
AUTOREFERAT

DR AGNIESZKA SKOWROŃSKA

KATEDRA FIZJOLOGII CZŁOWIEKA



OLSZTYN 2017

1. Imię i nazwisko	3
2. Wykształcenie	3
2.1. Dyplom	3
2.2. Rozprawa doktorska	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
3.1. Przebieg pracy zawodowej	4
4. Osiągnięcie naukowe i omówienie prac będących podstawą osiągnięcia naukowego	7
a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego	7
5. Omówienie pozostałych osiągnięć badawczych/artystycznych	24
5.1. Analiza bibliometryczna	33

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: **Agnieszka Skowrońska**

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

2.1. 1993 – dyplom lekarza weterynarii, Wydział Weterynarii, Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie. Obecnie Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

2.2. 2004 – uzyskanie stopnia doktora nauk biologicznych na podstawie rozprawy doktorskiej: „Ocena bioróżnorodności bakterioplanktonu jeziorowego przy zastosowaniu metod molekularnych”, promotor prof. dr hab. Aleksander Świątecki, Wydział Biologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie – *(rozprawa wyróżniona)*

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

1993 – 1997	Weterynaryjna Inspekcja Sanitarna w Portach Gdynia-Gdańsk, lekarz graniczny
1997 – 2000	urlop bezpłatny, pobyt z rodziną w Japonii, Tokushima
2000 – 2004	słuchacz dziennych Studiów Doktoranckich w Zakładzie Mikrobiologii, Wydział Biologii UWM w Olsztynie
I. 2004 – VI. 2005	pobyt z rodziną w Danii, Aarhus
2005 – 2007	specjalista naukowo-techniczny, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, UWM, Olsztyn
IV. 2008 – VI 2008	adiunkt w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej
VII. 2008	adiunkt w Katedrze Fizjologii Człowieka, Wydział Nauk Medycznych w Olsztynie, do chwili obecnej

3.1. Przebieg pracy zawodowej

Po ukończeniu studiów i uzyskaniu dyplomu lekarza weterynarii, rozpoczęłam staż w Wojewódzkim Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Olsztynie, a od 1 września 1993 roku pracę jako lekarz graniczny w porcie handlowym w Gdyni. W trakcie pracy odbyłam szkolenia w Instytucie Weterynarii w Puławach z zakresu mikrobiologii i nadzoru nad żywnością pochodzenia zwierzęcego. W kwietniu 1997 roku wraz z mężem i córką wyjechalismy do Japonii, ponieważ mąż rozpoczął doktorat w Katedrze Farmakologii Wydziału Stomatologii Uniwersytetu Tokushima. W Japonii mieszkaliśmy 3,5 roku, czas ten wykorzystywałam głównie dla rodziny, urodziłam syna, ale jednocześnie intensywnie interesowałam się kulturą Japonii, ukończyłam kursy językowe, podstawowy w języku japońskim i zaawansowany w języku angielskim, zakończony zdaniem egzaminem (2000r.) na poziomie B, TOEIC (odpowiednik polskiego egzaminu ADVANCE). Udzielałam także lekcji angielskiego w popołudniowych szkołach typu „Kumon” dla japońskich dzieci w wieku przedszkolnym.

W październiku 2000 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biologii UWM w Olsztynie. Na początku studiów nawiązałam współpracę z Prof. Rudolfem Ammanem i Dr Jakobem Perenthalerem z Max Planck Institut w Bremen i od kwietnia 2001 roku odbywałam systematyczne staże naukowe w Instytucie, wykonując tam w dużym zakresie swoją pracę doktorską. Tematyka badawcza realizowana z mikrobiologii, do momentu zatrudnienia w Katedrze Fizjologii Człowieka, koncentrowała się głównie na wykorzystaniu technik biologii molekularnej do identyfikacji bakterii z różnych środowisk. Szczególnie zastosowana po raz pierwszy w Polsce, w mikrobiologii środowiskowej metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), z którą zapoznałam się w Instytucie Max Plancka wzbudziła zainteresowanie innych badaczy. W związku z tym już w czasie realizacji doktoratu (w 2003r.) zostałam zaproszona przez prof. dr hab. Ryszarda Chrósta z Uniwersytetu Warszawskiego do udziału w grantie zamawianym w ramach stworzonego konsorcjum. Współpracę z Uniwersytetem Warszawskim kontynuowałam także po ukończeniu doktoratu i podczas pobytu z rodziną w Danii w latach 2004-2005; mąż w tym czasie pracował na stanowisku post-doca na Uniwersytecie w Aarhus. Wynikiem współpracy jest cykl prac naukowych opublikowanych w renomowanych czasopiśmie z zakresu mikrobiologii oraz komunikaty prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych.

W 2005 roku rozpoczęłam pracę na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim na stanowisku specjalisty w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej. W tym czasie zostałam zaproszona do wygłoszenia wykładów na temat metody FISH na Uniwersytecie Warszawskim oraz w Instytucie Polskiej Akademii Nauk w Dziekanowie k/Warszawy. Ponadto nawiązałam współpracę z Wydziałem Bioinżynierii gdzie wspólnie opracowaliśmy metodę do automatycznej analizy liczebności bakterii z przewodu pokarmowego z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* FISH. Pracując na etacie specjalisty samodzielnie opracowałam dwa przedmioty z zakresu mikrobiologii molekularnej, które realizowałam na Wydziale Ochrony Środowiska i Rybactwa oraz na Wydziale Biologii Biotechnologii. Wykłady i ćwiczenia cieszyły się dużym zainteresowaniem, w wyniku czego od kwietnia 2008r. awansowałam na stanowisko adiunkta.

W lipcu 2008r. zostałam przyjęta do zespołu Katedry Fizjologii Człowieka, kierowanego przez prof. dr. hab. Mariusza Majewskiego, Wydziału Nauk Medycznych UWM w Olsztynie. Doświadczenia zdobyte za granicą podczas licznych staży: znajomość metod badawczych, planowania badań, organizacji pracy i dobra znajomość fizjologii zwierząt i człowieka wyniesiona ze studiów, umożliwiły mi szybką zmianę profilu badawczego. W swojej działalności naukowej skupiałam się nad badaniem roli akwaporyn (AQP) w układzie rozrodczym na modelu świni. Dzięki współpracy z katedrą Fizjologii Zwierząt, Wydziału Biologii i Biotechnologii uzyskaliśmy granty na badania z tego zakresu, których byłam głównym wykonawcą. Badania te przyniosły szereg publikacji w renomowanych czasopismach z zakresu fizjologii rozrodu. Ponadto rozpoczęłam badania dotyczące ekspresji akwaporyn w mięśniakach macicy kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym oraz rolę AQP5 w progresji raka jajnika. W tym czasie dwukrotnie starałam się o grant z KBN i NCN, aby rozwinąć badania z tego zakresu, ale nie uzyskałam finansowania. Mimo to, badania te kontynuuję z przydzielonych środków statutowych. Współpracuję także z Kliniką Nefrologii, Hipertensjologii i Chorób Wewnętrznych, Szpitala Wojewódzkiego w Olsztynie. Badamy ekspresje akwaporyn 1, 2 i 3 na poziomie mRNA i białka w komórkach nabłonka kanalików nerkowych, pacjentów z przewlekłymi glomerulopatiami oraz u pacjentów po przeszczepieniu nerki.

W ramach działalności dydaktycznej prowadzę ćwiczenia z Fizjologii człowieka dla studentów kierunku Lekarskiego oraz studentów kierunku Lekarskiego w języku

angielskim. Jestem koordynatorem zajęć z przedmiotu *Physiology*, na kierunku Lekarskim w języku angielskim. Jestem promotorem trzech prac licencjackich na kierunku Pielęgniarstwo. Od 2011 roku jestem opiekunem studenckiego Koła Naukowego Fizjologów Doświadczalnych w Katedrze Fizjologii Człowieka. Pod moim naukowym kierunkiem studenci uzyskali wyróżnienia i nagrody na krajowych i międzynarodowych kongresach studenckich. Aktualnie jestem promotorem pomocniczym jednej pracy doktorskiej.

4. Osiągnięcie naukowe i jego omówienie

Wskazanie osiągnięcia naukowego,* stanowiącego znaczny wkład autora w rozwój określonej dyscypliny naukowej wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r.(Dz. U. nr 65, poz.595 ze zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U . z 2014r. poz. 1852.)

* w przypadku gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Cykl publikacji powiązanych tematycznie:

Wpływ hormonów steroidowych, oksytocyny, kwasu arachidonowego, forskoliny oraz cAMP na regulację ekspresji mRNA i białka akwaporyny (AQP) 1 i 5 w tkankach macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica*) w czasie cyklu estralnego i wczesnej ciąży.

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 4 oryginalnych prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Sumaryczny IF = 8.716, punkty MNISW₂₀₁₅ = 95,0. Wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych.

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

1. Skowronska A, Mlotkowska P, Wojciechowicz B, Okrasa S, Nielsen S, Skowronski MT. (2015) Progesterone, estradiol, arachidonic acid, oxytocin, forskolin and cAMP influence on aquaporins 1 and 5 expression in porcine uterine explants during the mid-luteal phase of the estrous cycle and luteolysis: an in vitro study. Reproductive Biology and Endocrinology, Feb 18, 13:7 doi:10.1186/12958-015-0004-5, (IF₂₀₁₅ 2.147, MNiSW₂₀₁₅ 25)

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji badań, przygotowaniu i przeprowadzeniu inkubacji tkanek, oznaczaniu poziomu białka metodą Western-blot, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. W publikacji jestem autorem korespondującym. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 65%.

2. Skowronska A, Mlotkowska P, Majewski M, Nielsen S, Skowronski MT. (2016) *Expression of aquaporins 1 and 5 and their regulation by ovarian hormones, arachidonic acid, forskolin and cAMP during implantation in pigs.* **Physiological Research**, [Mar 15 Epub ahead of print], Volume 65: 637-650, (IF₂₀₁₆ 1.618, MNiSW₂₀₁₅ 20)

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji badań, przeprowadzeniu inkubacji tkanek, zapewnieniu integralności całego eksperymentu, udziału w oznaczaniu poziomu ekspresji mRNA metodą (real-time PCR) i białka (Western blot), wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. W publikacji jestem autorem korespondującym. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 70%.

3. Skowronska A, Mlotkowska P, Okrasa S, Nielsen S, Skowronski MT. (2016) *Modulatory effects of steroid hormones, oxytocin, arachidonic acid, forskolin and cAMP on the expression of AQP1 and AQP5 in the porcine uterus during placentation.* **Journal of Physiology and Pharmacology**, 67(2), 311-319 (IF₂₀₁₅ 2.804, MNiSW₂₀₁₅ 25)

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji badań, inkubacji tkanek, przygotowaniu preparatów immunohistochemicznych, oznaczaniu poziomu białka metodą Western blot, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. W publikacji jestem autorem korespondującym. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 70%.

4. Skowronska A, Mlotkowska P, Nielsen S, Skowronski MT. (2015) *Differences in expression between AQP1 and AQP5 in porcine endometrium and myometrium in response to steroid hormones, oxytocin, arachidonic acid, forskolin and cAMP during the mid-luteal phase of the estrous cycle and luteolysis.* **Reproductive Biology and Endocrinology**, Dec.1; 13: 131 doi:10.1186/s12958-015-0128-7, (IF₂₀₁₅ 2.147, MNiSW₂₀₁₅ 25)

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji badań, izolacji endometrium i miometrium i ich inkubacji in vitro, udziale w analizach: immunohistochemii, real-time PCR i Western blot, wiodący udział w analizie

i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. W publikacji jestem autorem korespondującym. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 70%.

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

Proces przemieszczania się wody przez dwuwarstwową błonę lipidową oraz utrzymanie odpowiedniego ciśnienia wewnątrzkomórkowego i równowagi wodnej między komórką a środowiskiem, warunkują wyspecjalizowane kanały, selektywne dla cząsteczek wody zwane akwaporynami. Akwaporyny (AQPs) są rodziną małych (25-34 kDa) białek błonowych, które tworzą kanały do szybkiego transportu cząsteczek wody. O doniosłości ich znaczenia świadczy przyznanie prof. Peter Agre w 2003 roku Nagrody Nobla w dziedzinie chemii. Kierunek transportu wody przez akwaporyny zależy od gradientu osmotycznego (Preston i wsp., 1992, Verkman AS., 2013). U ssaków wykazano 13 izoform akwaporyn (AQP0 - AQP12), podzielonych w zależności od transportowanych substancji na trzy główne grupy: klasyczne - selektywne tylko dla wody (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4 i AQP5), akwagliceroporyny - transportujące dodatkowo glicerol oraz mocznik i niektóre jony, np. chloru i rtęci (AQP3, AQP7, AQP9, AQP10) oraz tzw. unorthodox (AQP6, AQP8, AQP11 i AQP12) (Agre i Kozano., 2003), ich funkcja jest obecnie intensywnie badana. Kilka izoform AQPs transportuje również cząsteczki gazów (CO₂, O₂, NO i NH₃). Na przykład AQP1 ułatwia transport CO₂, NO i NH₃ (Herrera i Gavin., 2011), natomiast AQP4 jest kanałem dla NO i O₂ (Wang i Tajkhorshid. 2010), a AQP5 transportuje także CO₂ (Musa-Aziz i wsp., 2009). Określenie miejsc ekspresji i poznanie budowy akwaporyn, pozwoliło na zdefiniowanie roli tych białek w niektórych procesach fizjologicznych dotyczących gospodarki wodnej. Te małe białka błonowe uczestniczą również w innych procesach fizjologicznych, takich jak: adhezja, migracja, proliferacja i różnicowanie komórek (Verkman i Mitra, 2000). Użycie myszy z wyciszonymi genami AQPs umożliwiło wykazanie ich udziału np. w migracji komórek śródbłonna (AQP1), (Carbrey i Agre, 2009) metabolizmie tłuszczów (AQP7) (Skowronski i wsp., 2007), metabolizmie glukozy (AQP9) (Rojek i wsp., 2007). Ekspresja AQPs różni się w zależności od tkanki, ponadto w jednej komórce może występować kilka izoform, często zlokalizowanych na przeciwległych biegunach komórki, w części szczytowej (apikalnej) i podstawnej (bazalnej) komórki. Wyniki badań ostatnich lat dowodzą, że niektóre AQPs (AQP6, 11 i 12) znajdują się

w błonach organelli wewnątrzkomórkowych (retikulum endoplazmatycznym, mitochondriach, jądrze komórki), odpowiadają za rozmieszczenie wody w komórce i regulują jej objętość. Inne z AQPs (AQP2 i 5), w odpowiedzi na niektóre czynniki, mogą podlegać przemieszczaniu z błony komórki do błon wewnątrzkomórkowych lub odwrotnie. Przykładowo stwierdzono wpływ acetylocholino na przemieszczanie białka AQP5 z błon wewnątrzkomórkowych do części apikalnej komórek ślinianki przyusznej u szczurów i w efekcie wzrost wydzielania wody (Ishikawa i wsp., 1998). Akwaporyny mogą być również wydzielane do płynów, przykładem jest AQP2 wydzielana do moczu, jej ilość jest wskaźnikiem działania wazopresyny w kanalikach zbiorczych nerki (Chung i wsp., 2010). Kilka AQPs (1 i 4) wykazano w różnych częściach mózgu i ich funkcje w produkcji płynu mózgowo-rdzeniowego.

W układzie rozrodczym ssaków zidentyfikowano 12 izoform akwaporyn, które pełnią bardzo ważną rolę w zachowaniu odpowiedniej homeostazy wodnej, a dysfunkcja ich działania może prowadzić do zaburzenia płodności. Ekspresja AQPs w tkankach macicy po raz pierwszy została opisana przez Li i wsp., (1994), którzy potwierdzili obecność transkryptu *Aqp1* w macicy kobiet. Inni autorzy wykazali w macicy kobiet ekspresję mRNA *AQP1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 i 11*, a w kosmówce, owodni i łożysku dodatkowo *Aqp4*, ale brak *Aqp2* (Escobar i wsp., 2012). Badania prowadzone na zwierzętach, również potwierdziły występowanie transkryptu *Aqp0 - 12* w endometrium kłaczy, jednak analiza Western blot potwierdziła obecność białka tylko AQP0, 2 i 5 (Klein i wsp., 2013). Obecność AQPs stwierdzono we wszystkich błonach plazmatycznych komórek zwierzęcych, jednak mechanizm ich działania oraz regulacja ich ekspresji na poziomie mRNA i białka jest wciąż mało poznana. Transport i homeostaza wody w układzie rozrodczym samic, a szczególnie w macicy, łożysku i błonach płodowych jest krytyczna dla utrzymania prawidłowych funkcji rozrodczych, implantacji embrionów oraz wzrostu i rozwoju płodu. W zależności od stanu fizjologicznego układu rozrodczego (faza cyklu, implantacja, placentacja, poród) ma miejsce okresowe pobudzenie lub wyciszenie ekspresji wielu genów w jego strukturach.

Powstaje zatem pytanie, jaka jest rola hormonów w regulacji ekspresji genów oraz białek AQPs? Pierwsze prace dotyczące roli hormonów steroidowych (estradiolu i progesteronu) w regulacji ekspresji AQP1 i 5 w tkankach macicy myszy i szczura pokazały ich zróżnicowane działanie. Stwierdzono bezpośredni wpływ estradiolu na ekspresję AQP5 w macicy myszy (Kobayashi i wsp., 2006). Następnie wykazano, że

podanie progesteronu lub/razem z estradiolem reguluje ekspresję AQP1 i 5 w macicy owariektomizowanych szczurów (Lindsay i Murphy (2006). Natomiast u owariektomizowanych myszy nie zaobserwowano podobnych zmian ekspresji AQP5. Dopiero wcześniejsze podanie progesteronu, a następnie estradiolu powodowało wzrost ekspresji AQP5 (Richard i wsp., 2003). Wykazano również wpływ podania samego estradiolu na ekspresję mRNA *AQP1* w miometrium macicy myszy, ale bez wzrostu poziomu białka. Z kolei stosując techniki immunocytochemiczną i immunoprecypitacji, inni badacze wykazali znaczący wpływ estrogenów na lokalizację AQP1 w miometrium macicy myszy, ale brak efektu na ekspresję AQP5 (Jablonski i wsp., 2003). Wykazano również, że poziom ekspresji AQP2 występującej w ludzkich komórkach endometrium jest zależny od fazy cyklu menstruacyjnego, wzrasta w środkowej i późnej fazie sekrecyjnej (Hildenbrand i wsp. 2006). Wykazano także, jakkolwiek w bardzo małym zakresie, wpływ oksytocyny na poziom ekspresji mRNA i białka AQP5 w macicy szczura podczas ciąży (Ducza i wsp., 2014) oraz udział forskoliny, aktywatora cykazy adenylanowej i cAMP w regulacji ekspresji AQP3 w ludzkich komórkach nabłonka owodni (Wang i wsp., 2006). W innej pracy (Wang i wsp., 2007) prowadzonej także na komórkach nabłonka owodni, wykazano wpływ forskoliny na ekspresję mRNA *AQP1*, *8* i *9*, ale brak działania analogu cAMP. Natomiast w badaniach prowadzonych na liniach komórkowych, wyprowadzonych z raka trofoblastu, obserwowano znaczący udział cAMP i wazopresyny w regulacji genu *AQP1* (Belkacemi i wsp., 2008). Kolejne badania pokazały, że AQPs w endometrium są zaangażowane w procesy proliferacyjne, aktywność sekrecyjną i mogą wspomagać proces implantacji zarodka (Zou i wsp., 2011).

Inspiracją do badań były wcześniejsze wyniki, także własne uzyskane na modelu świni, które jednoznacznie wykazały fluktuację ekspresji białka AQP1 i AQP5 w macicy i jajowodzie podczas cyklu estralnego i ciąży (Skowronski i wsp., 2010; 2011). Zaobserwowano specyficzny wzór ekspresji badanych AQPs, który wskazywał na ich udział w utrzymaniu odpowiedniego nawodnienia i zdolności regeneracyjnych dróg rodnych w czasie cyklu estralnego i ciąży. Uznałam, że są one bardzo dobrą bazą do dalszych pogłębionych badań, ponieważ pośrednio sugerowały udział hormonów steroidowych w regulacji ekspresji białka AQP1 i 5 w badanych tkankach. Ponadto, świnia pod względem anatomicznym i fizjologicznym uznawana jest za najbardziej odpowiedni model badawczy, zbliżony do człowieka stosowany w badaniach biomedycznych (Kuzmuk and Schook, 2010). Na uwagę zasługuje fakt, że zastosowanie

tego modelu m.in. w badaniach endokrynologicznych umożliwiło zrozumienie mechanizmu działania hormonów rozrodczych, hormonów przysadki mózgowej, a w szczególności poznania struktury insuliny. Świńska insulina była stosowana przez kilka dekad w leczeniu cukrzycy u ludzi (Kuzmuk and Schook, 2010).

Zatem wybór związków biologicznie aktywnych, które potencjalnie mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genu i białka AQP1 i 5 w macicy świni nie pozostawiał wątpliwości, że należy uwzględnić: **1/** hormony jajnika (progesteron i estradiol), które przygotowują drogi rodne samicy do zapłodnienia i ciąży; **2/** wytwarzane w macicy prostaglandyny (PG): $PGF_{2\alpha}$ - luteolityczna i PGE_2 - luteotropowa, które wpływają na czas życia ciała żółtego, a tym samym regularność cykli estralnych i utrzymanie ciąży u świni (Moeljono i wsp. 1976, Bazer i Tchatcher 1977; Okrasa i wsp., 1985; Blitek i Zięcik 200, Kraeling i wsp., 1985). Rolę PGs w ekspresji AQP 1 i 5 oceniano pośrednio, używając kwasu arachidonowego, który jest substratem do ich syntezy; **3/** oksytocynę, która nie tylko wpływa na kurczliwość macicy, ale jest produkowana przez endometrium świni (Trout i wsp., 1995) i reguluje syntezę i sekrecję prostaglandyn w macicy (Mirando i wsp., 1996; Uzumcu i wsp., 1998); **4/** udział szlaku cyklicznego adenylnowego/cykliczny adenylnomonofosforan (AC/cAMP) w ekspresji AQP1 i 5 w macicy świni: w tym celu stosowano forskolinę – aktywator cyklicznego adenylnowego, który katalizuje produkcję cAMP i analog cAMP (cpt-cAMP), który aktywuje komórkową kinazę białkową A (PKA). **Stąd, hipoteza badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe zakładała, że wyżej wymienione czynniki biologiczne uczestniczą w regulacji ekspresji mRNA oraz białka AQP1, 5 i mają wpływ na ich działanie. Ponadto zakładałam, że powyższe czynniki będą miały wpływ na dystrybucję badanych akwaporyn w tkankach macicy.**

Eksperymenty opisane w prezentowanych publikacjach zatwierdzone zostały przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Badań na Zwierzętach, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Macice do badań pobierano w ściśle określonych dniach cyklu: w 10-12 dniu cyklu, jest to faza środkowo lutealna - powstałe w tym czasie ciało żółte wydziela duże ilości progesteronu, którego celem jest zapewnienie warunków do rozwoju zarodka, jego implantacji i utrzymania ciąży oraz 14-16 dnia cyklu, jest to okres regresji ciała żółtego - luteolizy, który charakteryzuje się gwałtownym spadkiem stężenia progesteronu we krwi. Macice od zwierząt ciężarnych pobierano w okresie implantacji (14-16 dniu ciąży) i w okresie placentacji (30-32 dnia ciąży). U wszystkich badanych

zwierząt dni cyklu i ciąży były kontrolowane. U świni, w przeciwieństwie do człowieka, występuje nieinwazyjny typ łożyska. Macice izolowano bezpośrednio po uboju zwierząt i transportowano do laboratorium. Z pobranych macic izolowano skrawki o masie 400 mg. Pobrane skrawki macic od zwierząt w czasie cyklu estralnego (10-12 i 14-16 dnia), implantacji (14-16 dnia) i placentacji (30-32 dnia) poddano wstępnej inkubacji (18 godz.) w medium M199 z dodatkiem 0,1% BSA i 20 µg nystatyny oraz 20 µg gentamycyny, następnie inkubowano z badanymi czynnikami przez 3 i 24 godziny w łaźni wodnej ruchomej (temp 37°C, atmosferze 95% O₂ i 5% CO₂). W skrawkach tkanek macicy, po ich inkubacji przez 3 i 24 godziny, oznaczano ekspresję genów *Aqp1* i *Aqp5* metodą real-time PCR, ekspresję białka metodą Western-blot i lokalizację białka AQP1 i AQP5 metodą immunohistochemiczną. Podjęto także próbę zweryfikowania dotychczasowej wiedzy na temat regulacji ekspresji genów i białka AQP1 i 5 nie tylko w eksplantach macicy, ale także oddzielnie w skrawkach endometrium i miometrium. W tym celu w dodatkowych, osobnych seriach badawczych, od zwierząt w 10-12 dniu i 14-16 dniu cyklu estralnego, z pobranych macic izolowano skrawki endometrium i miometrium (ok. 200 mg) i inkubowano z badanymi czynnikami przez 3 i 24 godziny. Ekspresję genów i białka AQP 1 i 5 oraz ich lokalizację w skrawkach endometrium i miometrium po 3 i 24 godz. inkubacji badano przy zastosowaniu tych samych metod, jak w przypadku eksplantów macicy.

W publikacji nr 1 wykazano że steroidowe hormony (P₄ i E₂) uczestniczą w regulacji ekspresji genu *Aqp1* i 5 w tkankach macicy świni (Tab. 1 i 2). Przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym wykazałam, że estradiol hamował ekspresję genu *Aqp1* w tkance macicy z fazy środkowo-lutealnej (10-12 dnia cyklu), po krótkiej inkubacji (3 godz.), a P₄ podczas luteolizy (14-16 dnia cyklu). Natomiast metoda Western-blot wykazała, że ekspresja białka AQP1 była istotnie stymulowana przez P₄ i E₂ w obu okresach cyklu (Tab. 1). Ponadto wykazano, że E₂ istotnie zwiększa ekspresję białka AQP1 w tkance macicy w okresie luteolizy (po 3 godz.) w porównaniu z fazą środkowo-lutealną. Z kolei ekspresja genu *Aqp5* była hamowana przez P₄ i E₂ w czasie fazy środkowo-lutealnej, ale istotnie stymulowana przez E₂ podczas luteolizy (Tab. 2). Jednocześnie wykazano, że ekspresja białka AQP5 w skrawkach macicy była istotnie stymulowana przez P₄ i E₂ w obu okresach cyklu i czasach inkubacji oraz istotnie wyższa w czasie luteolizy w porównaniu z fazą środkowo-lutealną. **Powyższe wyniki wskazują**

na ważną rolę hormonów steroidowych w regulacji ekspresji AQP1 i 5 podczas cyklu estralnego, a szczególnie białka AQP5 podczas luteolizy.

Oksytocyna (OT) jest jednym z kluczowych hormonów zaangażowanych w kontrolowanie kurczliwości macicy oraz jako regulator aktywności wydzielniczej macicy. Wcześniejsze badania prowadzone na modelu świni wykazały, że endometrium wydziela OT (Trout i wsp.,1995). Wyniki pracy pokazały, że OT powodowała istotne hamowanie ekspresji genu *Aqp1 i 5* w tkankach macicy, szczególnie po 3 godz. inkubacji, ale nie miała wpływu na ekspresję białka badanych akwaporyn (Tab.1 i 2). Uwzględniając fakt, że u świni OT jest odpowiedzialna za pulsacyjne uwalnianie PGF_{2alfa} podczas luteolizy i kurczliwość miometrium, można sądzić, że hamujące działanie OT na poziomie transkryptu może być związane z przebudowaniem endometrium, jakie ma miejsce pod koniec fazy lutealnej. Co więcej badania przeprowadzone na hodowlach skrawkowych endometrium i miometrium (**publikacja nr 4**), jednoznacznie wykazały stymulujące działanie OT na ekspresję genu i białka AQP1 i 5 w mięśniówce macicy z fazy środkowo-lutealnej (po 3 i 24 godz. inkubacji) oraz AQP5 w czasie luteolizy (po 3 godz.), (Tab. 3 i 4).

Z kolei kwas arachidonowy (AA), który jest metabolizowany w macicy świni do prostaglandyn (PGE₂ i PGF_{2alfa}), powodował hamowanie ekspresji genu *Aqp1 i 5* w tkankach macicy z fazy środkowo-lutealnej po 3 i 24 godz. inkubacji. Jednak ekspresja białka obu AQPs była istotnie stymulowana przez AA w tkance macicy z okresu luteolizy, po 3 godz. inkubacji (Tab. 1 i 2). **W oparciu o uzyskane wyniki można wnioskować, że prostaglandyny uczestniczą w regulacji ekspresji AQP1 i AQP5 w tkance macicy podczas luteolizy.** Uzyskane wyniki korespondują również dobrze ze stanem fizjologicznym zwierząt, ponieważ w tym okresie PGF_{2alpha} jest uwalniana pulsacyjnie z endometrium powodując regresję ciała żółtego.

W publikacji 1 poddałam również weryfikacji hipotezę dotyczącą udziału szlaku cyklicznego adenylationa/cykliczny adenylationa (AC/cAMP) w ekspresji AQP1 i 5 w macicy świni. W przeprowadzonych badaniach stwierdziłam, że po zastosowaniu forskoliny (aktywator AC) i analogu cAMP ekspresja białka AQP1 w obu okresach cyklu była istotnie pobudzona, ale jedynie w czasie krótkiej 3 godz. inkubacji, natomiast po 24 godz. była na poziomie grupy kontrolnej (Tab. 1). Z kolei ekspresja AQP5 po suplementacji zarówno forskoliną jak i analogiem cAMP utrzymywała się na wysokim poziomie po 3 i 24 godz. inkubacji w obu okresach cyklu, mimo braku pełnej

współzależności między poziomem ekspresji genu i białka (Tab. 2). Dodatkowo na uwagę zasługuje fakt, że poziom ekspresji białka AQP5 po inkubacji skrawków macicy z forskoliną i cAMP był istotnie wyższy w tkance macicy z 14-16 dnia cyklu (okres luteolizy) w porównaniu do 10-12 dnia (faza środkowo-lutealna). **Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że szlak AC/cAMP jest włączony w wewnątrzkomórkowy przekaz sygnałów związanych z regulacją ekspresji badanych akwaporyn, a szczególnie AQP5 w macicy świni w czasie cyklu.**

Coraz więcej badań wskazuje, że ilość badanego białka nie zawsze koreluje z ilością jego mRNA. Podobne zależności w przypadku badanych AQP5 zaobserwowałam w swojej pracy. Najnowsze doniesienia wskazują, że różnice pomiędzy ilością białka, a ilością transkryptu dla danego białka wynikają z nierównomiernego procesu transkrypcji i translacji (Vogel i Marcotte, 2012). Znaczącą rolę w tych procesach przypisuje się mikroRNA (miRNA), ich sekwencja może być fragmentarycznie komplementarna do jednej lub kilku cząsteczek mRNA. Mikro RNA wiążąc się do komplementarnych sekwencji w rejonie 3'UTR (*untranslated regions*) mRNA genu docelowego mogą wpływać na regulację ekspresji genu, co skutkuje degradacją transkryptu lub zahamowaniem translacji docelowego RNA. Przyjmuje się, że translacja ok. 30% komórkowego RNA może być regulowana przez cząsteczki miRNA, których do tej pory opisano ponad 1000 u człowieka (Ouellet i wsp., 2006) .

Z publikacji nr 1 pochodzą również inne bardzo interesujące wyniki, dotyczące zmian w lokalizacji komórkowej AQP5 w odpowiedzi na badane czynniki. Reakcja immunohistochemiczna pozwoliła na zlokalizowanie AQP5 w niestymulowanych eksplantach w błonie apikalnej komórek nabłonka macicy. Natomiast inkubacja eksplantów z P₄, E₂, forskoliną i cAMP spowodowała przemieszczanie białka AQP5 z apikalnej części błony komórek nabłonka endometrium do części bazolateralnej, w obu okresach cyklu. Podobny wzór lokalizacji AQP5 stwierdzono po 3 godz. suplementacji z AA w tkankach macicy z okresu luteolizy. Analiza lokalizacji AQP5 wskazuje na zmiany związane z potencjalnie dwukierunkowym przepływem wody przez błonę pod wpływem badanych czynników i współdziałanie tego białka w utrzymaniu właściwej homeostazy wodnej w tkance macicy w badanych okresach cyklu.

Reasumując, uzyskane wyniki po raz pierwszy wykazały, że P₄, E₂, AA, forskolina i cAMP regulują ekspresję genu i białka AQP1 i AQP5 w macicy świni w czasie fazy środkowo-lutealnej (10-12 dnia cyklu) i luteolizy (14-16 dnia cyklu).

Ponadto wykazano, że ekspresja białka AQP5, w odpowiedzi na niektóre spośród badanych czynników, była istotnie wyższa w okresie luteolizy (14-16 dnia) niż w fazie środkowo-lutealnej (10-12 dnia). Szczególnie wysoka ekspresja białka AQP5 była obserwowana po 3 godz. suplementacji P₄, E₂, forskoliną i cAMP, i utrzymywała się podwyższona do 24 godzin inkubacji. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały, że odpowiedź akwaporyn na badane czynniki zależy od fazy cyklu i czasu ich działania.

W publikacji nr 2 wykazano fluktuację ekspresji transkryptu *Aqp1* i *Aqp5* w tkance macicy pobranej w okresie implantacji (14-16 dzień ciąży), w zależności od czasu inkubacji 3 lub 24 godz (Tab. 1 i 2). Ponadto ekspresja mRNA *Aqp1* ulegała obniżeniu po 3-godz. inkubacji z E₂, oksytocyną, AA i cAMP, jakkolwiek istotnie wzrastała po dłuższej inkubacji z oksytocyną, AA, cAMP i forskoliną, w porównaniu do grupy kontrolnej. Progesteron nie wpływał na ekspresję mRNA badanych akwaporyn. Z kolei E₂, oksytocyna i AA obniżały ekspresję mRNA *Aqp5* po 3-godz. inkubacji, a cAMP powodował wzrost poziomu transkryptu *Aqp5* po 24-godz.

Badane czynniki, z wyjątkiem oksytocyny, istotnie podwyższały ekspresję białka AQP1 i AQP5 w tkankach macicy z okresu implantacji (Tab. 1 i 2). Progesteron i E₂ istotnie stymulował ekspresję białka AQP1 i AQP5 po 3 i 24 godz., mimo braku pełnej zależności pomiędzy koncentracją transkryptu i białka. Z kolei AA, forskolina i cAMP istotnie podwyższały ekspresję białka AQP1 po dłuższej inkubacji, natomiast ekspresja białka AQP5 była stymulowana przez wymienione czynniki po 3 i 24 godz. z wyjątkiem AA, który pobudzał jej ekspresję tylko po 3 godz. Obserwacje te potwierdziły nasze przypuszczenia, że P₄, E₂, AA, forskolina i cAMP są włączone w regulację ekspresji AQP1 i 5 w tkankach macicy świni podczas implantacji, ponieważ podwyższały koncentrację białka AQP1 i 5. Obserwowane zmiany w ekspresji mRNA i białka badanych akwaporyn były zależne od czasu działania czynników eksperymentalnych na izolowane tkanki macicy. **Szczególnie cenne są wyniki dotyczące roli kwasu arachidonowego, a pośrednio prostaglandyn, ponieważ wzbogaciły naszą wiedzę o ich znaczeniu w regulacji ekspresji genu i białka AQP1 i AQP5 podczas implantacji.** Wcześniej było wiadomo, że prostaglandyny produkowane przez macicę są włączone w proces implantacji; kontrolują uwalnianie cytokin, wzrost i różnicowanie komórek oraz układ naczyniowy, ale nie było badań dotyczących ich roli w regulacji ekspresji AQPów w układzie rozrodczym zwierząt i ludzi. Analiza immunohistochemiczna skrawków macicy z 14-16 dnia ciąży wykazała, podobnie jak w cyklu, obecność AQP1

w apikalnej i bazalnej błonie komórek śródbłonna naczyń krwionośnych macicy, natomiast AQP5 była zlokalizowana w części apikalnej błony komórek nabłonka endometrium. Progesteron, E₂, forskolina i cAMP powodowały przemieszczanie się AQP5, z apikalnej do bazolateralnej części błony plazmatycznej komórek nabłonka, po 3 i 24 godz. inkubacji. Kwas arachidonowy także powodował zmiany w lokalizacji AQP5 w komórkach nabłonka, ale tylko podczas krótkiej 3 godz. inkubacji. Obecność AQP5 wykazano także w komórkach mięśniówki gładkiej macicy. Uzyskane wyniki sugerują przezkomórkowy transport wody pomiędzy światłem macicy i naczyniami krwionośnymi oraz udział tego białka w regulacji macicznego płynu podczas implantacji. Ponadto wskazują na ważną rolę AQP1 i AQP5 w utrzymaniu lokalnego bilansu płynów wewnątrz macicy świni i komunikacji embriion-matka podczas implantacji. Na kanwie uzyskanych w **publikacji nr 1** i **publikacji nr 2** wyników wykazano, że ekspresja mRNA *Aqp1* w tkance macicy loszek z 14-16 dnia ciąży, w grupie kontrolnej była około 4.5 razy wyższa w porównaniu do 14-16 dnia cyklu (luteoliza). Natomiast ekspresja mRNA *Aqp5* była 3 razy wyższa w tkance macicy loszek z cyklu niż loszek ciężarnych. Co więcej ekspresja białka AQP1 w odpowiedzi na suplementację P₄, E₂, AA, forskolinę i cAMP była wyższa podczas luteolizy (po 3 godz. inkubacji) w porównaniu do implantacji. Powyższe dane wskazują, że obecność zarodków mogła wpływać na ekspresję AQPs w macicy. W świetle tych badań pojawiło się kolejne pytanie, jak będzie przebiegała ekspresja akwaporyn w tkankach macicy pochodzących z okresu placentacji, w takich samych warunkach doświadczalnych. W **publikacji nr 3** wykazano, że ekspresja mRNA *Aqp1* w skrawkach macicy z 30-32 dnia ciąży (okres placentacji) w grupie kontrolnej była na zbliżonym poziomie po 3 i 24 godz. inkubacji. W odpowiedzi na badane czynniki, E₂ pobudzał ekspresję mRNA *Aqp1* i 5, a P₄ hamował (Tab 1 i 2). Z kolei oksytocyna istotnie stymulowała ekspresję mRNA AQPs podczas 3 godz. inkubacji, a hamowała *AQP1* po 24 godz. (Tab. 1 i 2). Natomiast AA i forskolina obniżały ekspresję genu *AQP1* po 3 godz. inkubacji. Przeciwnie do *AQP1*, ekspresja mRNA *AQP5* była wysoce stymulowana przez AA, forskolinę i cAMP, po 3 godz. Dłuższa (24 godz.) inkubacja z AA i cAMP spowodowała istotne obniżenie odpowiednio ekspresji genu *AQP1* i 5. Bardzo interesujące okazały się wyniki dotyczące wpływu badanych czynników na ekspresję białka AQP1 i 5 w okresie placentacji. Spośród badanych suplementów tylko kwas arachidonowy istotnie stymulował ekspresję białka AQP1 i 5 w skrawkach macicy, podczas krótkiej (3 godz.) inkubacji. Pozostałe czynniki nie miały

wpływu na ekspresję białka AQP1 i 5 w tym czasie. Powyższe dane pośrednio świadczą o krótkim, ale istotnym udziale prostaglandyn w regulacji ekspresji białka AQP1 i 5 w tkance macicy z okresu placentacji. Po 24 godz. wykazano także istotny wzrost ekspresji białka AQP1 pod wpływem hormonów steroidowych (P_4 i E_2), bez wpływu pozostałych czynników. Z kolei ekspresja białka AQP5 po 24 godz. inkubacji była wysoce stymulowana przez hormony steroidowe oraz forskolin i cAMP. **Analiza wyników publikacji nr 2 i nr 3 pokazała, jak zmieniała się ekspresja białka AQP1 i 5 pod wpływem badanych czynników, w miarę rozwoju ciąży.** Niewątpliwie hormony steroidowe odgrywały nadal ważną rolę w regulacji ekspresji białka AQP1 i AQP5 podczas placentacji, jakkolwiek ich wpływ uwidocznił się dopiero po 24 godz. inkubacji. Natomiast w czasie implantacji stymulujący efekt P_4 i E_2 na ekspresję białka AQP1 i AQP5 stwierdzono już po 3 godz. i utrzymywał się po 24 godz. Podobnie forskolina i cAMP istotnie pobudzały ekspresję białka AQP5 w tkankach macicy z okresu placentacji, ale dopiero po 24 godz. inkubacji, a w okresie implantacji po 3 i 24 godz. **Powyższe wyniki wskazują na mniejszą rolę badanych czynników w regulacji ekspresji akwaporyn, a szczególnie AQP1, w okresie powstawania łożyska w porównaniu do okresu implantacji i/lub zmniejszoną wrażliwość macicy na badane czynniki.** W prezentowanej pracy wykazano, że hormony steroidowe, AA, cAMP i forskolina, w przeciwieństwie do kontroli powodują akumulację AQP5, głównie w błonach bazolateralnych komórek nabłonkowych macicy. Obecność AQP5 w błonach apikalnych komórek nabłonkowych i dodatkowa intensywna akumulacja w błonach bazolateralnych wskazuje, że jest ona włączona w transport wody wewnątrz macicy w okresie placentacji. Wyniki obu publikacji podkreślają istotną rolę macicznych akwaporyn podczas wczesnej ciąży oraz wskazują, że hormony steroidowe, prostaglandyny i cAMP mogą kontrolować lub modulować ich ekspresję. **W świetle otrzymanych wyników interesujące byłoby zbadanie ekspresji akwaporyn przykładowo w ciąży chorobie trofoblastycznej i raku trzonu macicy u kobiet po zabiegu.**

W publikacji nr 4 przedstawiono wyniki dotyczące roli hormonów steroidowych (P_4 i E_2), oksytocyny, AA, forskoliny i cAMP w regulacji ekspresji genu i białka AQP1 i AQP5, oddzielnie, w endometrium i miometrum macicy świni z 10-12 dnia cyklu (faza środkowo-lutealna) i 14-16 dnia cyklu (okres luteolizy). Ilość transkryptu w *Aqp1* i *Aqp5* (w grupie kontrolnej) w endometrium z 10-12 dnia cyklu była wyższa odpowiednio ok. 5

i 2 razy niż w 14-16 dniu cyklu (Tab. 3 i 4). Podobnie w miometrium z 10-12 dnia cyklu, transkrypt *Aqp5* był wyższy w porównaniu do 14-16 dnia. Natomiast po zastosowaniu badanych czynników odpowiedź endometrium i miometrium na poziomie genu i białka była bardziej wyraźna podczas luteolizy w porównaniu do fazy środkowo-lutealnej. Progesteron stymulował ekspresję genu i białka AQP1 i AQP5 w endometrium w czasie luteolizy oraz w fazie środkowo-lutealnej podczas dłuższej inkubacji (24 godz.). W czasie krótkiej inkubacji (3 godz.) ekspresja genu *AQP1* była obniżona, natomiast białka istotnie podwyższona. W miometrium ekspresja mRNA i białka była istotnie stymulowana przez P_4 , podczas luteolizy, po 3 i 24 godz. inkubacji. Z kolei w fazie środkowo-lutealnej tylko ekspresja białka AQP5 była stymulowana (Tab 3 i 4). W badaniach na skrawkach macicy, bez rozdziału na endometrium i miometrium (**publikacja nr 1**) wykazaliśmy, że P_4 ewidentnie stymulował ekspresję obu AQPs na poziomie translacji, lecz w większości hamował na poziomie transkrypcji. **Zatem, powyższe wyniki sugerują, że P_4 jest ważnym regulatorem ekspresji AQP1 i AQP5 w macicy świni, szczególnie w endometrium.** Estradiol nie miał wpływu na ekspresję genu i białka AQP1 i AQP5 w endometrium z fazy środkowo-lutealnej. Przeciwnie, podczas luteolizy istotnie stymulował ekspresję mRNA i białka obu AQPs. Natomiast suplementacja E_2 tkanek miometrium z fazy środkowo-lutealnej powodowała wzrost mRNA i białka AQP1 i AQP5 (po 24 godz.), a podczas luteolizy wzrost ekspresji białka AQP5 po 3 i 24 godz. i AQP1 po 24 godz. (Tab.3 i 4). W skrawkach macicy (**publikacja nr 1**) E_2 stymulował ekspresję AQP1 i AQP5 na poziomie białka podczas obu faz cyklu, lecz jego wpływ na ekspresję mRNA nie zawsze był tak jednoznaczny. W oparciu o uzyskane wyniki po raz pierwszy wykazano, że rozdzielone tkanki macicy endometrium i miometrium mają swój własny profil ekspresji AQP1 i 5 w odpowiedzi na hormony steroidowe, który zależy od fazy cyklu oraz ilościowych i jakościowych zmian związanych z aktywnością sekrecyjną endometrium, promowaniem angiogenezy i stopniem uwodnienia macicy.

Wyniki uzyskane w publikacji nr 4 pozwoliły także na wyjaśnienie roli hormonu oksytocyny w regulacji ekspresji AQP1 i 5 w macicy świni. Stwierdzono, że oksytocyna istotnie stymulowała ekspresję mRNA i białka AQP1 i AQP5 w skrawkach miometrium z fazy środkowo-lutealnej cyklu, po 3 i 24 godz. oraz ekspresję mRNA i białka AQP5 podczas luteolizy, po 3 godz. Nie miała natomiast wpływu na ekspresję białka badanych AQPs w endometrium, mimo często stwierdzanej wysokiej ekspresji mRNA (Tab. 3 i 4). Uzyskane wyniki korespondują z badaniami dotyczącymi koncentracji receptorów

oksytocyny w macicy świni podczas cyklu estralnego i ich wzrostem w miometrium i endometrium w fazie środkowo-lutealnej. Stwierdzone stymulujące działanie OT na ekspresję mRNA i białka AQP1 i 5 w mięśniówce macicy oraz brak takiego działania na tkankę całej macicy (**publikacja nr 1**) mogło być wynikiem lokalnych oddziaływań między endometrium i miometrium, obejmujących komunikację między śluzówką macicy, zrębem i mięśniówką oraz lokalnie produkowanych hormonów steroidowych, czynników wzrostu i cytokin.

Kwas arachidonowy (AA), substrat dla syntezy prostaglandyn silnie pobudzał ekspresję mRNA i białka AQP1 i AQP5 w skrawkach endometrium podczas luteolizy, po 3 i 24 godz. (Tab. 3 i 4) Te wyniki są w pełni zgodne z naszymi wcześniejszymi badaniami, które wykazały stymulujące działanie AA na ekspresję białka AQPs w eksplantach macicy, również z okresu luteolizy (**publikacja nr 1**). Powyższe wyniki są także zgodne z fizjologicznym wzrostem uwalniania $\text{PGF}_{2\alpha}$ z endometrium podczas luteolizy, w celu spowodowania regresji ciała żółtego.

Forskolina i cAMP stymulowały ekspresję mRNA i białka AQP1 i AQP5 w endometrium i miometrium podczas luteolizy. Natomiast wyniki dotyczące ekspresji AQPs w endometrium i miometrium z fazy środkowo-lutealnej cyklu były zróżnicowane, w odpowiedzi na działanie forskoliny lub cAMP, np. w endometrium nie było odpowiedzi lub występowało hamowanie ekspresji AQPs na poziomie mRNA, natomiast na poziomie białka nie stwierdzono wpływu lub obserwowano stymulację (Tab. 3 i 4). Niewątpliwie uzyskane wyniki wykazały, że szlak cykloazy adenylanowa/cAMP partycypuje w wewnątrzkomórkowym przekazie sygnałów związanych z regulacją ekspresji AQP1 i AQP5 w endometrium i miometrium oraz wydaje się bardzo aktywny podczas luteolizy, lecz zróżnicowany podczas fazy środkowo-lutealnej, w zależności od typu tkanki i czasu inkubacji. Reasumując, na rozdzielonych tkankach macicy wykazano zróżnicowany wpływ estradiolu, oksytocyny i forskoliny na ekspresję AQP1 i AQP5 na poziomie mRNA i białka oraz odmienny wzór ich ekspresji w endometrium i miometrium podczas fazy środkowo-lutealnej, w porównaniu do luteolizy.

Podsumowanie wyników badań przedstawionych w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe oraz potencjalne zastosowanie kliniczne uzyskanych wyników badań

- Przedstawiony cykl publikacji jest opracowaniem oceniającym kompleksowo udział odpowiednio dobranych czynników w regulacji ekspresji mRNA i białka AQP1 i AQP5 w tkance macicy świni – *in vitro*, w czasie cyklu estralnego i wczesnej ciąży. Zamierzona konstrukcja badań została oparta na ocenie poziomu ekspresji AQPs w dwóch fazach cyklu środkowo-lutealnej (10-12 dzień) i luteolizy (14-16 dzień) oraz dwóch okresach ciąży, implantacji (14-16 dzień) i placentacji (30-32 dzień) w eksplantach macicy, jak również porównaniu poziomu ekspresji AQPs w tkance endometrium i miometrium podczas badanych faz cyklu estralnego, (śródkowo-lutealnej i luteolizy).
- Uzyskane wyniki po raz pierwszy wykazały, że: hormony steroidowe (P_4 i E_2), kwas arachidonowy, forskolina i cAMP wpływają na ekspresję genu i białka AQP1 i AQP5 w macicy świni. Ponadto stwierdzono, że P_4 , E_2 , kwas arachidonowy, forskolina i cAMP powodują przemieszczanie AQP5 wewnątrz komórki z błony apikalnej do części bazolateralnej, co świadczy o dużym znaczeniu tej akwaporyny w transporcie wody w macicy w czasie cyklu i ciąży, a szczególnie podczas luteolizy i procesu implantacji.
- Stopień regulacji ekspresji genu i białka AQP1 i AQP5 przez badane czynniki był zależny od fazy cyklu estralnego i okresu ciąży oraz czasu inkubacji. Wykazano wyższą ekspresję AQP1 i 5 podczas luteolizy w porównaniu z fazą środkowo-lutealną. Z kolei podczas ciąży, w miarę jej rozwoju, od implantacji do placentacji, obserwowano zmniejszoną odpowiedź tkanki macicy na badane czynniki i odmienny wzór ekspresji badanych akwaporyn.
- Zamierzona konstrukcja badań na eksplantach całej macicy i jednocześnie na skrawkach endometrium i miometrium po raz pierwszy wykazała, że oksytocyna reguluje ekspresję genu i białka AQP1 w skrawkach miometrium, z fazy środkowo-lutealnej oraz AQP5 z obu faz cyklu, natomiast nie ma takiego wpływu na tkankę endometrium. Z kolei E_2 i forskolina nie miały wpływu na ekspresję badanych akwaporyn w tkance endometrium z fazy środkowo-lutealnej, ale regulowały ich ekspresję w okresie luteolizy.
- Biorąc pod uwagę, że wzór ekspresji AQP1 i 5 i ich odpowiedź na badane czynniki różni się w endometrium i miometrium, uważam, że lepszym modelem

do badań jest cała tkanka macicy, ponieważ zachowane są w niej fizjologiczne oddziaływania typowe dla tego narządu.

- Reasumując, uzyskane wyniki wniosły istotny wkład do nauki w zakresie roli badanych czynników w regulacji ekspresji akwaporyny 1 i 5 podczas cyklu i wczesnej ciąży.
- Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę monitorowania skutków lub następstw przyjmowania związków o działaniu hormonalnym, przykładowo stosowane jako suplementy diety, min. związki przypominające naturalne estrogeny, które wykazują zdolność łączenia się z receptorami estrogenowymi, mogą negatywnie wpływać na ekspresję akwaporyn i związany z tym transport wody w macicy i prawidłową regulację płynu macicznego, a w konsekwencji na transport plemników, czy zapłodnionej komórki jajowej. Ponadto zmniejszona ilość płynu macicznego na skutek nieprawidłowej ekspresji akwaporyn może zaburzać proces proliferacji endometrium.
- W ciągu ostatnich kilku lat prace innych autorów, a także własne pokazały, że białka te pełnią ważne funkcje w układzie rozrodczym, jakkolwiek wiedza na temat ich roli w fizjologii i patofizjologii wymaga dalszych pogłębionych badań. Szczególnie poznanie mechanizmów związanych z przemieszczaniem się akwaporyn w błonach komórkowych może mieć istotne znaczenie w terapii wielu chorób.
- Są przesłanki, że akwaporyny mogą być odpowiednim celem w leczeniu niektórych chorób. Zatem ważne z punktu widzenia klinicznego jest opracowanie sposobów ingerencji farmakologicznej, pozwalającej regulować aktywność tych kanałów np. w patologii układu rozrodczego (nieprawidłowy przebieg ciąży, nowotwory jajnika i macicy).

Referencje:

1. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*. Apr 17;256(5055):385-7.
2. Verkman AS. (2013) Aquaporins. *Curr Biol*. 23(2): R52–R55. doi:10.1016/j.cub.2012.11.025.
3. Agre P, Kozano D. (2003) Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *EBS Lett*. 55 (1), 72-7.
4. Herrera M, Gavin JI. (2011) Aquaporins as a gas channels. *Pflugers Arch*. 462 (4), 623-630.
5. Wang Y, Tajkhorshid E (2010) Nitric oxide conduction by the brain aquaporins AQP4. *Proteins* 78(3), 661-670.
6. Musa-Aziz, R, Che LM, Pelletier MF, Boron, WF. (2009) Relative CO₂/N₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(13), 5406-5411.

7. Verkman AS, Mitra AK. (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Jan;278(1):F13-28. Review.
8. Carbrey JM, Agre P.. (2009) Discovery of the aquaporins and development of the field *Handb Exp Pharmacol*; (190):3-28. doi: 10.1007/978-3-540-79885-9_1. Review.
9. Skowronski MT, Lebeck J, Rojek A, Praetorius J, Füchtbauer EM, Frøkiaer J, Nielsen S. (2007) AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* Mar;292(3):F956-65.
10. Rojek AM, Skowronski MT, Füchtbauer EM, Füchtbauer AC, Fenton RA, Agre P, Frøkiaer J, Nielsen S. (2007) Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 27;104(9):3609-14. Epub 2007 Feb 21.
11. Ishikawa Y, Eguchi T, Skowronski MT, Ishida H. Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via cytosolic Ca²⁺ elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Apr 28;245(3):835-40
12. Chung SH, Jun DW, Kim KT, Chae JD, Park EK, Son BK, Kim SH, Jo YJ, Park YS. (2010) Aquaporin-2 urinary excretion in cirrhosis: relationship to vasopressin and nitric oxide. *Dig Dis Sci.* Apr;55(4):1135-41. doi: 10.1007/s10620-009-0829-x. Epub 2009 Jun 3.
13. Li X, Yu H, Koide SS. (1994) The water channel gene in human uterus. *Biochem. Mo. Biol. Int.* 32(2) 371-377.
14. Escobar J, Gormaz M, Arduini A, Gosens K, Martinez A, Perales A, Escrig R, Tormos E, Roselló M, Orellana C, Vento M. (2012) Expression of aquaporins early in human pregnancy *Early Human Develop.* Aug;88(8):589-94. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2012.01.009. Epub 2012 Feb 14.
15. Klein C, Troedsson MH, Rutllant J (2012) *Reprod Domest Anim.* 2013 Aug;48(4):529-37. doi: 10.1111/rda.12116. Epub Oct 26. Expression of aquaporin water channels in equine endometrium is differentially regulated during the oestrous cycle and early pregnancy.
16. Kobayashi M, Takahashi E, Miyagawa S, Watanabe H Taisen Iguchi T. (2006) Chromatin immunoprecipitation-mediated target identification proved aquaporin 5 is regulated directly by estrogen in the uterus. *Genes to Cells* Volume 11, Issue 10, pages 1133–1143.
17. Lindsay LA, Murphy CR. (2006) Redistribution of aquaporins 1 and 5 in the rat uterus is dependent on progesterone: a study with light and electron microscopy. *Reproduction.* Feb;131(2):369-78.
18. Richard C, Gao J, Brown N, Reese J. (2003) Aquaporin water channel genes are differentially expressed and regulated by ovarian steroids during the periimplantation period in the mouse. *Endocrinology.* Apr;144(4):1533-41.
19. Jablonski EM, McConnell NA, Hughes FM Jr, Huet-Hudson YM. (2003) Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biol Reprod.*;69(5):1481-7. Epub Jul 9.
20. Hildenbrand A, lalitikumar L, Nielsen S, Genzell-Danilsson K, Stavreus- Evers A. Expression of aquaporin 2 in human endometrium. *Fertility and Sterility* 86, 5, 2006.
21. Ducza E, Seres AB, Hajagos-Tóth J, Falkay G, Gáspár R. (2014) Oxytocin regulates the expression of aquaporin 5 in the late-pregnant rat uterus *Mol Reprod Dev.* Jun;81(6):524-30. doi: 10.1002/mrd.22320.
22. Wang S, Amidi F, Beall M, Gui L, Ross MG. (2006) Aquaporin 3 expression in human fetal membranes and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in amnion epithelial cell culture. *J Soc Gynecol Investig.* Apr;13(3):181-5.
23. Wang S, Amidi F, Yin S, Beall M, Ross MG. (2007) Cyclic adenosine monophosphate regulation of aquaporin gene expression in human amnion epithelia. *Reprod Sci.* 14:234-40.
24. Belkacemi L, Beall MH, Magee TR, Pourtemour M, Ross MG. (2008) AQP1 gene expression is upregulated by arginine vasopressin and cyclic AMP agonists in trophoblast cells. *Life Sci.* Jun 20;82(25-26):1272-80. doi: 10.1016/j.lfs.2008.04.014.
25. Li-Bo Zou, Run-Ju Zhang, Ya-Jing Tan, Guo-Lian Ding, Shuai Shi, Dan Zhang, Rong-Huan He, Ai-Xia Liu, Ting-Ting Wang, Peter C. K. Leung, Jian-Zhong Sheng, and He-Feng Huang. (2011) Identification of Estrogen Response Element in the Aquaporin-2 Gene That Mediates Estrogen-Induced Cell Migration and Invasion in Human Endometrial Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, September 2011, 96(9):E1399 – E1408.
26. Skowronski MT. (2010) Distribution and quantitative changes in amounts of aquaporin 1, 5 and 9 in the pig uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* Sep 9;8:109. doi: 10.1186/1477-7827-8-109.
27. Skowronski MT, Skowronska A, Nielsen S. (2011) Fluctuation of aquaporin 1, 5, and 9 expression in the pig oviduct during the estrous cycle and early pregnancy. *J Histochem Cytochem.* Apr;59(4):419-27. doi: 10.1369/0022155411400874.
28. Kuzmuk KN, and Schook LB. (2010) *Pigs as a Model for Biomedical Sciences.* CAB International 2011. The Genetics of the Pig, 426 2nd Edn (eds M.F. Rothschild and A. Ruvinsky).
29. Moeljoo MPE, Bazer W, Thatcher WW. (1976) A study of prostaglandin F_{2α} at the luteolysin in swine. Part I: effects of prostaglandin F_{2α} in hysterectomized gilts. *Prostaglandins*;11:737-43.
30. Bazer FW, Tacer WW. (1977) Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F_{2α} by uterine endometrium. *Prostaglandins*; 14:397-401.

31. Okrasa S, Tilton JE, Weigl RM. (1985) Utero-ovarian venous concentrations of prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) following PGE₂ intrauterine infusions. *Prostaglandins*;30: 851-6.
32. Blitek A, Ziecik AJ. Effect of LH on prostaglandin F_{2α} and prostaglandin E₂ secretion by cultured porcine endometrial cells. (2005) *Reproduction*; 130:105-112.
33. Kraeling RR, Rampacek GB, Fiorello NA. (1985) Inhibition of pregnancy with indomethacin in mature and prepubertal gilts induced to ovulate. *Biol. Reprod.* 32: 105-110.
34. Trout WE, Smith GW, Gentry PC, Alvin JM, Keisler DH. (1995) Oxytocin secretion by the endometrium of the pig during maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.* 52 (suppl 1):189 (abstract).
35. Miranda MA, Uzumcu M, Carnahan KG, Ludwig TE. (1996) A role of oxytocin during luteolysis and early pregnancy in swine. *Reprod. Dom. Anim.*31:455-61.
36. Uzumcu M, Braileanu GT, Carnahan KG, Ludwig TE, Miranda MA. (1998) Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F secretion by luminal epithelial, glandular epithelial, and stromal cells from pig endometrium. Part I: response of cyclic pigs on day 16 postestrus. *Biol Reprod*;59:1259-65.
37. Vogel C, Marcotte EM. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* Mar 13;13(4):227-32. doi: 10.1038/nrg3185. Review.
38. Ouellet DL, Perron MP, Gobeil LA, Plante P, Prorok P. (2006) Micro RNA is gene regulation; when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol* (on-line), ID69616;1-20

Tabela 1. Zmiany ekspresji genu i białka AQP1 w skrawkach macicy w wybranych dniach cyklu i ciąży podczas 3 i 24 h inkubacji z wybranymi czynnikami. Po inkubacji próby analizowano metodą real-time PCR i metodą Western blot. Skróty: ns-nie istotny statystycznie, ↑- wzrost ekspresji, ↓ - spadek ekspresji

AQP1	Cykl				AQP1	Ciąża			
	Ekspresja mRNA		Ekspresja białka			Ekspresja mRNA		Ekspresja białka	
Czas inkubacji	3 h	24 h	3 h	24 h	Czas inkubacji	3 h	24 h	3 h	24 h
Badane dni	Kontrola				Badane dni	Kontrola			
10-12	ns	ns	ns	ns	14-16	ns	ns	ns	ns
14-16	ns	ns	ns	ns	30-32	ns	ns	ns	ns
	Progesteron					Progesteron			
10-12	ns	↓	↑	↑	14-16	ns	ns	↑	↑
14-16	↓	ns	↑	↑	30-32	↓	↓	ns	↑
	Estradiol					Estradiol			
10-12	↓	ns	ns	↑	14-16	↓	ns	↑	↑
14-16	↑	↑	↑	↑	30-32	ns	↑	ns	↑
	Oksytocyna					Oksytocyna			
10-12	ns	↓	ns	ns	14-16	↓	↑	ns	ns
14-16	↓	ns	ns	ns	30-32	ns	↓	ns	ns
	Kwas arachidonowy					Kwas arachidonowy			
10-12	↓	↓	ns	ns	14-16	↓	↑	ns	↑
14-16	ns	ns	↑	ns	30-32	↓	↓	↑	ns
	Forskolina					Forskolina			
10-12	ns	↑	↑	ns	14-16	ns	↑	ns	↑
14-16	ns	↑	↑	ns	30-32	↓	ns	ns	ns
	cAMP					cAMP			
10-12	ns	ns	↑	ns	14-16	↓	↑	ns	↑
14-16	ns	↑	↑	ns	30-32	ns	ns	ns	ns

Tabela 2. Zmiany ekspresji genu i białka AQP5 w skrawkach macicy w wybranych dniach cyklu i ciąży podczas 3 i 24 h inkubacji z wybranymi czynnikami. Po inkubacji próby analizowano metodą real-time PCR i metodą Western blot. Skróty: ns-nie istotny statystycznie, ↑- wzrost ekspresji, ↓ - spadek ekspresji

AQP5	Cykl				AQP5	Ciąża			
	Ekspresja mRNA		Ekspresja białka			Ekspresja mRNA		Ekspresja białka	
Czas inkubacji	3 h	24 h	3 h	24 h	Czas inkubacji	3 h	24 h	3 h	24 h
Badane dni	Kontrola				Badane dni	Kontrola			
10-12	ns	ns	ns	ns	14-16	ns	ns	ns	ns
14-16	ns	ns	ns	ns	30-32	ns	ns	ns	ns
	Progesteron					Progesteron			
10-12	↓	↓	↑	↑	14-16	ns	ns	↑	↑
14-16	ns	ns	↑	↑	30-32	↓	↓	ns	↑
	Estradiol					Estradiol			
10-12	↓	↓	↑	↑	14-16	↓	ns	↑	↑
14-16	↑	ns	↑	↑	30-32	↑	ns	ns	↑
	Oksytocyna					Oksytocyna			
10-12	↓	ns	ns	ns	14-16	↓	↓	ns	ns
14-16	↓	ns	ns	ns	30-32	↑	ns	ns	ns
	Kwas arachidonowy					Kwas arachidonowy			
10-12	↓	↓	ns	ns	14-16	↓	ns	↑	ns
14-16	ns	ns	↑	ns	30-32	↑	ns	↑	ns
	Forskolina					Forskolina			
10-12	↓	↓	↑	↑	14-16	ns	ns	↑	↑
14-16	↓	↑	↑	↑	30-32	↑	ns	ns	↑
	cAMP					cAMP			
10-12	↓	ns	↑	↑	14-16	ns	↑	↑	↑
14-16	ns	↓	↑	↑	30-32	↑	↓	ns	↑

Tabela 3. Zmiany ekspresji genu i białka AQP1 w skrawkach endometrium i miometrium w wybranych dniach cyklu podczas 3 i 24 h inkubacji z wybranymi czynnikami. Po inkubacji próby analizowano metodą real-time PCR i metodą Western blot. Skróty: ns-nie istotny statystycznie, ↑ - wzrost ekspresji, ↓ - spadek ekspresji

AQP1	Cykl (endometrium)				AQP1	Cykl (miometrium)			
	Ekspresja mRNA		Ekspresja białka			Ekspresja mRNA		Ekspresja białka	
Czas inkubacji	3 h	24 h	3 h	24 h	Czas inkubacji	3 h	24 h	3 h	24 h
Badane dni	Kontrola				Badane dni	Kontrola			
10-12	ns	ns	ns	ns	10-12	ns	ns	ns	ns
14-16	ns	ns	ns	ns	14-16	ns	ns	ns	ns
	Progesteron					Progesteron			
10-12	↓	↑	↑	↑	10-12	ns	↓	ns	ns
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	↑	↑	↑	↑
	Estradiol					Estradiol			
10-12	↓	↓	ns	ns	10-12	↓	↑	ns	↑
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	ns	ns	ns	↑
	Oksytocyna					Oksytocyna			
10-12	↓	↑	ns	ns	10-12	↑	ns	↑	↑
14-16	↑	↑	ns	ns	14-16	ns	ns	ns	ns
	Kwas arachidonowy					Kwas arachidonowy			
10-12	ns	ns	ns	ns	10-12	↓	↓	ns	ns
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	ns	ns	ns	ns
	Forskolina					Forskolina			
10-12	↓	↓	ns	ns	10-12	ns	↑	ns	↑
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	↑	ns	↑	↑
	cAMP					cAMP			
10-12	ns	↓	ns	↑	10-12	↓	↓	ns	ns
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	↑	↓	↑	↑

Tabela 4. Zmiany ekspresji genu i białka AQP5 w skrawkach endometrium i miometrium w wybranych dniach cyklu podczas 3 i 24 h inkubacji z wybranymi czynnikami. Po inkubacji próby analizowano metodą real-time PCR i metodą Western blot. Skróty: ns-nie istotny statystycznie, ↑- wzrost ekspresji, ↓ - spadek ekspresji

AQP5	Cykl (endometrium)				AQP5	Cykl (miometrium)			
	Ekspresja mRNA		Ekspresja białka			Ekspresja mRNA		Ekspresja białka	
Czas inkubacji	3 h	24 h	3 h	24 h	Czas inkubacji	3 h	24 h	3 h	24 h
Badane dni	Kontrola				Badane dni	Kontrola			
10-12	ns	ns	ns	ns	10-12	ns	ns	ns	ns
14-16	ns	ns	ns	ns	14-16	ns	ns	ns	ns
	Progesteron					Progesteron			
10-12	↓	↑	ns	↑	10-12	ns	↓	↑	↑
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	↑	↑	↑	↑
	Estradiol					Estradiol			
10-12	↓	ns	ns	ns	10-12	↓	↑	ns	↑
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	↑	ns	↑	↑
	Oksytocyna					Oksytocyna			
10-12	↓	↑	ns	ns	10-12	↑	↑	↑	↑
14-16	↑	↑	ns	ns	14-16	↑	ns	↑	ns
	Kwas arachidonowy					Kwas arachidonowy			
10-12	ns	ns	↑	ns	10-12	↓	↓	ns	ns
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	↓	ns	ns	ns
	Forskolina					Forskolina			
10-12	↓	↓	ns	ns	10-12	↓	↑	ns	↑
14-16	↑	ns	↑	↑	14-16	↑	↑	↑	↑
	cAMP					cAMP			
10-12	ns	ns	↑	ns	10-12	↓	↓	ns	↑
14-16	↑	↑	↑	↑	14-16	↑	ns	ns	↑

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych/artystycznych:

Poza powyższym cyklem czterech prac, będących podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, mój dorobek naukowy ze względu na tematykę poruszanych zagadnień można podzielić na dwa okresy, związane z przebiegiem mojej pracy zawodowej. Wskazane prace cechują się różnorodnością modeli badawczych, w tym przeprowadzone na zwierzętach (świnia, pies) oraz na zwierzętach z wyciszonym genem (mysz), badania na materiale ludzkim, jak również badania mikrobiologiczne z wykorzystaniem materiału badawczego pozyskiwanego z różnych środowisk. Do ich przeprowadzenia wykorzystywałam wiele różnych metod doświadczalnych m.in. hodowle *in vitro*, techniki biologii molekularnej, metody detekcji białek: immunohistochemiczna i Western-blot, co pozwoliło na zdobycie umiejętności swobodnego posługiwania się dostępnymi narzędziami badawczymi w pracy naukowej. Prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. Mój dorobek naukowy odzwierciedlający dotychczasową aktywność naukową można pogrupować według następujących tematów:

A. Cykl publikacji poświęcony ekspresji akwaporyny 1, 5 i 9 (AQP1, AQP5 i AQP9) w układzie rozrodczym na modelu świni w czasie cyklu estralnego i wczesnej ciąży

Powyższy temat obejmuje prace przedstawiające charakterystykę ekspresji akwaporyn w jajowodzie i splocie okołojajnikowym (PVC) świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży. AQP1 została zlokalizowana wewnątrz naczyń krwionośnych jajowodu, AQP5 w komórkach mięśni gładkich i podobnie jak AQP9 także w komórkach nabłonkowych jajowodu. Stwierdzono, że ekspresja białka AQP1, AQP5 i AQP9 w jajowodzie istotnie zmienia się podczas cyklu estralnego w dniach 2-4 i 18-20 w porównaniu do dni 10-12 i 14-16. Powyższe wyniki wyraźnie sugerują udział hormonów steroidowych, a szczególnie estrogenów, w regulacji badanych akwaporyn. Ponadto wykazaliśmy, że w okresie wczesnej ciąży, w dniach 14-16 oraz 30-32, ekspresja białka AQP 1, 5 i 9 była na podobnym poziomie jak w czasie cyklu estralnego. Była to pierwsza charakterystyka ekspresji AQPów w jajowodzie świni w czasie cyklu estralnego i wczesnej ciąży. *Praca dotycząca jajowodu została wyróżniona przez BioMedical Library Uniwersytetu Minnesota w USA na trzecim miejscu wśród 10 najlepszych publikacji w ocenianym obszarze badań w roku 2011, natomiast dotycząca splotu okołojajnikowego na miejscu siódmym (załącznik).* W publikacji dotyczącej splotu okołojajnikowego (PVC) stwierdzono, podobnie jak w jajowodzie istotny wzrost ekspresji AQP1 w 2-4 i 18-20 dniu cyklu w porównaniu do 10-12 i 14-16 dnia. Na

początku okresu implantacji i pod koniec, ekspresja AQP1 utrzymywała się na poziomie zbliżonym do środkowej i późnej fazy lutealnej. Obecność białka AQP1 wykazano w komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych i krwionośnych splotu okołojajnikowego. Uzyskane wyniki wskazują, że ekspresja AQP1 w PCV jest także hormono-zależna.

1. Skowronski MT, **Skowronska A**, Nielsen S. Fluctuation of aquaporin 1, 5 and 9 expression in the pig oviduct during the estrous cycle and early pregnancy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2011, 59: 419-427. **IF₂₀₁₁ = 2.725, punkty, MNiSW = 20**, (*praca oryginalna*).

2. Skowronski MT, Frackowiak L, **Skowronska A**. Expression of aquaporin 1 in the pig peri-ovarian vascular complex during the estrous cycle and early pregnancy. *Reproductive Biology*. 2011, 11: 210-223. **IF₂₀₁₁ = 1.921, punkty MNiSW = 15** (*praca oryginalna*).

B. Ekspresja akwaporyn (AQPs) w mięśniakach macicy kobiet w okresie przed- i pomenopauzalnym

Wykazano po raz pierwszy u kobiet, ekspresję AQP1, AQP5 i AQP9 w łagodnych guzach gładkomórkowych macicy oraz w otaczającej prawidłowej błonie śluzowej i mięśniowej macicy. Stwierdzono, że ekspresja akwaporyny 1 i 5 była istotnie wyższa w tkankach zmienionych chorobowo w porównaniu do tkanki prawidłowej. AQP9 obecna była jedynie w niezmienionym endometrium. Nadekspresja AQP1 i AQP5 jest związana z powstawaniem guzów, wskazują na to także obecnie publikowane prace dotyczące guzów w macicy oraz jajniku kobiet.

1. Skowronski MT, Frackowiak L, **Skowronska A**. Expression of aquaporin 1 and 5 in uterine leiomyomata in premenopausal women. *Reproductive Biology*, 2012, (1):81-9. **IF₂₀₁₂=1.222, punkty, MNiSW =15** (*praca oryginalna*).

C. Wpływ wybranych czynników na sekrecję progesteronu, estradiolu i androstendionu przez eksplanty macicy świni (*in vitro*)

Badaliśmy, czy progesteron, estradiol, oksytocyna, kwas arachidonowy, forskolina i cAMP wpływają na syntezę i sekrecję hormonów steroidowych przez eksplanty macicy świni. Po raz pierwszy w eksperymentach na całych eksplantach macicy wykazaliśmy że: 1/ eksplanty macicy syntetyzują i wydzielają progesteron, estradiol i androstendion, 2/ badane czynniki, z wyjątkiem oksytocyny, miały wpływ na sekrecję hormonów steroidowych, ale był on zróżnicowany, w zależności od fazy cyklu estralnego (środkowo-lutealna, luteoliza), okresu ciąży (implantacji, placentacji) oraz czasu inkubacji. Wykazaliśmy, że w fazie środkowo-lutealnej i w okresie luteolizy sekrecja

progesteronu była stymulowana przez estradiol, forskolinę i cAMP. Z kolei sekrecja estradiolu była stymulowana przez progesteron, forskolinę i cAMP, w fazie środkowo-lutealnej i dodatkowo przez kwas arachidonowy podczas luteolizy. Sekrecja androstendionu w fazie środkowo-lutealnej była stymulowana przez progesteron, estradiol, forskolinę i cAMP, a podczas luteolizy tylko przez progesteron i estradiol. W czasie ciąży sekrecja progesteronu i estradiolu przez eksplanty macicy (w grupie kontrolnej) wzrastała wraz z zaawansowaniem ciąży (od implantacji do placentacji), natomiast sekrecja androstendionu utrzymywała się na tym samym poziomie. W grupach doświadczalnych, sekrecja estradiolu w okresie implantacji i placentacji była stymulowana przez P₄, kwas arachidonowy, forskolinę i cAMP. Sekrecja progesteronu w obu okresach ciąży była stymulowana przez estradiol, forskolinę i cAMP. Natomiast sekrecja androstendionu była stymulowana przez progesteron, estradiol, forskolinę i cAMP. Uzyskane wyniki wykazały, że macica świni jest bogatym źródłem hormonów steroidowych i ich sekrecja może być modulowana przez różne czynniki wydzielane lokalnie.

1. Skowronska A, Eliszewski M, Młotkowska P, Skowroński MT. Secretion of progesterone, estradiol-17 β and androstenedione by porcine uterine explants during the mid-luteal phase of the estrous cycle and luteolysis. *Veterinary Medicine, Medycyna Weterynaryjna*, 2015, 71 (11), 674-678. **IF₂₀₁₄ = 0.195 punkty MNiSW = 15 (praca oryginalna).**

2. Skowronska A, Eliszewski M, Młotkowska P, Skowronski MT. Differential effects of progesterone, estradiol-17 β , oxytocin, arachidonic acid, forskolin and cAMP on steroid output by the porcine uterus during implantation and placentation. *Veterinary Medicine, Medycyna Weterynaryjna*, 2016, 72 (1), 58-63. **IF₂₀₁₅ = 0.195, punkty MNiSW = 15 (praca oryginalna).**

D. Ekspresja AQP1, 5 i 9 w jajniku świni oraz wpływ hormonów gonadotropowych i hormonu wzrostu na regulację ekspresji akwaporyny 1, 5 i 9 w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni

Kolejny wątek badawczy z moim współautorstwem dotyczy jajnika świni. Badaliśmy lokalizację i ekspresję białka akwaporyn 1, 5 i 9 w jajniku świni podczas różnych faz cyklu oraz wczesnej ciąży. Wykazaliśmy, że AQP1 jest zlokalizowana w błonach komórek śródbłonna naczyń kapilarnych, AQP5 w błonach komórek granulozy, pęcherzyków rozwijających się i pierwotnych, a AQP9 w błonach komórek granulozy, pęcherzyków rozwijających się. Wyniki tej pracy dowiodły, że ekspresja białka AQP1 i AQP5 była najwyższa 18-20 dnia cyklu w porównaniu do dni 2-4, 10-12 i 14-16, co wskazuje na ich zaangażowanie w proces dojrzewania pęcherzyka jajnikowego podczas

fazy folikularnej. W czasie ciąży (dni 14-16 oraz 30-32) ekspresja białka AQP1 i 5 była na podobnym poziomie jak 10-12 i 14-16 dnia cyklu. Podobnie ekspresja AQP9 była na zbliżonym poziomie we wszystkich badanych dniach cyklu i ciąży. Następna publikacja złożona w redakcji dotyczy ekspresji genu *AQP1*, 5 i 9 w izolowanych komórkach granulocyty, komórkach osłonki wewnętrznej oraz w płynie pęcherzykowym w czasie cyklu i wczesnej ciąży. Uzyskane wyniki przyczyniły się do otrzymania grantu w 2014 roku, którego jestem głównym wykonawcą. W ramach tego projektu obecnie badamy: „Wpływ hormonów gonadotropowych i hormonu wzrostu na regulację ekspresji akwaporyny 1, 5 i 9 w komórkach granulocyty i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świni”.

1. Skowronska A, Młotkowska P, Eliszewski M, Nielsen S, Skowroński MT. Expression of aquaporin 1, 5 and 9 in the ovarian follicles of cycling and early pregnancy. *Physiological Research*, 2015, 64: 237-245. **IF₂₀₁₅= 1.618 punkty MNiSW = 20 (praca oryginalna).**

Praca aktualnie w recenzji:

2. Patrycja Młotkowska, Agnieszka Skowronska, Damian Tanski, Mariusz T. Skowronski. The quantitative expression of mRNAs for aquaporin 1 and 5 and 9 in the ovarian follicles of cycling and early pregnant pigs.

E. Ekspresja i lokalizacja AQP1 u myszy z wyciszonym genem AQP7 (AQP7 KO)

Publikacja powstała w wyniku współpracy z Uniwersytetem Aarhus w Danii. Poprzednie badania z wykorzystaniem myszy transgeniczných wykazały koekspresję AQP1 i AQP7 w błonie cytoplazmatycznej naczyń włosowatych białej tkanki tłuszczowej WAT (*White Adipose Tissue*). Biała tkanka tłuszczowa jest głównym miejscem występowania AQP7, która jest akwagliceroporyną i odpowiada również za transport glicerolu przez błony komórkowe. W tych badaniach sprawdzaliśmy, czy długotrwałe głodzenie ma wpływ na ekspresję AQP1 w naczyniach włosowatych myszy AQP7 KO. Stwierdziliśmy obecność AQP1 w naczyniach krwionośnych we wszystkich rodzajach badanych genotypów. Ponadto wykazaliśmy, że u głodzonych myszy AQP7 KO ekspresja AQP1 w śródbłonku naczyń WAT jest istotnie wyższa w porównaniu do pozostałych badanych grup. Dodatkowo u myszy AQP7 KO nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie glicerolu w osoczu w warunkach kontrolnych i podczas głodzenia. Natomiast wykazano istotnie statystyczną utratę glicerolu w moczu u myszy AQP7 KO, zarówno kontrolnych jak i głodzonych w porównaniu do grup kontrolnych. Ponadto głodzenie zwierząt nie

miało istotnego wpływu na wielkość adipocytów WAT w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Praca wskazuje na fizjologiczne znaczenie różnych izoform AQP w utrzymaniu właściwej lokalnej homeostazy wody w tkance tłuszczowej. Technika knock-out`tu genowego wykorzystuje się w medycynie doświadczalnej, ponieważ metoda pomaga wyjaśnić funkcje fizjologiczne, np. pojedynczych białek w organizmie, jest także pomocna w tworzeniu modeli zwierzęcych różnych chorób oraz wprowadzaniu nowych form terapii.

1. Skowronski MT, **Skowronska A**, Rojek A, Oklinski MK and Nielsen S. Prolonged starvation causes up-regulation of AQP1 in capillaries of adipose tissue of AQP7 knockout mice. International Journal of Molecular Science, 2016 Jul 22;17(7). pii: E1101. doi: 10.3390/ijms17071101. **IF₂₀₁₅=3.257 punkty MNiSW = 30 (praca oryginalna)**

Praca aktualnie w recenzji:

Agnieszka Skowronska, Damian Tanski, Stanislaw Okrasa, Søren Nielsen and Mariusz T. Skowronski. Arachidonic acid, oxytocin, forskolin, cAMP and steroid hormones are implicated in the regulation of porcine uterine aquaporins. Review article, submitted September 2016

F. Akwaporyny w rdzeniu kręgowym

1. Michal K. Oklinski, **Agnieszka Skowronska** Mariusz T. Skowronski Michael Rützler, Kirsten Nørgaard J., John D. Nieland, Tae-Hwan Kwon , Søren Nielsen. Aquaporins in the spinal cord. Int J Mol Sci. 2016 Dec 7;17(12). pii: E2050. **IF₂₀₁₅=3.257 punkty MNiSW = 30,(praca przeglądowa)**

G. Analiza częstości mutacji/polimorfizmu genów GGA1 związanych z występowaniem złośliwego nowotworu sutka u suk

W ostatnich latach, dzięki zaawansowanym technikom diagnostycznym stosowanym również u małych zwierząt, liczba wykrytych i zdiagnozowanych złośliwych guzów sutka znacznie wzrosła. Rozwój guzów złośliwych jest przede wszystkim związany z częstą mutacją genów lub ich polimorfizmem. Zmiany te prowadzą do zaburzeń w sekwencji aminokwasów i strukturze białek, które mogą być odpowiedzialne za powstawanie niekontrolowanej proliferacji i rozrostu guzów. W publikacji opisano analizę częstotliwość polimorfizmu genu GGA1 i występowanie nowotworów złośliwych sutka u suk.

1. Kranc W, Chachuła A, Wojtanowicz-Markiewicz K, Zaorska K, Ociepa E, Piotrowski A, Bukowska D, Ciesiołka S, Borys S, Piotrowska H, **Skowrońska A**, Nowak M, Antosik P, Brüßow K.-P, Kempisty B, Bruska M, Nowicki M, Zabel M. Association between GGA1 gene polymorphisms and occurrence of mammary mixed tumours and aging in domestic bitches.

Veterinary Medicine, 2016, 72 (1), 34-40. **IF₂₀₁₅ =0.195, punkty MNiSW = 15, (praca oryginalna).**

Tematyka badawcza realizowana z mikrobiologii do momentu zatrudnienia w Katedrze Fizjologii Człowieka:

H. Identyfikacja bakterii z przewodu pokarmowego z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* FISH

Kierunek ten obejmuje prace dotyczące identyfikacji mikroflory przewodu pokarmowego z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Zastosowałam metodę Fluorescencyjnej Hybrydyzacji In Situ (FISH) do oceny składu mikroflory jelitowej młodych indyków, a następnie możliwe było wykorzystanie tej wiedzy w ocenie skuteczności żywieniowej, modulacji składu mikroflory przewodu pokarmowego indyków, poprzez dodatek zróżnicowanej zawartości włókna surowego w paszy lub dodatków paszowych, takich jak: krótko łańcuchowe kwasy tłuszczowe, probiotyki i olejki eteryczne. W publikacji analizowano skład populacji mikroflory jelitowej w treści jelit ślepych indyków i skonfrontowano ze wskaźnikami procesów fermentacyjnych w jelitach ślepych indyków żywionych mieszankami z różną zawartością SFM. Ponadto opracowaliśmy automatyczny program do analizy bakterii z przewodu pokarmowego uzyskany ze zdjęć z mikroskopu fluorescencyjnego co znacznie skróciło analizy ilościowe.

1. Mikulski D, Juśkiewicz J, **Skowrońska A**, Sosnowska E, Jankowski J, Lecewicz A, Zduńczyk Z. Response of the caecal microflora of turkeys fed diets with a different content of high-fibre sunflower meal. *Annals of Animal Science*, 2011 Vol 11, No. 1 143-155. **IF₂₀₁₁= 0.389, punkty MNiSW = 15 (praca oryginalna)**

2. **Skowrońska A**, Mikulski D, Mikulska M, Zapotoczny P, Zmysłowska I, Szczypiński PM. Methodological aspects and applications of fluorescence In Situ hybridization to identify bacteria from the gastrointestinal tract of turkeys. *ISSN 1392-2130. Vet Med Zoot. T. 2009, 48 (70).* **IF₂₀₀₉=0.167, punkty MNiSW = 10 (praca oryginalna)**

I. Różnorodność zespołów mikroorganizmów w obrębie pętli mikrobiologicznej, a procesy produkcji, utylizacji i dekompozycji materii organicznej w pelagialu jezior

Cykl publikacji powstał w ramach grantu zamawianego, do którego zostałam zaproszona przez Profesora R. Chrósta z Uniwersytetu Warszawskiego. Moim zadaniem było zastosowanie metody FISH do badania bioróżnorodności bakterii w jeziorach o różnym stopniu zanieczyszczenia. Przeprowadziliśmy również eksperymenty w tzw. systemie „mesocosm” dodając nieorganiczne składniki (N i P) i obserwowaliśmy zmiany

bioróżnorodności komponentów pętli mikrobiologicznej oraz wielkość i intensywność procesów mikrobiologicznych zachodzących w jej obrębie. Wzbogacenie wody jeziornej w biogeny mineralne doprowadziło do ilościowych i jakościowych zmian struktury biocenozy (m.in. obserwowaliśmy zmianę populacji bakterii z *Cytophaga-flavobacterium* na *Alphaproteobacteria*). Identyfikacja bakterii ze środowisk wodnych technikami hodowlanymi jest bardzo utrudniona, a czasami wręcz niemożliwa, alternatywą są techniki biologii molekularnej. We wszystkich opublikowanych pracach brałam czynny udział w doświadczeniach oraz wspólnie z zespołem opracowaliśmy wszystkie manuskrypty.

1. Adamczewski T, Chróst RJ, Kalinowska K, **Skowronska A**. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoflagellates in lake water examined by different techniques controlling grazing pressure. *Aquatic Microbial Ecology*, 2010 60:203-213doi:10.3354/ame01420 **IF₂₀₁₀=2.089, punkty MNiSW = 32 (praca oryginalna)**

2. Chróst R, Adamczewski T, Kalinowska K, and **Skowronska A**. Abundance and structure of microbial loop components (bacteria and protists) in lakes of different trophic status. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009 Sep; 19 (9): 858-868. **IF₂₀₀₉=1.450, punkty MNiSW = 20 (praca oryginalna)**

3. Chróst R, Adamczewski T, Kalinowska K, and **Skowronska A**. Effect of organic phosphorus and nitrogen enrichment of mesotrophic lake water on dynamics and diversity of planktonic microbial communities-DNA and protein case studies (mesocosm experiments). *Polish Journal of Microbiology* 2009, Vol. 58, No 2, 163-180, **punkty MNiSW = 6 (praca oryginalna)**

4. Chróst R, Adamczewski T, Kalinowska K and **Skowronska A**. Inorganic phosphorus and nitrogen modify composition and diversity of microbial communities In water of mesotrophic Lake. *Polish Journal of Microbiology* 2009, Vol. 58, No 1, 77-90, **punkty MNiSW = 6 (praca oryginalna)**

J. Zastosowanie klasycznych i molekularnych metod badawczych do oceny wpływu czynników antropogennych na jakość mikrobiologiczną wód górnego odcinka rzeki Drwęcy

Prace dotyczące zbadania, jak zmienia się skład jakościowy i ilościowy mikroflory rzeki Drwęcy w wyniku zanieczyszczeń pochodzących z hodowli ryb.

1. Gołaś I, Zmysłowska I, Harnisz M, Korzekwa K, **Skowronska A**, Teodorowicz M, Górnica D, Dudziec E – Anthropogenic Impact on Quantitative Differentiation of Nitrogen Cycling Bacteria in Waters of the Drwęca River. *Polish Journal of Natural sciences* 2008, Abbrev.: *Pol. J. Natur. Sc.*, Vol 23(3): 667–680, **punkty MNiSW = 2 (praca oryginalna)**

2. Gołaś I, Zmysłowska I, Harnisz M, Korzekwa K, **Skowronska A**, Teodorowicz M, Górnica D, Gros M, Brzozowa S. Nitrogen Cycle bacteria in the Waters of the River Drwęca *Polish Journal*

of Environmental Studies 2007, Vol.17, No.2, 215-225. **IF₂₀₀₇ = 0.627 punkty MNiSW =10**
(praca oryginalna)

K. Zastosowanie metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* FISH do badań hydromikrobiologicznych

Opublikowane wyniki dotyczyły 3 wybranych zbiorników systemu Wielkich Jezior Mazurskich; jeziora Mamry, Dargin i Niegocin. Po raz pierwszy w kraju zastosowałam metodę FISH w badaniach hydromikrobiologicznych do określenia struktury taksonomicznej bakterii w eutroficznym i hipertroficznym jeziorach. Druga praca to publikacja poglądowa opisująca szczegółowo metodę FISH i CARD-FISH oraz jej zastosowanie w mikrobiologii środowiskowej.

1. Skowronska A Distribution of Microbial-Selected Populations in Lake North Mamry by Fluorescent *in situ* Hybridization. Polish Journal of Environmental Studies 2007 Vol.16, No.1, 123-128. **IF₂₀₀₇ = 0.627 punkty MNiSW =10** (praca oryginalna)

2. Skowrońska A, Zmysłowska I. Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych, Fluorescencyjna Hybrydyzacja *in situ* FISH. Postępy Mikrobiologii 2006, 45, 183-193. **punkty MNiSW = 9** (praca przeglądowa)

K. Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Skowrońska A, Świątecki A. Application of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to investigate biodiversity of freshwater bacterioplankton communities. Limnological Papers XXIII 2003, Acta Universitatis Nicolai Copernici 123- 130. ISSN: 0860-1232

2. Skowrońska A, Świątecki A. The bacterial diversity on lake studied via cloning and sequencing of 16S rRNA genes. XXIII 2004 Limnological Papers, Acta Universitatis Nicolai Copernic, 123-130 ISSN: 0860-1232

6.1. Analiza bibliometryczna

Podsumowując, mój łączny dorobek naukowy obejmuje 66 pozycji, w tym 25 prace oryginalne (24 artykuły w języku angielskim, 2 prace pogładowe w języku angielskim i polskim) i 41 komunikatów prezentowanych na konferencjach i kongresach krajowych i zagranicznych, o współczynniku oddziaływania **IF=28.021**, **MNiSW = 405 pkt.** Punktacja cyklu publikacji przedłożona jako rozprawa habilitacyjna, który obejmuje 4 prace oryginalne, wynosi **IF=8.716**, **punkty MNiSW= 95**. Po wyłączeniu 4 prac oryginalnych wchodzących w skład osiągnięcia mój dorobek stanowi 21 prac, w tym 19 prac oryginalnych, 2 prace pogładowe, o łącznej punktacji **IF= 19,305**, **punkty MNiSW= 310**. W 12 publikacjach jestem pierwszym, a w 3 drugim autorem. W oparciu o listę Journal Citation Reports liczba cytowań moich publikacji według bazy **Web of Science wynosi: 63**; **Indeks Hirscha według bazy Web of Science wynosi 4**, liczba cytowań według bazy **Scopus = 65**; **Indeks Hirscha według bazy Scopus wynosi 5**.

Sumaryczny Impact Factor (punkty MNiSW) zgodny z rokiem publikowania prac	Bez uwzględnienia publikacji stanowiących główne osiągnięcie naukowe, zgodny z rokiem publikowania prac	Sumaryczny Impact Factor (punkty MNiSW) w roku 2015/16
28.021 (405)	19.305 (310)	28.800 (449)

Szczegółowe informacje na temat wykazu opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki znajduje się w **załączniku 3**.

17.01.2017
Agnieszka Stasiak

Załączniki:

Analiza bibliometryczna Biblioteki UWM w Olsztynie

Top lista 10. najlepszych publikacji z tego samego obszaru nauki w 2011 roku według BioMedical Library, Uniwersytetu Minnesota w USA.