin- activity blockres: development and potential use in experimental biology and medicine. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013, 91: 873-82.

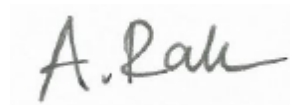
Podsumowując:

- ✓ wyniki moich badań zostały opublikowane w 35 publikacjach, z których 31 w czasopismach z listy *Journal Citation Reports (JCR)* (lista A MNiSW). Spośród tych prac 29 ukazało się po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. Wyniki moich badań zostały zaprezentowane na 50 konferencjach w kraju (26) i za granicą (24). Jestem współautorką 4 prac przeglądowych, 1 popularno-naukowej i 1 rozdziału w książce.
- ✓ sumaryczny współczynnik wpływu *impact factor* moich publikacji wg bazy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania prac) wynosi 70.833, łączna punktacja wg wykazu czasopism naukowych MNiSW wynosi 832 pkt (z dnia 23.12.2015). Współczynnik Hirscha wg *Web of Science* wynosi 10, a sumaryczna liczba cytowani według WoS wynosi 256 razy, bez autocytowań 204 razy (z dnia 24.05.2016).
- ✓ byłam kierownikiem 2 projektów „luventus Plus” MNiSW, 1 projektu „Sonata” NCN i 5 projektów wewnętrznych WBiNoZ UJ finansowanych ze środków na działalność statutową MNiSW; oraz wykonawcą 5 projektów krajowych. Byłam także dwukrotnie laureatką projektu europejskiego „Społeczeństwo – Technologie – Środowisko” (załącznik 3, poz.III.A.2, poz.III.A. 4). Obecnie jestem kierownikiem 1 projektu wewnętrznego WBiNoZ UJ oraz wykonawcą w 2 projektach „Opus” NCN. Kieruję także projektem w ramach programu wymiany osobowej „Polonium” na lata 2016 – 2017 we współpracy z zespołem dr Joëlle Dupont (*Université de Tours Haras Nationaux Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, Francja*).
- ✓ odbyłam kilka staży w polskich i zagranicznych ośrodkach naukowych między innymi w Uniwersytecie Medycznym Charité w Berlinie, Uniwersytecie w Lizbonie oraz Uniwersytecie w Okayama, Japonia.
- ✓ od 2010 roku wykonałam 34 recenzji prac nadsyłanych do redakcji polskich i międzynarodowych czasopism naukowych (np. *Reproductive Biology, Gynecological Endocrinology, Regulatory Peptides, Reproductive Biology and Endocrinology, Reproductive Sciences, General and Comparative Endocrinology, Domestic Animal Endocrinology, Animal Reproduction Science, Journal of Clinical Pathology*). Wykonałam recenzję jednego międzynarodowego projektu badawczego dla *US-Israel Binational Agricultural Research and Development Fund*. Byłam recenzentem 6 prac magisterskich i 9 prac licencjackich.
- ✓ w uznaniu moich osiągnięć naukowych zostałam kilkakrotnie nagrodzona m.in. stypendium im. Adama Krzyżanowskiego Funduszu Stypendialnego UJ dla najlepszych doktorantów UJ, dwukrotnie stypendium Fundacji na rzecz Nauki Polskiej dla młodych naukowców. W latach 2009 – 2015 pięciokrotnie otrzymałam zespołową nagrodę JM Rektora UJ za publikacje naukowe. Otrzymałam również nagrodę za zajęcie I miejsca w konkursie na najlepszą

prezentację pracy naukowej na III Zimowej Szkole TBR. Zostałam także laureatką prestiżowej nagrody TBR im. Władysława Bielańskiego za cykl oryginalnych prac badawczych, co wiązało się z zaproszeniem do wygłoszenia wykładu podczas konferencji TBR. W 2014 roku otrzymałam stypendium MNiSW dla wybitnych młodych naukowców.

- ✓ poza działalnością naukową biorę czynny udział w pracy dydaktycznej. W ramach kursów *Fizjologia Zwierząt, Biochemia, Endokrynologia Porównawcza Rozrodu Kręgowców, Fizjologiczne Techniki Badań oraz Hodowla Tkanek - zastosowania w badaniach naukowych* prowadzę zajęcia dla studentów kierunku Biologia na WBiNoZ UJ. Byłam współautorką scenariusza i prowadzącą zajęcia on-line dla uczniów podkrakowskich szkół w ramach pilotażowego projektu dydaktycznego (*załącznik 3, poz.III.A.3*). Od 2012 roku byłam promotorem 5 zakończonych prac licencjackich i 4 prac magisterskich; aktualnie pod moją opieką powstają 4 prace licencjackie i 2 prace magisterskie. Jestem również promotorem pomocniczym w 1 otwartym przewodzie doktorskim.
- ✓ w ramach działalności organizacyjnej na UJ jestem przedstawicielem pracowników niesamodzielnich do Rady Instytutu Zoologii UJ i Rady WBiNoZ UJ. Byłam trzykrotnie członkiem Wydziałowej Komisji, przyznającej środki DS na zadania służące rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich WBiNoZ UJ. Jestem członkiem Rady Programowej kierunku biologia oraz opiekunem Studiów Uzupełniających Magisterskich. Od 2012 roku jestem również członkiem Komitetu Okręgowego Olimpiady Biologicznej w Krakowie oraz Komisji egzaminacyjnej II stopnia Olimpiady Biologicznej w Krakowie. Biorę aktywny udział w promocji nauki i WBiNoZ UJ. W latach 2012-2013 byłam koordynatorem ds. promocji WBiNoZ UJ organizując i prezentując zajęcia w ramach Nocy Biologów, Targów Edukacyjnych, Dniu Otwartym UJ oraz Targach Kariery UJ. Chętnie biorę udział w organizowaniu warsztatów dla dzieci i młodzieży krakowskich szkół.

Pozostałe osiągnięcia naukowe i dydaktyczne przedstawiono w „Wykazie opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”.



Kraków, dnia 25.05.2016 r.

dr Agnieszka Rak