

Anna Hejmej

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

AUTOREFERAT

Kraków 2015

1. Imię i nazwisko

Anna Hejmej

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Magister biologii; stopień uzyskany w 2003 roku, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego; praca magisterska pt. *Wpływ estrogenów na wznowienie spermatogenezy u niedojrzałych samców nornicy rudej (Clethrionomys glareolus)*, promotor: Prof. dr hab. Barbara Bilińska, recenzent: Prof. dr hab. Maria Szołtys (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie)

Doktor nauk biologicznych; stopień uzyskany w 2007 roku, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. *Rola receptorów hormonów steroidowych w regulacji funkcji układu reprodukcyjnego ogiera i wnętrza*, promotor: Prof. dr hab. Barbara Bilińska, recenzenci: Prof. dr hab. Maria Słomczyńska (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie), Prof. dr hab. Marian Tischner (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2003–2007: doktorantka w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ

2007–2010: zatrudnienie w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii UJ na stanowisku asystenta

od 1 lutego 2010 zatrudnienie w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii UJ na stanowisku adiunkta

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

Molekularne mechanizmy działania związków o aktywności hormonalnej na komórki męskiego układu rozrodczego ssaków

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 2014; liczbę cytowań według ISI Web of Science (z 15.02.2015).

ORYGINALNE PRACE BADAWCZE

1. Hejmej A, Kotula-Balak M, Galas J, Bilińska B. Effects of 4-tert-octylphenol on the testes and seminal vesicles in adult male bank voles. *Reproductive Toxicology* 2011; 31:95-105.

IF 2011: 3,226

Punkty MNiSW: 30

Liczba cytowań: 11

Liczba cytowań bez autocytowań: 3

2. **Hejmej A**, Kotula-Balak M, Chojnacka K, Kuras P, Lydka-Zarzycka M, Bilinska B. Photoperiod-dependent effects of 4-*tert*-octylphenol on adherens and gap junction proteins in bank vole seminiferous tubules. *International Journal of Endocrinology* 2013; 2013:134589.

IF 2013: 1,515

Punkty MNiSW: 20

Liczba cytowań: 3

Liczba cytowań bez autocytowań: 3

3. **Hejmej A**, Górowska E, Kotula-Balak M, Chojnacka K, Zarzycka M, Zając J, Bilińska B. Androgen signaling disruption during fetal and postnatal development affects androgen receptor and connexin 43 expression and distribution in adult boar prostate. *BioMed Research International* 2013; 2013:407678.

IF 2013: 2,706

Punkty MNiSW: 30

Liczba cytowań: 1

Liczba cytowań bez autocytowań: 0

Czasopismo założone jako „Journal of Biomedicine and Biotechnology”, w 2013 roku zmieniło nazwę na „BioMed Research International”. Obowiązującym IF jest IF 2013 „Journal of Biomedicine and Biotechnology” (patrz: załączona informacja ze strony internetowej wydawcy).

4. Górowska E, Zarzycka M, Chojnacka K, Bilinska B and **Hejmej A**. Post-natal exposure to flutamide affects CDH1 and CTNNB1 gene expression in adult pig epididymis and prostate and alters metabolism of testosterone. *Andrology* 2014; 2:186-197.

IF 2010: 3,365

Punkty MNiSW: 50

Liczba cytowań: 3

Liczba cytowań bez autocytowań: 1

Czasopismo powstało w 2013 roku w wyniku fuzji „International Journal of Andrology” i „Journal of Andrology”. Obowiązującym obecnie IF jest średni IF obu czasopism z 2010 roku (patrz: załączona informacja ze strony internetowej wydawcy).

ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY

5. **Hejmej A**, Bilinska B. A role of junction-mediated interactions in cells of the male reproductive tract: Impact of prenatal, neonatal, and prepubertal exposure to anti-androgens on adult reproduction. *Histology & Histopathology* 2014; 29:815-830.

IF 2013: 2,236

Punkty MNiSW: 25

Liczba cytowań: 0

Liczba cytowań bez autocytowań: 0

ROZDZIAŁ W KSIĄŻCE

6. **Hejmej A**, Kotula-Balak M, Bilińska B. Antiandrogenic and estrogenic compounds: Effect on development and function of male reproductive system, [in:] Steroids - Clinical Aspect, Abduljabbar H. (ed.), InTech 2011, pp. 51-82.

Sumaryczny IF prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe wynosi **13,048**, suma punktów MNiSW **155**, całkowita liczba cytowań **18**, liczba cytowań bez autocytowań **7**

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

Rozwój oraz funkcjonowanie męskiego układu rozrodczego ssaków kontrolowane są hormonalnie. Główne hormony zaangażowane w te procesy to androgeny, a wśród nich testosteron, produkowany w gonadzie męskiej już od wczesnych etapów rozwoju płodowego, oraz jego metabolit dihydrotestosteron (DHT). W narządach męskiego układu rozrodczego, a także w tkankach pozareprodukcyjnych, takich jak mózg czy tkanka tłuszczowa, syntetyzowane są także estrogeny, których rola w regulacji męskich funkcji rozrodczych jest przedmiotem aktualnego zainteresowania naukowców. Badania prowadzone w ostatnich dekadach dowodzą, że osłabione działanie androgenów, i, co równie istotne, zaburzenie równowagi między androgenami a estrogenami, negatywnie wpływa na męską płodność, sprzyjając powstawaniu wad rozwojowych lub zmian patologicznych w narządach układu rozrodczego (Rivas i wsp. 2002; Yarkin i wsp. 2009). U podłoża tego typu zjawisk mogą leżeć czynniki endogenne (np. defekty genetyczne, otyłość), ale coraz częściej zasadniczą rolę przypisuje się egzogennym substancjom o aktywności hormonalnej (ang. *Endocrine Disrupting Chemicals*) (Diamanti-Kandarakis i wsp. 2009). Efekty wywoływane działaniem tych związków zależą w znacznym stopniu od czasu (okresu rozwoju), w którym nastąpiła ekspozycja – za okres największej wrażliwości uznaje się powszechnie rozwój płodowy (Skakkebaek i wsp. 2001). Wzrost częstotliwości występowania wad męskiego układu rozrodczego (np. spodziectwa i wnętrstwa) zarówno u człowieka, jak i u dziko żyjących zwierząt, a także wzrost zachorowalności na nowotwory jąder i prostaty u mężczyzn, wiązany jest z narastającym, w kilku ostatnich dziesięcioleciach w krajach rozwiniętych, zanieczyszczeniem środowiska oraz ze współczesnym stylem życia (używane środki czystości, kosmetyki, farmaceutyki), a co za tym idzie z ekspozycją na szkodliwe substancje już od wczesnych etapów rozwoju (Kumar i Holt 2014, Main i wsp. 2010). Intensywne

badania, mające na celu identyfikację hormonalnie czynnych substancji zakłócających funkcjonowanie układu rozrodczego oraz poznanie ich mechanizmów działania na poziomie komórki, prowadzone są aktualnie w wielu ośrodkach badawczych na świecie. Mają one przyczynić się do ograniczenia produkcji i wykorzystania tych związków, a tym samym ograniczenia stopnia ekspozycji człowieka oraz zwierząt na te substancje. Istotnym zagadnieniem pozostaje też wyjaśnienie zależności między ekspozycją na daną substancję, zmianami na poziomie molekularnym (np. zmianami ekspresji genów), a reakcjami całego narządu lub układu narządów (np. stanem hormonalnym). Problem ten stanowi przedmiot podejmowanych przeze mnie badań.

Kluczowym elementem systemu regulacyjnego tkanek układu rozrodczego, a przy tym potencjalnym celem działania egzogennych substancji o aktywności hormonalnej, są białka zaangażowane w procesy syntezy i metabolizmu hormonów steroidowych oraz odbiór sygnałów hormonalnych. Proces steroidogenezy, zachodzący w komórkach Leydiga jąder, obejmuje szereg przemian enzymatycznych, prowadzących do powstania testosteronu, który poza bezpośrednim działaniem na tkanki docelowe może ulegać w tych tkankach metabolizmowi do innych hormonalnie czynnych związków: estradiolu przy udziale aromatazy cytochromu P450, lub do DHT przy udziale 5α -reduktaz. Enzymy te ulegają szerokiej ekspresji w tkankach męskiego układu rozrodczego, obecne są w najądrzu i gruczołach dodatkowych, a aromataza również w jądrach. Działanie androgenów oraz estrogenów uwarunkowane jest nie tylko właściwym przebiegiem syntezy hormonów (regulowanej dostępnością substratu oraz poziomem ekspresji i aktywności wspomnianych enzymów), ale także obecnością specyficznych receptorów w tkankach docelowych. Pomimo scharakteryzowania w ostatnich latach błonowych receptorów estrogenowych (GPR30; Revankar i wsp. 2005) oraz androgenowych (ZIP9; Pascal i Wang 2014), podstawowe działania tych hormonów wiązane są wciąż z klasycznymi, tzn. wewnątrzkomórkowymi receptorami: androgenowym (AR) oraz estrogenowymi α i β (ER α i ER β), funkcjonującymi jako indukowane ligandem czynniki transkrypcyjne. Stąd też zaburzenia ekspresji tych receptorów, a także nieprawidłowa ekspresja wspomnianych wcześniej enzymów mogą przyczyniać się do powstawania wad rozwojowych lub dysfunkcji męskiego układu rozrodczego, prowadzących w konsekwencji do zaburzeń płodności (Bulun 2014, Subramaniam i wsp. 2013).

Poza kontrolą hormonalną prawidłowe funkcjonowanie tkanek reprodukcyjnych zapewniają lokalne mechanizmy regulacyjne oparte na sygnalizacji parakrynowej oraz bezpośrednich interakcjach między komórkami poprzez połączenia międzykomórkowe.

Połączenia te stanowią kompleksy białkowe zlokalizowane w błonach kontaktujących się ze sobą komórek. Biorą one udział w utrzymaniu polarności komórek, regulacji pozakomórkowej dyfuzji (połączenia ściste), adhezji międzykomórkowej (połączenia przylegania), a także bezpośredniej komunikacji między komórkami (połączenia szczelinowe). Zmiany w ekspresji białek połączeń, bądź zmiany w ich międzybiałkowych oddziaływaniach w komórkach układu rozrodczego, związane są m.in. z zaburzeniami spermatogenezy i procesami nowotworowymi (Czyż i wsp. 2012, Kotula-Balak i wsp. 2007).

Założeniem badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe było wyjaśnienie udziału zaburzeń w biosyntezie, metabolizmie i działaniu hormonów steroidowych oraz roli połączeń międzykomórkowych w mechanizmie odpowiedzi komórek narządów męskiego układu rozrodczego na działanie egzogennych substancji o aktywności hormonalnej, ksenoestrogenu i anty-androgenu.

Pierwszy model doświadczalny wykorzystany w moich badaniach stanowiły dojrzałe płciowo samce nornicy rudej eksponowane na działanie 4-*tert*-oktylofenolu. Związek ten powszechnie występuje w środowisku w wyniku procesów przemysłowych. Jego obecność stwierdzono w wodach śródlądowych i przybrzeżnych, w osadach oraz w glebie (Bergé i wsp. 2012). 4-*tert*-oktylofenol zaliczany jest do alkilofenoli, substancji określanych jako „słabe estrogeny”, ponieważ wykazują 100 – 10 000 razy mniejsze powinowactwo i zdolność do aktywacji klasycznych receptorów estrogenowych w porównaniu z ich naturalnym ligandem, 17 β -estradiolem. Substancje takie mogą jednak aktywować alternatywne szlaki transdukcji sygnału oraz ulegać bioakumulacji, co znacznie rozszerza zakres możliwych oddziaływań alkilofenoli na organizm.

Wykorzystując 4-*tert*-oktylofenol jako modelowy ksenoestrogen, podjęłam problem, nieobecny wcześniej w literaturze naukowej, występowania zależności między fizjologicznym stanem układu rozrodczego a wrażliwością na ksenoestrogeny ssaków o rozrodzie sezonowym. W celu wyjaśnienia tej kwestii, w swoich badaniach wykorzystałam samce nornicy rudej hodowane w warunkach długiego oraz krótkiego dnia świetlnego. U nornicy głównym czynnikiem wpływającym na aktywność gonad jest bowiem długość fotoperiodu (dnia świetlnego). Samce z dnia długiego stanowią populację zwierząt aktywnych rozrodczo, natomiast zwierzęta dnia krótkiego wykazują częściową regresję gonad i innych narządów układu rozrodczego, co spowodowane jest zmianami aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowej, i, w konsekwencji, spadkiem produkcji androgenów. Nornica ruda jako gryzoń o rozrodzie sezonowym stanowi więc dobry model do badania wpływu

substancji wykazujących działanie hormonalne na funkcjonowanie gonad w różnych fazach aktywności (Bilińska i wsp. 2001).

W oparciu o uzyskane wyniki stwierdziłam, iż ekspozycja dojrzałych samców gryzoni na 4-*tert*-oktylofenol (200 mg/kg masy ciała) prowadziła do spadku masy jąder, zaburzeń morfologii plemników oraz zaburzeń spermatogenezy. Znaczące zmiany odnotowałam przede wszystkim u zwierząt dnia długiego poddanych 2-miesięcznej ekspozycji na oktylofenol, podczas gdy 1-miesięczna ekspozycja nie wywołała widocznych efektów. Zaburzenia spermatogenezy manifestowały się uszkodzeniem struktury nabłonka plemnikotwórczego oraz przedwczesnym uwalnianiem niedojrzałych jeszcze komórek plemnikotwórczych, głównie spermatocytów i okrągłych spermatyd, z nabłonka plemnikotwórczego, czemu towarzyszyła nasilona apoptoza komórek plemnikotwórczych (Poz. 1; Hejmej i wsp. 2011). Radioimmunologiczne pomiary poziomu steroidów płciowych wykazały spadek poziomu testosteronu i równoczesny wzrost poziomu estradiolu po 2-miesięcznej ekspozycji na oktylofenol samców nornic hodowanych zarówno w warunkach dnia długiego, jak i krótkiego. W celu wyjaśnienia mechanizmu tych zmian, metodą półilościowej analizy Western blotting zbadałam ekspresję dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (3 β -HSD), enzymu zaangażowanego w biosyntezę testosteronu, oraz ekspresję aromatazy. Okazało się, że niezależnie od długości fotoperiodu poziom białka 3 β -HSD jest obniżony w komórkach Leydiga nornic eksponowanych na oktylofenol w porównaniu do osobników kontrolnych, natomiast poziom aromatazy wzrósł przede wszystkim w komórkach nabłonka plemnikotwórczego. Zmianom tym towarzyszyły zmiany ekspresji AR i ER α , a co za tym idzie zmiany w zdolności komórek do odpowiedzi na działanie steroidów płciowych. Wraz ze spadkiem syntezy testosteronu, stwierdzono spadek poziomu białka AR; jednakże efekt ten występował tylko u samców dnia długiego. Nasilonej aromatyzacji i produkcji estradiolu towarzyszył natomiast wzrost ekspresji ER α (Poz 1, Hejmej i wsp. 2011).

W kolejnym etapie prac poddałam analizie ekspresję białek połączeń międzykomórkowych: N-kadheryny, β -kateniny i koneksyny 43 (Cx43) w gonadzie samców nornicy. N-kadheryna, zaliczana wraz z E i P-kadheryną do „klasycznych” kadheryn, to transbłonowe białko zaangażowane w zależną od Ca²⁺ adhezję komórek. Częsteczki N-kadheryny poprzez zewnątrzkomórkowe domeny oddziałują z częsteczkami kadheryn obecnymi w błonach sąsiadujących komórek. Natomiast wysoce konserwatywny C-końcowy region cytoplazmatycznej domeny kadheryn wiąże się z β -kateniną, która z kolei asocjuje z α -kateniną, kotwiczącą cały kompleks do cytoszkieletu aktynowego. Poza rolą w regulacji adhezji komórek kompleksy kadheryny/kateniny są ważnym elementem

wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych. Szczególną rolę odgrywa w nich β -katenina, ulegająca fosforylacji przez kinazy białkowe, np. kinazy Akt i Src, co wpływa m.in. na jej oddziaływanie z kadherynami i ma istotne znaczenie w przebudowie połączeń przylegania zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych (Shapiro i Weis 2009). β -katenina pełnić może również rolę koaktywatora transkrypcji, stanowiąc kluczowy element szlaku sygnalizacyjnego Wnt, zaangażowanego m.in. w procesy rozwojowe podczas embriogenezy, a także w procesy nowotworowe. Połączenia szczelinowe zbudowane z koneksyny 43 (Cx43) stanowią zaś istotny element lokalnego systemu komunikacyjnego w gonadzie męskiej, jak też w innych narządach męskiego układu rozrodczego. Prawidłowa ekspresja Cx43 w nabłonku plemnikotwórczym jest – jak wykazały badania z wykorzystaniem myszy z warunkowym nokautem genu Cx43 – konieczna do niezakłóconego przebiegu procesu spermatogenezy. Heksamery podjednostek białkowych Cx43 zakotwiczone w błonach sąsiadujących komórek tworzą półkanały zwane koneksonami. Koneksyny sąsiadujących komórek łączą się w homotypowe lub heterotypowe kanały, umożliwiające transport między komórkami cząsteczek o masie niższej niż 1,5 kDa, takich jak aminokwasy, krótkie peptydy, jony, cAMP czy trifosforan inozytolu (IP3). Należy zaznaczyć, że kompleksy połączeń międzykomórkowych występujące w nabłonku plemnikotwórczym wyróżniają się na tle kompleksów połączeniowych innych nabłoneków, zarówno charakterystycznym rozmieszczeniem, wynikającym m.in. z ich udziału w formowaniu bariery krew-jądro, jak również dużą dynamiką związaną z ciągłą przebudową poszczególnych kompleksów białkowych podczas przemieszczania się komórek plemnikotwórczych ku światłu kanalika plemnikotwórczego w procesie spermatogenezy (Yan i wsp. 2008). Stąd też istotny element moich prac stanowiła immunohistochemiczna analiza badanych białek, pozwalająca na uchwycenie ewentualnych zmian w ich dystrybucji i tym samym umożliwiającą wnioskowanie o funkcjonalności badanych kompleksów białkowych.

W nabłonku plemnikotwórczym dojrzałych samców nornic dnia długiego kompleksy N-kadheryna/ β -katenina zlokalizowane były zarówno w bazalnych specjalizacjach powierzchniowych w obrębie bariery krew-jądro, jak również pomiędzy komórkami Sertoliego a różnicującymi się komórkami plemnikotwórczymi w apikalnym przedziale nabłonka plemnikotwórczego (Poz. 2, Hejmej i wsp. 2013), gdzie ich główną funkcją jest zapewnienie stabilnej adhezji spermatyd do komórek Sertoliego. Koneksyna 43 w kanaliku plemnikotwórczym tworzyła połączenia między sąsiadującymi komórkami Sertoliego w ich przypodstawnym rejonie oraz między komórkami Sertoliego a plemnikotwórczymi. W tkance interstycjalnej liniowy wzór barwienia obserwowano między komórkami Leydiga. Podobną

lokalizację tych białek opisywano wcześniej u dojrzałych płciowo samców innych gatunków ssaków. U samców nornic z dnia krótkiego obserwowaliśmy natomiast sygnał rozproszony w całym nabłonku plemnikotwórczym i wyraźny spadek jego intensywności w obrębie bariery krew-jądro. W przypadku Cx43 sygnał również często był widoczny w cytoplazmie komórek szlaku spermatogenezy. Obserwacje te wskazują, iż częściowa regresja gonad zachodząca poza okresem rozrodczym związana jest z reorganizacją i częściową utratą połączeń przylegania oraz szczelinowych, szczególnie w rejonie bariery krew-jądro. Świadczy o tym również spadek poziomu badanych białek, określony przy użyciu półilościowej analizy Western blotting (Poz. 2, Hejmej i wsp. 2013).

Analiza ekspresji i rozmieszczenia N-kadheryny, β -kateniny oraz Cx43 po 2-miesięcznej ekspozycji obydwu grup samców na 4-*tert*-oktylofenol przyniosła zaskakujące rezultaty. W nabłonku plemnikotwórczym nornic dnia długiego widoczna była delokalizacja tych białek, świadcząca o rozpadzie bądź reorganizacji połączeń, co poprzez wpływ na integralność nabłonka i interakcje międzykomórkowe mogło bezpośrednio przyczynić się do obserwowanych wcześniej zmian strukturalnych. Związek między zaburzeniami ekspresji wspomnianych białek połączeniowych a przedwczesnym złuszczeniem się komórek nabłonka plemnikotwórczego został niedawno wykazany również u szczurów z indukowanym doświadczalnie stanem zapalnym jąder (Perez i wsp. 2011), co wskazuje na pewną uniwersalność opisanego mechanizmu. W przeciwieństwie do tych efektów, u samców hodowanych w warunkach dnia krótkiego oktylofenol przyczyniał się do skupiania się kompleksów połączeniowych w przypodstawnym rejonie nabłonka, a zatem do częściowego odtworzenia wzoru rozmieszczenia białek w rejonie bariery krew-jądro, charakterystycznego dla samców dnia długiego. Obserwowano również nasilenie sygnału Cx43 w błonach komórek plemnikotwórczych i Sertoliego (Poz. 2, Hejmej i wsp. 2013).

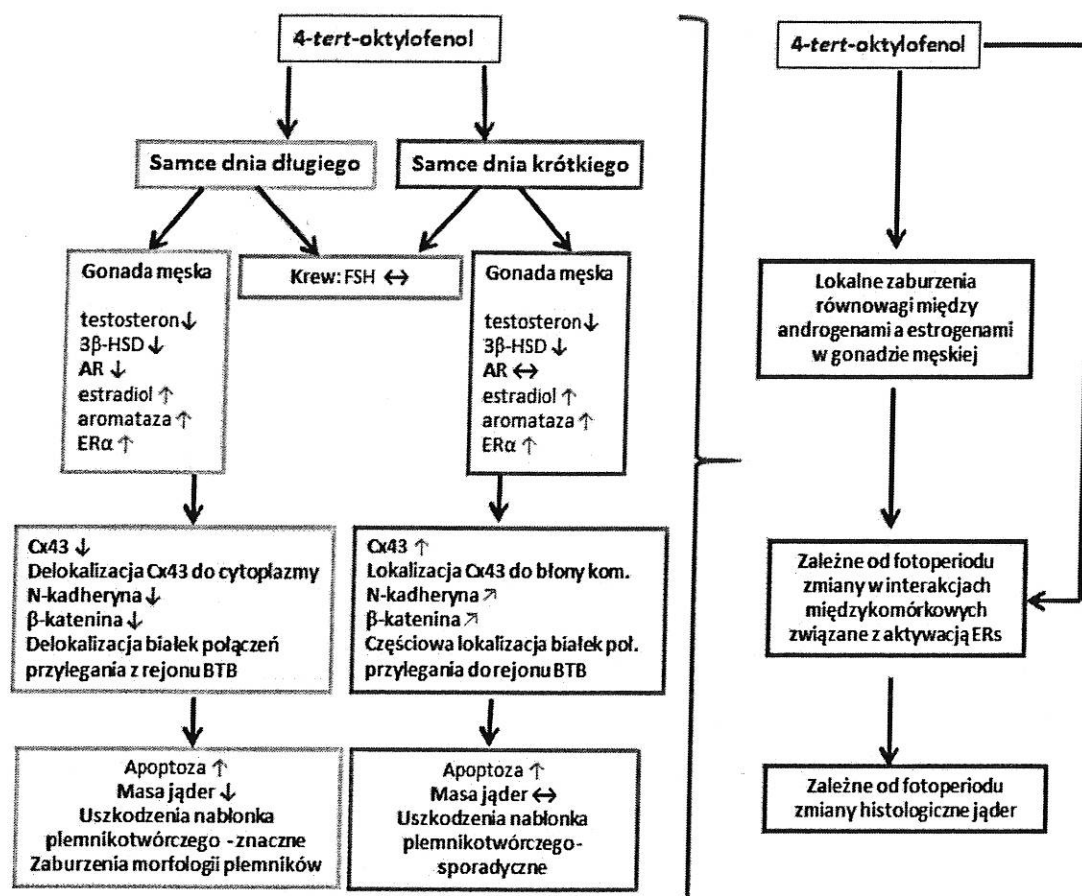
W świetle uzyskanych wyników pojawiło się pytanie, czy zmiany po ekspozycji na oktylofenol mogą być efektem wpływu tego związku na aktywność osi przysadkowo-podwzgórzowej czy bezpośredniego działania na komórki gonady. Pomiar stężenia folitropiny (będącej regulatorem funkcjonowania połączeń międzykomórkowych w kanaliku plemnikotwórczym, a zarazem hormonem, którego poziom zmienia się w zależności od fotoperiodu) wykazał brak istotnych statystycznie różnic między zwierzętami eksponowanymi na oktylofenol a osobnikami kontrolnymi niezależnie od długości dnia świetlnego, wykluczając tym samym mechanizm związany z oddziaływaniem na oś przysadkowo-podwzgórzową.

W dalszych badaniach, wykorzystując model *in vitro*, poddałam weryfikacji hipotezę dotyczącą bezpośredniego działania ksenoestrogenu na połączenia międzykomórkowe w komórkach jąder. Fragmenty jąder pobrane od nietraktowanych zwierząt inkubowane były przez 24 h w obecności wzrastających dawek oktylofenolu. Dodatkowo, zastosowanie w tym układzie doświadczalnym anty-estrogenu ICI 182 780 pozwoliło ustalić, czy działanie oktylofenolu na ekspresję białek połączeń międzykomórkowych zachodziło na drodze aktywacji receptorów estrogenowych α i β (ER α i ER β). Wyniki tych doświadczeń dowiodły, że oktylofenol modyfikuje ekspresję i dystrybucję badanych białek, działając na poziomie gonady oraz że wpływ tego związku na poziom β -kateniny i koneksyny 43 jest związany z aktywacją ER α i/lub ER β . Podsumowując, po raz pierwszy wykazałam, że uszkadzające działanie 4-*tert*-oktylofenolu na komórki gonady męskiej aktywnych rozrodczo samców związane jest z zaburzeniem adhezji i komunikacji międzykomórkowej oraz że efekty te w znacznym stopniu wynikają z aktywacji przez ten związek ER α i ER β w gonadzie (Poz. 2, Hejmej i wsp. 2013).

Przytoczone powyżej wyniki moich badań pozwalają na postawienie hipotezy dotyczącej zróżnicowanego wpływu oktylofenolu na połączenia międzykomórkowe i spermatogenezę samców hodowanych w różnych warunkach świetlnych (Poz. 2, Hejmej i wsp. 2013). U samców nornic dnia długiego oktylofenol obniża ekspresję białek połączeniowych, prowadzi do ich delokalizacji, a w konsekwencji zaburza spermatogenezę, poprzez indukcję nadmiernej, нефизjologicznej stymulacji estrogennej (wywieranej przez sam ksenoestrogen, jak również wynikającej z nasilonej aromatyzacji androgenów i wzrostu ekspresji ER α). Uszkodzenia spermatogenezy obserwowane były także w naszych wcześniejszych badaniach, w których samcom nornicy rudej podawano wysokie dawki egzogenego estradiolu (Załącznik 3, poz. IIA 1).

U zwierząt dnia krótkiego natomiast oktylofenol, wpływając bezpośrednio na komórki gonady – jako związek o charakterze estrogennym lub poprzez indukcję lokalnej syntezy endogennych estrogenów – działa częściowo w kierunku przywrócenia ekspresji białek połączeniowych i ich błonowej lokalizacji, a co za tym idzie wywołuje w nabłonku plemnikotwórczym zmiany odpowiadające tym związanym z wejściem samców w stan aktywności rozrodczej. Takie wyjaśnienie wspierają wyniki badań Pak i wsp. (2002) dowodzące, że estrogeny stymulują spermatogenezę u osobników chomika syberyjskiego (gryzonia o rozrodzie sezonowym), znajdujących się w okresie regresji gonad, oraz nasze wcześniejsze obserwacje, wskazujące, że ekspozycja na niskie dawki egzogennych

estrogenów przyspiesza wznowienie spermatogenezy u niedojrzałych płciowo samców nornicy rudej (Załącznik 3, poz. IIA 1).



Ryc. 1. Proponowany mechanizm zależnego od fotoperiodu działania 4-*tert*-oktylofenolu na komórki gonady męskiej nornicy rudej; na podstawie wyników badań zaprezentowanych jako osiągnięcie naukowe (Poz. 1 i Poz. 2). 3β-HSD – dehydrogenaza 3β-hydroksysteroidowa; AR – receptor androgenowy; ERα – receptor estrogenowy α; ERs – klasyczne receptory estrogenowe α i β; Cx43 – koneksyna 43; FSH – folitropina; BTB – bariera krwi-jądro; ↑ – wzrost ekspresji genu lub stężenia hormonów; ↓ – spadek ekspresji genu lub stężenia hormonów; ↗ – wzrostowa tendencja w ekspresji genu; ↔ brak zmian ekspresji genu lub stężeniu hormonów. Tekst pogrubiony – różnice w odpowiedzi komórek samców hodowanych w warunkach długiego i krótkiego dnia na działanie oktylofenolu.

Narządami, których rozwój i funkcjonowanie podlegają wyraźnemu wpływowi zarówno androgenów, jak i estrogenów są obok jąder, gruczoły dodatkowe męskiego układu rozrodczego, a wśród nich pęcherzyki nasienne (Williams i wsp. 2001), będąc potencjalnym celem działania egzogennych substancji hormonalnie czynnych. Stąd też w swoich badaniach, prześledziłam zmiany w strukturze i funkcjonowaniu pęcherzyków nasiennych wywołane oktylofenolem. Samce nornic wykazywały statystycznie istotny spadek masy pęcherzyków nasiennych już po miesięcznej ekspozycji na oktylofenol, co wskazuje, że gruczoły te szybciej odpowiadają na zaburzenie środowiska hormonalnego organizmu niż gonady. W obrazie histologicznym pęcherzyków nasiennych tych zwierząt widoczna była zmiana

proporcji tkanki gruczołowej do tkanki zrębowej, zmniejszenie wysokości nabłonka i bardzo wyraźne zmniejszenie przedziału luminalnego, wywołane przez redukcję ilości wydzieliny produkowanej przez komórki nabłonkowe. Zmiany te związane były z zakłóceniem działania androgenów (spadkiem ekspresji AR) i nasiloną stymulacją estrogenną (wzrostem ekspresji aromatazy i ER α) (Poz 1, Hejmej i wsp. 2011).

Podsumowując, u samców nornicy rudej, gryzonia o rozrodzie sezonowym, organizacja kompleksów połączeń międzykomórkowych w gonadach oraz ekspresja tworzących je białek zależy od długości dnia świetlnego, a tym samym od fizjologicznego stanu układu rozrodczego. Sposób odpowiedzi komórek układu rozrodczego na środowiskowe związki charakteryzujące się słabymi właściwościami estrogennymi, takie jak wykorzystany w moich doświadczeniach 4-*tert*-oktylofenol, również związany jest z długością fotoperiodu. Oktylofenol może prowadzić do zaburzeń funkcjonalnych i strukturalnych w narządach męskiego układu rozrodczego dojrzałych samców, poprzez oddziaływanie na mechanizmy odpowiadające za utrzymanie homeostazy mikrośrodowiska hormonalnego tych tkanek oraz na bezpośrednie interakcje międzykomórkowe.

Rola androgenów w rozwoju i funkcjonowaniu prostaty oraz najądrzy jest już od wielu lat przedmiotem zainteresowania andrologii eksperymentalnej oraz klinicznej. Wiadomo, iż morfogeneza i różnicowanie się tych narządów, a także procesy dojrzewania, transportu i magazynowania plemników w najądrzu oraz produkcja przez komórki gruczołowe prostaty wydzieliny wpływającej na ruchliwość plemników i uzyskanie zdolności do zapłodnienia podlegają precyzyjnej kontroli przez androgeny. Odpowiedź tych narządów na stymulację androgenną odbywa się przede wszystkim dzięki aktywacji AR, którego ekspresja udokumentowana została zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i zrębowych najądrza oraz prostaty. Kompleks hormon-receptor wiąże się ze specyficzną sekwencją w promotorze regulowanego genu, zwaną elementem odpowiedzi androgenowej, i moduluje transkrypcję docelowego genu. Opisane zostały ostatnio również inne drogi działania AR zwane „nieklasycznymi”, obejmujące interakcje receptora z kinazami białkowymi, np. kinazą c-Src, i aktywację zależnych od kinaz szlaków transdukcji sygnału, np. szlaku MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Walker i wsp. 2010). Należy podkreślić, że zarówno zmiany w poziomie liganda (androgenu), jak również zmiany konformacji AR bądź jego ekspresji prowadzą do zaburzeń sygnalizacji androgenowej, a w konsekwencji do nieprawidłowego przebiegu procesów androgenozależnych.

Substancje o charakterze anty-androgenów zakłócają syntezę endogennych androgenów (np. linuron, ftalany) lub, najczęściej, zakłócają interakcję pomiędzy

androgenami a AR, tym samym uniemożliwiając powstanie aktywnego kompleksu hormon-receptor (np. winklozolina, p,p'-DDE). Do tej drugiej grupy zalicza się też flutamid (2-metylo-N-[4-nitro-3-(trifluorometylo)fenylo]propanamid), pierwszy syntetyczny niesteroidowy anty-androgen (Peets i wsp. 1974). Flutamid, w praktyce medycznej wykorzystywany w terapii raka prostaty, w badaniach eksperymentalnych służy jako modelowy anty-androgen. W organizmie flutamid jest metabolizowany w wątrobie do 2-hydroksyflutamidu i uważa się, że aktywność biologiczna flutamidu związana jest głównie z działaniem tego metabolitu. Flutamid oraz 2-hydroksyflutamid wiążą się z AR i hamują zależną od AR aktywność transkrypcyjną, zakłócając tym samym działanie endogennych androgenów.

W ostatnim dziesięcioleciu prace kilku zespołów badawczych, w tym także nasze badania prowadzone w zespole prof. Barbary Bilińskiej (Załącznik 3, poz. IIA 15, 17, 18), skupiały się na wyjaśnieniu mechanizmów leżących u podłoża zaburzeń spermatogenezy wywołanych prenatalną ekspozycją na flutamid. Wyniki tych badań skłoniły mnie do postawienia pytania, w jaki sposób krótkotrwałe ograniczenie działania androgenów na różnych etapach rozwoju osobniczego wpływa na oddziaływanie międzykomórkowe oraz regulację hormonalną w prostatie i najądrzu dojrzałego samca. Odpowiedź na to pytanie stała się możliwa dzięki przeprowadzeniu badań finansowanych ze środków MNiSW (Program „Juventus Plus”), w ramach kierowanego przeze mnie projektu pt. *Knur jako model do badania indukowanych flutamidem zmian ekspresji receptora androgenowego i białka połączeń szczelinowych, koneksyny 43, w prostatie* (0172/IP1/2011/71).

Świnia domowa (*Sus scrofa*), ze względu na liczne podobieństwa anatomiczne i fizjologiczne do człowieka, od kilku dziesięcioleci wykorzystywana jest z powodzeniem jako model w badaniach biomedycznych, m.in. dotyczących otyłości, chorób układu krążenia, układu rozrodczego, nowotworów czy zaburzeń hormonalnych, a wyniki tych badań znalazły już wielokrotnie zastosowanie w terapii chorób człowieka. Dotychczasowe prace wskazują też, że świnia stanowi wiarygodny model do badania ekspozycji na ksenobiotyki, farmaceutyki i zanieczyszczenia środowiska (Kuzmuk i Schook 2011).

W swoich badaniach poddałam analizie tkanki reprodukcyjne dojrzałych płciowo knurów, które eksponowane były na flutamid we wczesnym okresie rozwoju płodowego (między 20 a 28 dniem ciąży) lub otrzymywały iniekcje flutamidu w okresie pourodzeniowym (między 2 a 10 dniem życia) bądź przed okresem dojrzewania płciowego (między 90 a 98 dniem życia). Uzyskane wyniki dowiodły, iż nawet przejściowe zakłócenia kontroli hormonalnej przez anty-androgen we wczesnym rozwoju płodowym oraz okresie

pourodzeniowym, nie powodujące wad rozwojowych, skutkują zaburzeniami funkcjonalnymi badanych tkanek w życiu dorosłym. W prostatkach knurów eksponowanych na flutamid w okresie płodowym i, szczególnie, w okresie pourodzeniowym zaobserwowano ogniska zapalne (Poz. 3, Hejmej i wsp. 2013). Radioimmunologiczne pomiary poziomów hormonów steroidowych oraz ocena ekspresji AR metodami real-time RT-PCR oraz ilościowej analizy Western blotting, wskazały na możliwą przyczynę tych zmian. Mogły one bezpośrednio wynikać z obniżonego stosunku androgenów do estrogenów u tych zwierząt oraz spadku ekspresji receptora androgenowego (Poz. 3, Hejmej i wsp. 2013; Poz. 4, Gorowska i wsp. 2014). Takie wyjaśnienie wspierają wcześniejsze obserwacje dotyczące hormonalnego podłoża stanów zapalnych gruczołu krokowego (Yatkin i wsp. 2009).

Obniżenie ekspresji AR i delokalizacja tego receptora do cytoplazmy (wskazująca na degradację receptora lub zmniejszoną dostępność liganda) mogą również stanowić przyczynę zmniejszenia przedziału luminalnego prostaty obserwowanego u badanych knurów. Redukcję przedziału luminalnego gruczołów prostaty można przypisywać osłabionej aktywności sekrecyjnej komórek nabłonkowych, która – jak wiadomo z wcześniejszych badań – podlega bezpośredniej regulacji przez androgeny. Ponadto, w oparciu o oznaczenie poziomu aktywnej formy kaspazy-3 oraz białka PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), w prostatkach knurów eksperymentalnych stwierdziłam nasilenie apoptozy i spadek proliferacji komórek, świadczące o zaburzeniu homeostazy tego gruczołu (Poz. 3, Hejmej i wsp. 2013). Efekty te również można przypisywać zaburzeniom lokalnej równowagi hormonalnej w prostacie knurów eksponowanych na flutamid w czasie rozwoju. Równocześnie odnotowałam zmiany ekspresji białek połączeń międzykomórkowych. Interesująca obserwacja dotyczyła wzrostu poziomu Cx43. Wykazałam, że u knurów kontrolnych, podobnie jak u gryzoni, białko to w prostacie występuje w komórkach podstawnych na granicy nabłonka i tkanki zrębowej, a także między komórkami zrębowymi. Ekspozycja na anty-androgen przyczyniła się nie tylko do nasilenia ekspresji w wymienionych typach komórek, ale również indukowała pojawienie się Cx43 w komórkach wydzielniczych nabłonka prostaty. Obecność Cx43 w tych komórkach u dojrzałych knurów może sygnalizować zaburzenia ostatecznego różnicowania się nabłonka wydzielniczego (Poz. 3, Hejmej i wsp. 2013). Na takie wyjaśnienie wskazują wyniki wcześniejszych badań na gryzoniach, u których koneksyna 43 występuje w niezróżnicowanym nabłonku prostaty, a w miarę różnicowania się komórek nabłonkowych w okresie dojrzewania płciowego jej ekspresja stopniowo zanika i jest zastępowana przez koneksynę 32 (Habbermann i wsp. 2001). O nieprawidłowościach funkcjonalnych komórek nabłonkowych prostaty knurów eksponowanych na flutamid świadczy również zmniejszenie

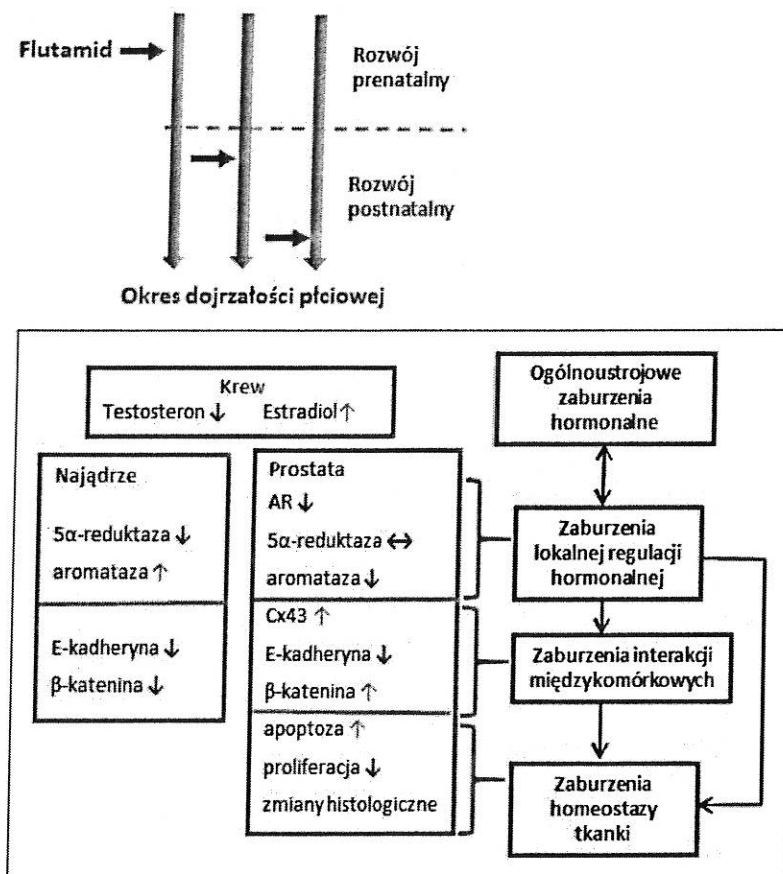
zawartości wydzieliny obecnej w gruczołach prostaty, a także zmiany w ekspresji i delokalizacja białek połączeń przylegania, E-kadheryny i β -kateniny w komórkach nabłonkowych prostaty (Poz. 3, Hejmej i wsp. 2013; Poz. 4, Gorowska i wsp. 2014).

Moje obserwacje wskazują, że ekspozycja knurów na anty-androgeny w okresie rozwoju pourodzeniowego oraz przedpokwitaniowego wywarła również wpływ na wzór ekspresji E-kadheryny i β -kateniny w najądrzach dojrzałych osobników. Spadek ekspresji obu białek był widoczny we wszystkich odcinkach najądrza, przy czym poziom E-kadheryny zmienił się w największym stopniu w obrębie trzonu i ogona najądrza. Wyniki te wskazują na różnice w odpowiedzi poszczególnych odcinków najądrza na warunki eksperymentalne, a wyjaśnić je można zróżnicowanymi wymaganiami komórek budujących te odcinki i/lub zróżnicowanym stężeniem androgenów w płynie głowy, trzonu i ogona najądrza. Zmianom w ekspresji białek towarzyszyło przemieszczenie się białek z ich prawidłowej przybłonowej lokalizacji w głąb cytoplazmy, świadczące o rozpadzie i utracie funkcjonalności przez kompleksy połączeniowe, przede wszystkim w trzonie najądrza (Poz. 4, Gorowska i wsp. 2014).

Wcześniejsze prace wykazały, że ekspresja E-kadheryny i β -kateniny w najądrzu i prostatie podlega bezpośredniej kontroli przez androgeny (Cyr i wsp. 1992), stąd w celu wyjaśnienia mechanizmu obserwowanych zmian w kolejnym etapie swoich badań skupiłam uwagę na lokalnym metabolizmie tych hormonów. Dihydrotestosteron powstający w wyniku aktywności 5 α -reduktazy jest istotnym regulatorem funkcjonowania najądrza i prostaty, wpływającym m.in. na ekspresję receptorów hormonów steroidowych, system anty-oksydacyjny tkanek, a także proliferację i apoptozę. Ponieważ w najądrzach knurów, otrzymujących iniekcje flutamidu w okresie pourodzeniowym, poziom ekspresji zarówno mRNA, jak i białka 5 α -reduktazy był znacznie obniżony przy równoczesnym wzroście ekspresji aromatazy, doszło do modyfikacji lokalnego środowiska hormonalnego w najądrzu, co nasiliło efekty ogólnoustrojowego zaburzenia stosunku androgenów do estrogenów. Może to wyjaśniać obserwowane zmiany w ekspresji białek połączeniowych, jak również opisywane wcześniej zaburzenia cytoarchitektury przewodu najądrza (Lydka i wsp. 2011) (Poz. 4, Gorowska i wsp. 2014).

Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na zróżnicowane konsekwencje zaburzonej sygnalizacji androgenowej w czasie rozwoju w najądrzu i prostatie. W przeciwieństwie do efektów obserwowanych w najądrzu, w prostatie stwierdzono wzrost ekspresji β -kateniny i jej cytoplazmatyczną akumulację w komórkach nabłonkowych, przy jednoczesnym spadku

ekspresji aromatazy. Wyniki te dowodzą specyficznych tkankowo mechanizmów odpowiedzi na zaburzenia środowiska hormonalnego organizmu (Poz. 4, Gorowska i wsp. 2014).



Ryc. 2. Proponowany mechanizm zaburzeń w prostatie i najądrzu dojrzałego knura, poddanego przejściowej ekspozycji na flutamid w czasie rozwoju pre- i postnatalnego, na podstawie wyników badań zaprezentowanych jako osiągnięcie naukowe (Poz. 3 i Poz. 4). AR – receptor androgenowy; Cx43 – koneksyna 43; ↑ – wzrost ekspresji genu lub stężenia hormonów; ↓ – spadek ekspresji lub stężenia hormonów; ↔ brak zmian ekspresji.

Wyjaśnienie związku między przejściowym zakłóceniem sygnalizacji androgenowej w czasie rozwoju a zmianami obserwowanymi w najądrzach i prostatkach dojrzałych samców można częściowo przypisywać czynnikom epigenetycznym. Wcześniejsze prace wskazują bowiem na zmiany metylacji kilku genów w prostatkach dojrzałych samców w odpowiedzi na pre- bądź neonatalną ekspozycję na substancje anty-androgenne lub estrogenne (Anway i wsp. 2006). Co istotne, ostatnio dowiedziono, że komórki progenitorowe prostaty mogą ulegać trwałemu „przeprogramowaniu” wskutek działania egzogennych substancji o aktywności hormonalnej (Hu i wsp. 2012). Natomiast przedstawione powyżej wyniki moich badań oraz nasze wcześniejsze obserwacje dotyczące funkcjonowania jąder u knurów eksponowanych na flutamid (Załącznik 3, poz. IIA 15, 17, 18) wskazują także na znaczny

udział czynnika hormonalnego – zaburzonej równowagi między androgenami i estrogenami, wywołanej dysfunkcją komórek Leydiga oraz zmianami w lokalnym (tkankowym) metabolizmie tych hormonów.

Podsumowując, wyniki moich badań wskazują na szczególną rolę sygnalizacji androgenowej nie tylko we wczesnym okresie rozwoju płodowego, lecz także w okresie neonatalnym i przedpokwitaniowym dla utrzymania prawidłowego fenotypu komórek i funkcjonowania układu rozrodczego dojrzałego samca. Tym samym akcentują krytyczne znaczenie nawet przejściowych zaburzeń równowagi hormonalnej dla rozwijającego się układu rozrodczego oraz fakt, że zaburzenia takie mogą prowadzić do nieprawidłowości ujawniających się w późniejszym życiu. Wyniki moich badań przyczyniły się do scharakteryzowania zmian funkcjonalnych w komórkach najądrza i prostaty, będących konsekwencją działania flutamidu. Wykazały, że przejściowe zablokowanie aktywacji AR w trakcie rozwoju prowadzi do zaburzenia lokalnego środowiska hormonalnego oraz bezpośrednich interakcji międzykomórkowych w prostacie i najądrzu dojrzałego samca. Otrzymane przeze mnie wyniki wnoszą nowe dane, poszerzając dotychczasową wiedzę dotyczącą molekularnych mechanizmów zaburzeń wywoływanych przez anty-androgeny.

Artykuł przeglądowy, który przedstawiłam jako **pozycję 5 (Hejmej i Bilinska 2014)** cyklu prac składających się na osiągnięcie naukowe, podsumowuje kilkuletnie badania (w tym również prezentowane w niniejszym autoreferacie) prowadzone w zespole prof. Barbary Bilińskiej, a dotyczące roli sygnalizacji androgenowej i jej zaburzeń w regulacji białek połączeń międzykomórkowych w męskim układzie rozrodczym. W opracowaniu została przedstawiona budowa i rola kompleksów połączeniowych w jądrze, najądrzu i prostacie. W kolejnych rozdziałach omówione zostały zmiany ekspresji i lokalizacji analizowanych przez nas białek połączeń ścisłych (ZO-1), przylegania (N- i E-kadheryny oraz β -kateniny) i szczelinowych (Cx43) w odpowiedzi na ekspozycję na flutamid podczas różnych etapów rozwoju. Wyniki te obszernie przedyskutowano w kontekście danych literaturowych dotyczących nieprawidłowości bezpośrednich interakcji międzykomórkowych i ich znaczenia dla funkcjonowania tkanek.

Uzupełnieniem cyklu moich prac doświadczalnych jest też rozdział w książce (**Poz. 6, Hejmej i wsp. 2011**), w którym przedstawiłam aktualny stan wiedzy dotyczącej zaburzeń rozwoju i funkcji męskiego układu rozrodczego, wywołanych ekspozycją na związki estrogenne i anty-androgenne z uwzględnieniem wyników własnych badań. Szczegółowe omówienie efektów działania poszczególnych substancji (przede wszystkim zanieczyszczeń pochodzących z przemysłowej i rolniczej działalności człowieka, farmaceutyków, ale także

związków pochodzenia naturalnego, takich jak fitoestrogeny), poprzedziłam wprowadzeniem przybliżającym rolę androgenów i estrogenów w rozwoju i funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego ssaków. W końcowej części omówiłam natomiast poznane dotychczas mechanizmy działania poszczególnych grup ksenoestrogenów i anty-androgenów na komórki.

Literatura

- Anway MD, Leathers C, Skinner MK. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*, 2006, 147:5515-23.
- Bergé A, Cladiere M, Gasperi J, Coursimault A, Tassin B, Moilleron R. Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2012, 19:3798-819.
- Bilińska B, Schmalz-Fraczek B, Kotula M, Carreau S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 178:189-98.
- Bulun SE. Aromatase and estrogen receptor deficiency. *Fertil Steril*, 2014, 101:323-9.
- Cyr DG, Hermo L, Blaschuk OW, Robaire B. Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. *Endocrinology*, 1992, 130:353-63.
- Czyż J, Szpak K, Madeja Z. The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nat Rev Urol*, 2012, 9:274-82.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*, 2009, 30:293-342.
- Habermann H, Chang WY, Birch L, Mehta P, Prins GS. Developmental exposure to estrogens alters epithelial cell adhesion and gap junction proteins in the adult rat prostate. *Endocrinology*, 2001, 142:359-69.
- Hu WY, Shi GB, Hu DP, Nelles JL, Prins GS. Actions of estrogens and endocrine disrupting chemicals on human prostate stem/progenitor cells and prostate cancer risk. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 354:63-73.
- Kotula-Balak M, Hejmej A, Sadowska J, Bilinska B. Connexin 43 expression in human and mouse testes with impaired spermatogenesis. *Eur J Histochem*, 2007, 51:261-8.
- Kumar E, Holt WV. Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 753:55-70.
- Kuzmuk KN, Schook LB. Pigs as a model for biomedical sciences. [in] *The Genetics of the Pig*, Vol. 2 (eds. Rothschild MF, Ruvinsky A) 426-444 (CAB International, 2011).
- Lydka M, Kopera-Sobota I, Kotula-Balak M, Chojnacka K, Zak D, Bilinska B. Morphological and functional alterations in adult boar epididymis: Effects of prenatal and postnatal administration of flutamide. *Acta Vet Scand*, 2011, 53:12.
- Main KM, Skakkebaek NE, Virtanen HE, Toppari J. Genital anomalies in boys and the environment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2010, 24:279-89.
- Pak TR, Lynch GR, Tsai PS. Estrogen accelerates gonadal recrudescence in photo-regressed male siberian hamsters. *Endocrinology*, 2002, 143:4131-4.
- Pascal LE, Wang Z. Unzipping androgen action through ZIP9: a novel membrane androgen receptor. *Endocrinology*, 2014, 155:4120-3.
- Peets EA, Henson MF, Neri R. On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide (alpha-alpha-alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide) in the rat. *Endocrinology*, 1974, 94:532-40.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 2005, 307:1625-30.
- Rivas A, Fisher JS, McKinnell C, Atanassova N, Sharpe RM. Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance. *Endocrinology*, 2002, 143:4797-808.

Shapiro L, Weis WI. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1:a003053.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod, 2001, 16:972-8.

Subramaniam A, Singh R, Tilak P, Devi R, Kulandaivelu M, Kumarasamy T. Androgen insensitivity syndrome: ten years of our experience. Front Biosci (Elite Ed), 2013, 5:779-84.

Walker WH. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010, 365:1557-69.

Yan HH, Mruk DD, Cheng CY. Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development. Curr Top Dev Biol, 2008, 80:57-92.

Yatkin E, Bernoulli J, Talvitie EM, Santti R. Inflammation and epithelial alterations in rat prostate: impact of the androgen to oestrogen ratio. Int J Androl, 2009, 32:399-410.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Główny obszar moich zainteresowań naukowych, począwszy od studiów magisterskich, poprzez studia doktoranckie, po aktualne projekty realizowane w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (BiNoZ) Uniwersytetu Jagiellońskiego, wyznaczają badania nad hormonalną regulacją funkcjonowania męskiego układu reprodukcyjnego.

W trakcie ostatnich lat studiów magisterskich brałam udział w pracach dotyczących działania estrogenów w jądrach gryzoni o rozrodzie sezonowym. Rezultatami prowadzonych doświadczeń były praca magisterska pt. *Wpływ estrogenów na wznowienie spermatogenezy u niedojrzałych samców nornicy rudej (Clethrionomys glareolus)* oraz współautorska praca opublikowana w specjalistycznym czasopiśmie naukowym (**Załącznik 3, poz. IIA 1**). Równocześnie w czasopiśmie „Postępy Biologii Komórki” opublikowałam artykuł przeglądowy, w którym podsumowałam ówczesny stan wiedzy na temat roli estrogenów w procesie spermatogenezy (**Załącznik 3, poz. IID 1**).

W trakcie studiów doktoranckich prowadziłam badania dotyczące zaburzeń w regulacji hormonalnej tkanek układu rozrodczego koni z wnętrstwem, ze szczególnym uwzględnieniem roli receptorów hormonów steroidowych i metabolizmu androgenów. Badania te realizowane były w ramach grantów wewnętrznych Wydziału BiNoZ UJ: *Proces aromatyzacji androgenów w tkankach reprodukcyjnych konia huculskiego. Lokalizacja ERs i aromatazy* (BW/IZ/22/2005) oraz *Wpływ wnętrstwa na komunikację międzykomórkową w układzie reprodukcyjnym ogiera* (BW/IZ/58/2006), finansowanych ze środków na działalność statutową MNiSW.

Wnętrstwo jest wrodzoną wadą rozwojową, której częstotliwość występowania u człowieka wzrasta w ostatnich latach, stąd też zainteresowanie modelami badawczymi, które

umożliwiałyby wyjaśnienie komórkowych mechanizmów i procesów związanych z tym zaburzeniem. Wykorzystanie przeze mnie koni z niezstąpionymi jądrami jako modelu badawczego pozwoliło wykazać, iż wnętrostwo związane jest z zakłóceniem syntezy i działania hormonów steroidowych, czego konsekwencją jest lokalne zaburzenie równowagi między androgenami a estrogenami. Stwierdzenie znaczących zmian w regulacji hormonalnej zarówno w jądrach, jak też w najądrzach i prostatie, wskazało na potrzebę szerszego spojrzenia na wnętrostwo nie tylko jako na dysfunkcję gonad, lecz całego układu rozrodczego. Wyniki badań prezentowałam na konferencjach krajowych i zagranicznych (m.in. na 14th *European Workshop on Molecular & Cellular Endocrinology of the Testis*, Bad Aibling, Niemcy 2006 oraz na Kongresie Polskiego Towarzystwa Andrologicznego, Kazimierz Dolny n/Wisłą 2007), opublikowałam w renomowanych czasopismach naukowych (Załącznik 3, poz. IIA 3-6; poz. IID 4). Stanowiły one też przedmiot mojej rozprawy doktorskiej pt. *Rola receptorów hormonów steroidowych w regulacji funkcji układu reprodukcyjnego ogiera i wnętra*, przygotowanej pod kierunkiem prof. Barbary Bilińskiej. Publiczna obrona mojej rozprawy doktorskiej odbyła się 25 czerwca 2007, a stopień doktora nauk biologicznych został mi nadany decyzją Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ 18 września 2007.

Już podczas studiów doktoranckich zainteresowałam się funkcjonowaniem połączeń międzykomórkowych w narządach męskiego układu rozrodczego. Moje pierwsze badania poświęcone temu zagadnieniu związane były z rolą połączeń szczelinowych w stanach patologicznych, takich jak wnętrostwo (Załącznik 3, poz. IIA 6) oraz zaburzenia spermatogenezy o podłożu genetycznym (zespół Klinefeltera, mutacja *mosaic Atp7a mo-ms* i częściowa delecja chromosomu Y) (Załącznik 3, poz. IIA 7). W kolejnych latach, dzięki współpracy z dr. hab. Zygmuntem Giżejewskim (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie), scharakteryzowałam ekspresję Cx43 w gonadzie męskiej w trakcie rozwoju postnatalnego żubra (Załącznik 3, poz. IIA 10). Współpraca z zespołem prof. Ralpha Brehma (University of Veterinary Medicine w Hannoverze) zaowocowała natomiast publikacją dotyczącą zmian ekspresji receptora androgenowego w jądrach myszy z nokautem genu kodującego Cx43 w komórkach Sertoliego (Załącznik 3, poz. IIA 20).

Od 2007 roku jestem zatrudniona w Zakładzie Endokrynologii w Instytucie Zoologii UJ: początkowo na stanowisku asystenta, a od 2010 roku na stanowisku adiunkta. W 2009 roku odbyłam podoktorski staż naukowy w Zakładzie Fizjologii Instytutu Biomedycyny na Uniwersytecie w Turku (Finlandia), jednym z wiodących na świecie ośrodków badawczych, zajmujących się szeroko rozumianą andrologią. Miałam tam możliwość zapoznania się z

nowoczesnymi metodami molekularnymi stosowanymi w endokrynologii eksperymentalnej, w tym także z opracowaną tam metodą pozyskiwania, klasyfikowania i analizowania mikroskrawków kanalików plemnikotwórczych z wykorzystaniem techniki transiluminacji. Ze względu na podobny profil prowadzonych prac badawczych miałam również możliwość skonfrontowania i przedyskutowania wyników swoich badań.

Pracując w Zakładzie Endokrynologii, brałam udział w kilku przedsięwzięciach we współpracy z grupami badawczymi z innych placówek naukowych. Badania prowadzone we współpracy z dr. hab. Ryszardem Tuzem (Uniwersytetu Rolniczy w Krakowie) pozwoliły na określenie wpływu desloreliny, agonisty gonadoliberyny, na ekspresję receptora androgenowego w układzie rozrodczym knurów (**Załącznik 3, poz. IIA 8**). Badania dotyczące wpływu tła genetycznego pstrąga tęczowego na ekspresję receptorów hormonów steroidowych w jądrach realizowane były we współpracy z prof. Janem Glogowskim (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie) (**Załącznik 3, poz. IIA 9**). Od kilku lat współpracuję także z zespołem prof. Andrzeja Ciereszki (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie), prowadzącym badania nad charakteryzacją nowych białek wyizolowanych z plazmy nasiennej ryb i ptaków. Mój wkład w te prace związany jest z określeniem dystrybucji transferyny, apolipoproteiny A oraz inhibitora proteaz serynowych typu Kazal w narządach męskiego układu rozrodczego ryb i ptaków. Efektem przeprowadzonych badań jest współautorstwo 3 artykułów oryginalnych (**Załącznik 3, poz. IIA 11, 22, 23**).

Główny nurt moich prac badawczych prowadzonych po uzyskaniu stopnia doktora dotyczy wpływu substancji o działaniu estrogennym i anty-androgenym na hormonalną regulację i oddziaływania międzykomórkowe w męskim układzie rozrodczym. Część tych badań stanowi podstawę osiągnięcia naukowego prezentowanego w pierwszej części autoreferatu, pozostałe zaś skupiły się przede wszystkim na analizie efektów wywoływanych przez prenatalną i neonatalną ekspozycję na anty-androgen, flutamid, na funkcjonowanie komórek gonady męskiej w kolejnych etapach rozwoju postnatalnego, aż do uzyskania dojrzałości płciowej. Uzyskane wyniki dowiodły, że nawet krótkotrwałe zaburzenie sygnalizacji androgenowej we wczesnej ciąży oraz tuż po urodzeniu wywołuje zmiany w ekspresji koneksyny 43. Co istotne, zmiany te ujawniły się dopiero w dalszych etapach rozwoju, tzn. w okresie przedpokwitaniowym i u zwierząt dojrzałych płciowo (**Załącznik 3, poz. IIA 13 -15**). Ponadto konsekwencją zablokowania sygnalizacji androgenowej we wczesnym rozwoju były nieprawidłowości w formowaniu się bariery krew-jądro obserwowane u knurów po osiągnięciu dojrzałości płciowej, co wykazałam, badając białka

połączeń ścisłych oraz połączeń przylegania w nabłonku plemnikotwórczym. Wyniki te zostały opublikowane w najwyżej notowanym czasopiśmie andrologicznym „International Journal of Andrology” (50 pkt. wg listy czasopism MNiSW) (**Załącznik 3, poz. IIA 17**). Dalsze badania dowiodły, że długoterminowe efekty działania flutamidu manifestują się też przerostem tkanki interstycjalnej, któremu towarzyszą defekty funkcjonalne komórek Leydiga, takie jak zmiany w ekspresji receptora lutropiny i zaburzenia steroidogenezy (**Załącznik 3, poz. IIA 18**). Wyniki przytoczonych badań nie tylko wyjaśniają mechanizmy zaburzeń wywołanych działaniem substancji anty-androgennych, ale stanowią również uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat roli androgenów w kolejnych etapach rozwoju w regulacji funkcjonowania komórek gonady męskiej ssaków. Wskazują one na krytyczne znaczenie nawet przejściowych zaburzeń regulacji hormonalnej podczas rozwoju dla funkcjonowania bariery krew-jądro oraz przebiegu spermatogenezy, a co za tym idzie dla płodności samca. Uzyskane wyniki dowodzą także, że skutki zaburzonej sygnalizacji androgenowej w okresie pre- i neonatalnym mogą ujawniać się dopiero w późniejszym życiu. Znaczną część tych badań realizowałam jako główny wykonawca w dwóch projektach (*Molecular background of antiandrogen induced alterations in the male reproductive system*; Program FNP „Mistrz” dla prof. B. Bilińskiej oraz *Rola androgenów w regulacji ekspresji genu koneksyny 43 w tkankach reprodukcyjnych świni w okresie neonatalnym oraz przed i po uzyskaniu dojrzałości płciowej*; grant MNiSW, N N303 339835). Dalsze prace prowadziłam dzięki uzyskaniu dofinansowania grantu wewnętrznego dla młodych naukowców (*Morfologiczno-funkcjonalne zmiany w komórkach Leydiga dojrzałych knurów wywołane prenatalną i neonatalną ekspozycją na anty-androgen, flutamid*; DS/MND/WBiNoZ/IZ/3/2011). Wyniki tych badań prezentowałam na polskich i zagranicznych sympozjach naukowych (m.in. na VI Zjeździe Towarzystwa Biologii Rozrodu, Polańczyk 2011 oraz 7th European Congress of Andrology, Berlin 2012).

Równocześnie, jako wykonawca projektu pt. *Komórkowe i molekularne mechanizmy działania 4-tert-oktylfenolu na układ rozrodczy samców nornicy rudej. Badania in vitro i in vivo* (N N303 816640, kierownik dr hab. Małgorzata Kotula-Balak), brałam udział w pracach, których celem było scharakteryzowanie oddziaływania 4-tert-oktykofenolu na komórki Leydiga gryzoni. Badania te dowiodły m.in. supresyjnego wpływu tego związku na aktywność szlaku cykloazy adenylanowa-cAMP, wskazując na „pozaestrogenne” mechanizmy działania oktylofenolu. Wykorzystanie w niniejszych badaniach zarówno hodowli pierwotnych komórek Leydiga, jak i linii komórek transformowanych nowotworowo, pozwoliło na stwierdzenie większej wrażliwości komórek pierwotnych na działanie związków

egzogennych w porównaniu do komórek transformowanych, a także na wykazanie różnic w mechanizmie odpowiedzi komórek pierwotnych i linii komórkowych na ten sam ksenoestrogen. Efektem mojego udziału w tych badaniach jest współautorstwo dwóch prac oryginalnych (**Załącznik 3, poz. IIA 19, 21**) i rozdziału w książce (**Załącznik 3, poz. IIE 2**).

Aktualnie biorę udział w badaniach, realizowanych w ramach projektu HARMONIA 3 (*Molekularne mechanizmy regulujące funkcje połączeń międzykomórkowych w jądrze szczura w warunkach ograniczonego dostępu androgenów. Badania in vivo i in vitro*; K/PMN/000067) kierowanego przez prof. Barbarę Bilińską, we współpracy z dr Dolores D. Mruk z Rockefeller University w Nowym Jorku, dotyczących m.in. udziału kinaz białkowych w regulacji międzybiałkowych oddziaływań w barierze krew-jądro. Ponadto, zaangażowana jestem w prace mające na celu wyjaśnienie pozagenomowych mechanizmów działania anty-androgenów na komórki nowotworowe prostaty. Uzyskane wyniki będą stanowiły przedmiot rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Górowskiej, w przewodzie której pełnię rolę promotora pomocniczego.

Jestem współautorką rozdziału w podręczniku akademickim pt. *Fizjologia starzenia się. Profilaktyka i rehabilitacja* pod red. A. Marchewki, Z. Dąbrowskiego i J. A. Żołądzia. Opracowanie to jest pozycją przeznaczoną dla studentów medycyny, biologii i wychowania fizycznego, szeroko ujmującą ogólnoustrojowe oraz narządowo specyficzne zjawiska związane ze starzeniem się organizmu. Rozdział mojego współautorstwa dotyczy zmian w działaniu poszczególnych gruczołów układu hormonalnego związanych z wiekiem, a także przyczyn tych zmian oraz ich konsekwencji dla funkcjonowania całego organizmu (**Załącznik 3, poz. IIE 1**).

Pozostałe 3 polskojęzyczne rozdziały mojego współautorstwa zawarte są w książce pt. *Układ płciowy męski* pod red. M. Piaseckiej, która prezentuje problemy fizjologii i patologii męskiego układu rozrodczego. Rozdziały te obejmują tematykę, którą zajmowałam się w dotychczasowej pracy naukowej: rolę estrogenów u samców (**Załącznik 3, poz. IIE 3**), mechanizmy i czynniki regulujące spermatogenezę (**Załącznik 3, poz. IIE 4**) oraz modele zwierzęce wykorzystywane do badań nad wnętrstwem (**Załącznik 3, poz. IIE 5**), z uwzględnieniem wyników własnych prac badawczych.

Podsumowując, byłam kierownikiem 1 projektu MNiSW („Juventus Plus”) i wykonawcą w 3 projektach krajowych. Kierowałam też 4 projektami finansowanymi ze środków MNiSW na działalność statutową (tzw. granty wewnętrzne Wydziału BiNoZ UJ). Obecnie jestem wykonawcą w 1 projekcie NCN („HARMONIA 3”). Wyniki moich dotychczasowych badań zostały opublikowane w 29 pracach oryginalnych, w tym 27 w

czasopismach z listy Journal Citation Reports (Lista A MNiSW). Spośród tych prac 21 ukazało się po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. Wyniki moich badań zostały zaprezentowane na 43 konferencjach w kraju (26) i za granicą (17). Jestem współautorką 3 prac przeglądowych: 1 polskojęzycznej i 2 anglojęzycznych. Brałam też udział w przygotowaniu 4 polskojęzycznych i 2 anglojęzycznych rozdziałów w książkach zbiorowych.

Łączny *Impact Factor* moich publikacji wg bazy JCR (zgodnie z rokiem ukazania się publikacji) wynosi 60,461, łączna punktacja wg wykazu czasopism naukowych MNiSW (z 31.12.2014) wynosi 910 pkt, a indeks Hirscha wg Web of Science 11 (dane z 15.02.2015). Prace, których jestem współautorką, cytowane były łącznie 238 razy (168 razy bez autocytowań) (dane z 15.02.2015).

Od 2010 roku jestem recenzentką prac nadsyłanych do redakcji międzynarodowych czasopism naukowych (*Acta Histochemica*, *Andrology*, *Annals of Animal Science*, *Cell Death and Disease*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *Folia Histochemica et Cytochemica*, *International Journal of Endocrinology*, *Journal of Equine Veterinary Science*, *Reproduction in Domestic Animals*, *Reproductive Biology*, *Reproductive Toxicology*, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *Theriogenology*, *Tissue and Cell*). Zrecenzowałam 27 manuskryptów.

Jestem również członkiem towarzystw naukowych: Komisji Andrologii przy Komitecie Biologii Rozrodu II Wydziału PAN, Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR) i Polskiego Towarzystwa Andrologicznego (PTA).

W uznaniu moich osiągnięć naukowych zostałam kilkakrotnie nagrodzona. W roku 2006 otrzymałam Stypendium im. S. Estreichera dla wyróżniających się w pracy naukowej doktorantów UJ. W latach 2008 i 2012 uzyskałam dwie indywidualne nagrody JM Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za rozprawę doktorską oraz za publikacje naukowe, a w latach 2009 i 2013 dwie nagrody zespołowe za cykle publikacji naukowych. Zostałam też dwukrotnie, w 2012 oraz 2014 roku, laureatką Nagrody Młodych Polskiego Towarzystwa Andrologicznego im. prof. M. Bokińca za najlepszą pracę naukową z dziedziny andrologii, co wiązało się z zaproszeniem do wygłoszenia wykładów podczas konferencji PTA.

Poza działalnością naukową zajmuję się również pracą dydaktyczną. Od 2004 roku prowadzę zajęcia dla studentów kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ w ramach kursów: *Fizjologia zwierząt*, *Endokrynologia ogólna* oraz *Fizjologiczne techniki badań*. Po utworzeniu Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR, od 2012 roku prowadzę ćwiczenia i konwersatoria dla studentów kierunku Weterynaria w ramach kursu *Biologia*. W okresie od 2011 roku byłam promotorem 5 zakończonych prac licencjackich i 3 magisterskich; aktualnie pod moja opieką powstaje 1 praca licencjacka i 2

magisterskie. Od 2014 roku pełnię funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr Eweliny Górskiej.

W ramach działalności organizacyjnej na Uniwersytecie Jagiellońskim pełnię funkcję pełnomocnika ds. ewaluacji jakości kształcenia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ. Jestem przedstawicielem niesamodzielnych pracowników naukowych w Radzie Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ. Biorę również udział w przedsięwzięciach popularyzujących naukę: podczas studiów doktoranckich corocznie uczestniczyłam w Festiwalu Nauki UJ, w kolejnych latach prowadziłam zajęcia w ramach Nocy Biologów i Dniach Otwartych UJ, a od 2013 roku jestem zaangażowana w organizację warsztatów w ramach odbywającej się cyklicznie Małopolskiej Nocy Naukowców.

Anna Hejmej