

Załącznik 2A
do wniosku z dnia 29.05.2017 r.
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr Małgorzata Grzesiak

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków 2017

1. IMIĘ I NAZWISKO

Małgorzata Grzesiak (z domu Durlej)

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

Magister biologii, tytuł uzyskany 5 czerwca 2007r. na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, praca magisterska pt. *Wpływ transferyny na aktywność aromatazy w hodowli pierwotnej komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni.*

Promotor: dr hab. Małgorzata Duda,

Recenzent: Prof. dr hab. Maria Słomczyńska (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie)

Doktor nauk biologicznych, stopień uzyskany 18 października 2011r. na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, rozprawa doktorska pt. *Rola androgenów w regulacji funkcji jajnika świni w okresie neonatalnym i postnatalnym.*

Promotor: Prof. dr hab. Maria Słomczyńska,

Recenzenci: Prof. dr hab. Barbara Bilińska (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie), Prof. dr hab. Genowefa Kotwica (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie)

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

01.02.2012 - 31.01.2014	asystent naukowy (zatrudnienie w ramach projektu "Społeczeństwo-Technologie-Środowisko"); Zakład Endokrynologii, Instytut Zoologii (obecnie Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
14.04.2014 - 28.02.2015	adiunkt naukowy (zatrudnienie w projekcie Narodowego Centrum Nauki); Zakład Endokrynologii, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
03.11.2014 - 31.03.2016	asystent naukowo-dydaktyczny ; Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
01.04.2016 - obecnie	adiunkt naukowo-dydaktyczny ; Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja 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. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W Dz. U. z 2016 R. POZ. 1311.)

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Funkcjonowanie ciałka żółtego ciężowego świni w warunkach niedoboru androgenów

4.2. AUTORZY, TYTUŁ PUBLIKACJI, NAZWA WYDAWNICTWA, ROK WYDANIA,

Współczynnik wpływu Impact factor (IF) podano według JCR zgodnie z rokiem opublikowania pracy; punkty MNiSW według aktualnego wykazu czasopism naukowych (lista A) z dnia 09.12.2016 r.; liczbę cytowań według *Web of Science*TM (z 26.05.2017).

- 1. Grzesiak M**, Knapczyk-Stwora K, Ciereszko R, Gołas A, Wiecech I, Słomczyńska M (2014) Androgen deficiency during mid- and late pregnancy alters progesterone production and metabolism in the porcine corpus luteum. *Reproductive Sciences* 21(6): 778-790.

IF₂₀₁₄: 2.230

Punkty MNiSW₂₀₁₆: 25

Liczba cytowań: 5

Liczba cytowań bez autocytowań: 1

- 2. Grzesiak M**, Knapczyk-Stwora K, Ciereszko R, Wiecech I, Słomczyńska M (2014) Alterations in luteal production of androstenedione, testosterone, and estrone, but not estradiol, during mid- and late pregnancy in pigs: Effects of androgen deficiency. *Theriogenology* 82(5): 720-733.

IF₂₀₁₄: 1.798

Punkty MNiSW₂₀₁₆: 30

Liczba cytowań: 4

Liczba cytowań bez autocytowań: 3

- 3. Grzesiak M**, Mitan A, Janik ME, Knapczyk-Stwora K, Słomczyńska M (2015) Flutamide alters β -catenin expression and distribution, and its interactions with E-cadherin in the porcine corpus luteum of mid- and late pregnancy. *Histology and Histopathology* 30: 1341-1352.

IF₂₀₁₅: 1.875

Punkty MNiSW₂₀₁₆: 25

Liczba cytowań: 3

Liczba cytowań bez autocytowań: 1

4. **Grzesiak M**, Knapczyk-Stwora K, Słomczyńska M (2017) The impact of flutamide on prostaglandin F2 α synthase and prostaglandin F2 α receptor expression, and prostaglandin F2 α concentration in the porcine corpus luteum of pregnancy. *Domestic Animal Endocrinology* 59: 81-89.

IF₂₀₁₅: 1.613

Punkty MNiSW₂₀₁₆: 30

Liczba cytowań: 0

Liczba cytowań bez autocytowań: 0

5. **Grzesiak M**, Knapczyk-Stwora K, Słomczyńska M (2016) Induction of autophagy in the porcine corpus luteum of pregnancy following anti-androgen treatment. *Journal of Physiology and Pharmacology* 67(6): 933-942.

IF₂₀₁₅: 2.804

Punkty MNiSW₂₀₁₆: 25

Liczba cytowań: 0

Liczba cytowań bez autocytowań: 0

Sumaryczny IF prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe wynosi 10.32

Suma punktów MNiSW: 135

Liczba cytowań: 12

Liczba cytowań bez autocytowań: 5

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

Podstawę rozprawy habilitacyjnej tworzy pięć oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2014 – 2017, które stanowią wzbogacenie i uzupełnienie aktualnego stanu wiedzy na temat roli androgenów w ciałku żółtym (CL) ciążowym świni. Przedstawione do oceny publikacje są wynikiem pracy naukowej prowadzonej w ramach dwóch projektów badawczych, wykonywanych pod moim kierunkiem.

CL jest tymczasowym gruczołem dokrewnym, którego główna funkcja polega na produkcji progesteronu. Hormon ten zapewnia regulację cyklu płciowego, a także odgrywa ważną rolę w procesie implantacji, utrzymaniu ciąży oraz prawidłowym rozwoju płodu. U wielu gatunków zwierząt domowych, w tym u świni, CL jest jedynym źródłem progesteronu przez cały okres ciąży, niezbędnym do jej utrzymania. Zatem świnka jest szczególnie interesującym i użytecznym modelem do badania funkcji tkanki lutealnej w czasie ciąży. Liczne dane literaturowe wskazują, że owariektomia przeprowadzona u ciężarnych sów na dowolnym etapie ciąży prowadzi do poronień lub przedwczesnych porodów. Co więcej, obniżona produkcja progesteronu przez CL wiąże się ze zmniejszoną liczbą potomstwa w miocie (*Taverne 2001*). Efektywność rozrodu u sów jest więc

nierozzerwalnie związana z ustaleniem i utrzymaniem prawidłowej funkcji CL ciążowego. Biorąc pod uwagę, że udany przebieg ciąży i porodu zależą od właściwej aktywności tkanki lutealnej, poznanie nowych czynników wpływających na funkcjonowanie CL ciążowego świni jest uzasadnione i może przyczynić się do zwiększenia efektywności reprodukcyjnej tych zwierząt.

W badaniach przedstawionych do osiągnięcia habilitacyjnego szczególną uwagę poświęciłam androgenom jako potencjalnym czynnikom modulującym funkcje tkanki lutealnej. Motywacją do podjęcia tego problemu badawczego były doświadczenia na gryzoniach sugerujące jednoznacznie, że androgeny stymulują produkcję progesteronu w komórkach lutealnych w czasie ciąży (*Carrizo i wsp. 1994; Thordarson i wsp. 1997*), co nie było dotąd badane u świni. Inspiracji dostarczyły mi także dotychczasowe prace prowadzone przez Zespół prof. dr hab. Marii Słomczyńskiej, które wskazały CL ciążowe świni jako miejsce syntezy i działania androgenów, ze szczególnym uwzględnieniem istotnych zmian zachodzących w okresie środkowej i późnej ciąży. W małych komórkach lutealnych stwierdzona została ekspresja cytochromu P450 17 α -hydroksylazy/17,20-liazy (CYP17A1) począwszy od 50 dnia ciąży, co świadczy o zdolności do syntezy androgenów (*Knapczyk-Stwora i wsp. 2011*). Hormony te wywierają swój efekt biologiczny poprzez receptory androgenowe (AR, *ang. androgen receptor*), których ekspresję wykazano w komórkach lutealnych świni przez cały okres ciąży (*Duda i wsp. 2004*). Interesująca natomiast jest translokacja AR z jądra komórkowego do cytoplazmy od 90 dnia, sugerująca zmianę w działaniu androgenów na tym etapie ciąży u świni. Jednocześnie obserwowano bardzo niski poziom ekspresji cytochromu P450 aromatazy (CYP19A1) do 90 dnia ciąży, który później ulegał stopniowemu zwiększeniu (*Duda i wsp. 2004*). Stąd wydaje się, że androgeny służą głównie jako substrat do syntezy estrogenów w tym okresie ciąży. Powyższe dane pozwalają zakładać, że androgeny, działając bezpośrednio poprzez AR lub pośrednio po konwersji do estrogenów, są ważnymi czynnikami wpływającymi na utrzymanie i prawidłowe funkcjonowanie CL świni w okresie środkowej i późnej ciąży. Uważam, że podjęty problem badawczy jest szczególnie istotny ze względu na obecność w środowisku czynników o aktywności anty-androgennej lub androgennej, które zaburzają działanie endogennych hormonów poprzez blokowanie lub naśladowanie ich funkcji. W świetle wzrastającej liczby publikacji opisujących szkodliwy wpływ tych czynników na płodność samic, w tym anty-androgenów obecnych np. w środkach ochrony roślin, coraz częściej wskazuje się zwierzęta gospodarskie jako użyteczny model badawczy pozwalający ocenić skutki działania środowiskowych anty-androgenów (*Magnusson 2005*). **Dlatego hipoteza badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe zakładała, że niedobór androgenów może wpływać na prawidłowe funkcjonowanie CL w środkowej i późnej ciąży u świni.**

W celu weryfikacji powyższej hipotezy badawczej zastosowałam model *in vivo*, w którym eksperymentalnie indukowano niedobór androgenów poprzez użycie specyficznego niesteroidowego

anty-androgenu flutamidu, blokującego AR (Tevell i wsp. 2006). Ciężarne lochy (Wielka Biała Polska × Polska Biała Zwisłoucha) otrzymywały podskórne iniekcje flutamidu codziennie przez 7 kolejnych dni w dawce 50 mg/kg masy ciała, między: dniem 43 a 49 po zapłodnieniu (GD50), dniem 83 a 89 po zapłodnieniu (GD90) lub dniem 101 a 107 po zapłodnieniu (GD108). Dla każdej grupy poddanej działaniu flutamidu przygotowano grupę kontrolną, której w tym samym okresie co flutamid, podawano podskórnie sam nośnik (olej kukurydziany). Następnego dnia po zakończeniu podawania flutamidu, czyli odpowiednio w dniu 50 (GD50), 90 (GD90) i 108 (GD108) ciąży, przeprowadzono obustronną owariektomię, a z jajników wyizolowano CL stanowiące materiał badawczy. Dni ciąży wybrane do podawania flutamidu odpowiadały środkowej (GD50) i późnej ciąży (GD90) oraz okresowi okołoporodowemu (GD108). Ponadto są one związane z przedstawionymi powyżej zmianami w ekspresji enzymów steroidogennych oraz AR w CL ciążowym świni. Warto podkreślić, że większość dotychczasowych badań opisuje funkcje CL ciążowego świni na wczesnych etapach ciąży. Niewiele natomiast wiadomo na temat jego funkcjonowania w środkowej i późnej fazie ciąży. Podobny problem badawczy nie był wcześniej podejmowany, co świadczy niewątpliwie o jego nowatorstwie. Spośród wielu aspektów determinujących prawidłowe funkcjonowanie CL ciążowego, które mogą ulegać zaburzeniu w warunkach niedoboru androgenów, swoją uwagę skierowałam na zbadanie funkcjonalności CL wyznaczonej przez aktywność steroidogenną (szczególnie produkcję progesteronu) oraz prawidłowej komunikacji pomiędzy komórkami lutealnymi. Ponadto skoncentrowałam się również na sprawdzeniu wpływu anty-androgenu na indukcję regresji CL.

Głównym markerem funkcjonalności tkanki lutealnej jest jej zdolność do syntezy progesteronu. Synteza i metabolizm tego steroidu zależy przede wszystkim od ekspresji białka natychmiastowo regulującego steroidogenezę (StAR) oraz enzymów szlaku steroidogenezy tj. cytochromu P450_{scc} odszczepiającego boczny łańcuch cholesterolu (CYP11A1), dehydrogenazy Δ^5 - Δ^4 -izomerazy 3β -hydroksysteroidowej (3β -HSD) oraz dehydrogenazy 20α -hydroksysteroidowej (AKR1C1) (Payne i Hales 2004). U gryzoni oraz zwierząt gospodarskich, AKR1C1 zlokalizowany w CL przekształca progesteron do nieaktywnego biologicznie 20α -hydroksyprogesteronu, prowadząc tym samym do rozpoczęcia porodu (Seo i wsp. 2011). Zatem precyzyjna regulacja czasu produkcji i degradacji progesteronu wpływa zasadniczo na efektywność rozrodu. Dlatego też pierwszym podjętym przeze mnie zadaniem badawczym było sprawdzenie, czy indukowany flutamidem niedobór androgenów w środkowej i późnej ciąży prowadzi do dysfunkcji CL świni objawiającej się zaburzoną produkcją progesteronu. W ramach pierwszej pracy stanowiącej osiągnięcie naukowe wykazałam obniżoną syntezę progesteronu w CL ciążowym świni po zastosowaniu flutamidu w grupach GD90 i GD108 oraz jego wyższy poziom w grupie GD50 (Grzesiak i wsp. 2014, poz. 1). Pomimo braku różnic w ekspresji białka StAR na poziomie transkrypcji i translacji po ekspozycji na

flutamid, obserwowane zmiany w koncentracji progesteronu można wytłumaczyć znaczącymi zmianami w ekspresji enzymów steroidogennych. Stwierdzono istotne obniżenie poziomu mRNA i białka CYP11A1 w grupach GD90 i GD108 oraz jego wzrost w środkowej fazie ciąży. W odniesieniu do 3 β -HSD, spadek ekspresji mRNA i białka dla tego enzymu obserwowano jedynie w grupie GD108. Ponadto po raz pierwszy wykazałam obecność mRNA i białka AKR1C1 w CL świni w drugiej połowie ciąży. Jednakże zmiany w ekspresji AKR1C1 były zależne od dnia ciąży, co nie pozwala jednoznacznie określić wpływu flutamidu na ten enzym (*Grzesiak i wsp. 2014, poz. 1*). Podsumowując, indukowany doświadczalnie niedobór androgenów zaburzył ekspresję kluczowych enzymów steroidogennych, a w konsekwencji produkcję progesteronu w CL ciążowym świni. Co istotne, najbardziej wrażliwymi na zastosowanie anty-androgeny okazały się okres późnej ciąży i okres okołoporodowy, niosąc ze sobą ryzyko przedwczesnego porodu w odpowiedzi na obniżony poziom progesteronu.

Oprócz progesteronu, CL ciążowe świni posiada również zdolność do syntezy androgenów i estrogenów (*Duda i wsp. 2004, Knapczyk-Stwora i wsp. 2011*). Steroidy te działają lokalnie na drodze autokrynowej/parakrynowej poprzez swoiste receptory i wywierają zasadniczy efekt prowadząc do utrzymania optymalnych funkcji CL. Zatem, aby rozszerzyć otrzymane do tej pory wyniki potwierdzające zaburzoną lutealną produkcję progesteronu po zastosowaniu flutamidu (*Grzesiak i wsp. 2014, poz. 1*), pojawiło się kolejne pytanie: czy podanie anty-androgeny w środkowej i późnej ciąży wpływa również na dalsze etapy steroidogenezy w CL ciążowym świni, obejmujące produkcję androgenów i estrogenów? W drugiej publikacji wybranej do osiągnięcia naukowego, oznaczyliśmy metodą radioimmunologiczną zawartość androstendionu, testosteronu, estronu i estradiolu w tkance lutealnej świni, zarówno z grup kontrolnych, jak i poddanych działaniu flutamidu. Analizy te zostały wykonane we współpracy z Profesor Renatą Ciereszko z Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Uzyskane wyniki pokazały, że zastosowanie anty-androgeny skutkowało podwyższonym poziomem obu androgenów w grupach GD50 i GD108 oraz obniżeniem ich zawartości w grupie GD90. Rezultaty te zostały potwierdzone zmianami w ekspresji mRNA i białka dla enzymów zaangażowanych w syntezę androgenów, odpowiednio CYP17A1 oraz dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej typu 1 (17 β -HSD1). Dodatkowo CYP17A1 i 17 β -HSD1 zostały zlokalizowane wyłącznie w małych komórkach lutealnych, co świadczy o ich pochodzeniu z komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego i udziale w produkcji androgenów (*Grzesiak i wsp. 2014, poz. 2*). W kolejnych etapach badań wykazałam zwiększoną zawartość estronu w tkance lutealnej świni z grup GD90 i GD108 po podaniu flutamidu. Ponadto w obu tych grupach obserwowano podwyższoną ekspresję CYP19A1 na poziomie transkrypty i białka. Biorąc pod uwagę równoczesny brak zmian w koncentracji estradiolu w grupach traktowanych flutamidem, można stwierdzić większe powinowactwo enzymu CYP19A1 do androstendionu niż do testosteronu, czego efektem jest jego

aromatyzacja do estronu. Warto podkreślić, że CL posiada również zdolność do przekształcania estronu w estradiol, za co odpowiedzialna jest dehydrogenaza 17β -hydroksysteroidowa typu 7 (17β -HSD7) (enzym występujący wyłącznie w tkance lutealnej) (Stocco i wsp. 2007). Brak wpływu flutamidu na ekspresję 17β -HSD7 w prezentowanych badaniach może wyjaśniać niezmienny poziom estradiolu obserwowany we wszystkich badanych dniach ciąży. Obecność mRNA i białka dla enzymu 17β -HSD7 została wykazana przeze mnie po raz pierwszy w CL ciążowym świni. Jego immunolokalizacja, wraz z CYP19A1, w dużych komórkach lutealnych dowodzi z kolei ich pochodzeniu z komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego i zaangażowaniu w syntezę estrogenów (Grzesiak i wsp. 2014, poz. 2). Wyniki prezentowane w niniejszej publikacji jasno dowodzą, że niedobór androgenów w środkowej i późnej ciąży zaburza, poza biosyntezą progesteronu, także dalsze etapy steroidogenezy w CL świni. Zachwiana równowaga w poziomie androgenów i estrogenów może natomiast prowadzić do niewłaściwego lokalnego działania tych steroidów w tkance lutealnej. Podsumowując rezultaty przedstawione w dwóch pierwszych pracach stanowiących część osiągnięcia naukowego można stwierdzić, że androgeny są kluczowymi czynnikami modulującymi funkcjonowanie CL ciążowego świni, natomiast anty-androgeny mogą stanowić istotny czynnik ryzyka prowadzący do dysfunkcji tkanki lutealnej, a w konsekwencji zaburzający płodność tych zwierząt.

Powszechnie wiadomo, że interakcje międzykomórkowe stanowią kluczowy czynnik wpływający na integralność CL oraz utrzymanie jego fizjologicznych funkcji, w tym efektywnej steroidogenezy. Wzajemna komunikacja pomiędzy komórkami lutealnymi jest bardzo złożona i wymaga udziału białek połączeń szczelinowych, połączeń ścisłych oraz przylegania (Grazul-Bilska i wsp. 1997; Shirasuna i wsp. 2007). Na podstawie doniesień literaturowych oraz naszych dotychczasowych prac wiadomo, że występuje zależność pomiędzy ekspresją koneksyny 43 (białko połączeń szczelinowych) oraz sekrecją progesteronu, co zaobserwowano w CL owcy (Borowczyk i wsp. 2007) i świni (Durlej i wsp. 2011). Ponadto wykazano wyraźne zaangażowanie β -kateniny, białka połączeń przylegania, w stymulowaną przez LH syntezę progesteronu w komórkach lutealnych krowy *in vitro* (Roy i wsp. 2009). β -katenina wiąże się specyficznie do domeny wiążącej ligand w AR, zwiększając tym samym aktywność receptora (Yang i wsp. 2002), co jest istotne z punktu widzenia mojego modelu badawczego. Biorąc pod uwagę powyższe informacje oraz prace pokazujące obniżoną ekspresję β -kateniny w narządach reprodukcyjnych świni po zastosowaniu flutamidu (Hejmej i wsp. 2012; Knapczyk-Stwora i wsp. 2013), w dalszych badaniach postawiłam kolejne pytanie: czy obniżona produkcja progesteronu w CL świni w warunkach niedoboru androgenów (Grzesiak i wsp. 2014, poz. 1) może być związana ze zmianami w ekspresji i funkcji β -kateniny? W trzeciej pracy włączonej do osiągnięcia naukowego wykazałam po raz pierwszy ekspresję mRNA

i białka β -kateniny w CL ciężowym świni w okresie środkowej i późnej ciąży. Ekspozycja na flutamid obniżyła istotnie poziom transkryptu i białka β -kateniny, szczególnie w grupach GD90 i GD108, potwierdzając tym samym korelację ze zmniejszonym poziomem progesteronu w tych samych grupach oraz podkreślając regulację β -kateniny przez androgeny (**Grzesiak i wsp. 2015, poz. 3**). Wiadomo, że specyficzna funkcja β -kateniny zależy od jej komórkowej dystrybucji. W swojej pracy pokazałam, że β -katenina była głównie zlokalizowana w błonie komórek lutealnych, zarówno w grupach kontrolnych, jak i poddanych działaniu flutamidu, wskazując tym samym na jej udział w adhezji komórkowej. Co więcej, obserwowałam także jej cytoplazmatyczne i jądrowe rozmieszczenie w małych komórkach lutealnych pochodzących od zwierząt ze wszystkich badanych grup, sugerując możliwość działania β -kateniny jako czynnika transkrypcyjnego. Wyniki reakcji immunohistochemicznej zostały potwierdzone poprzez uzyskanie poszczególnych frakcji komórkowych i ich dalszą analizę metodą Western blot. Zarówno w grupach kontrolnych, jak i traktowanych flutamidem, największą ekspresję obserwowano we frakcji błonowej przy jednoczesnym braku różnic indukowanych anty-androgenem. Ponadto, jedynie w grupie GD108 wykazano istotny wzrost poziomu β -kateniny we frakcji jądrowej, co świadczy o wzmożonej aktywności transkrypcyjnej. Otrzymany wynik potwierdzają badania dowodzące, że β -katenina jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym steroidogenezę na poziomie białka StAR (*Roy i wsp. 2009*). Wyniki te w znacznym stopniu podkreślają udział β -kateniny w adhezji komórkowej niż w regulacji steroidogenezy jako czynnik transkrypcyjny. Ustalenie jednoznacznego związku pomiędzy obniżoną koncentracją progesteronu i ekspresją β -kateniny pod wpływem flutamidu wymaga dalszych badań (**Grzesiak i wsp. 2015, poz. 3**). β -katenina uczestniczy w adhezji komórkowej poprzez interakcje z E-kadheryną (białko połączeń przylegania). W związku z tym kolejnym krokiem w moich badaniach było sprawdzenie czy podanie flutamidu wpływa na tworzenie kompleksów pomiędzy tymi białkami. We współpracy z dr Marceliną Janik z Zakładu Biochemii Glikokoniugatów (Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych UJ) wykorzystaliśmy technikę immunoprecypitacji, dzięki której obserwowano istotnie większe oddziaływanie obu białek w tkance lutealnej świni w warunkach niedoboru androgenów w grupach GD90 i GD108. Powszechnym mechanizmem modulującym stopień adhezji komórkowej jest fosforylacja E-kadheryny (*Stappert i Kemler 1994*). Stąd kolejnym podjętym przez mnie krokiem było wykazanie zwiększonej fosforylacji E-kadheryny w pozycji seryny (S838/S840) w obrębie domeny wiążącej β -kateninę, zarówno w grupie GD90, jak i GD108. Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi (*Lickert i wsp. 2000*) i mogą tłumaczyć silniejsze wiązanie β -kateniny i E-kadheryny po podaniu flutamidu (**Grzesiak i wsp. 2015, poz. 3**). Rezultaty powyższej pracy znacząco wskazują, że sygnalizacja androgenowa uczestniczy w regulacji ekspresji i funkcji białek przylegania, a tym samym wpływa na komunikację pomiędzy komórkami lutealnymi.

Wyniki badań przedstawione w trzech powyższych publikacjach włączonych do osiągnięcia naukowego zostały otrzymane w ramach realizacji kierowanego przeze mnie projektu SONATA pt. *Molekularne podstawy funkcjonowania ciała żółtego ciążowego świni w warunkach doświadczalnego ograniczenia działania androgenów – badania in vivo* (2011/03/D/NZ4/00303), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Czas trwania CL jest precyzyjnie regulowany przez szereg czynników o działaniu luteotropowym, bądź luteolitycznym. Główną luteolizyną u wielu gatunków zwierząt gospodarskich, w tym u świni, jest uwalniana z macicy prostaglandyna F_{2α} (PGF_{2α}), która na odpowiednim etapie cyklu płciowego lub ciąży indukuje osłabienie funkcji steroidogennych oraz produkcji progesteronu w CL ulegającym dalej stopniowej regresji (*Bowen-Shauver i Gibori 2004*). Ekspresja PGF_{2α} została potwierdzona również w CL świni podczas cyklu oraz wczesnej ciąży, wskazując jej istotne zaangażowanie w mechanizm luteolizy mediowany przez PGF_{2α} pochodzenia macicznego (*Waclawik i wsp. 2006*). Regresja CL obejmuje luteolizę *funkcjonalną* charakteryzującą się osłabioną syntezą i sekrecją progesteronu oraz następującą po niej luteolizę *strukturalną*, obejmującą zmiany morfologiczne w tkance lutealnej prowadzące do jej degeneracji. Zaprezentowane powyżej wyniki badań wskazują na indukowaną flutamidem obniżoną produkcję progesteronu oraz ekspresję enzymów CYP11A1 i 3β-HSD w CL świni w późnej ciąży oraz w okresie okołoporodowym (***Grzesiak i wsp. 2014, poz. 1***), co sugeruje wystąpienie luteolizy funkcjonalnej. Z tego względu do dalszych analiz wybrałam dwa okresy ciąży: późna ciąża (GD90) i okres okołoporodowy (GD108). Kolejnym etapem moich badań, jakie wyznaczyłam, było sprawdzenie, czy niedobór androgenów może być czynnikiem przyczyniającym się do regresji CL ciążowego świni. W czwartej pracy wybranej do osiągnięcia naukowego zbadalam ekspresję syntazy (PGFS) oraz receptora (PTGFR) PGF_{2α}, a także koncentrację PGF_{2α} w CL ciążowym świni. Otrzymane rezultaty wykazały po raz pierwszy wzrost ekspresji mRNA i białka dla PGFS w grupach GD90 i GD108 po ekspozycji na flutamid, co skutkowało zwiększoną lutealną koncentracją PGF_{2α} w obu badanych grupach. Ponadto obserwowano wzrost poziomu transkryptu dla PTGFR w grupie GD90 oraz białka w grupach GD90 i GD108, co może skutkować wzmożoną odpowiedzią komórek lutealnych na PGF_{2α}. Warto dodać, że w okresie późnej ciąży PGFS była obecna jedynie w cytoplazmie dużych komórek lutealnych, natomiast w okresie okołoporodowym również małe komórki lutealne wykazywały pozytywne barwienie. PTGFR występował w błonie dużych komórek lutealnych w obu badanych dniach ciąży, zarówno w grupach kontrolnych i poddanych działaniu flutamidu (***Grzesiak i wsp. 2017, poz. 4***). Można zatem stwierdzić, że zaburzenie sygnalizacji androgenowej poprzez zastosowanie anty-androgenu wydaje się być potencjalnym mechanizmem zwiększającym luteolizę w późnej ciąży i tuż przed porodem u świni.

Opierając się na zaprezentowanych powyżej wynikach badań, w dalszych pracach skoncentrowałam się na potwierdzeniu statusu regresji CL poprzez zbadanie procesów apoptozy i autofagii. Powszechnie wiadomo, iż luteoliza strukturalna jest związana z apoptotyczną śmiercią komórek charakteryzującą się fragmentacją DNA, zwiększoną ekspresją genów pro-apoptotycznych, a ostatecznie efektorowej proteazy, kaspazy 3 (*Sugino i Okuda 2007*). W ostatniej publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego wykonałam detekcję apoptozy w CL ciążowym świni, której wystąpienie sugerowały poprzednie rezultaty odnoszące się do osłabionej steroidogenezy (**Grzesiak i wsp. 2014, poz. 1**) oraz zwiększonej wrażliwości luteolitycznej CL (**Grzesiak i wsp. 2017, poz. 4**). Detekcja fragmentacji DNA metodą TUNEL nie potwierdziła jednak moich przypuszczeń i nie wykazała istotnych różnic w ilości komórek apoptotycznych pomiędzy grupami kontrolnymi i poddanymi działaniu flutamidu. Co więcej, wyniki te potwierdziła analiza ekspresji aktywnej formy kaspazy 3 w obu badanych okresach ciąży (**Grzesiak i wsp. 2016, poz. 5**). Ponadto ekspresja pro-apoptotycznego białka Bax była istotnie niższa w grupie GD108, sugerując zahamowanie apoptozy komórek lutealnych w warunkach niedoboru androgenów. Dodatkowo do zahamowania indukcji apoptozy przyczynić się mógł wysoki poziom anty-apoptotycznego białka Bcl-2 obserwowany w obu badanych grupach po ekspozycji na flutamid. Sugeruje się, że nieudana aktywacja szlaku apoptozy może prowadzić do indukcji autofagii (*Kang i wsp. 2011*). Warto podkreślić, że coraz więcej doniesień literaturowych dowodzi udziału autofagii w regresji CL gryzoni i bydła, jako alternatywnego szlaku śmierci komórkowej (*Choi i wsp. 2011, Aboelenain i wsp. 2015*). Podobny problem badawczy nie był do tej pory podejmowany u świni, co świadczy o nowatorstwie prowadzonych badań. W prezentowanej pracy obserwowano wzrost ekspresji głównego markera autofagii, białka LC3-II występującego w błonie autofagosomów, w grupach GD90 i GD108 (**Grzesiak i wsp. 2016, poz. 5**). W świetle doniesień literaturowych, wysoki poziom ekspresji białka LC3-II występował w CL szczura w czasie pseudociąży lub po podaniu PGF2 α (*Choi i wsp. 2011*), co jest zgodne z obserwowaną wcześniej zwiększoną koncentracją PGF2 α w tkance lutealnej w grupach GD90 i GD108 warunkach ograniczonego działania androgenów (**Grzesiak i wsp. 2017, poz. 4**). Ważnym etapem w przebiegu autofagii jest formowanie autofagolizosomów. Z tego względu skupiłam się na zbadaniu ekspresji białka Lamp1 związanego z błoną lizosomów. W obu grupach poddanych działaniu flutamidu stwierdzono wzrost poziomu mRNA i białka Lamp1, potwierdzając tym samym wystąpienie autofagii. Ponadto białko Lamp1 zostało po raz pierwszy zlokalizowane metodą immunohistochemiczną w CL ciążowym świni. Zgodnie z ostatnimi badaniami, szlaki autofagii i apoptozy mogą łączyć się ze sobą poprzez oddziaływanie bekliny 1 (białko indukujące autofagię) oraz anty-apoptotycznego białka Bcl-2. Bezpośrednia interakcja bekliny 1 i Bcl-2 hamuje aktywację procesu autofagii, podczas gdy odłączenie Bcl-2 jest znanym mechanizmem indukującym autofagię (*Kang i wsp. 2011*). W prezentowanej pracy obserwowałam wzrost ekspresji bekliny 1 na poziomie mRNA i białka w obu grupach poddanych

działaniu flutamidu, potwierdzając tym samym aktywację autofagii w CL ciężowym świni. Ponadto wyniki otrzymane metodą immunoprecypitacji wykazały istotnie słabszą interakcję pomiędzy beklina 1 i białkiem Bcl-2 w grupach GD90 i GD108, sugerując zaburzenie tworzenia kompleksów bekliny 1/Bcl-2 jako mechanizm indukujący autofagię w tkance lutealnej świni w warunkach niedoboru androgenów (**Grzesiak i wsp. 2016, poz. 5**). Wyniki tych badań poszerzają znacząco wiedzę na temat zależności pomiędzy androgenami i autofagią w CL ciężowym świni i stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań, mających na celu pełne zrozumienie mechanizmu ich współdziałania.

Wyniki badań przedstawione w czwartej i piątej publikacji, zaliczanych do osiągnięcia naukowego, zostały otrzymane w ramach realizacji kierowanego przeze mnie projektu luventus Plus pt. *Określenie udziału procesów apoptozy i autofagii w regresji ciątka żółtego ciężowego świni – wpływ ograniczonego działania androgenów* (IP2014 014373) finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Podsumowując, wyniki badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe podkreślają szczególną rolę androgenów w regulacji funkcjonowania CL ciężowego świni poprzez modulację funkcji steroidogennych, interakcji międzykomórkowych oraz wpływ na indukcję luteolizy. Warto podkreślić, że obserwowane zmiany zależały od okresu ciąży, co wydaje się istotne w świetle potencjalnego narażenia na czynniki środowiskowe o aktywności anty-androgennej, które mogą zaburzać działanie endogennych androgenów. Co więcej, modele zwierzęce naśladujące fizjologiczny niedobór androgenów mogą być użyteczne w poszerzaniu wiedzy dotyczącej wpływu anty-androgenów na funkcje rozrodcze samicy.

4.4. LITERATURA

Aboelenain M, Kawahara M, Balboula AZ, *et al.* Status of autophagy, lysosome activity and apoptosis during corpus luteum regression in cattle. *J Reprod Dev* 2015; 61: 229-236.

Borowczyk E, Johnson ML, Bilski JJ, Bilaska MA, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilaska AT. Role of gap junctions in regulation of progesterone secretion by ovine luteal cells in vitro. *Reproduction* 2007; 133: 641-651.

Bowen-Shauver JM, Gibori G. The corpus luteum of pregnancy. In: Leung PCK, Adashi EY, editors. The ovary. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 201–30.

Carrizo DG, Rastrilla AM, Telleira CM, Aguado LI. Androstendione stimulates progesterone production in corpora lutea of pregnant rats: an effect not mediated by estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 51: 191-197.

Choi J, Jo M, Lee E, Choi D. The role of autophagy in corpus luteum regression in the rat. *Biol Reprod* 2011; 85: 465-472.

- Duda M**, Burek M, Galas J, Koziol K, Kozirowski M, Slomczynska M. Immunohistochemical localization of androgen receptor and aromatase in the ovary of the pregnant pig. *Reprod Biol* 2004; 4(3): 289-298.
- Durlej M**, Knapczyk-Stwora K, Duda M, Kopera-Sobota I, Hejmej A, Bilinska B, Slomczynska M. Prenatal and neonatal exposure to the antiandrogen flutamide alters connexin 43 gene expression in the adult porcine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 2011; 40: 19-29.
- Grazul-Bilska AT**, Redmer DA, Reynolds LP. Cellular interactions in the corpus luteum. *Semin Reprod Endocrinol* 1997; 15: 383-393.
- Hejmej A**, Kopera I, Kotula-Balak M, Lydka M, Lenartowicz M, Bilinska B. Are expression and localization of tight and adherens junction proteins in testes of adult boar affected by foetal and neonatal exposure to flutamide? *Int J Androl* 2012; 35: 340-352.
- Kang R**, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; 18: 571-580.
- Knapczyk-Stwora K**, Sternak M, Durlej M, Slomczynska M. Immunolocalization of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/c17-20 lyase in the ovary of pregnant pigs and fetal gonads. *Reprod Biol* 2011; 11(2): 71-82.
- Knapczyk-Stwora K**, Grzesiak M, Slomczynska M. In utero exposure to the anti-androgen flutamide influences connexin 43 and β -catenin expression in porcine fetal gonads. *Domest Anim Endocrinol* 2013; 44: 185-194.
- Lickert H**, Bauer A, Kemler R, Stappert J. Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/ β -catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 2000; 275: 5090-5095.
- Magnusson U**. Can farm animals help to study endocrine disruption? *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29: 430-435.
- Payne AH**, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004; 25(6): 947-970.
- Roy L**, McDonald CA, Jiang C, Maroni D, Zeleznik AJ, Wyatt TA, Hou X, Davis JS. Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 β /beta-catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis. *Endocrinology* 2009; 150(11): 5036-5045.
- Seo KS**, Naidansuren P, Kim SH, et al. Expression of aldo-keto reductase family 1 member C1 (AKR1C1) gene in porcine ovary and uterine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9(1): 139.
- Shirasuna K**, Watanabe S, Nagai K, Sasahara K, Shimizu T, Ricken AM, Spänel-Borowski K, Miyamoto A. Expression of mRNA for cell adhesion molecules in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and PGF $_{2\alpha}$ -induced luteolysis. *J Reprod Dev* 2007; 53: 1319-1328.
- Stappert J**, Kemler R. A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. *Cell Adhes Commun* 1994; 2: 319-327.
- Stocco C**, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 2007; 28: 117-149.

Sugino N, Okuda K. Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *J Reprod Dev* 2007; 53: 977-986.

Taverne MAM. Corpus luteum function and parturition in cattle and pigs. *Arch Tierz Dummerstorf* 2001; 44: 37-50.

Tevell A, Lennernas H, Jonsson M, Norlin M, Lennernas B, Bondesson U, Hedeland M. Flutamide metabolism in four different species in vitro and identification of flutamide metabolites in human patient urine by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 982-992.

Thordarson G, Galosy S, Gundmundsson GO, Newcomer B, Sridaran R, Talamantes F. Interaction of mouse placental lactogens and androgens in regulating progesterone release in cultured mouse luteal cells. *Endocrinology* 1997; 138: 3236-3241.

Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B, Sun Z. Linking β -catenin to androgen-signaling pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 11336-11344.

Waclawik A, Rivero-Muller A, Blitek A, Kaczmarek MM, Brokken LJ, Watanabe K, Rahman NA, Ziecik AJ. Molecular cloning and spatiotemporal expression of prostaglandin F synthase and microsomal prostaglandin E synthase-1 in porcine endometrium. *Endocrinology* 2006; 147: 210-221.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Główny obszar moich zainteresowań naukowych, począwszy od studiów magisterskich, poprzez studia doktoranckie, po aktualnie realizowane projekty, dotyczy hormonalnej regulacji funkcjonowania żeńskiego układu rozrodczego. Szczególnie interesującym mnie zagadnieniem jest wpływ androgenów na funkcje gonady żeńskiej świni podczas cyklu płciowego oraz ciąży.

W trakcie studiów magisterskich (kierunek Biologia) na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (BiNoZ) Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (UJ) związałam się z Zakładem Endokrynologii, kierowanym przez prof. dr hab. Barbarę Bilińską. Podczas ostatnich lat studiów uczestniczyłam w badaniach dotyczących wpływu transferyny, białka transportującego żelazo, na aktywność cytochromu P450 aromatazy w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni *in vitro*, koordynowanych przez mojego promotora - dr hab. Małgorzatę Dudę. Rezultatem prowadzonych doświadczeń była praca magisterska pt. *Wpływ transferyny na aktywność aromatazy w hodowli komórek warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego świni* oraz oryginalna praca badawcza: **Durlej i wsp. 2008, zał. 3, poz. II.A.1.**

Po ukończeniu z wyróżnieniem studiów magisterskich i obronie pracy magisterskiej, rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale BiNoZ UJ (2007-2011), kontynuując tym samym pracę naukową w Zakładzie Endokrynologii UJ. W ramach pracy doktorskiej zajmowałam się znaczeniem androgenów w regulacji funkcji jajnika świni. Podjęta tematyka znajduje silne uzasadnienie ze

względu na stale wzrastającą obecność środowiskowych czynników zaburzających procesy endokrynne (EDCs, ang. *endocrine disrupting chemicals*) o potencjale androgennym i/lub antyandrogennym oraz udział zarówno nadmiaru, jak i niedoboru androgenów w patogenezie zaburzeń rozrodu ludzi i zwierząt. Przeprowadzone doświadczenia polegały na eksperymentalnym indukowaniu niedoboru androgenów poprzez zastosowanie flutamidu, specyficznego blokera AR. Badania te realizowałam w ramach przyznanego mi na lata 2009-2011 grantu promotorskiego MNiSW pt. *Rola androgenów w regulacji funkcji jajnika świni w okresie neonatalnym i postnatalnym* (N303 017737) oraz częściowo z projektu badawczego MNiSW kierowanego przez prof. dr hab. Barbarę Bilińską pt. *Rola androgenów w regulacji ekspresji genu koneksyny 43 w tkankach reprodukcyjnych świni w okresie neonatalnym oraz przed i po uzyskaniu dojrzałości płciowej* (N303 339835). Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, że ekspozycja na flutamid w okresie płodowym i neonatalnym ma ogromny wpływ na rozwój i funkcje jajnika świni w życiu postnatalnym. Niedobór androgenów prowadził do dysfunkcji jajników po osiągnięciu dojrzałości płciowej, która objawiała się zaburzoną równowagą pomiędzy proliferacją a apoptozą w pęcherzyku jajnikowym, nadprodukcją estradiolu i niedoborem androgenów, niekompletną luteinizacją, pojawieniem się ciałek żółtych o charakterze cyst oraz obniżoną produkcją progesteronu przez ciała żółte. Wyniki powyższych badań prezentowałam na konferencjach zagranicznych (m.in. *5th International Conference on the Female Reproductive Tract*, Frauenchiemsee, Niemcy, 2009 oraz *14th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer*, Edynburg, Szkocja, 2010) i krajowych (m.in. *Endocrinology of Reproduction, II Polish-French Symposium*, Kraków, 2009) oraz opublikowałam w renomowanych czasopismach w cyklu oryginalnych publikacji: **Durlej i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.7; Durlej i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.9; Durlej i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.10; Durlej i wsp. 2012, zał. 3, poz. II.A.16; Durlej i wsp. 2012, zał. 3, poz. II.A.18; Grzesiak i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.21; Grzesiak i wsp. 2016, zał. 3, poz. II.A.33**. Ponadto znalazły one uznanie wśród krajowego grona specjalistów z zakresu biologii rozrodu, czego dowodem było przyznanie mi w 2010 roku nagrody za najlepszą prezentację naukową podczas *II Zimowej Szkoły Towarzystwa Biologii Rozrodu*. Stanowiły one również podstawę mojej rozprawy doktorskiej pt. *Rola androgenów w regulacji funkcji jajnika świni w okresie neonatalnym i postnatalnym*, przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Słomczyńskiej. Publiczna obrona mojej rozprawy doktorskiej odbyła się 26 września 2011, a stopień doktora nauk biologicznych został mi nadany 18 października 2011 decyzją Rady Wydziału BiNoZ UJ. Rozprawa doktorska została wyróżniona nagrodą JM Rektora UJ.

Równoległe z realizacją badań dotyczących mojej pracy doktorskiej, zostałam włączona w prace doświadczałne prowadzone przez Pracowników Zakładu Endokrynologii UJ. Uczestniczyłam w badaniach koordynowanych przez prof. dr hab. Marię Słomczyńską, które były poświęcone roli

estrogenów wczesnych etapów steroidogenezy w układzie reprodukcyjnym ciężarnej świnii i rozwijającego się płodu. Wykazały one różnorodną ekspresję i dystrybucję receptorów estrogenowych (ER) α i β w jajniku i macicy ciężarnej świnii, a także obecność enzymu szlaku steroidogenezy - CYP17A1 - w jajniku ciężarnej świnii oraz w płodowych gonadach. W tym czasie byłam wykonawcą grantu wewnętrznego Wydziału BiNoZ UJ pt. *Immunolokalizacja receptorów estrogenowych (ER α i ER β) w macicy ciężarnej świnii* (BW/IZ/36A/2008, kierownik: dr hab. Katarzyna Knapczyk-Stwora). Ponadto wykonywałam analizy dotyczące ekspresji obu typów receptora progesteronowego (PGR α i PGR β) w jajniku świnii. W ramach tych badań jestem współautorką czterech oryginalnych publikacji: **Knapczyk i wsp. 2008, zał. 3, poz. II.A.2; Durlej i wsp. 2010, zał. 3, poz. II.A.5; Knapczyk-Stwora i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.6; Knapczyk-Stwora i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.12** oraz doniesień konferencyjnych (m.in. na *The Society for Reproduction and Fertility Conference and Exhibition*, Edynburg, Szkocja, 2008 i *VIIIth International Conference on Pig Reproduction*, Banff, Kanada, 2009). W latach 2008-2011 byłam wykonawcą w projekcie kierowanym przez prof. dr hab. Barbarę Bilińską, z którego - dzięki uprzejmości Pani Profesor - pochodził materiał do mojej pracy doktorskiej. Przeprowadzone badania dotyczyły wpływu prenatalnego i neonatalnego podawania anty-androgenu flutamidu na ekspresję koneksyny 43, ważnego białka połączeń szczelinowych, zarówno w gonadzie męskiej, jak i żeńskiej świnii na kolejnych etapach rozwoju postnatalnego, aż do uzyskania dojrzałości płciowej. Rezultatem tych prac było wykazanie istotnego wpływu zablokowania sygnalizacji androgenowej na ekspresję koneksyny 43 w jądrze i jajniku świnii. Największe zaburzenia obserwowano dopiero w gonadach zwierząt dorosłych, co świadczy o odległych efektach ograniczenia działania androgenów prowadzących do zaburzeń funkcji reprodukcyjnych. Efektem mojego udziału w tych pracach jest współautorstwo czterech oryginalnych artykułów: **Kopera i wsp. 2010, zał. 3, poz. II.A.4; Durlej i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.7; Durlej i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.10; Kopera i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.11**, a także licznych doniesień konferencyjnych (m.in. na *XIIIth International Congress of Endocrinology*, Rio de Janeiro, Brazylia, 2008, *1st Symposium of the Clinical Research Unit 181. Molecular Andrology*, Gissen, Niemcy, 2009 oraz *16th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis*, La Biodola, Elba, 2010). Materiał zgromadzony w ramach powyższego grantu umożliwił przeprowadzenie dodatkowych doświadczeń, w których wykazaliśmy, że prenatalna ekspozycja na flutamid wpływa również na rozwój macicy u neonatalnych i 3-miesięcznych świń, co może zaburzać jej funkcjonowanie w okresie dojrzałości płciowej. Z uzyskanych wyników przygotowano oryginalną pracę badawczą (**Knapczyk-Stwora i wsp. 2011, zał. 3, poz. II.A.8**). Uczestniczyłam także w badaniach koordynowanych przez prof. dr hab. Marię Szołtyś polegających na immunolokalizacji receptora androgenowego i enzymów steroidogennych w jajnikach niedojrzałych płciowo szczurów oraz

w komórkach ziarnistych wzgórka jajonośnego szczurów dojrzałych płciowo (**Szołtys i wsp. 2010, zał. 3, poz. II.A.3; Galas i wsp. 2012, zał. 3, poz. II.A.13**).

W roku 2009 zostałam laureatką stypendium im. Florentyny Kogutowskiej dla doktorantów UJ na badania zagraniczne i odbyłam trzymiesięczny staż w School of Biosciences i School of Veterinary Medicine and Science na Uniwersytecie w Nottingham (Wielka Brytania). Współpracując z Profesorem Martinem R. Luckiem oraz Profesorem Ali Mobasheri, poznałam technikę oceny wrażliwości osmotycznej komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego krowy oraz zainteresowałam się akwaporynami – białkami budującymi kanały wodne. W rezultacie zmodyfikowałam i zaadaptowałam powyższą metodę dla komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego świni, a następnie wykonałam doświadczenie, które po raz pierwszy wykazało zwiększony transport wody przez błonę izolowanych komórek ziarnistych świni pod wpływem testosteronu i znoszenie tego efektu w obecności anty-androgeny 2-hydroxyflutamidu. Sugeruje to bezpośrednią androgenozależną regulację aktywności akwaporyn. Wyniki badań przeprowadzonych we współpracy z Profesorem Luckiem i Profesorem Mobasheri zostały włączone do mojej rozprawy doktorskiej, a także opublikowane w dwóch pracach badawczych: **Grzesiak i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.21; Grzesiak i wsp. 2016, zał. 3, poz. II.A.33**. Otrzymane rezultaty prezentowałam na konferencji krajowej (VI Zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu, Polańczyk, 2011) i zagranicznej (7th Biennial Conference of the UK Fertility Societies "Fertility 2011", Dublin, Irlandia, 2011). Ponadto w czasie studiów doktoranckich zostałam nagrodzona Małopolskim Stypendium Doktoranckim (2009), Nagrodą Dziekana Wydziału BiNoZ dla wyróżniających się doktorantów za szczególny dorobek naukowy (2009) oraz Stypendium START dla młodych naukowców Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (2011).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, w listopadzie 2011 roku odbyłam kolejny staż naukowy w laboratorium Profesora Lucka na Uniwersytecie w Nottingham. Podczas tego pobytu kontynuowałam nawiązaną dotychczas współpracę i realizowałam badania dotyczące znaczenia akwaporyn w jajniku różnych gatunków zwierząt w ramach grantu akademickiego pt. *Rola akwaporyn w rozwoju pęcherzyka jajnikowego* (kierownik Prof. Martin R. Luck), którego byłam wykonawcą. Moja dalsza współpraca z Profesorem Mobasheri (aktualnie Uniwersytet w Surrey) zaowocowała natomiast badaniami nad ekspresją akwaporyny 5 w przedowulacyjnych wzgórkach jajonośnych szczura, które wykonywałam wspólnie z dr Agnieszką Starowicz, ówczesną doktorantką prof. dr hab. Marii Szołtys (Zakład Endokrynologii UJ). Wyniki zostały opublikowane w postaci artykułu: **Starowicz i wsp. 2014, zał. 3, poz. II.A.27**.

W okresie od lutego 2012 do stycznia 2014 roku byłam zatrudniona w Zakładzie Endokrynologii UJ na stanowisku asystenta naukowego w ramach otrzymanego przeze mnie stypendium dla młodych doktorów z projektu „Społeczeństwo-Technologie-Środowisko” finansowanego przez Unię Europejską. Początkowo tematyka moich badań była kontynuacją wcześniejszych zagadnień dotyczących wpływu zablokowania AR flutamidem na funkcjonowanie jajnika świni. W ramach kierowanego przeze mnie grantu wewnętrznego Wydziału BiNoZ UJ pt. *Czy prenatalne i neonatalne zastosowanie flutamidu wpływa na syntezę estradiolu w pęcherzykach jajnikowych dojrzałych płciowo świń? – analiza ekspresji genów CTNNB1 i CYP19A1* (DS/MND/WBiNoZ/IZ/3/2012) wykazałam nadprodukcję estradiolu w pęcherzyku jajnikowym dojrzałej płciowo świni po prenatalnym i neonatalnym zastosowaniu anty-androgeny. Korelowała ona ze wzrostem ekspresji CYP19A1 i receptora FSH, co wskazuje na zwiększoną aromatyzację. Jednocześnie badałam udział białka β -kateniny jako czynnika transkrypcyjnego w tej regulacji, które okazało się być jedynie zaangażowane w komunikację międzykomórkową (**Grzesiak i wsp. 2012, zał. 3, poz. II.A.17**). Będąc wykonawcą projektu MNiSW pt. *Genomowe i pozagenomowe działanie androgenów w pęcherzyku jajnikowym świni - badania in vitro* (N303 538838) kierowanego przez dr hab. Małgorzatę Dudę, uczestniczyłam w doświadczeniach prowadzonych z zastosowaniem hodowli pierwotnych komórek ziarnistych *in vitro* oraz hodowli narządowych całych pęcherzyków jajnikowych świni w obecności agonisty AR (testosteron) lub/i antagonisty AR (2-hydroxyflutamid, metabolit flutamidu). Badania te dowiodły kluczowej roli androgenów w procesie apoptozy oraz regulacji ekspresji receptora androgenowego, progesteronowego i enzymów szlaku steroidogenezy w pęcherzyku jajnikowym świni. Wśród uzyskanych wyników na szczególną uwagę zasługuje obserwacja, że anty-androgen hamuje jądrową translokację AR, co manifestuje się cytoplazmatyczną i okołojądrową lokalizacją AR w komórkach ziarnistych, a w konsekwencji daje możliwość włączenia pozagenomowego mechanizmu działania androgenów. Efektem mojego udziału w tych badaniach jest współautorstwo czterech prac oryginalnych: **Duda i wsp. 2012, zał. 3, poz. II.A.14; Duda i wsp. 2012, zał. 3, poz. II.A.15; Duda i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.20; Duda i wsp. 2014, zał. 3, poz. II.A.28**.

Rezultaty dotychczasowych badań, które wykazały istotny wpływ zaburzenia poziomu androgenów w okresie prenatalnym na rozwój i funkcjonowanie jajnika świni po uzyskaniu dojrzałości płciowej, przyczyniły się do podjęcia dalszych szczegółowych prac badawczych. Postawiliśmy pytanie, które okresy rozwoju płodowego jajnika świni są najbardziej wrażliwe na niedobór androgenów, a tym samym najbardziej krytyczne dla całej folikulogenezy. Będąc wykonawcą projektu badawczego finansowanego przez MNiSW: *Molekularne podstawy rozwoju jajnika świni po zastosowaniu antyandrogeny (flutamidu) w okresie życia płodowego* (N303 596539, kierownik prof. dr hab. Maria Słomczyńska) brałam udział w pracach, które wykazały opóźnienie

folikulogenezy oraz rekrutacji pęcherzyków pierwotnych do dalszego wzrostu w płodowym jajniku świni po zastosowaniu antyandrogeny w późnej ciąży oraz w okresie okołoporodowym. Przyczyną obserwowanych zmian było zakłócenie równowagi pomiędzy apoptozą i proliferacją komórek płodowego jajnika oraz wzrost ekspresji E-kadheryny, opóźniających rozpad gniazd i tworzenie pęcherzyków pierwotnych. Natomiast zahamowanie tranzycji pęcherzyków pierwotnych do pierwszorzędowych było rezultatem zaburzenia ekspresji układów KL/c-Kit i IGF1/IGF1R oraz ekspresji czynników należących do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu typu β i ich receptorów. Wyniki opublikowano w trzech oryginalnych artykułach: ***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.23; Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.24; Knapczyk-Stwora i wsp. 2014, zał. 3, poz. II.A.30.*** Ponadto uczestniczyłam w pracach dotyczących wpływu prenatalnego podania anty-androgeny flutamidu na funkcjonowanie płodowych gonad świni jako wykonawca projektu MNiSW pt. *Wpływ antyandrogeny (flutamidu) na ekspresję wybranych białek połączeń szczelinowych oraz enzymów szlaku steroidogenezy w płodowych gonadach świni* (IP2011 024571, kierownik dr hab. Katarzyna Knapczyk-Stwora). Prowadziłam badania nad ekspresją i lokalizacją koneksyny 43 oraz β -kateniny w płodowych jajnikach oraz jądrach świni po zastosowaniu flutamidu. Przeprowadzone doświadczenia, będące kontynuacją wcześniejszych prac (***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.19***), wykazały zaburzoną ekspresję powyższych białek w płodowych gonadach, sugerując tym samym zakłócenie oddziaływań międzykomórkowych. Dodatkowo wykazaliśmy istotną rolę androgenów w regulacji ekspresji enzymów steroidogennych zaangażowanych w ich syntezę, a co za tym idzie w lokalną produkcję androgenów w płodowych gonadach świni. W związku z najnowszymi doniesieniami sugerującymi, iż androgeny mogą zwiększać ekspresję genów związanych z syntezą miRNA, w tym również enzymu Dicer1, podjęliśmy kolejne prace mające na celu wyjaśnienie czy opisane powyżej zmiany w ekspresji genów w warunkach ograniczonego działania androgenów mogą być związane z zaburzoną biogenezą miRNA. Obserwacje zmiany ekspresji Dicer1 w płodowych gonadach świni po podaniu antyandrogeny potwierdziło naszą hipotezę o wpływie androgenów na biogenezę miRNA oraz potranskrypcyjną regulację ekspresji genów. Efektem mojego udziału w tych badaniach jest współautorstwo trzech prac oryginalnych: ***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.25; Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.29; Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.32*** oraz artykułu przeglądowego: ***Knapczyk-Stwora i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.D.35.***

Realizacja powyższych tematów badawczych skłoniła mnie do zainteresowania się udziałem androgenów w regulacji przebiegu ciąży u świni. W swoich pracach skoncentrowałam się na funkcjonowaniu ciała żółtego ciążowego świni w warunkach ograniczonego działania androgenów, co stanowi główny nurt moich zainteresowań naukowych oraz podstawę osiągnięcia naukowego prezentowanego w pierwszej części niniejszego autoreferatu. Badania zrealizowałam w ramach

dwóch kierowanych przeze mnie projektów badawczych: *Molekularne podstawy funkcjonowania ciała żółtego ciężarowego świni w warunkach doświadczalnego ograniczenia działania androgenów – badania in vivo* (grant NCN, 2011/03/D/NZ4/00303) oraz *Określenie udziału procesów apoptozy i autofagii w regresji ciała żółtego ciężarowego świni – wpływ ograniczonego działania androgenów* (grant MNiSW, IP2014 014373). Poza publikacjami stanowiącymi osiągnięcie naukowe, w ramach pierwszego grantu powstała również praca popularnonaukowa: **Mitan i Grzesiak 2015, zał. 3, poz. II.D.37**. Prowadziłam także badania dotyczące wpływu flutamidu na ekspresję AR i koneksyny 43 w łożysku i macicy ciężarnej świni (**Wieciech i wsp. 2013, zał. 3, poz. II.A.22; Wieciech i wsp. 2014, zał. 3, poz. II.A.31**). W ramach kierowanego przeze mnie grantu wewnętrznego Wydziału BiNoZ UJ pt. *Wpływ prenatalnego podania antyandrogenu na ekspresję 20 α -HSD w łożysku świni - rola w biologicznej inaktywacji progesteronu czy nowy mechanizm hormonalnej regulacji ciąży?* (DS/MND/WBiNoZ/IZ/2/2013) wykonałam analizę ekspresji enzymu dehydrogenazy 20 α -hydroksysteroidowej w łożysku świni po zastosowaniu antyandrogenu, których rezultatem był oryginalny artykuł: **Grzesiak i wsp. 2014, zał. 3, poz. II.A.26** oraz praca przeglądowa podsumowująca aktualną wiedzę na temat ekspresji oraz fizjologicznej roli dehydrogenazy 20 α -hydroksysteroidowej w tkankach matki oraz płodu podczas ciąży (**Grzesiak i wsp. 2014, zał. 3, poz. II.D.36**). Pragnę podkreślić, że uzyskanie materiału od ciężarnych świń było możliwe dzięki współpracy prof. dr hab. Marii Słomczyńskiej z prof. dr hab. Markiem Koziorowskim z Pozawydziałowego Instytutu Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych Uniwersytetu Rzeszowskiego, która umożliwiła realizację doświadczeń dotyczących funkcjonowania płodowych gonad i układu rozrodczego ciężarnej świni w warunkach ograniczonego działania androgenów. Moja dalsza współpraca z zespołem Profesora Koziorowskiego zaowocowała współautorską publikacją naukową: **Tabęcka-Łonczyńska i wsp. 2016, zał. 3, poz. II.A.34**.

W okresie od 14 kwietnia 2014 do 28 lutego 2015 roku byłam zatrudniona w Zakładzie Endokrynologii UJ na stanowisku adiunkta naukowego w projekcie NCN pt. *Molekularne podstawy wczesnych etapów folikulogenezy u świni: aspekty komórkowe i biotechnologiczne - badania in vitro* (2013/09/B/NZ9/00226, kierownik dr hab. Małgorzata Duda). Realizowałam zadania badawcze polegające na izolacji pęcherzyków pierwotnych z tkanki jajnika świni, których efektem jest moje współautorstwo rozdziału w książce: **Duda i wsp. 2016, zał. 3, poz. II.E.1**. Uzyskane wyniki prezentowane były także na forum międzynarodowym (*World Congress of Reproductive Biology*, Edynburg, Szkocja, 2014) i krajowym (*XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików*, Międzyzdroje, 2015).

W listopadzie 2014 roku związałam się z Katedrą Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt (HiBZ) Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (UR). Początkowo byłam

zatrudniona na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego, a od kwietnia 2016 na stanowisku adiunkta. Włączyłam się w prace badawcze Katedry i aktualnie jestem wykonawcą projektu OPUS 8 pt. *Molekularny mechanizm działania wybranych nitrofenoli w jajniku kury (Gallus domesticus)* (2014/15/B/NZ9/01986) kierowanego przez prof. dr hab. Andrzeja Sechmana. Dotyczy on wpływu nitrofenoli (4-nitrofenolu i 3-metylo-4-nitrofenolu), powstających podczas pracy silników diesla i emitowanych do atmosfery, na funkcje steroidogenne jajnika kury. Uzyskane do tej pory wyniki badań zaprezentowano na dwóch konferencjach międzynarodowych (*45th Conference of ESNA*, Belgrad, Serbia, 2016 oraz *11th International Symposium on Avian Endocrinology*, Niagara, Kanada, 2016). Ponadto jestem zaangażowana w prace mające na celu wyjaśnienie mechanizmu działania nanocząsteczek srebra w jajniku kury. Otrzymane wyniki będą stanowiły przedmiot rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Katarzyńskiej-Banasik, w przewodzie której pełnię rolę promotora pomocniczego. Pracując w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii UR realizuję także swoje dotychczasowe zainteresowania badawcze. Jako kierownik grantu wewnętrznego Wydziału HiBZ UR finansowanego ze środków MNiSW na działalność statutową pt. *Rola metaloproteinaz (MMPs) w regresji ciątka żółtego ciężowego świni po zastosowaniu antyandrogenu* (BM-4255) badałam udział metaloproteinazy 2 i 9 oraz ich tkankowych inhibitorów 1 i 2 w przebudowie tkanki lutealnej po zastosowaniu flutamidu, a uzyskane wyniki zaprezentowałam w postaci prezentacji ustnej na *III Warsztatach Naukowych "Fizjologiczna regulacja procesów rozrodu i laktacji oraz skład i rola mleka matki"* (Jabłonna 2016). Kontynuując współpracę z Zakładem Endokrynologii UJ, aktualnie jestem wykonawcą w dwóch projektach badawczych finansowanych przez NCN: *Molekularne aspekty działania związków o aktywności hormonalnej na proces folikulogenezy w neonatalnym jajniku świni* (OPUS 9, numer projektu 2015/17/B/NZ9/01457, kierownik prof. dr hab. Maria Słomczyńska) oraz *Wpływ neonatalnej ekspozycji na związki o aktywności hormonalnej na funkcjonowanie jajnika świni w okresie dojrzałości płciowej - aspekty molekularne i epigenetyczne* (OPUS 10, numer projektu 2015/19/B/NZ9/00420, kierownik dr hab. Katarzyna Knapczyk-Stwora).

Najbardziej aktualny obszar moich zainteresowań badawczych stanowi tematyka dotycząca roli witaminy D₃ w regulacji funkcji żeńskiego układu rozrodczego. Badania te realizuję w ramach przyznanego mi projektu Ośrodka Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej (OMEiI) Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR pt. *Określenie roli witaminy D₃ w regulacji funkcji macicy świni - nowy model w badaniach fizjologii i patologii macicy* (30/99/003). Doskonaląc swój warsztat metodyczny odbyłam dwa staże szkoleniowe w Katedrze Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego oraz Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Poznałam technikę przygotowywania skrawków macicy do inkubacji oraz metodę hodowli *in vitro* komórek

endometrium macicy świni. Nabyte umiejętności oraz współpraca nawiązana z prof. dr hab. Anitą Franczak (Katedrze Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego) umożliwią mi realizację podjętych zadań badawczych.

Podsumowując, moja dotychczasowa praca naukowa była realizowana w ramach projektów badawczych finansowanych przez NCN, MNiSW oraz ze środków na działalność statutową. Kierowałam 1 projektem SONATA finansowanym przez NCN, 1 projektem "Iuventus Plus" finansowanym przez MNiSW oraz 3 projektami wewnętrznymi finansowanymi ze środków MNiSW na działalność statutową (2 na WBiNoZ UJ i 1 na WHiBZ UR). Byłam wykonawcą w 7 projektach krajowych (5 MNiSW, 1 NCN, 1 na działalność statutową) i 1 zagranicznym (kierownik Prof. Martin R. Luck) oraz laureatką europejskiego projektu „Społeczeństwo-Technologie-Środowisko”. Obecnie jestem kierownikiem projektu dla młodych pracowników naukowych Uniwersytetu Jagiellońskiego i Uniwersytetu Rolniczego realizowanego w Ośrodku OMEil Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR, a także wykonawcą w 3 projektach NCN (OPUS).

Wyniki moich badań zostały opublikowane w **39** pracach oryginalnych w czasopismach z listy JCR (Lista A MNiSW), **2** polskojęzycznych pracach przeglądowych, **1** popularnonaukowej i **1** rozdziale w książce. Spośród tych prac 31 pozycji ukazało się po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. Ponadto wyniki moich badań zostały zaprezentowane w postaci **87** doniesień konferencyjnych w kraju (29) i za granicą (58). Sumaryczny współczynnik wpływu Impact Factor moich publikacji wg bazy JCR (zgodnie z rokiem ukazania się publikacji) wynosi **65.214**; łączna punktacja wg wykazu czasopism naukowych MNiSW (z 09.12.2016 r.) wynosi **907 pkt**; sumaryczna liczba cytowań wg *Web of Science*TM (bez autocytowań) wynosi **142**; a Indeks Hirscha równy jest **9** (dane z 26.05.2017).

Od 2012 roku jestem recenzentką prac nadsyłanych do redakcji polskich i międzynarodowych czasopism naukowych (*Reproduction, Reproduction in Domestic Animals, Animal Reproduction Science, Theriogenology, Reproductive Biology and Endocrinology, General and Comparative Endocrinology, Histology and Histopathology, Reproduction Fertility and Development, Endocrine Connections, Experimental Biology and Medicine, Acta Histochemica, Histochemistry and Cell Biology, Current Molecular Pharmacology, Journal of Histology, Episteme*). Wykonałam łącznie recenzje 22 manuskryptów. Jestem członkiem Rady Naukowej czasopisma *Endocrine Connections*. Byłam i jestem członkiem towarzystw naukowych: Society of Reproduction and Fertility (SRF), European Society of Endocrinology (ESE), Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR), Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (PTHC), Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki (PTBK) oraz Komisji Endokrynologii przy Komitecie Biologii Rozrodu PAN.

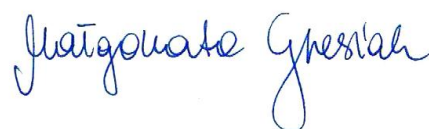
W uznaniu szczególnych osiągnięć w pracy naukowej zostałam kilkakrotnie nagrodzona m.in. stypendium im. Florentyny Kogutowskiej Funduszu Stypendialnego UJ dla doktorantów UJ na badania zagraniczne, stypendium START dla młodych uczonych Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Dwukrotnie zostałam nagrodzona nagrodą zespołową JM Rektora UJ za publikacje naukowe. Otrzymałam również nagrodę za zajęcie I miejsca w konkursie na najlepszą prezentację pracy naukowej na II Zimowej Szkole TBR.

Do moich obowiązków oprócz pracy naukowej należy również działalność dydaktyczna. W latach 2007-2011 prowadziłam ćwiczenia w ramach kursów Endokrynologia Ogólna i Fizjologiczne Techniki Badań dla studentów kierunku Biologia WBiNoZ UJ, a w latach 2012-2014 prowadziłam zajęcia z kursu Biologia dla kierunku Weterynaria Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR. Od momentu zatrudnienia na Uniwersytecie Rolniczym prowadzę zajęcia dydaktyczne (ćwiczenia i wykłady) w wymiarze godzin przekraczającym pensum ze studentami kierunków Biologia, Zootechnika, Bioinżynieria zwierząt i Rybactwo śródlądowe i ochrona środowiska wodnego WHiBZ UR, kierunku Biotechnologia WBiO UR oraz kierunku Weterynaria Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR. Jestem aktualnie koordynatorem dwóch przedmiotów (Endokrynologia ogólna i Analiza instrumentalna), dla których samodzielnie opracowałam treści programowe. W roku akademickim 2014/2015 prowadziłam ćwiczenia w języku angielskim dla studentów programu ERASMUS w ramach kursu Application of Isotopes and Antibodies in Biology and Medicine. Byłam promotorem 6 zakończonych prac inżynierskich i 2 magisterskich. Kolejna praca inżynierska i magisterska są w trakcie realizacji. Jestem również promotorem pomocniczym w otwartym przewodzie doktorskim. Pod moją opieką naukową pracowała magistrantka Zakładu Endokrynologii UJ, z którą przygotowałam pracę popularnonaukową opublikowaną w czasopiśmie *Kosmos*. Kolejne 2 prace popularnonaukowe przygotowane we współpracy ze studentami zostały zaakceptowane do druku w czasopiśmie *Kosmos* i będą opublikowane w czerwcu oraz wrześniu 2017 roku. Pierwsza z nich dotyczy wykorzystania jajnika kury domowej (*Gallus domesticus*) w badaniach procesu nowotworzenia (*Konieczny i Grzesiak*), natomiast druga opisuje rolę witaminy D₃ i jej receptora w żeńskim układzie rozrodczym (*Herian i Grzesiak*). Wykonałam recenzje 3 prac magisterskich oraz 3 inżynierskich.

W ramach działalności organizacyjnej na Uniwersytecie Rolniczym jestem członkiem Zespołu Doradczego ds. Dobrostanu Zwierząt przy WHiBZ UR, a także jestem opiekunem Sekcji Biologów i Bioinżynierów Studenckiego Koła Naukowego Biologów przy WHiBZ UR. W obu moich dotychczasowych miejscach pracy zdobywałam doświadczenie w zakresie popularyzacji nauki uczestnicząc aktywnie w pokazach i zajęciach organizowanych w ramach Festiwalu Nauki oraz Małopolskiej Nocy Naukowców. Przygotowałam i prowadziłam również warsztaty „Od komórki do

narządu” dla uczniów Zespołu Szkół nr 5 im. Józefa Rymera w Rybniku. Wygłosiłam dwa wykłady otwarte na zebraniach naukowych Krakowskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (16 listopada 2015) oraz Olsztyńskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (7 lipca 2016).

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” (ZAŁĄCZNIK 3).



dr Małgorzata Grzesiak

Kraków, dn. 29.05.2017 r.