

dr Magdalena Karolina Kowalik

Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk

ul. Tuwima 10

10-748 Olsztyn

ZAŁĄCZNIK II

Autoreferat

Ekspresja i lokalizacja błonowych receptorów progesteronu w układzie rozrodczym krowy (*Bos taurus*)

Olsztyn 2019

1. Dane personalne

Imię i nazwisko **Magdalena Karolina Kowalik (z domu Duras)**

Miejsce pracy Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk
ul. Tuwima 10
10-748 Olsztyn

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2008 - doktor nauk biologicznych, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Mechanizm oddziaływania steroidów jajnikowych na komórki układu rodnego krowy: wpływ genomowy i pozagenomowy”*

Praca wykonana w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu IRZiBŻ PAN, promotor: prof. dr hab. Jan Kotwica.

Rozprawa doktorska wyróżniona Nagrodą Prezesa Rady Ministrów spośród prac doktorskich obronionych w roku 2008 oraz wyróżniona przez Dyrektora Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

2002 - magister biotechnologii: Wydział Biologii, kierunek biotechnologia, specjalność biotechnologia zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Tytuł pracy magisterskiej: *„Wpływ oksytocyny na komórki lutealne świń -badanie sekrecji progesteronu, stężenia fosforanów inozytoli oraz mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} ”*.

Praca wykonana w Katedrze Fizjologii Zwierząt, promotor: dr. hab. Genowefa Kotwica, prof. UWM, dyplom ukończenia studiów z wyróżnieniem.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

2002- 2008 - asystent

Zakład Endokrynologii Rozrodu Bydła (obecnie Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu), Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

od 01.10.2008 - obecnie – adiunkt

Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Urlopy macierzyńskie 18.12.2007-20.04.2008 i 08.04.2011-25.08.2011 (łącznie 8 miesięcy)

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

A) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą złożonego wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego jest cykl publikacji przedstawionych pod wspólnym tytułem:

**„Ekspresja i lokalizacja błonowych receptorów progesteronu
w układzie rozrodczym krowy (*Bos taurus*)”**

B) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Kowalik M.K.**, Slonina D., Rekawiecki R., Kotwica J. (2013) *Expression of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1) and nuclear progesterone receptor (PGR) in the bovine endometrium during the oestrous cycle and the first trimester of pregnancy. Reproductive Biology* 13 (1): 15-23.

IF₂₀₁₃=1,048, punkty MNiSW₂₀₁₃= 15, cytowania 23, bez autocytowań 16

2. **Kowalik M.K.**, Rekawiecki R., Kotwica J. (2014) *Expression and localization of progesterone receptor membrane component (PGRMC)1 and 2 and serpine MRNA binding protein 1 (SERBP1) in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. Theriogenology* 82(8):1086-1093.

IF₂₀₁₄=1,798, punkty MNiSW₂₀₁₄ =30, cytowania 3, bez autocytowań 1

3. **Kowalik M.K.**, Martyniak M., Rekawiecki R., Kotwica J. (2016) *Expression and immunolocalization of membrane progesterone receptors in the bovine oviduct. Domestic Animal Endocrinology* 55:83-96

IF₂₀₁₆=1,644, punkty MNiSW₂₀₁₆= 30, cytowania 6, bez autocytowań 5

4. **Kowalik M.K.**, Rekawiecki R., Kotwica J. (2018) *Membrane progestin receptors (mPRs) in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and first trimester of pregnancy. Domestic Animal Endocrinology* 63: 69-76.

IF₂₀₁₇= 1,937, punkty MNiSW₂₀₁₈ = 30, cytowania 0

IF podano zgodnie z rokiem opublikowania, punkty MNiSW podano zgodnie z listą, która obowiązywała w czasie opublikowania czasopisma. Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład zamieszczono w Załączniku V.

Łącznie dla w/w cyklu publikacji:

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF -*Impact factor*) zgodnie z rokiem opublikowania - **6,427**

Sumaryczna ilość punktów MNiSW zgodnie z odpowiednimi wykazami MNiSW = **105**

Sumaryczna ilość punktów MNiSW według obecnie obowiązującej listy z roku 2017=**110**

Liczba cytowań (bez autocytowań) = **22**

Prace finansowane były w ramach następujących projektów, w których byłam kierownikiem:

1. projekt badawczy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N311 348237 „*Molekularny mechanizm pozagenomowego wpływu progesteronu (P4) na czynność komórek macicy i jajnika krwi podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży: udział błonowego receptora P4 i białkowej kinazy G*” (2009-2012);
2. projekt badawczy Narodowego Centrum Nauki, projekt Opus 2012/05/B/NZA/01810 „*Rola hormonów steroidowych oraz czynników luteotropowych i luteolitycznych w regulacji ekspresji i funkcji błonowych receptorów progesteronu w układzie rodnyim krwi*” (2013-2016).

C) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

1. Wprowadzenie

Podstawę rozprawy habilitacyjnej tworzą cztery oryginalne prace badawcze opublikowane w latach 2013 – 2018, które stanowią wzbogacenie i uzupełnienie aktualnego stanu wiedzy na temat roli progesteronu (P4) w tkankach układu rodnyim krwi. Publikacje dotyczą ekspresji, lokalizacji oraz możliwej roli receptorów błonowych P4 w endometrium, ciałku żółtym oraz jajowodzie w okresie cyklu rujowego oraz w pierwszym trymestrze ciąży. Przedstawione do oceny publikacje są wynikiem badań prowadzonych w ramach dwóch projektów badawczych, wykonywanych pod moim kierunkiem i realizowanych w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

Progesteron produkowany przez ciało żółte (CL) uczestniczy w regulacji cyklicznych zmian w układzie rozrodczym samicy oraz zapewnia odpowiednie warunki dla implantacji blastocysty i rozwoju ciąży u wielu gatunków ssaków. Wpływ P4 na komórki odbywa się przez jądrowe receptory progesteronu (PGR), które należą do rodziny czynników transkrypcyjnych [Mulac-Jericevic i Conneely 2004] oraz na drodze pozagenomowej, ponieważ efekt działania hormonu pojawia się w bardzo krótkim czasie, tj. kilka sekund lub minut od jego podania i nie

jest hamowany przez inhibitory transkrypcji i translacji [Peluso 2006, Gellersen i wsp. 2009]. Sugerowany jest udział błonowych receptorów P4 w tym procesie. Progesteron łączy się ze swoim receptorem błonowym, aktywuje odpowiednie szlaki przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych i zapoczątkowuje specyficzną odpowiedź komórki [Peluso 2006, Gellersen i wsp. 2009]. Fizjologiczne znaczenie takiego oddziaływania P4 nadal nie jest w pełni wyjaśnione, jednak zidentyfikowano białka, które mogą pełnić rolę potencjalnych błonowych receptorów P4 [Peluso 2006, Gellersen i wsp. 2009]. Są to:

(a) błonowy receptor P4 - PGRMC1 (*progesterone membrane receptor component 1*) i jego homolog PGRMC2, oraz

(b) rodzina błonowych receptorów progestagenów - mPR (*membrane progesterin receptor*) α , mPR β i mPR γ .

Białko PGRMC1 i jego homolog PGRMC2 należą do rodziny białek błonowych MAPR (*membrane – associated progesterone receptor*), wymaganych w regulacji licznych funkcji biologicznych komórki [Gellersen i wsp. 2009]. Wykazano, że białko PGRMC1 może uczestniczyć w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu cholesterolu oraz w procesie steroidogenezy [Hughes et al. 2007, Rohe et al. 2009], wpływać na kurczliwość miometrium [Wu et al., 2011], odgrywać istotną rolę w dojrzewaniu oocytów [Luciano et al., 2010] oraz promować przeżycie normalnych i nowotworowych komórek jajnika w warunkach *in vitro* [Peluso et al. 2010]. Prawdopodobnym jest również, że PGRMC1 może wiązać się z innym polipeptydem – białkiem SERBP1 (*serpine mRNA binding protein 1*). Powstaje w ten sposób kompleks błonowego receptora P4, który przez aktywację białkowej kinazy G i regulację poziomu wewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺, bierze udział w antyapoptotycznym działaniu P4 w komórkach jajnika [Peluso 2006].

Dotychczas mniej jest danych o białku PGRMC2. Stwierdzono, że jest on homologiem PGRMC1, jednak sekwencja tych białek różni się w domenie transbłonowej, co wskazuje na możliwość oddziaływania z różnymi białkami [Wendler i Wehling, 2013]. Ponadto, wykazano, że białko to może brać udział w regulowaniu funkcji jajowodu [Saint-Dizier i wsp., 2012] oraz przedwczesnego porodu [Shankar i wsp., 2010].

Inną z możliwych dróg wpływu P4 na komórki jest oddziaływanie z błonowymi receptorami mPR, należącymi do rodziny białek PAQR (*progesterin and adipoQ receptors*), które mają budowę charakterystyczną dla receptorów związanych z białkami G [Zhu i wsp. 2003, Gellersen i wsp. 2009]. Początkowo zidentyfikowano trzy izoformy tego receptora kodowane przez różne geny: mPR α , mPR β , mPR γ , nazywane również PAQR7, PAQR8, PAQR5, odpowiednio [Gellersen i wsp. 2009]. U owiec ekspresję tych izoform mPRs obserwowano w tkankach układu rozrodczego oraz podwzgórz i przysadce [Ashley i wsp. 2006], zaś u kobiet w komórkach endometrium [Fernandes i wsp. 2005] oraz miometrium [Karteris i wsp. 2006], co sugeruje ich udział w regulacji funkcji rozrodczych. Wykazano, że aktywacja receptorów mPR przez P4 może hamować aktywność cyklicznej adenylanowej [Karteris i wsp. 2006] oraz produkcję cyklicznego AMP (cAMP) w komórkach, co prowadzi do aktywacji kinaz MAP [Gellersen i wsp. 2009]. Wykazano, że zmniejszenie stężenia cAMP prowadzi do hamowania procesu steroidogenezy w komórkach lutealnych u szczurów, natomiast aktywacja MAPK może być częścią mechanizmu apoptycznego w wielu komórkach

[Peluso 2006]. Możliwe zatem, że P4 działając poprzez mPR może wpływać na regresję ciała żółtego [Peluso 2006] i wzmagać również apoptozę w innych narządach. Należy zaznaczyć, że ścieżka sygnałowa zależna od kinazy MAP uczestniczy w regulacji licznych procesów komórkowych takich jak proliferacja czy apoptoza komórek, dlatego też poznanie możliwych dróg działania P4 w komórkach docelowych ma istotne znaczenie.

Należy zauważyć, że implantacja zarodka oraz utrzymanie ciąży wymagają m.in. zniesienia aktywności motorycznej macicy, bowiem ciąża może zachodzić jedynie w warunkach zupełnej atonii tego narządu. Taki stan zapewnia progesteron, dlatego prawidłowe funkcjonowanie CL i związana z tym synteza oraz sekrecja P4 kontrolują przebieg normalnego cyklu rujowego oraz rozwój ciąży. Możliwe zatem jest, że P4 oraz inne steroidy, docierając do komórki, mogą aktywować syntezę nowych białek (działanie genomowe), a równocześnie zapoczątkować szereg zmian na poziomie błony komórkowej (działanie pozagenomowe). Takie działanie hormonów steroidowych może zmieniać komórkową wrażliwość na P4 oraz inne czynniki hormonalne, a w konsekwencji ograniczyć wpływ tych hormonów na jajnik i macicę.

W badaniach prowadzonych w naszym Zespole wykazaliśmy, możliwość pozagenomowego działania P4 na czynność układu rodnej krwi [Bogacki i wsp. 2002, Duras i wsp. 2005, 2005b, Kowalik i Kotwica 2008, Kowalik et al. 2009, Słonina et al. 2009]. Ponadto, w trakcie badań wykazaliśmy obecność genu błonowego receptora P4 - PGRMC1 w komórkach nabłonka endometrium macicy (Kowalik et al. 2009) oraz w CL (Kowalik i Kotwica 2008) krwi. Dane te wskazują na możliwy udział receptora PGRMC1 w mechanizmie pozagenomowego działania P4 na funkcje komórek macicy i CL krów. Możliwe jest także, że w opisane procesy mogą być zaangażowane również inne receptory błonowe P4 (PGRMC2, receptory mPR czy białko SERBP1), jednak brak było danych na temat tych receptorów w tkankach układu rodnej krwi.

Z piśmiennictwa wynika, że głównym modelem stosowanym w badaniach nad receptorami błonowymi P4 są linie komórkowe oraz narządy/ komórki gryzoni. Natomiast rola tych receptorów u zwierząt gospodarskich nie była dotychczas badana.

Do tej pory nie był znany profil ekspresji genów i białek błonowych receptorów P4 w tkankach układu rodnej w cyklu rujowym i ciąży u krowy. Brak było danych na temat możliwej roli tych receptorów, a także roli kompleksu błonowego receptora PGRMC1 i białka SERBP1 w regulacji funkcji macicy, jajnika czy jajowodu. Nie wiadomo również, czy istnieją korelacje pomiędzy receptorami jądrowymi i błonowymi dla P4 w tkankach układu rodnej krowy podczas cyklu i ciąży. Wyjaśnieniu tych niejasności miały posłużyć badania przedstawione w publikacjach zgłoszonych do osiągnięcia habilitacyjnego. Dlatego też **celem ogólnym prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego prezentowanego we wniosku jest: określenie ekspresji genów i białek błonowych receptorów progesteronu oraz ich komórkowej lokalizacji w układzie rozrodczym krowy.**

Cele szczegółowe obejmowały:

- (a) określenie profilu ekspresji genów i białek PGRMC1, PGRMC2 oraz SERBP1 w endometrium macicy oraz w ciałku żółtym krowy w trakcie cyklu rujowego i w pierwszym trymestrze ciąży (publikacja I i II)
- (b) oznaczenie poziomu ekspresji mRNA PGR oraz białka izoforma PGRA i PGRB w błonie śluzowej macicy podczas cyklu rujowego oraz w pierwszym trymestrze ciąży (publikacja I)
- (c) zbadanie profilu ekspresji genów i białek mPR α , mPR β i mPR γ w ciałku żółtym krowy w trakcie cyklu rujowego i w pierwszym trymestrze ciąży (publikacja IV),
- (d) określenie ekspresji genów i białek receptorów błonowych P4 (PGRMC i mPR) oraz jądrowych (PGR) w jajowodzie (lejek, bańka cieśń) przyległym i przeciwległym do aktywnego CL (publikacja III),
- (e) określenie komórkowej lokalizacji receptorów błonowych P4 w CL, macicy i jajowodzie (Publikacje II-IV)
- (f) oznaczenie poziomu P4 w tkance w celu oceny ich potencjalnego wpływu na poziom transkrypty i białka dla błonowych receptorów P4 (Publikacje I-IV)

Doświadczenia przeprowadzono na tkankach endometrium i ciałkach żółtych pobranych od krów/ jałówek będących w cyklu rujowym (dni 2-5, 6-10, 11-16 i 17-20; n=6 dla każdej fazy cyklu) oraz w pierwszym trymestrze ciąży (3-5, 6-8, 9-12 tydzień ciąży; n=5 dla każdego okresu ciąży), a także jajowodach (lejek, bańka i cieśń) przyległym i przeciwległym do aktywnego CL, pobranych od krów/jałówek w dniach 6-12 oraz 18-20 cyklu rujowego (n=5 dla każdej fazy cyklu).

W badaniach zastosowano następujące metody badawcze:

- real-time PCR - do określenia ekspresji genów błonowych receptorów P4: PGRMC1, PGRMC2, SERBP1, mPR α , mPR β , mPR δ oraz jądrowych receptorów P4 (PGR);
- Western blot – do określenia ekspresji białek badanych receptorów;
- immunohistochemię (IHC) - do wykrycia białek receptorów błonowych P4 oraz
- metodę immuno-enzymatyczną (EIA) - do określenia koncentracji P4 w badanych tkankach.

2. Omówienie wyników prac wskazanych jako szczególne osiągnięcie naukowe:

2.1. Kowalik M.K., Slonina D., Rekawiecki R., Kotwica J. (2013) Expression of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1) and nuclear progesterone receptor (PGR) in the bovine endometrium during the oestrous cycle and the first trimester of pregnancy. *Reproductive Biology* 13 (1): 15-23.

W niniejszej pracy wykazano obecność genów i białek błonowych receptorów P4: PGRMC (*progesterone receptor membrane component*) 1 i PGRMC2 oraz białka SERBP1 (*serpine*

mRNA binding protein 1), które do swojego działania wymaga związania z PGRMC1, a także jądrowych receptorów PGR w błonie śluzowej macicy krowy. Określono po raz pierwszy profil ekspresji mRNA i białka PGRMC1, PGRMC2 oraz SERBP1 w błonie śluzowej macicy podczas cyklu rujowego (dni 1-5, 6-10, 11-16, 17-21) oraz w pierwszym trymestrze ciąży (tydzień 3-5, 6-8, 9-12). Nie stwierdzono różnic w ekspresji mRNA PGRMC1 i PGRMC2 podczas cyklu rujowego, jednak poziom ekspresji tych genów wzrastał w okresie ciąży. Ponadto, wykazano wysoki poziom ekspresji mRNA SERBP1 w czasie ciąży oraz w 11-16 dniu cyklu rujowego. Dane te wskazują, że błonowe receptory PGRMC1, PGRMC2 oraz kompleks białek PGRMC1/SERBP1 są wymagane w mechanizmie pozagenomowego wpływu P4 w błonie śluzowej macicy krowy w okresie ciąży. Możliwe jest, że P4 działając przez te receptory uczestniczy w procesach warunkujących zapoczątkowanie i utrzymanie ciąży.

W powyższych badaniach określono również profil ekspresji mRNA jądrowych receptorów P4 oraz po raz pierwszy oznaczono ekspresję białek obu izoform PGR – PGRA i PGRB, w endometrium krowy w trakcie cyklu rujowego oraz w pierwszym trymestrze ciąży. Stwierdzono wysoki poziom ekspresji mRNA PGR oraz białek PGRA i PGRB w 1-5 i 17-21 dniu cyklu rujowego, w porównaniu do 6-16 dnia cyklu oraz badanych okresów ciąży. Ponadto, wykazano pozytywną korelację pomiędzy poziomem białka PGRA oraz zawartością P4 w tkance endometrium, co sugeruje, że być może genomowy wpływ P4 na endometrium odbywa się głównie przez interakcje P4 z białkami receptora PGRA.

Uzyskane wyniki wskazują, że P4 może działać w endometrium macicy krowy zarówno na drodze genomowej, jak i pozagenomowej i tymi drogami może on uczestniczyć w regulacji cyklu rujowego oraz utrzymaniu ciąży.

2.2. Kowalik M.K., Rekawiecki R., Kotwica J. (2014) *Expression and localization of progesterone receptor membrane component (PGRMC)1 and 2 and serpine MRNA binding protein 1 (SERBP1) in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. Theriogenology 82(8):1086-1093.*

W pracy określono obecność oraz zmiany w ekspresji genów i białek błonowych receptorów P4: PGRMC1, PGRMC2 oraz białka SERBP1 w ciałku żółtym (CL) krowy podczas cyklu rujowego oraz w pierwszym trymestrze ciąży. Zbadano również komórkową lokalizację białek błonowych receptorów P4 w CL.

Wykazano, najwyższą ekspresję mRNA PGRMC1 w dniach 6-16 cyklu, zaś PGRMC2 w dniach 11-16 cyklu rujowego oraz w badanych okresach ciąży. Poziom białka PGRMC1 był najwyższy w dniach 11-16 cyklu rujowego, w porównaniu do pozostałych przedziałów cyklu i ciąży, podczas gdy ekspresja białka PGRMC2 była najwyższa w dniach 17-20, a także w badanym okresie ciąży. Ponadto, stwierdzono, że poziom ekspresji mRNA PGRMC1 jest pozytywnie skorelowany z zawartością P4 w tkance lutealnej. Badania immunohistochemiczne wykazały lokalizację obu białek PGRMC w małych i dużych komórkach lutealnych. Dane te sugerują, że PGRMC1 i PGRMC2 w ciałkach żółtych pochodzących z fazy środkowej i późnolutealnej cyklu rujowego, mogą uczestniczyć w steroidogenezie i ochronie CL przed przedwczesną lutolizę.

Należy zaznaczyć również, że ekspresja mRNA PGRMC1 i PGRMC2 wzrasta w okresie ciąży, co wskazuje że receptory te mogą być zaangażowane w procesy regulujące

funkcję ciężowego CL, takie jak proliferacji komórek, mitozu czy angiogeneza. Ponadto, barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność białek PGRMC1 i PGRMC2, nie tylko w komórkach lutealnych, ale także w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych. Możliwe jest zatem, że P4 działając przez swoje receptory błonowe moduluje przepływ krwi w tkankach układu rodowego przez bezpośredni wpływ na naczynia krwionośne.

Stwierdzono również, zmienną ekspresję genu i białka SERBP1 w czasie cyklu i ciąży w CL, co sugeruje, że wpływ P4 na komórki CL może odbywać się przy udziale kompleksu białek PGRMC1- SERBP1, ale intensywność tego działania zależy od poziomu i dostępności białka SERBP1 w tkance.

Zmienna ekspresja mRNA i białek badanych receptorów w trakcie cyklu i ciąży wskazuje, że receptory te mogą być regulowane przez hormony steroidowe. Jednak, jedynie ekspresja PGRMC1 jest skorelowana ze stężeniem P4 w tkance lutealnej. Możliwe zatem, że ekspresja tych receptorów jest regulowana również przez inne czynniki lokalnie produkowane w CL.

Podsumowując, wykazano zmienną ekspresję mRNA i białek PGRMC1, PGRMC2 i SERBP1, co sugeruje, że P4 może działać na komórki CL bezpośrednio przez związanie się z receptorami PGRMC1 i PGRMC2 lub kompleksem białek PGRMC1- SERBP1, jednak intensywność tego procesu zależy od statutu fizjologicznego samicy. Ponadto uzyskane wyniki sugerują, że niegenomowy wpływ P4 na CL może odbywać się przy udziale receptorów błonowych P4, głównie przez regulację przepływu krwi w tym narządzie.

2.3. Kowalik M.K., Martyniak M., Rekawiecki R., Kotwica J. (2016) *Expression and immunolocalization of membrane progesterone receptors in the bovine oviduct.* Domestic Animal Endocrinology 55:83-96.

Wyniki badań przedstawione w publikacji I [Kowalik i wsp. 2013] i II [Kowalik i wsp. 2014] obejmowały przede wszystkim określenie możliwości pozagenomowego wpływu P4 na czynność komórek macicy i jajnika krowy. Należy jednak zaznaczyć, że również jajowód tworząc odpowiednie warunki pozwalające na transport gamet, ich dojrzewanie oraz zapewniając optymalne warunki do zapłodnienia odgrywa istotną rolę w zapłodnieniu i wczesnym rozwoju zarodkowym, dlatego poznanie i zrozumienie roli i mechanizmu działania P4 w tym narządzie ma kluczowe znaczenie. Ponadto, badania przeprowadzone na CL wyraźnie wykazały możliwy udział hormonów steroidowych, w tym P4 w regulacji ekspresji błonowych receptorów P4. Dlatego też, w niniejszej pracy określone zostały zmiany w ekspresji genów receptorów błonowych P4, w tym receptorów PGRMC1 i PGRMC2 oraz receptorów mPR α , mPR β i mPR γ w jajowodzie (lejek, bańka, cieśń) przyległym i przeciwległym do CL w 6-12 (faza środkowolutealna) oraz 18-20 (faza pęcherzykowa) dniu cyklu rujowego. Oznaczono również lokalizację receptorów błonowych P4 w badanej tkance.

Wykazano po raz pierwszy obecność genów i białek mPR α , mPR β i mPR γ w jajowodzie krów. Potwierdzono również, ekspresję receptorów PGRMC1 i PGRMC2 oraz receptora PGR w tkance jajowodu. Nie wykazano natomiast różnic w ekspresji mRNA badanych receptorów w jajowodzie przyległym i przeciwległym do CL lub dominującego pęcherzyka w badanych fazach cyklu. Jednakże, jajowody (przyległy i przeciwległy do CL) zebrane podczas różnych faz cyklu rujowego, wykazały wyższą ekspresję mRNA PGRMC1 i PGRMC2 oraz mPR α w dniu 18-20, niż w dniu 6-12 cyklu rujowego. Ponadto, ekspresja PGRMC1, PGRMC2 oraz

mPR α była negatywnie skorelowana z zawartością P4 badanej tkance. Dane te sugerują, że P4 reguluje ekspresję tych receptorów w jajowodzie krowy. Ponadto, stwierdzono różnice w ekspresji PGR, PGRMC1, mPR α i mPR β w różnych fragmentach jajowodu (bańka, lejek, cieśń), co wskazuje, że receptory te mogą mieć odmienną rolę w różnych częściach jajowodu. Barwienia immunohistochemiczne potwierdziły również obecność białek błonowych receptorów P4 w lejku, bańce i cieśni, zarówno w jajowodzie przyległym i przeciwnym do CL w obu badanych fazach cyklu rujowego. Nie wykazano zmian w intensywności i komórkowej lokalizacji białek badanych receptorów P4 pomiędzy jajowodem przyległym i przeciwnym do CL oraz pomiędzy fazami cyklu rujowego. Najintensywniejsze wybarwienie obserwowano w komórkach nabłonka powierzchniowego zaś słabsze w miocytach i stromie. Wykazano również obecność badanych receptorów błonowych P4 w śródbłonku naczyń krwionośnych. Sugeruje to, że błonowe receptory P4 mogą uczestniczyć w regulacji funkcji wydzielniczej i motorycznej jajowodu oraz w przepływie krwi w tym narządzie.

2.4. Kowalik M.K., Rękawiecki R., Kotwica J. (2018) *Membrane progesterin receptors (mPRs) in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and first trimester of pregnancy. Domestic Animal Endocrinology* 63: 69-76.

W niniejszej pracy określone zostały zmiany w profilu ekspresji genów i białek receptorów błonowych mPR (membrane progesterin receptor) α , mPR β i mPR γ w ciałku żółtym krowy podczas cyklu rujowego (dni 2-5, 6-10, 11-16 i 17-20) oraz w pierwszym trymestrze ciąży (tydzień 3-5, 6-8, 9-12).

Zaobserwowano, najwyższy poziom ekspresji genu mPR α w CL z 11-20 dnia cyklu rujowego, w porównaniu do pozostałych dni cyklu rujowego oraz ciąży. Ekspresja mRNA mPR β była najwyższa w 11-16 i 17-20 dniach cyklu rujowego oraz we wszystkich badanych okresach ciąży, w porównaniu do dni 2-10 cyklu rujowego. Stwierdzono, wyższą ekspresję genu mPR γ w 17-20 dniu cyklu rujowego oraz w 9-12 tygodniu ciąży, niż w pozostałych okresach cyklu i ciąży. Barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność białek mPR α , mPR β i mPR γ w trakcie cyklu i w pierwszym trymestrze ciąży w obu typach komórek lutealnych, ale barwienie było silniejsze w małych komórkach lutealnych. Wszystkie badane receptory były również zlokalizowane w komórkach endotelialnych śródbłonka naczyń krwionośnych CL. Lokalizacja komórkowa receptorów błonowych P4 w CL wskazuje, że receptory te mogą umożliwiać P4 udział w regulacji funkcji komórek poprzez wpływ na proces luteolizy, apoptozy i angiogeny oraz przepływ krwi w tych tkankach w trakcie cyklu i ciąży. Możliwe jest również, że receptory mPR mogą regulować udział P4 w przepływie krwi i tą drogą wpływać na utrzymanie bądź regresję CL.

3. Podsumowanie

Wyniki prowadzonych przeze mnie badań pozwoliły określić ekspresję i lokalizację błonowych receptorów P4 oraz ich udział w funkcjonowaniu narządów rozrodczych krowy w szczególności macicy (endometrium), jajnika (ciałko żółte) oraz jajowodu. Przedstawione badania przyczyniły się do lepszego zrozumienia molekularnych podstaw pozagenomowego działania P4 oraz udziału receptorów błonowych P4 w funkcjonowaniu układu rodowego samicy.

Badania wykazały specyficzny wzór ekspresji genów PGRMC1, PGRMC2 i SERBP1 oraz mPR α , mPR β i mPR γ w macicy oraz jajniku podczas cyklu rujowego oraz w pierwszym trymestrze ciąży, a także w jajowodzie (mPR i PGRMC) w czasie cyklu rujowego. Na uwagę zasługuje fakt, że ekspresja genów wszystkich receptorów błonowych była wyższa w drugiej połowie cyklu oraz w badanym okresie ciąży, co sugeruje, że receptory te pełnią istotną rolę w działaniu P4 w jajniku, macicy i jajowodzie podczas przygotowania do ciąży oraz we wczesnych jej etapach. Wyniki te wskazują, że P4 może wpływać na czynność tych narządów na drodze genomowej oraz pozagenomowej i tymi drogami P4 może regulować przebieg cyklu rujowego oraz utrzymanie ciąży. Określenie lokalizacji białek badanych receptorów P4 w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych we wszystkich badanych tkankach układu rozrodczego wskazuje, że niegenomowy (szybki) wpływ P4 na macicę, jajnik oraz jajowód może odbywać się poprzez regulację przepływu krwi w tych narządach. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na możliwy udział tych receptorów w procesach związanych steroidogenezą, angiogenezą, apoptozą i luteolizą, które warunkują prawidłowy przebieg cyklu lub ciąży. Natomiast receptory błonowe P4 obecne w jajowodzie prawdopodobnie uczestniczą w funkcji wydzielniczej i motorycznej tego narządu, zapewniając odpowiednie warunki do transportu gamet i zarodka oraz wpływają na przygotowanie odpowiedniego środowiska do rozwoju zarodka. Należy zaznaczyć, że dane uzyskane w tych badaniach pozwalają lepiej zrozumieć mechanizm udziału P4 w regulacji cyklu rujowego oraz ochronie wczesnej ciąży. Ponadto, określenie możliwych dróg działania P4 na komórkę docelową może mieć znaczenie w wywołaniu efektu lokalnego np. w miejscu uwolnienia lub podania hormonu. Dlatego też znajomość możliwych dróg działania P4 ma istotne znaczenie i wyniki uzyskane w tych badaniach stanowią istotne uzupełnienie i wzbogacenie istniejącego stanu wiedzy w dziedzinie fizjologii i endokrynologii rozrodu.

4. Do najważniejszych osiągnięć rozprawy habilitacyjnej zaliczam:

- Wykazanie obecności genów i białek błonowych receptorów P4, w tym PGRMC1, PGRMC2, mPR α , mPR β i mPR γ w endometrium macicy, ciała żółtego oraz jajowodzie krowy;
- Określenie poziomów mRNA i białka dla PGRMC1, PGRMC2, SERBP1, mPR α , mPR β i mPR γ w endometrium macicy oraz CL podczas cyklu rujowego oraz w pierwszym trymestrze ciąży u krowy;
- Oznaczenie poziomu mRNA i białka dla PGRMC1, PGRMC2 i SERBP1 oraz mPR α , mPR β , mPR γ w jajowodzie krowy podczas cyklu rujowego;
- Określenie komórkowej lokalizacji białek błonowych receptorów P4 (PGRMC i mPR) w endometrium macicy, ciała żółtego oraz jajowodzie krowy;
- Wykazanie obecności białek błonowych receptorów P4 w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych we wszystkich badanych tkankach układu rozrodczego krowy.

Piśmiennictwo

1. Ashley RL, Clay CM, Farmerie TA, Niswender GD, Nett TM. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. *Endocrinology* 2006; 147: 4151-4159.
2. Bogacki M, Silvia WJ, Rękawiecki R, Kotwica J. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F2 α from bovine endometrial tissue. *Biol. Reprod.* 2002; 67:184-188.
3. Duras M, Mlynarczuk J, Kotwica J. Non-genomic effect of steroids on oxytocin-stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin F2 and E2 secretion from bovine endometrial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005; 76: 105-116.
4. Duras M, Brzosko E, Kotwica J. Influence of progesterone, pregnenolone and 17 β -hydroxyprogesterone on the function of luteal cells treated with luteinizing hormone, noradrenaline and prostaglandin E2. *Pol J Vet Sci* 2005;8:113-9.
5. Fernandes MS, Pierron V, Michalovich D, Astle S, Thorton S, Peltoketo H, Lam EW, Gellersen B, Huhtaniemi I, Allen J, Brosens JJ. Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J. Endocrinol.* 2005; 187: 89-101.
6. Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 2009; 15: 119-138.
7. Hughes AL, Powell DW, Bard M, Eckstein J, Barbuch R, Link AJ, Espenshade PJ. Dap1/ PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metab.* 2007; 5: 143-149.
8. Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS, Thomas P. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20:1519-1534.
9. Kowalik M, Kotwica J. Non-genomic effect of ovarian steroids on oxytocin-stimulated prostaglandin (PG) F2 and E2 secretion from bovine endometrial cells. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2007; 51: 37-42.
10. Kowalik MK, Kotwica J. Progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) gene expression in corpus luteum during the estrous cycle in cows. *Reprod. Biol.* 2008; 8: 291-297.
11. Kowalik MK, Slonina D, Kotwica, J. Genomic and non-genomic effect of progesterone (P4) and pregnenolone (P5) on the function of bovine endometrial cells. *Vet. Med.* 2009; 54: 205–214.
12. Luciano AM, Lodde V, Franciosi F, Ceciliani F, Peluso JJ. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction* 2010; 140: 663-672.

13. Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 2004; 128: 139-146.
14. Peluso JJ. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biol. Reprod.* 2006; 75: 2-8.
15. Peluso JJ, Liu X, Gawkowska A, Lodde V, Wu CA. Progesterone inhibits apoptosis in part by PGRMC1-regulated gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 320: 153-161.
16. Rohe HJ, Ahmed IS, Twist KE, Craven RJ. PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): A targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol. Ther.* 2009; 21: 14-19.
17. Saint-Dizier M, Sandra O, Ployart S, Chebrou M, Constant F. Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cycling and pregnant cows during the post-ovulation period. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:76.
18. Shankar R, Johnson MP, Williamson NA, Cullinane F, Purcell AW, Moses EK, Brennecke SP. Molecular markers of preterm labour in the choriodecicua. *Reprod Sci* 2010;17:297-310.
19. Slonina D, Kowalik MK, Subocz M, Kotwica J. The effect of ovarian steroids on oxytocin-stimulated secretion and synthesis of prostaglandins in bovine myometrial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009; 90: 69-75.
20. Wendler A, Wehling M. PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. *Steroids.* 2013 Jun;78(6):555-8.
21. Wu W, Shi SQ, Huang HJ, Balducci J, Gaterfield RE. Changes in PGRMC1, a potential progesterone receptor, in human myometrium during pregnancy and labour at term and preterm. *Mol. Hum. Reprod.* 2011; 17: 233-242.
22. Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *PNAS* 2003; 100: 2237-2242.

D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

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

Przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie studiów magisterskich (kierunek Biotechnologia) na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie uczestniczyłam w badaniach realizowanych w Katedrze Fizjologii Zwierząt UWM w Olsztynie, pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Genowefy Kotwica, prof. UWM. Badania dotyczyły transdukcji sygnału pomiędzy oksytocyną (OT) i jej receptorem w komórkach lutealnych świni. Rezultatem prowadzonych doświadczeń była praca magisterska pt. *„Wpływ oksytocyny na komórki lutealne świni – badanie sekrecji progesteronu, stężenia fosforanów inozytoli oraz mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} ”*. Wynik zostały zaprezentowane na konferencji (załącznik 4, poz.III.B.1.1) oraz opublikowane w formie pracy oryginalnej (załącznik 4, poz. II.A.9).

Po ukończeniu z wyróżnieniem studiów magisterskich, w czerwcu 2002 r. rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Endokrynologii Rozrodu Bydła (obecnie Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu) IRZiBŻ PAN w Olsztynie, kierowanym przez prof. dr hab. Jana Kotwicę. Tematyka moich badań dotyczyła mechanizmu działania steroidów jajnikowych, głównie P4, w regulacji funkcjonowania macicy i ciała żółtego krowy, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości pozagenomowego działania tych hormonów na czynność komórek błony śluzowej macicy oraz komórek lutealnych CL. Badania te realizowałam w ramach dwóch projektów badawczych kierowanych przez prof. dr hab. Jana Kotwicę, w których byłam głównym wykonawcą: (a) projekt badawczy Komitetu Badań Naukowych pt. *„Mechanizm pozagenomowego wpływu progesteronu na czynność komórek układu rodowego krowy”* (KBN 3P06D 025 22; 2002-2005) oraz (b) grant Ministerstwa Nauki i Edukacji pt. *„Ekspresja dla enzymów odpowiedzialnych za syntezę PGE2 i PGF2 w tkankach macicy krowy: genomowy i pozagenomowy wpływ steroidów”* (MNiE 2 P06K 038; 292005-2008). Wyniki badań uzyskane w ramach tych projektów stanowiły podstawę mojej pracy doktorskiej, którą wykonywałam pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Kotwicy w IRZiBŻ PAN w Olsztynie.

W cyklu badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wykazano, że P4 i jego pochodne (prekursor i metabolit) hamują, stymulowaną przez oksytocynę, sekrecję luteolitycznej prostaglandyny (PG) F2 α , ale nie sekrecję luteotropowej PGE2 z błony śluzowej macicy na drodze pozagenomowej [Duras i wsp. 2005 (załącznik 4, poz. II.A.3)]. Stwierdzono, że badane steroidy nie wpływają na czynność wydzielniczą komórek lutealnych CL stymulowanych czynnikami luteotropowymi [Duras i wsp. 2005 b (załącznik 4, poz. II.A.4)]. Równocześnie wykazano, że steroidy obniżają koncentrację wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} w komórkach endometrium [Duras i wsp. 2005 (załącznik 4, poz. II.A.3)] oraz małych komórkach lutealnych [Duras i wsp. 2005b (załącznik 4, poz. II.A.4)] i tą drogą mogą ograniczać wpływ OT i hormonów luteotropowych na komórki macicy i jajnika. Następnie,

wykazano, że pozagenomowy wpływ P4 i jego pochodnych na komórki błony śluzowej macicy krów nie jest specyficzny i inne hormony steroidowe, w tym estradiol i testosteron mogą również ograniczać działanie OT na te komórki [Kowalik i Kotwica 2007 (*załącznik 4, poz. II.A.5*)]. Efekt ten może bezpośrednio zmieniać funkcje komórek endometrium, i prawdopodobnie również innych komórek tego i innych narządów, docelowych dla OT [Kowalik i Kotwica 2007 (*załącznik 4, poz. II.A.5*)]. Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, że P4 i inne steroidy działają na badane komórki przez mechanizm genomowy oraz pozagenomowy. Możliwe ponadto, że pozagenomowy wpływ steroidów na sekrecję PGF2 α i PGE2 z endometrium jest dodatkowym mechanizmem służącym ochronie wczesnej ciąży [Rekawiecki i wsp. 2008 (*załącznik 4, poz. II.A.8*)]. Dane te znacząco poszerzają wiedzę o wpływie P4 oraz innych steroidów na czynność komórek jajnika i macicy na poziomie molekularnym [Kowalik i wsp. 2008 (*załącznik 4, poz. II.A.6*), Rekawiecki i wsp. 2008 (*załącznik 4, poz. II.A.8*)].

Wyniki badań prezentowałam na konferencjach krajowych (*załącznik 4, poz. III.B.1.1., poz. III.B.2.1, poz. III.B.2.2, poz. III.B.2.3*) i zagranicznej (*załącznik 4, poz. III.B.2.4*) oraz opublikowałam w renomowanych czasopismach naukowych w formie trzech oryginalnych publikacji (*załącznik 4, poz. II.A.3, poz. II.A.4, poz. II.A.5*) oraz pracy przeglądowej (*załącznik 4, poz. II.A.6*).

Stopień doktora nauk biologicznych został mi nadany decyzją Rady Wydziału Biologii UWM 15 maja 2008. Rozprawa doktorska została wyróżniona nagrodą Prezesa Rady Ministrów oraz wyróżniona nagrodą Dyrektora IRZiBZ PAN.

Oprócz badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, uczestniczyłam jednocześnie w doświadczeniach prowadzonych w Zakładzie, dotyczących regulacji funkcji CL krów. W cyklu badań wykazaliśmy, że P4 może sam wspierać swoją syntezę poprzez stymulację aktywności dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej w okresie intensywnego wzrostu i formowania się CL (dzień 5-10 cyklu rujowego) [Kotwica i wsp. 2004 (*załącznik 4, poz. II.A.2*)], a także poprzez wpływ na OT jajnikową, która zwrótnie wzmacnia uwalnianie P4 [Kotwica i wsp. 2003 (*załącznik 4, poz. II.A.1*)].

W tym czasie byłam również wykonawcą w projekcie MNiSW pt „*Molekularna regulacja stymulującego wpływu hormonów luteotropowych na czynność ciała żółtego krowy*” (MNiSW 2P06D 045 300; kierownik dr hab. Robert Rekawiecki). Badania te miały na celu wykazanie wpływu czynników luteotropowych (LH, P4, OT, NA i PGE2) na poziom ekspresji genów i białka receptorów P4 i receptora OT w CL. W ramach tego projektu uczestniczyłam w badaniach wpływu tych czynników na ekspresję białka dla receptora PGR, poszerzając swój warsztat metodyczny. Wyniki uzyskane w tym projekcie wykazały zależność pomiędzy P4 a OT w regulacji funkcji CL.

Wyniki badań dotyczących autoregulacji funkcji CL, udziału czynników luteotropowych w regulacji funkcji CL oraz pozagenomowego działania P4 na komórki ciała żółtego zostały przedstawione w publikacji przeglądowej [Rekawiecki i wsp. 2008 (*załącznik 4, poz. II.A.8*)] oraz nagrodzone Nagrodą Zespołową II stopnia Dyrektora IRZiBZ PAN za cykl publikacji „*Genomowy i pozagenomowy wpływ steroidów na komórki macicy krowy*”.

Osiągnięcia badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Z dniem 1 października 2008, zostałam adiunktem w Zakładzie kontynuując badania dotyczące mechanizmów związanych z fizjologią i regulacją funkcji CL oraz macicy. Szczególnie interesującym mnie zagadnieniem jest mechanizm działania P4 na drodze pozagenomowej w funkcjonowaniu żeńskiego układu rozrodczego oraz udział błonowych receptorów P4 w regulacji funkcji komórek układu rodnego krwi podczas cyklu rujowego oraz ciąży.

Realizowane przeze mnie badania skupiają się wokół następujących zagadnień:

- I) Molekularny mechanizm pozagenomowego działania P4 w tkankach układu rozrodczego krwi, z uwzględnieniem udziału błonowych receptorów P4 w tym procesie.
- II) Rola i regulacja ekspresji izoform Ai B jądrowego receptora P4 w CL i endometrium.

I) *Molekularny mechanizm pozagenomowego działania P4 w tkankach układu rozrodczego krwi, z uwzględnieniem udziału błonowych receptorów P4 w tym procesie.*

Główny tematem moich prac badawczych prowadzonych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora była kontynuacja badań związanych z mechanizmem pozagenomowego działania P4 w tkankach układu rozrodczego krów, ze szczególnym uwzględnieniem udziału błonowych receptorów P4 (PGRMC i mPR) w tym mechanizmie. Badania prowadziłam w ramach dwóch projektów badawczych, w których byłam kierownikiem: (a) projekt pt. „*Molekularny mechanizm pozagenomowego wpływu progesteronu (P4) na czynność komórek macicy i jajnika krwi podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży: udział błonowego receptora P4 i białkowej kinazy G*” finansowany przez MNiSW [N N311 348237 - realizowany w latach 2009-2012) oraz (b) projekt pt. „*Rola hormonów steroidowych oraz czynników luteotropowych i luteolitycznych w regulacji ekspresji i funkcji błonowych receptorów progesteronu w układzie rodny krwi*” finansowany przez NCN [Opus NCN 2012/05/B/NZA/01810 – realizowany w latach 2013-2016].

Zakres badań obejmował następujące zagadnienia:

1. *Określenie możliwości pozagenomowego działania P4 na funkcje wydzielnicze komórek endometrium i miometrium macicy.*

W badaniach określono wpływ steroidów (P4, jego prekursora –pregnenolonu; P5) na sekrecję prostaglandyn (PG) oraz ekspresję genów enzymów uczestniczących w syntezie PGF2 α i PGE2 w komórkach endometrium i miometrium macicy krwi stymulowanych OT [Kowalik i wsp. 2009 (*załącznik 4, poz. II.A.10*), Słonina i wsp. 2009 (*załącznik 4, poz. II.A.11*)]. Wykazano, że P4 i P5 hamują wpływ OT na sekrecję PGF2 α z komórek endometrium i miometrium krwi, a równocześnie nie obserwowano zmian w ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę prostaglandyn (COX2, PGES i PGFS) w tych komórkach po 4 godzinach inkubacji komórek z OT i steroidami; co wskazuje na możliwość pozagenomowego wpływu steroidów na sekrecję obu PG [Kowalik i wsp. 2009 (*załącznik 4, poz. II.A.10*), Słonina i wsp. 2009 (*załącznik 4, poz. II.A.11*)]. Natomiast w komórkach inkubowanych 6 godzin z

czynnikami wykazano wyższą ekspresję genu COX2 w wyniku stymulacji OT. Wpływ OT na COX2 nie był obserwowany w komórkach preinkubowanych z P4 i P5, co wskazuje na jego genomowe działanie [Kowalik i wsp. 2009 (*załącznik 4, poz. II.A.10*), Słonina i wsp. 2009 (*załącznik 4, poz. II.A.11*)]. Na podstawie uzyskanych danych można przypuszczać, że regulacja wpływu P4 i innych steroidów w komórkach macicy może odbywać się zarówno przez mechanizm pozagenomowy, jak i na poziomie transkrypcji np. genu COX2. Możliwe więc, że pozagenomowy efekt wywierany przez P4 na komórki macicy jest dodatkowym, obok genomowego, mechanizmem ochrony wczesnej ciąży. [Rękawiecki i wsp. 2008 (*załącznik 4, poz. II.A.8*)].

Część tych badań została wykonana w ramach rozprawy doktorskiej Pani Dominiki Słoniny pt. „Molekularny mechanizm wpływu progesteronu oraz oksytocyny na czynność komórek miometrium podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży krowy; udział błonowego receptora progesteronu (PGRMC1)” wykonywanej pod kierunkiem Prof. J. Kotwicy.

Równoległe z prowadzonymi badaniami wykazano po raz pierwszy ekspresję genu błonowego receptora P4 (PGRMC1) w ciałku żółtym krów podczas cyklu rujowego, co może sugerować udział tego receptora w pozagenomowym działaniu progesteronu w tej tkance [Kowalik i Kotwica 2008 (*załącznik 4, poz. II.A.7*)].

2. *Określenie profilu ekspresji oraz komórkowej lokalizacji błonowych receptorów P4: PGRMC i mPR w tkankach układu rodnego w trakcie cyklu rujowego i w pierwszym trymestrze ciąży.*

W cyklu tych badań po raz pierwszy zidentyfikowano i scharakteryzowano profil ekspresji genów i białek błonowych receptorów P4, w tym PGRMC1, PGRMC2, białka SERBP1 oraz mPR α , mPR β , mPR γ w trakcie cyklu i ciąży w macicy, jajniku i jajowodzie krowy. Określono również lokalizację komórkową tych białek w badanych tkankach.

Wyniki dotyczące tego zagadnienie w odniesieniu do endometrium macicy, ciałka żółtego oraz jajowodu przedstawiłam w opisie osiągnięcia naukowego (publikacje I-IV).

W badaniach tych oznaczono również:

(a) profil ekspresji genów i białek PGRMC1, PGRMC2 oraz białka SERBP1 w miometrium w trakcie cyklu i w pierwszym trymestrze ciąży krowy oraz obecność tych białek w miocytach oraz w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych błony mięśniowej macicy [Słonina i wsp. 2012 (*załącznik 4, poz. II.A.13*)]. Stwierdzono, że w miometrium poziom ekspresji badanych receptorów P4 wzrasta w czasie ciąży w porównaniu do cyklu rujowego, co sugeruje możliwy udział tych receptorów w regulacji procesów związanych z zapoczątkowaniem i utrzymaniem ciąży [Słonina i wsp. 2012 (*załącznik 4, poz. II.A.13*)].

(b) profil ekspresji mRNA i białek receptorów mPR α , mPR β i mPR γ w endometrium i miometrium macicy krowy podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży, a także komórkową lokalizację tych receptorów w macicy. Wykazano zmienną ekspresję mRNA i białka tych receptorów w cyklu i ciąży. Najwyższą ekspresję mPR α i mPR β mRNA obserwowano w endometrium w dniach 11-16 cyklu rujowego. Natomiast w miometrium poziom mRNA mPR α i mPR β obniżał się w 6-16 dniu oraz 11-16 dniu cyklu odpowiednio. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji mPR γ mRNA w endometrium i miometrium podczas cyklu. Podczas ciąży w

endometrium i myometrium poziom mPR α i mPR β mRNA był utrzymywany się na podobnym poziomie jak w cyklu rujowym. Jednak, ekspresja genu mPR γ była wyższa w okresie ciąży w porównaniu do cyklu w obu badanych tkankach. Barwienia wykazały obecność białek mPR α , mPR β i mPR γ zarówno w błonie śluzowej i mięśniowej macicy, we wszystkich badanych fazach cyklu rujowego. Najwyższą immunoreaktywność receptorów mPR wykazano w nabłonku powierzchniowym i gruczołowym endometrium, zaś niższą intensywność w stromie i w komórkach mięśniówki macicy. Intensywne barwienie obserwowano również w komórkach endotelialnych śródbłonka naczyń krwionośnych, zarówno w warstwie śluzówki, jak i mięśniówki macicy [Kowalik i wsp. 2019; praca założona do recenzji w *Theriogenology*].

Uzyskane dane sugerują, że błonowe receptory mPR mogą odgrywać ważną rolę w przygotowaniu odpowiedniego środowiska do implantacji zarodka oraz jego rozwoju. Możliwe jest również, że P4 poprzez receptory mPR może w szybki, niegenomowy sposób wpływać na przepływ krwi w naczyniach krwionośnych i tą drogą regulować czas trwania cyklu rujowego oraz rozpoczęcie i utrzymanie ciąży [Kowalik i wsp. 2019; praca założona do recenzji w *Theriogenology*].

3. *Określenie ekspresji i lokalizacji PGRMC1 i PGRMC2 w łożysku i macicy podczas ciąży oraz w okresie okołoporodowym*

W ramach współpracy naukowej z Prof. Alois Boos oraz Prof. Mariuszem Kowalewskim z Institute of Veterinary Anatomy, University of Zurich, Szwajcaria, realizowałam badania dotyczące określenia ekspresji genów i białek oraz komórkowej lokalizacji błonowych receptorów P4 w ścianie macicy i łożysku krwi w trakcie ciąży oraz w okresie okołoporodowym. Częścią tego projektu były badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej Pani Nory M. Beyer (tytuł rozprawy doktorskiej: *Expression und zelluläre Lokalisation von PGRMC1 und PGRMC2 im Uterus und Plazentom während der Trächtigkeit beim Rind* [w języku niemieckim]).

W badaniach tych wykazano obecność białek receptorów PGRMC1 i PGRMC2 głównie w komórkach nabłonka powierzchniowego, gruczołowych komórkach nabłonkowych, a także w śródbłonku naczyń krwionośnych w ścianie macicy. W placentach, oba białka wykryto w części matczynej (stroma, nabłonek i komórki śródbłonka naczyń krwionośnych), jak również w śródbłonku naczyń krwionośnych części płodowej. PGRMC2 dodatkowo ulegał ekspresji w nabłonku kosmówki część płodowej. Intensywność zabarwienia oraz poziom ekspresji mRNA i białka obu receptorów nie różniły się znacznie w czasie ciąży. Uzyskane wyniki sugerują, że receptory PGRMC mogą być zaangażowane w czynność wydzielniczą nabłonka oraz regulację przepływu krwi w macicy i łożysku w okresie ciąży u krów. Obecnie kontynuowane są badania dotyczące ekspresji receptorów mPR w łożysku w czasie ciąży.

4. *Określenie czynników regulujących ekspresję genów i białek błonowych receptorów P4 – badania in vitro*

W kolejnych etapach badań określono wpływ hormonów steroidowych oraz czynników lutotropowych i luteolitycznych produkowanych w jajniku i macicy na ekspresję błonowych receptorów P4 w komórkach. Analizowano wpływ P4, E2 (podanych oddzielnie, jak i łącznie) oraz LH, OT, NA, PGE2 i PGF2 α w warunkach in vitro na ekspresję genów receptorów

PGRMC i mPR w komórkach nabłonka endometrium, komórkach miometrium oraz komórkach lutealnych pochodzących z wybranych faz cyklu rujowego. Wykazano, że steroidy, w tym P4 i E2 podane oddzielnie jak i łącznie, mogą regulować ekspresję genów poszczególnych receptorów błonowych P4, jednak wpływ ten zależy od typu badanych komórek, dnia cyklu rujowego, zastosowanej dawki steroidów oraz czasu działania czynników.

W ramach tego zagadnienia prowadziłam również badania dotyczące wpływu steroidów oraz ludzkiej gonadotropiny łożyskowej (hCG) na ekspresję genów PGRMC1, PGRMC2 oraz mPRs w linii komórek łożyska JEG-3 (ludzka linia komórek choriocarcinomy).

Uzyskane dane nie potwierdziły jednoznacznie wpływu hormonów steroidowych oraz badanych czynników na regulację ekspresji genów błonowych receptorów P4. Badania te są obecnie kontynuowane w projekcie promotorskim realizowanym przez Panią mgr Karolinę Dobrzyń w ramach Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”, Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW) pt. „Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku krowy” (KNOW2015/CB/PRO1/25; kierownik projektu prof. dr hab. Jan Kotwica).

5. *Określenie udziału antagonistów receptorów jądrowych w regulacji ekspresji genów błonowych receptorów P4.*

Badania dotyczące udziału antagonistów PGR w regulacji ekspresji genów błonowych receptorów P4 były realizowane w kierowanym przez mnie projekcie pt. „Udział antagonistów receptora progesteronu w regulacji ekspresji mRNA i białka błonowych receptorów progesteronu w błonie śluzowej macicy krowy” finansowanym przez MNiSW w ramach projektu Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW). Celem tych badań było zastosowanie klasycznych antagonistów receptorów PGR tj. mifepristonu (RU486) oraz onapristonu (ZK299) do zablokowania receptorów jądrowych P4, aby wykluczyć genomowe działanie P4 w błonie śluzowej macicy krowy.

Uzyskane wyniki wykazały, że P4 oraz antagoniści PGR, wpływają na: (a) ekspresję mRNA receptorów błonowych P4, oraz (b) ekspresję genów enzymów szlaku syntezy prostaglandyn, w skrawkach endometrium macicy krowy w zależności od dawki zastosowanego czynnika oraz fazy cyklu rujowego. Wykazany zmienny wpływ RU486 i ZK299 na poziom ekspresji mRNA błonowych receptorów P4 wyklucza możliwość zastosowania farmakologicznego wyłączenia genomowej drogi oddziaływanie P4 na komórki przy użyciu tych klasycznych antagonistów PGR. Dlatego też, w dalszych badaniach wewnątrzkomórkowych szlaków niegenomowego działania P4 planujemy wykorzystać koniugat P4-BSA (kompleks nie przenika przez błonę komórkową), co pozwoli na uzyskanie odpowiedzi komórki na pobudzenie tylko błonowych receptorów oraz siRNA do blokowania jądrowych i/lub błonowych receptorów P4, jako kolejnego narzędzia do określenia roli błonowych receptorów P4 w macicy.

Badania takie zostały zaplanowane i będą realizowane w obecnie wykonywanym grantie przyznanym przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Rola receptorów błonowych progesteronu w regulacji czynności endometrium”, w którym jestem kierownikiem (projekt Opus 14, UMO-2017/27/B/NZ4/02973; realizowany od 03.08.2018).

Wyniki badań dotyczących mechanizmu pozagenomowego działania P4, ekspresji receptorów błonowych P4 oraz ich możliwej roli w układzie rozrodczym krowy zostały podsumowane w pracach przeglądowych (*załącznik 4, poz. II.A.12, poz. II.A.15*) oraz rozdziale w książce (*załącznik 4, poz. II.C*).

II. Rola oraz regulacja ekspresji izoform A i B jądrowego receptora P4 w CL i endometrium

Moje zainteresowania naukowe związane są również z tematyką i projektami realizowanymi w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu. Jako wykonawca w projekcie badawczym MNiSzW N N311 113 638, kierowany przez dr. hab. Roberta Rękawieckiego, pt. „Regulacja syntezy progesteronu w ciałku żółtym podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży u krowy: udział izoform A i B receptora progesteronu” uczestniczyłam w badaniach dotyczących określenie ekspresji izoform PGRA i PGRB receptora jądrowego P4 w tkankach układu rozrodczego krowy oraz regulacji ich funkcji.

W badaniach tych ustalono charakterystyczną częściową sekwencję PGRB receptora jądrowego P4. Ta 429 nukleotydomowa sekwencja cDNA izoformy PGRB, która wykazuje 79% podobieństwo z sekwencją świni i konia, 75% z sekwencją ludzką, 71% z sekwencją szczura oraz 68% z sekwencją myszy została zdeponowana w GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC433571> [Rękawiecki i wsp. 2014, (*załącznik 4, poz. II.A.17*)].

Ustalenie tej sekwencji pozwoliło oznaczyć profil mRNA i białek dla PGRA oraz PGRB w trakcie cyklu rujowego oraz w pierwszym trymestrze ciąży w CL krów. W badaniach wykazano wysoki poziom ekspresji genów i białek obu izoform PGR w CL na początku cyklu rujowego (w 2-5 dniu cyklu) oraz w 6-12 tygodniu ciąży, co wskazuje, że P4 reguluje funkcje CL poprzez swoje receptory jądrowe głównie w okresie tworzenia się CL oraz w trakcie ciąży. Ponadto, stwierdzono wyższą ekspresję mRNA i białka izoformy PGRA niż PGRB, w CL w podanych okresach cyklu i ciąży, co sugeruje, że P4 reguluje funkcje CL przez tę izoformę receptora PGR. Możliwe jest zatem, że ta izoforma jest elementem regulacyjnym aktywność P4, chroniącym CL przed możliwymi skutkami nadprodukcji tego hormonu [Rękawiecki i wsp. 2014, (*załącznik 4, poz. II.A.17*)].

Kolejnym etapem tych badań było określenie wpływu czynników luteotropowych i luteolitycznych na ekspresję mRNA i białek dla obu izoform receptora PGR w endometrium krowy. Zbadano wpływ LH, E2, PGE2, PGF2 α oraz donora tlenu azotu (NONOate) na ekspresję mRNA i białek dla obu izoform receptora PGR w skrawkach endometrium z 6-10 oraz 17-20 dnia cyklu rujowego. Stwierdzono, że zarówno badane czynniki luteotropowe, jak i luteolityczne modulują poziom mRNA oraz białka dla PGRA oraz PGRB i w ten sposób mogą regulować działanie P4 w komórkach endometrium. Wykazane w tych badaniach zależności mają istotny wpływ dla zrozumienia mechanizmów molekularnych zachodzących w macicy, które mogą być zaangażowane w luteolizę lub w ochronę CL przed luteolizą [Rękawiecki i wsp. 2014, (*załącznik 4, poz. II.A.18*)].

Ponadto, zbadano udział P4 oraz antagonistów PGR (ZK299 i RU486) w regulacji poziomu mRNA i białka PGRA i PGRB w endometrium bydła. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno ZK299, jak i RU486 wpływają na poziom ekspresji mRNA i białka izoform PGRA i

PGRB w endometrium. Dane te sugerują, że końcowy efekt fizjologiczny wywołany przez antagonistę receptora P4 zależy od izoformy PGR, która jest z nią związana [Rękawiecki i wsp. 2015 (załącznik 4, poz. II.A.19)].

Następnie uczestniczyłam także w badaniach, których celem było oznaczenie poziomu mRNA i białka dla wybranego koaktywatora (P300/CBP-associated factor; PCAF) i korepresora (Nuclear Receptor Corepressor 1; NCOR1) PGR w CL i endometrium podczas cyklu rujowego u krów. Uzyskane wyniki wskazują, że poziom mRNA i białka dla koaktywatora PCAF i korepresora NCOR1 ulega zmianom w zależności od poziomu P4, co sugeruje zaangażowanie tego hormonu w regulację ich ekspresji. Ponadto, podobne poziomy ekspresji badanego koregulatora i korepresora w CL i endometrium mogą wskazywać, że rywalizują one o miejsce wiązania zlokalizowane w receptorze PGR [Rękawiecki i wsp. 2017, załącznik 4, poz. II.A.20]. Badania te są kontynuowane w obecnie realizowanym projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (UMO-2015/17/B/NZ4/02440; kierownik dr hab. Robert Rękawiecki) pt. „Koaktywatory i korepresory receptora progesteronu jako regulatory wpływu progesteronu na tkanki układu rozrodczego krowy”, w którym jestem wykonawcą.

Uczestniczyłam również w badaniach mających na celu określenie poziomu metylacji promotorów izoform PGRA i PGRB receptora P4 oraz oznaczenie procentu metylacji każdej z izoform w CL i endometrium podczas cyklu rujowego. Uzyskane wyniki wskazały, że izoforma PGRA jest metylowana pomiędzy 15 a 17%, zaś izoforma PGRB pomiędzy 6 a 7,7% podczas cyklu w CL. Natomiast w endometrium metylacja dla PGRA waha się pomiędzy 6 a 7,3%, a dla izoformy PGRB pomiędzy 3 a 4,8% podczas cyklu. Dane te sugerują, że zwiększona metylacja promotora izoformy PGRA może być mechanizmem regulującym hamującą aktywność PGRA wobec PGRB i w ten sposób metylacja może regulować działania progesteronu w CL i endometrium [Rękawiecki i wsp. 2018 (załącznik 4, poz. II.A.21)].

Ponadto, uczestniczyłam w badaniach dotyczących wyznaczenia najbardziej stabilnych genów referencyjnych do badań ekspresji genów metoda Real Time PCR w miometrium krowy. Badania te dotyczyły oznaczenia stabilności ekspresji 13 wybranych genów, które najczęściej wykorzystywane są w publikacjach naukowych do badań ekspresji genów w tkance miometrium krowy. Stabilność ekspresji tych genów została wyznaczona za pomocą programów geNorm i NormFinder. Wykazano, że w miometrium najbardziej stabilnymi genami są: C2orf29 (*similar to uncharacterized protein C2orf29*), SUZ12 (*suppressor of zeste 12 homolog*) oraz TBP (*TATA box binding protein*). Uzyskane wyniki przedstawiono w pracy Rękawiecki i wsp. (2013; załącznik 4, poz. II.A.14).

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących udziału polichlorowanych bifenyli w mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺ w komórkach jajnika krowy. W badaniach tych określono wpływ polichlorowanych bifenyli (PCB), w tym PCB 126 (dioksynopodobny), PCB 77 (ambiwalentny), PCB 153 (estrogenopodobny) oraz mieszaniny PCB (Aroclor 1248) na mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺ w komórkach granulozy i komórkach lutealnych stymulowanych FSH i LH. Oznaczono zmiany mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów Ca²⁺ z wykorzystaniem barwnika Fura 2AM, w komórkach

inkubowanych z PCB przez 72 godziny, a następnie stymulowanych FSH lub LH. Uzyskane wyniki wykazały niekorzystny wpływ PCB na mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , co sugeruje, że obserwowany negatywny wpływ PCB na procesy reprodukcyjne odbywa się poprzez zakłócenie procesu przekazywania sygnału w komórkach [Młynarczuk i Kowalik 2013 (załącznik 4, poz. II.A.16)].

Aktualnie prowadzone badania

Obecnie rozpoczęłam realizację grantu OPUS 14 Narodowego Centrum Nauki pt. „*Rola receptorów błonowych progesteronu w regulacji czynności endometrium*”, w którym jestem kierownikiem (UMO-2017/27/B/NZ4/02973; realizowany od 03.08.2018).

Celem naukowym tego projektu jest: (a) określenie funkcji błonowych receptorów P4: PGRMC i mPR w regulacji czynności macicy, (b) identyfikacja szlaków przekazu sygnałów przez te receptory wraz z udziałem interakcji wybranych szlaków sygnalizacyjnych, oraz (c) zdefiniowanie procesów komórkowych regulowanych przez te receptory w warunkach fizjologicznych w błonie śluzowej macicy krowy. Na podstawie naszych wcześniejszych badań dotyczących pozagenomowego wpływu P4 na czynność komórek macicy i jajnika krowy oraz ekspresji błonowych receptorów P4 w macicy, ciałku żółtym, a także łożysku zakładamy, że: błonowe receptory P4 regulują czynność endometrium poprzez ich (i) udział w modulacji sygnałów wewnątrzkomórkowych, (ii) wpływ na ekspresję wybranych genów oraz (iii) regulację procesów sekrecyjnych (biosynteza PG i hormonów steroidowych) i proliferacyjnych (proliferaacja, migracja, angiogeneza) w komórkach nabłonka endometrium oraz śródbłonka naczyń krwionośnych endometrium.

Proponowane badania mają charakter podstawowy, jednak ważny dla zrozumienia zaburzeń płodności u samic. Mamy nadzieję uzyskać nowe dane dotyczące udziału receptorów PGRMC oraz receptorów mPR w regulacji funkcji sekrecyjnej i proliferacyjnej endometrium, co pozwoli lepiej zrozumieć mechanizm udziału P4 w regulacji cyklu rujowego oraz ochronie wczesnej ciąży.

Ponadto, jestem opiekunem naukowym w projekcie promotorskim KNOW „*Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku krowy*”, realizowanym przez Panią mgr Karolinę Dobrzyń (kierownik projektu prof. dr hab. Jan Kotwica). Realizuję również badania w ramach projektu Narodowe Centrum Nauki (UMO-2015/17/B/NZ4/02440; kierownik dr hab. Robert Rękawiecki) pt. „*Koaktywatory i korepresory receptora progesteronu jako regulatory wpływu progesteronu na tkanki układu rozrodczego krowy*”, w którym jestem wykonawcą.

Podsumowanie dorobku naukowego

Wyniki moich badań zostały opublikowane w 25 publikacjach w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR) (lista A MNiSW). Spośród tych prac 19 ukazało się po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. Jestem współautorką 3 prac przeglądowych i 1 rozdziału w książce anglojęzycznej. Wyniki badań prezentowałam w formie referatów (15) oraz

plakatów (27) na licznych konferencjach międzynarodowych i krajowych. Z 42 komunikatów naukowych, w 22 jestem pierwszym autorem.

Sumaryczny współczynnik wpływu impact factor moich publikacji wg bazy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania prac) wynosi 32,987, łączna punktacja wg wykazu czasopism naukowych MNiSW wynosi 605 pkt (z dnia 21.01.2017r.). Współczynnik Hirscha wg Web of Science wynosi 9, a sumaryczna liczba cytowani według WoS wynosi 229 razy, bez autocytoowań 167 razy (z dnia 28.03.2018).

Podsumowując, brałam udział lub obecnie uczestniczę w realizacji 10 projektów badawczych, w tym w pięciu projektach byłam/jestem kierownikiem. Odbyłam staż w ramach programu „Skills – Staże” Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w Institute of Veterinary Anatomy, University of Zurich, Switzerland.

Uczestniczyłam w krajowych i międzynarodowych kursach dotyczących technik biologii molekularnej, metod badania ekspresji genów i białek, hodowli komórek w modelu 3D, analiz mikroskopowych oraz sekwencjonowania nowej generacji.

Od 2008 roku wykonałam 21 recenzji publikacji nadsyłanych do redakcji polskich i międzynarodowych czasopism naukowych: *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *Reproductive Biology*, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *International Journal of Fertility & Sterility*, *Reproductive Biology and Endocrinology*, *Theriogenology*, *Reproduction in Domestic Animals*, *International Immunopharmacology*, *The Journal of Veterinary Sciences*. Recenzowałam również abstrakty konferencyjne na VII Zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu. Byłam dwukrotnie członkiem Zespołu Ekspertów Narodowego Centrum Nauki w konkursach Opus, Preludium i Sonata. Zrecenzowałam łącznie 30 projektów zgłoszonych do NCN.

W uznaniu szczególnych osiągnięć w pracy naukowej zostałam kilkakrotnie nagrodzona m.in. Nagroda prezesa Rady Ministrów za najlepszą pracę doktorską, stypendium Skills - Staże Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, stypendium w ramach programu Pomost Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Dwukrotnie zostałam nagrodzona nagrodą zespołową Dyrektora IRZiBZ PAN za publikacje naukowe.

Byłam promotorem 3 prac magisterskich, opiekunem naukowym 2 doktorantów oraz opiekunem stażystów i praktykantów w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu IRZiBZ PAN.

W ramach działalności organizacyjnej w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN jestem członkiem Komisji Socjalnej oraz Komisji ds. monitorowania procesu wdrożenia Europejskiej Karty Naukowca. Ponadto, aktywnie uczestniczę w pokazach i zajęciach organizowanych w ramach Rodzinnego Pikniku Naukowego „Nauka też Sztuka” oraz Europejskiej Nocy Naukowców „Fusion Night”.

Pełna lista moich osiągnięć dotyczący pracy badawczej, dydaktycznej i organizacyjnej znajduje się w Załączniku IV pt: „Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”.

Informacje bibliometryczne dorobku naukowego:

Sumaryczny impact factor (IF) zgodny z rokiem opublikowania (dla publikacji z 2018 r. przyjęto IF z 2017 r.) = **32,987**

Sumaryczny impact factor (IF) zgodny z listą opublikowaną w 2017 r. = **39,751**

Cytowania według bazy Web of Science (28.03.2019 r.) = **229** (bez autocytowań 167)

Cytowania według bazy Scopus (28.03.2019 r.) = **259** (bez autocytowań 173)

Indeks Hirscha według bazy Web of Science = 9

Indeks Hirscha według bazy Scopus = 9

Punkty MNiSW zgodnie z rokiem publikacji: **520**

Punkty MNiSW zgodnie z listą czasopism opublikowaną w 2017r.: **605**

Odnosiniki do stron źródłowych baz danych innych niż Web of Science, które określają liczbę cytowań oraz indeks Hirsha przedstawione są na stronie Open Researcher and Contributor ID pod adresem: **orcid.org/0000-0001-7637-0911**

BIBLIOMETRYCZNE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO

Pozycje bibliograficzne	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
Publikacje naukowe w czasopismach z listy JCR, wymienionych w części A wykazu MNiSW	6	19	25
Rozdziały w książkach	-	1	1
Doniesienia i komunikaty konferencyjne	4	38	42
łącznie	10	58	68

Magdalena Kasalik