



---

# **AUTOREFERAT OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

---

**DR INŻ. HANNA KALAMARZ-KUBIAK**

---

**PRACOWNIA FIZJOLOGII ORGANIZMÓW MORSKICH  
ZAKŁAD GENETYKI I BIOTECHNOLOGII MORSKIEJ  
INSTYTUT OCEANOLOGII POLSKIEJ AKADEMII NAUK**  
Powstańców Warszawy 55  
81-712 Sopot

---

**Sopot 2015**

## 1. IMIĘ I NAZWISKO

**Hanna Kalamarz-Kubiak**

## 2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

- 1989 – magister inżynier w zakresie zootechniki, Wydział Zootechniczny (obecnie Bioinżynierii), Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski);  
Tytuł pracy magisterskiej: „*Związek między aktywnością kwaśnej fosfatazy leukocytów krwi a poziomem wybranych wskaźników diagnostycznych u krów i cieląt rasy czarnobiałej*”.  
Promotor : *prof. dr hab. Krzysztof Walawski*, Instytut Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt, Wydział Zootechniczny (obecnie Bioinżynierii), Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski).
- 1990 – Międzywydziałowe Studium Pedagogiczne, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski).
- 1999 – doktor nauk rolniczych w zakresie zootechniki, specjalność: biologia rozrodu zwierząt, Wydział Bioinżynierii, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski);  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Wpływ neuropeptydu Y, substancji P, galaniny i  $\beta$ -endorfiny na uwalnianie LHRH z wyniosłości pośrodkowej łoszek podczas indukowanego wyrzutu LH*”.  
Promotor : *prof. dr hab. Stanisław Okrasa*, Instytut Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii (obecnie Biologii i Biotechnologii), Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski).

## 3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH I DOŚWIADCZENIU ZAWODOWYM.

- 1989–1990 Instytut Fizjologii Zwierząt, Wydział Zootechniczny; Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, *asystent stażysta*
- 1990–1999 Instytut Fizjologii Zwierząt, Wydział Zootechniczny; Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, *asystent*
- 1999–2000 Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, *asystent*
- 2000–2003 Zakład Medycyny Nuklearnej, Centralny Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, *starszy asystent*
- 2003–2013 Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej, Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie, *adiunkt*
- 2013–obecnie Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej, Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie, *specjalista biolog*

**4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM (Dz. U. NR 65, POZ 595 ZE ZM.):**

**A) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO,**

**Nonapeptydy: wazotocyna argininowa i izotocyna w regulacji odpowiedzi na stres u ryb**

**B) (AUTOR/AUTORZY, TYTUŁ PUBLIKACJI, ROK WYDANIA, NAZWA WYDAWNICTWA),**

1. **Kalamarz-Kubiak H.**, Meiri-Ashkenazi I., Kleszczyńska A., Rosenfeld H. 2014. *In vitro* effect of cortisol and urotensin I on arginine vasotocin and isotocin secretion from pituitary cells of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Journal of Fish Biology* 84 (2); 448-458. doi: 10.1111/jfb.12297.  
**IF =1,65; 30pkt. MNiSzW**
2. **Kalamarz-Kubiak H.**, Meiri-Ashkenazi I., Kleszczyńska A., Rosenfeld H. 2014. Urotensin II inhibits arginine vasotocin and stimulates isotocin release from nerve endings in the pituitary of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Experimental Zoology: Part A Ecological Genetics and Physiology* 321(8):467-471. doi: 10.1002/jez.1875.  
**IF =1,44; 30pkt. MNiSzW**
3. **Kalamarz-Kubiak H.**, Gozdowska M., Nietrzeba M., Kulczykowska E. 2011. A novel approach to AVT and IT studies in fish brain and pituitary: In vitro perfusion technique. *Journal of Neuroscience Methods* 199 (1): 56-61. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.04.035.  
**IF =1,98; 25pkt. MNiSzW**
4. **Kalamarz-Kubiak H.**, Kleszczyńska A., Kulczykowska E. 2015. Cortisol stimulates arginine vasotocin and isotocin release from the hypothalamo-pituitary complex of round goby (*Neogobius Melanostomus*): Probable mechanisms of action. *Journal of Experimental Zoology: Part A Ecological Genetics and Physiology* 323 (9): 616-626. doi: 10.1002/jez.1952.  
**IF =1,44; 30pkt. MNiSzW**

**SUMARYCZNY IF ZGODNIE Z ROKIEM OPUBLIKOWANIA = 6,51**

**RAZEM LICZB PUNKTÓW MNiSzW ZGODNIE Z WYKAZEM CZASOPISM Z GRUDNIA 2014 = 115**

*(Oświadczenia współautorów publikacji oraz określenie indywidualnego wkładu pracy każdego z nich znajdują się w załączniku 6)*

**C) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW ORAZ OMÓWIENIE ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.**

Celem podjętych badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego było wyjaśnienie udziału argininy wazotocynowej (AVT) oraz izotocyny (IT) w regulacji odpowiedzi na stres u ryb.

Ryby podobnie jak inne kregowce są narażone na stres, nie tylko w ich naturalnym środowisku ale również w akwakulturach, laboratoriach *etc.* Fizjologiczna odpowiedź na czynniki stresowe obejmuje aktywację osi mózg – współczulny układ nerwowy – komórki chromochłonne (*ang. the brain – sympathetic – chromaffin cell axis; BSC-axis*) oraz osi podwzgórze – przysadka mózgowa – komórki międzynerkowe (*ang. the hypothalamo – pituitary – interrenal axis; HPI-axis*) (Wendelaar-Bonga, 1997)<sup>1</sup>. Podczas aktywacji osi podwzgórze – przysadka mózgowa – komórki międzynerkowe, pod wpływem pobudzenia biegnącego z współczulnych zakończeń nerwowych, komórki chromochłonne części głównej nerki uwalniają katecholaminy (adrenalinę i noradrenalinę). Aktywacja osi mózg – współczulny układ nerwowy – komórki chromochłonne następuje kiedy czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF) uwalniany z podwzgórza stymuluje komórki kortykotropowe przysadki do wydzielania hormonu kortykotropowego (ACTH), który z kolei aktywuje komórki międzynerkowe części głównej nerki do syntezy i uwalniania kortyzolu. Pomimo, że kortyzol jest powszechnie uznawany jako kluczowy element hormonalnej odpowiedzi na stres, hormony takie jak wazotocyna argininowa (AVT), izotocyna (IT), urotensyny, dopamina, serotonina i  $\beta$ -endnorfina są również zaangażowane w regulację odpowiedzi na stres u ryb.

Nonapeptydy: AVT i IT występujące u ryb są homologami ssaczej wazotocyny (AVP) i oksytocyny (OT). U ryb, AVT i IT są syntetyzowane w oddzielnych drobno- i wielkokomórkowych neuronach obszaru przedwzrostowego (POA), magazynowane w zakończeniach nerwowych części nerwowej przysadki mózgowej i uwalniane do krążenia w wyniku odpowiedniej stymulacji. Oba peptydy produkowane są w formie nieaktywnych prohormonów i stają się biologicznie czynne dopiero po oddysocjowaniu od niekowalencyjnych kompleksów z białkami ochronnymi w procesie dojrzewania, który zachodzi w podwzgórze i nerwowej części przysadki mózgowej. Tylko dojrzałe nonapeptydy, działają jako hormony obwodowe, neurotransmitery i/lub neuromodulatory w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Fizjologiczna rola AVT związana jest z regulacją aktywności układu krążenia oraz utrzymaniem wodno-elektrolitowej równowagi organizmu. Oba neuropeptydy, współdziałając z innymi układami wydzielania wewnętrznego, kontrolują zachowania socjalne i rozrodcze ryb. A co najważniejsze, wykazano, że AVT i IT są zaangażowane w fizjologiczną odpowiedź na stres u ryb. Zmiany stężenia AVT i IT w podwzgórze, przysadce i osoczu zaobserwowano u wielu gatunków ryb poddanych różnym

---

<sup>1</sup> Wendelaar Bonga SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev* 77:591–625.

sytuacjom stresowym takim jak: ograniczenie przestrzeni, zakłócanie spokoju, duże zagęszczenie, pozbawienie pokarmu i stres osmotyczny. Można więc stwierdzić, że działanie stresu na syntezę i uwalnianie nonapeptydów jest uzależnione od rodzaju czynnika stresowego (*Publikacje wg Autoreferatu 5.3.2; 5.3.6; 5.3.9; 5.3.19; 5.4.20*). Wobec tego, AVT i IT mogą stanowić ważny element osi stresu u ryb (Kulczykowska, 2008)<sup>2</sup>. U wielu gatunków ryb wykazano, że neurony AVT współwystępują z neuronami CRF w jądrze przedwzrokowym (NPO) a ekspresja mRNA dla AVT i CRF wzrasta równocześnie w odpowiedzi na różnego rodzaju czynniki stresowe. Badania *in vitro* wykazały, że AVT może niezależnie lub synergistycznie z CRF stymulować uwalnianie ACTH z komórek przysadki ryb.

Działanie kortyzolu na AVT zbadano jedynie w warunkach *in vivo* u dorady (*Sparus aurata*). Zastosowanie implantów z kortyzolem, najpierw spowodowało podwyższenie ekspresji mRNA dla AVT a potem zwiększyło zawartość AVT w przysadce dorady. Nieliczne badania dotyczące IT sugerują, że ten nonapeptyd wzmaga uwalnianie ACTH z komórek przysadki ryb. Jak dotąd nikt nie podjął badań *in vitro* dotyczących działania kortyzolu na wydzielanie AVT i IT u ryb (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1*). U dorady, w przeciwieństwie do innych ryb kostnoszkieletowych, CRF nie jest czynnikiem uwalniającym dla ACTH i kortyzolu. Powodem tego jest brak anatomicznych połączeń pomiędzy perikarionami CRF a komórkami kortykotropowymi uwalniającymi ACTH w gruczołowej części przysadki mózgowej (Quesada i wsp., 1988; Mancera & Fernandez-Lebrez, 1995; Duarte i wsp., 2001)<sup>3 4 5</sup>. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że urotensyna I (UI) zamiast CRF może regulować uwalnianie AVT i IT u dorady. Od dawna wiadomo, że UI jest zaangażowana w regulację neuroendokrynej, autonomicznej i behawioralnej odpowiedzi na stres u ryb. Ekspresję genu dla UI zaobserwowano nie tylko w urofizie, ale także w regionie kresomózgowia i obszaru przedwzrokowego, pokrywy wzrokowej i wzgórze, podwzgórze i

<sup>2</sup> Kulczykowska, E. 2008. Arginine vasotocin and isotocin as multifunctional hormones, neurotransmitters and neuromodulators in fish. In *Avances en Endocrinología Comparada*, Vol. IV (Munoz-Cueto, J.A., Mancera, J.M., Martínez-Rodríguez, G., eds.), Universidad de Cádiz, Spain: Servicio de Publicaciones, pp. 41–47.

<sup>3</sup> Quesada, J., Lozano, M.T., Ortega, A. & Agulleiro, B. 1988. Immunocytochemical and ultrastructural characterization of the cell types in the adenohypophysis of *Sparus aurata* L. (Teleost). *General and Comparative Endocrinology* 72, 209–225.

<sup>4</sup> Mancera, J.M. & Fernandez-Lebrez, P. 1995. Localization of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in the brain of the teleost *Sparus aurata*. *Cell and Tissue Research* 281, 569–572.

<sup>5</sup> Duarte, G., Segura-Noguera, M.M., Martín del Río, M.P. & Mancera, J.M. 2001. The hypothalamo-hypophyseal system of the white seabream *Diplodus sargus*: immunocytochemical identification of arginine-vasotocin, isotocin, melanin-concentrating hormone and corticotropin-releasing factor. *Histochemical Journal* 33, 569–578.

tylnej części mózgu, co wskazuje na działanie regulacyjne w obrębie OUN. Z kolei, strukturalne podobieństwo pomiędzy UI i CRF może sugerować podobną rolę obu tych hormonów w osi podwzgórze – przysadka mózgowa – komórki międzynerkowe u ryb. Wykazano, że UI moduluje wydzielanie kortyzolu, bezpośrednio przez działanie na komórki tkanki międzynerkowej lub pośrednio przez oś podwzgórze – przysadka mózgowa. Ponadto wykazano, że UI-immunoreaktywne (UI-ir) włókna biegnące z jądra bocznego guza (NLT) do przysadki mózgowej mogą oddziaływać na zakończenia nerwowe AVT i IT u wielu gatunków ryb.

Celem badań podjętych i opisanych w pierwszej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1*) było określenie czy kortyzol i UI wpływają na wydzielanie AVT i IT w hodowli komórek przysadki mózgowej dorady. Badania *in vitro* przeprowadzono w National Center for Mariculture, Israel Oceanographic and Limnological Research w Eilacie (Izrael), z którym nawiązałam współpracę i gdzie przebywałam na stażu naukowym w ramach wymiany bezdewizowej pomiędzy Polską Akademią Nauk a Izraelską Akademią Nauk Ścisłych i Humanistycznych (*Wg Wykazu Osiągnięć: III.K.1; załącznik 4*). Reszta analiz została przeprowadzona w Pracowni Fizjologii Organizmów Morskich Zakładu Genetyki i Biotechnologii Morskiej IOPAN w Sopocie. Do badań użyto 3 letnich dorad obu płci (n=49). W badaniach *in vitro* zastosowano hodowlę pierwotną komórek przysadki mózgowej zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Levavi-Sivan i wsp. (1995, 2004)<sup>6 7</sup>. Komórki przysadki były hodowane z dodatkiem kortyzolu ( $1,4 \times 10^{-8}$  M;  $1,4 \times 10^{-7}$  M;  $0,4 \times 10^{-6}$  M) lub UI ( $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  M). Przy wyborze dawki kortyzolu wzięto pod uwagę poziom tego hormonu mierzony w odpowiedzi na stres u różnych gatunków ryb. Dawki UI stosowane w hodowli były określone na podstawie literatury, biorąc pod uwagę stężenie UI w różnych tkankach ryb. Po upływie 6, 24 i 48 godzin hodowli, media inkubacyjne zbierano i zamrażano w  $-70^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analiz AVT i IT. Stężenie AVT i IT w mediach inkubacyjnych oznaczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją fluorescencji zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Kulczykowskiej (1995)<sup>8</sup>, która pozwala na pomiar obu neuropeptydów w jednej próbce. (*Szczegółowe informacje dotyczące zastosowań*

---

<sup>6</sup> Levavi-Sivan, B., Safarian, H., Rosenfeld, H., Elizur, A. & Avitan, A. 2004. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-receptor gene expression in tilapia: effect of GnRH and dopamine. *Biology of Reproduction* 70, 1545–1555.

<sup>7</sup> Levavi-Sivan, B., Ofir, M. & Yaron, Z. 1995. Possible sites of dopaminergic inhibition of gonadotropin release from the pituitary of a teleost fish, tilapia. *Molecular and Cellular Endocrinology* 109, 87–97.

<sup>8</sup> Kulczykowska, E. 1995. Solid-phase extraction of arginine vasotocin and isotocin in fish samples and subsequent gradient reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation. *Journal of Chromatography B* 673, 289–293.

metody *in vitro* oraz analizy HPLC znajdują się w pierwszej omawianej publikacji; *Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1; załącznik 9*)

W wyniku przeprowadzonych badań, jako pierwsza udowodniłam, że kortyzol i UI wpływa na sekrecję AVT i IT z zakończeń nerwowych w przysadce mózgowej dorady (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1*). Wszystkie zastosowane dawki kortyzolu wykazywały stymulujące działanie na sekrecję AVT w hodowli komórek przysadki. Po 24 godzinach hodowli zaobserwowałam, że działanie kortyzolu jest zależne od dawki. U ssaków, wpływ kortyzolu na sekrecję AVT potwierdzono zarówno w doświadczeniach *in vivo* jak *in vitro*. Stymulujące działanie kortyzolu (*in vivo*) na poziom AVT w osoczu zanotowano u bydła Zebu (*Bos indicus*) podczas ograniczenia dostępu do wody. Z kolei, u owiec domowych (*Ovis aries*) podczas stresu audiowizualnego (obraz szczekającego psa) zaobserwowano wzrost poziomu kortyzolu i AVT w osoczu. Natomiast, chroniczny stres wywoływał u szczurów wzrost ekspresji AVT w drobnocząsteczkowych neuronach jądra przykomorowego (PVN) oraz wzrost sekrecji AVT do krążenia wrotnego przysadki mózgowej. Ponadto u szczurów wykazano, że stres może regulować w górę (*ang. up-regulation*), czyli zwiększać ilość receptorów AVT w gruczołowej części przysadki. Wyniki moich badań ujawniły, że stymulujące działanie kortyzolu na sekrecję AVT zmniejsza się po 48 godzinach hodowli (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1*). Prawdopodobnym wytłumaczeniem jest to, że zapasy AVT w ziarnistościach wydzielniczych mogą się po prostu wyczerpać bez uzupełnienia ich z zakończeń AVT-ergicznymi. Innym wytłumaczeniem może być zjawisko uniewrażliwienia receptorów kortykoidowych (CR). Uniewrażliwienie CR w wyniku procesów fizjologicznych, stresu lub choroby jest znanym zjawiskiem występującym u ssaków. Jednakże z drugiej strony, spadek wydzielania AVT po 24 godzinnej ekspozycji na kortyzol może być związany ze wzrostem aktywności aminopeptydazy odpowiedzialnej za metabolizm tych nanopeptydów jak dowiedziono u szczurów i kurcząt. Tak jak w przypadku AVT, działanie kortyzolu (*in vitro*) na wydzielanie IT nie było badane u ryb kostnoszkieletowych. Wyniki moich badań wskazują, że kortyzol obniża sekrecję IT z zakończeń nerwowych w przysadce mózgowej dorady. U ssaków, działanie kortyzolu na OT potwierdzono zarówno w badaniach *in vivo* jak *in vitro*. Stwierdzono, że glikokortykoidy hamują neurosekrecyjną aktywność drobnokomórkowych szczurzych neuronów OT-ergicznymi. Z kolei, deksametazon hamuje wzrost OT w osoczu szczurów po dożylnym podawaniu izotonicznego lub hipertonicznego roztworu soli fizjologicznej.

Na podstawie przedstawionych powyżej przesłanek założyłam, że UI zamiast CRF może regulować uwalnianie AVT i IT u dorady. Wyniki moich badań wykazały zależne od dawki



stymulujące działanie UI na wydzielanie AVT po 6 godzinach hodowli (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1*). U szczurów zaobserwowano, że UI nieznacznie zwiększa uwalnianie AVT z podwzgórza, co prawdopodobnie wskazuje na stymulujące działanie tego peptydu na produkcję AVT. Prezentowane wyniki badań wykazują, że po 24 godzinach hodowli tylko najwyższa dawka UI wzmacnia sekrecję AVT z zakończeń nerwowych w przysadce. Stymulujące działanie UI zanika po 48 godzinach hodowli. Zważywszy na fakt, że UI jest naturalnym ligandem receptorów CRF (CRFR), zaistniałą sytuację można wyjaśnić późniejszym uniewrażliwieniem tych receptorów. Uniewrażliwienie CRFR zostało udokumentowane wieloma badaniami *in vitro*. W tym miejscu należy nadmienić, że UI zwiększa sekrecję kortyzolu i może pośrednio wpływać na wydzielanie AVT także poprzez stymulację uwalniania kortyzolu. Prezentowane wyniki wykazały, że UI nie wpływa na wydzielanie IT. Dotychczas oddziaływanie UI na sekrecję IT lub OT nie było badane.

Przeciwstawna odpowiedź AVT i IT na działanie UI i kortyzolu w hodowli komórek przysadki dorady, potwierdza wyniki wcześniejszych badań wskazujące na niezależną regulację wydzielania tych nonapeptydów u ryb.

Uzyskane wyniki potwierdziły założenia przyjęte w pierwszej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1*). Wykazałam, że:

- ✓ Kortyzol wpływa na sekrecję AVT i IT z zakończeń nerwowych w przysadce mózgowej dorady,
- ✓ Kortyzol pobudza uwalnianie AVT w sposób zależny od dawki i hamuje uwalnianie IT w hodowli komórek przysadki dorady,
- ✓ UI wywołuje wzrost uwalniania AVT, jednakże nie wpływa na uwalnianie IT z zakończeń nerwowych w przysadce dorady
- ✓ UI w zastępstwie CRF bierze udział w regulacji osi podwzgórza – przysadka mózgowa – komórki międzynerkowe u dorady,
- ✓ AVT i IT są ważnymi elementami odpowiedzi na stres u ryb.

Jak wspomiałam na początku rozdziału, poza kortyzolem w regulację odpowiedzi na stres u ryb zaangażowane są między innymi urotensyny. Działanie UI zostało już omówione. O urotensynie II (UII) wiadomo, że jest zaangażowana w kontrolę osmoregulacji, funkcji metabolicznych a także kontrolę aktywności układu krwionośnego, pokarmowego i immunologicznego u ryb. Zawartość UII w urofizie wzrasta w ciągu 24 godzin po przeniesieniu storni (*Platichthys flesus*) z wody słonej do słodkiej, podczas gdy jej zawartość



w osoczu i ekspresja receptorów dla UII w narządach docelowych (nerka i skrzela) zmniejsza się, sugerując tzn. regulację w dół (*ang. down-regulation*) systemu UII.

Zaobserwowano, że synteza i uwalnianie AVT i IT z nerwowej części przysadki mózgowej są wrażliwe na zmiany zasolenia. U ryb kostnoszkieletowych, gwałtowne zmiany zasolenia oddziałują na ekspresję pro AVT i pro IT mRNA w neuronach podwzgórza oraz zawartość AVT i IT w przysadce. Już dawno sugerowano, że istnieje związek pomiędzy AVT oraz innymi układami hormonalnymi takimi jak UII w osmoregulacji u ryb. Jak wiadomo, AVT i IT są syntetyzowane w POA i transportowane do nerwowej części przysadki mózgowej, gdzie są magazynowane i uwalniane z zakończeń nerwowych do układu krążenia. Natomiast, UII zidentyfikowano nie tylko w urofizie ale także w OUN u ryb. Ekspresję mRNA dla UII i receptorów UII wykryto we wszystkich obszarach mózgu ryb wliczając region kresomózgowia i obszaru przedwzrokowego, podwzgórza i przysadki mózgowej. Przedstawione wyniki wskazują na POA, podwzgórze oraz przysadkę mózgową jako potencjalne miejsca wzajemnego oddziaływania pomiędzy systemem UII a AVT/IT. U storni zaobserwowano, że oba peptydy UII i AVT są zaangażowane w stres hyper- i hypo-osmotyczny. Jednakże, wpływ UII na sekrecję AVT i IT nie był jeszcze badany u ryb.

Celem badań podjętych i opisanych w drugiej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.2*) było określenie czy UII wpływa na uwalnianie AVT i IT z zakończeń nerwowych w przysadce mózgowej dorady. Badania *in vitro* tak jak poprzednio, przeprowadzono w National Center for Mariculture, Israel Oceanographic and Limnological Research w Eilacie (Izrael) w ramach wymiany bezdewizowej pomiędzy Polską Akademią Nauk a Izraelską Akademią Nauk Ścisłych i Humanistycznych (*Wg Wykazu Osiągnięć: III.K.1; załącznik 4*). Resztę analiz wykonano w Pracowni Fizjologii Organizmów Morskich Zakładu Genetyki i Biotechnologii Morskiej IOPAN w Sopocie. Badania przeprowadzono na 3 letnich doradach obu płci. W badaniach *in vitro* zastosowano hodowlę pierwotną komórek przysadki zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Levavi-Sivan i wsp. (1995, 2004). Komórki przysadki hodowano w medium z dodatkiem UII ( $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  M). Dawki UII zastosowane w hodowli były określone na podstawie literatury, biorąc pod uwagę stężenie tego peptydu w różnych tkankach ryb. Po upływie 6, 24 i 48 godzin hodowli, media inkubacyjne zbierano i zamrażano w  $-70^{\circ}\text{C}$  do czasu oznaczenia AVT i IT metodą HPLC. (*Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanej metody in vitro oraz analizy HPLC znajdują się w drugiej omawianej publikacji; Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.2; załącznik 9*)

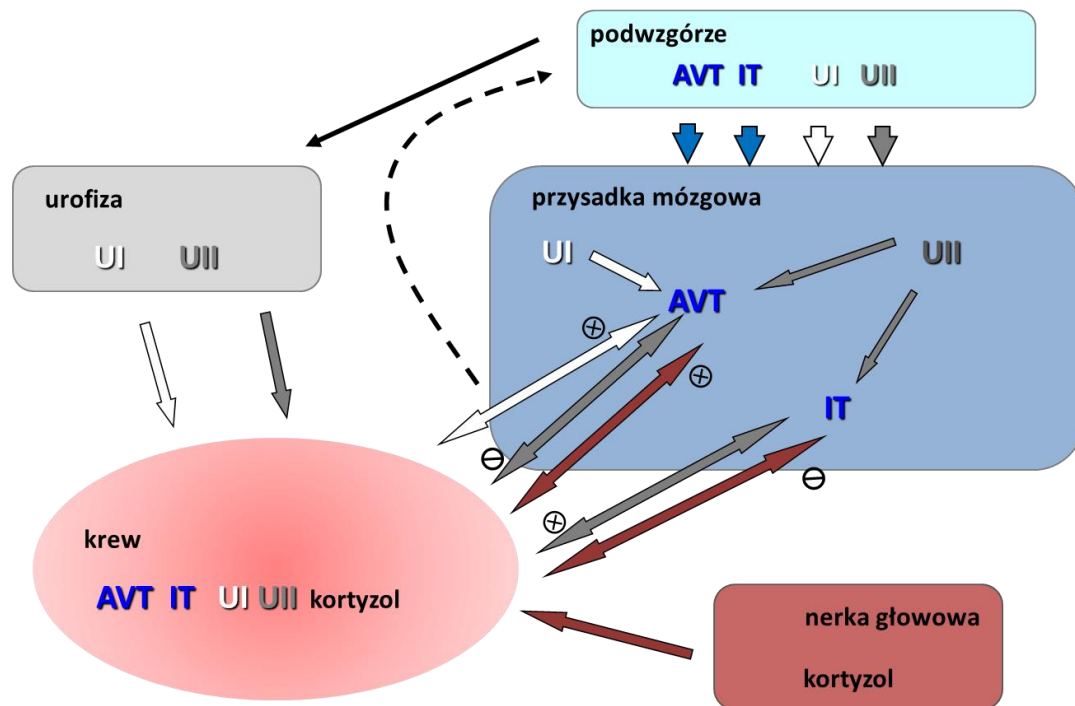
W drugiej publikacji, udowodniłam po raz pierwszy, że UII wpływa na uwalnianie AVT i IT z zakończeń nerwowych w przysadce mózgowej dorady (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.2*).

Przedstawione wyniki wykazują, że UII hamuje sekrecję AVT w hodowli komórek przysadki. Wiadomo, że AVT, jako hormon antydiuretyczny zmniejsza produkcję moczu u ryb. A zatem, UII może działać moczopędne poprzez hamowanie wydzielania AVT. Poza tym stwierdzono, że UII podawana *in vivo* zwiększa przepływ krwi przez nerki, szybkość filtracji kłębuszkowej i w konsekwencji zwiększa diurezę i natriurezę u szczura. Wyniki moich badań wykazały, że, silne hamujące działanie UII na uwalnianie AVT jest niezależne od czasu i zastosowanej dawki. Po 24 godzinach hodowli, hamowanie AVT było niższe i utrzymywało się do końca inkubacji. Takie odhamowanie wydzielania AVT w czasie długiej hodowli może wskazywać na uniewrażliwienie receptorów UII tak jak to obserwowano w hodowlach ludzkich linii komórkowych. W przeciwieństwie do AVT, wydzielanie IT znacznie wzrasta pod wpływem UII po 24 godzinach hodowli. To stymulujące działanie UII wydaje się być niezależne od zastosowanej dawki. U ssaków, UII jest naturalnie występującym analogiem somatostatyny, wykazującym pewne funkcjonalne podobieństwa z tym hormonem. Wyniki uzyskane przeze mnie są zgodne z wynikami uzyskanymi u ssaków, gdzie dokomorowe podawanie somatostatyny podnosi poziom osoczowej OT u dziewiczych i ciężarnych samic szczurów.

Przeciwstawne odpowiedzi AVT i IT na działanie UII w hodowli komórek przysadki dorady, wskazują na niezależną regulację wydzielania nonapeptydów.

Uzyskane wyniki potwierdziły założenia przyjęte w drugiej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.2*). Wykazałam, że:

- ✓ UII wpływa na uwalnianie AVT i IT zakończeń nerwowych w przysadce mózgowej dorady,
- ✓ UII hamuje uwalnianie AVT i pobudza uwalnianie IT w hodowli komórek przysadki dorady,
- ✓ UII razem z AVT i IT może kontrolować odpowiedź na różne zasolenia u ryb.



Rys 1. Schemat oddziaływań kortyzolu, urotensyny I oraz urotensyny II na sekrecję wztocyny argininowej i izotocyny u dorady.

Kolejnym etapem w moich doświadczeniach było zbadanie mechanizmu działania kortyzolu na uwalnianie AVT i IT u ryb. Zadanie to wymagało zastosowania metody, która pozwala na monitorowanie dynamicznych zmian w sekrecji hormonów i rejestrowanie nawet najmniejszych i krótkotrwałych wahań w ich wydzielaniu. Jedynie metoda hodowli perfuzyjnej pozwala na szczegółowe badanie zmian w uwalnianiu hormonów przy jednoczesnym zapewnieniu optymalnych warunków hodowli.

Celem badań podjętych i opisanych w trzeciej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.3*) było opracowanie procedur dla unikalnej techniki *in vitro* – gradientowej hodowli perfuzyjnej (3D) eksplantów mózgu, kompleksu podwzgórze – przysadka mózgowa oraz przysadek mózgowych ciernika (*Gasterosteus aculeatus*) i babki byczej (*Neogobius melanostomus*). Wszystkie eksperymenty i analizy wykonano w Pracowni Fizjologii Organizmów Morskich Zakładu Genetyki i Biotechnologii Morskiej IOPAN w Sopocie.

Do tej pory metody perfuzji narządowej nie były zbyt często stosowane u ryb, głównie z powodu braku odpowiedniej techniki. Dopiero innowacyjny system do perfuzji narządowej (MINUCCELLS and MINUTISSUE) zaproponowany przez Minuth i wsp. w latach 90-tych stworzył znacznie więcej możliwości. Technika perfuzji gradientowej spełnia wymagania stawiane badaniom siatkówki, bariery krew-siatkówka i krew-mózg, tkanek nerwowych,

odnowy skóry, regeneracji naczyń krwionośnych, kości i tkanki mięśniowej u ssaków (Minuth i wsp., 2010)<sup>9</sup>. We wszystkich doświadczeniach użyłam sprzętu firmy MINUCCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH (Niemcy). Poszczególne moduły wchodzące w skład zestawów do perfuzji mogą być użyte w różnych kombinacjach w zależności od celu badań oraz rodzaju badanych tkanek. Eksplanty są umieszczone na membranach w komorze gradientowej a przepływające medium obmywa tkankę ze wszystkich stron. Takie rozwiązanie zapobiega tworzeniu się przestrzeni martwej wokół eksplantów. W badaniach użyłam 3 zestawów do testowania metody transportu medium inkubacyjnego do komory gradientowej.

*Zestaw 1* – medium bez napowietrzania transportowane od góry do komory gradientowej.

*Zestaw 2* – napowietrzane medium transportowane od góry do komory gradientowej.

*Zestaw 3* – jedno lub dwa napowietrzane media transportowane jednocześnie od góry i od dołu do komory gradientowej.

Przy użyciu *zestawu 1* ustaliłam skład medium perfuzyjnego dla każdego gatunku ryb, rodzaj membrany i określiłam czas, w którym medium perfuzyjne jest transportowane do poszczególnych modułów systemu. Ponadto, wyznaczyłam czas konieczny do osiągnięcia stabilnego poziomu uwalniania AVT i IT podczas perfuzji eksplantów tkankowych. Względnie stabilny poziom uwalniania AVT i IT stwierdziłam między 60 a 80 minutą perfuzji i tym samym wyznaczyłam optymalny przedział czasu, w którym należy zadawać testowane czynniki w dalszych badaniach. *Zestaw 2* zawierający moduł wymiany gazowej posłużył do wyboru rodzaju napowietrzania medium inkubacyjnego, w atmosferze 0,3% CO<sub>2</sub> lub mieszaninie 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>. Ponadto, ustaliłam równowagę kwasowo-zasadową medium perfuzyjnego w atmosferze 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> przy zawartości 25mM HEPES i 0,5mM NaHCO<sub>3</sub> oraz w atmosferze 0,3% CO<sub>2</sub> przy zawartości 30mM HEPES i 0,5mM NaHCO<sub>3</sub>. Wyniki badań wskazały, że tylko mieszanina 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> gwarantuje odpowiednie warunki perfuzji i reaktywność tkanek na zastosowanie medium ze zwiększoną ilością jonów K<sup>+</sup> (60 mM KCl). W celu optymalizacji warunków perfuzji przetestowałam różne wartości ciśnienia mieszaniny gazów (127,51; 255,02; 315,03 mmHg). Ciśnienie mieszaniny gazów wynoszące 127,51 mmHg, zapewnia optymalne warunki perfuzji w *zestawie 2* wyposażonym w 1 moduł wymiany gazu. W celu utrzymania tych samych warunków perfuzji w *zestawie 3* zaopatrzone w 2 moduły wymiany gazu trzeba było zastosować wyższe ciśnienie – 315,03 mmHg. W zebranych podczas perfuzji frakcjach,

<sup>9</sup> Minuth WW, Denk L, Glashauser A. 2010. A modular culture system for the generation of multiple specialized tissues. *Biomaterials* 31:2945-54.

poziom AVT i IT oznaczano za pomocą HPLC zgodnie z zmodyfikowaną metodą Gozdowskiej (2006)<sup>10</sup>. (Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanej metody perfuzji oraz analizy HPLC znajdują się w trzeciej omawianej publikacji; *Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.3; załącznik 9*)

Uzyskane wyniki potwierdziły założenia przyjęte w trzeciej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.3*). Jako pierwsza zastosowałam technikę inżynierii tkankowej (3D) firmy MINUCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH do perfuzji eksplantów mózgu, kompleksu podwzgórze – przysadka oraz przysadek mózgowych ryb. Opracowałam unikalną procedurę i zdefiniowałam warunki perfuzji. Wprawdzie metoda została opracowana do badań AVT i IT w eksplantach ryb, jednakże po drobnych modyfikacjach może posłużyć do wielu innych zadań.

Wykazałam, że:

- ✓ *Zestaw 1* jest przeznaczony tylko do perfuzji krótkoterminowych,
- ✓ *Zestaw 2*, gdzie medium jest napowietrzane mieszaniną 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> pod ciśnieniem 127,51 mmHg, jest przeznaczony do badań długoterminowych,
- ✓ *Zestaw 3* jest również rekomendowany do badań długoterminowych, ale wymaga napowietrzania mieszaniną 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> pod ciśnieniem 315,03 mmHg,
- ✓ *Zestaw 1* i *2* pozwala na transport tylko jednego rodzaju medium do komory gradientowej, podczas gdy, *zestaw 3* umożliwia dostarczanie dwóch różnych mediów od dołu i od góry komory perfuzyjnej w tym samym czasie.

Moja metoda gradientowej hodowli perfuzyjnej (3D) cieszy się dużym zainteresowaniem. Prof. Minuth<sup>11 12</sup>, twórca tego modułowego systemu perfuzji, w swoich publikacjach zauważył, że wyniki badań, jakie uzyskałam przy zastosowaniu tej metody u ryb są bardzo obiecujące. Schaeck i wsp. w publikacji “Fish as Research Tools: Alternatives to *In Vivo* Experiments”<sup>13</sup> z ALTA (2013) wskazała, że moja metoda perfuzji jest alternatywą dla badań *in vivo* oraz bardzo przydatnym narzędziem badawczym dla neurobiologów. ALTA (Alternatives to Laboratory Animal) jest wydawana przez FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments) w Wielkiej Brytanii. Z kolei, chińska firma KL Bio-Tech (Wuhan) Co., Ltd na swoich stronach internetowych podaje przykład mojej metody przy omawianiu napowietrzania w systemach do perfuzji. (<http://www.kangluobio.com/news/html/?430.html>) (<http://www.kangluobio.com/news2/13/60.html>).

<sup>10</sup> Gozdowska M, Kleszczyńska A, Sokołowska E, Kulczykowska E. 2006. Arginine vasotocin (AVT) and isotocin (IT) in fish brain: diurnal and seasonal variations. *Comp Biochem Physiol B* 143:330–334.

<sup>11</sup> Minuth and Dunk. 2012. Supportive development of functional tissues for biomedical research using the MINUSHEET® perfusion system. *Clinical and Translational Medicine* 1:22  
<http://www.clintransmed.com/content/1/1/22>

<sup>12</sup> Minuth and Dunk. 2015. Bridging the gap between traditional cell cultures and bioreactors applied in regenerative medicine: practical experiences with the MINUSHEET perfusion culture system. *Cytotechnology*, doi:10.1007/s10616-015-9873-x, <http://link.springer.com/article/10.1007/s10616-015-9873-x>

<sup>13</sup> Schaeck M., Van den Broeck W., Hermans K. and Decostere A. 2013. Fish as Research Tools: Alternatives to *In Vivo* Experiments. *ALTA Alternatives to Laboratory Animal* 41.3; 219-229. <http://www.atla.org.uk/fish-as-research-tools-alternatives-to-in-vivo-experiments/>

Tak jak wspominałam powyżej, w badaniach podjętych i opisanych w czwartej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.4*), postawiłam sobie dwa zadania w celu ustalenia mechanizmu działania kortyzolu na uwalnianie AVT i IT u ryb. Po pierwsze, określić która klasa receptorów, glikokortykoidowe (GR) czy mineralokortykoidowe (MR) jest zaangażowana w ten mechanizm. Po drugie, wskazać które szlaki, genomowe czy niegenomowe są zaangażowane w ten mechanizm. Od dawna wiadomo, że kortyzol wydzielany przez część głowową nerki u ryb wykazuje zarówno działanie korykotropowe, jak i mineralokortykotropowe (Wendelaar Bonga, 1997). Udział obydwu klas receptorów kortykoidowych (CR): mineralokortykoidowych i glikokortykoidowych zaobserwowano w odpowiedzi na różnego rodzaju sytuacje stresowe u ryb. U ryb wykryto dwa geny kodujące GR (GR1 i GR2) i jeden gen kodujący MR. Ekspresję genów kodujących GR1, GR2 i MR jak również GR-immunoreaktywność (GR-ir) w drobno i olbrzymiomórkowych neuronach NPO czyli miejscu produkcji AVT, IT i CRF, zaobserwowano u wielu gatunków ryb. Natomiast, w przysadce mózgowej, ekspresję mRNA dla GR1, GR2 i MR jak również GR-ir zlokalizowano w części dalszej (*pars distalis*) i części pośredniej (*pars intermedia*), gdzie mają swoje projekcje włókna AVT-ergiczne. Obie klasy receptorów glikokortykoidowe i mineralokortykoidowe są zaangażowane w genomowy i niegenomowy mechanizm działania kortyzolu u ryb. Kompleks kortyosteroid-receptor wewnątrzkomórkowy wiąże się z elementem odpowiadającym na glikokortykoidy (*ang. glucocorticoid response elements; GRE*) a następnie moduluje proces transkrypcji i syntezy białek (działanie genomowe). Działanie niegenomowe odbywa się za pośrednictwem nieswoistych oddziaływań z błoną komórkową (bez udziału receptorów) (Falkenstein i wsp., 2000)<sup>14</sup>, nieklasycznych receptorów błonowych takich jak receptory związane z białkami G (Tasker i wsp., 2006)<sup>15</sup> i klasycznych form GR znajdujących się w błonie komórkowej (błonowe GR; mGR) (Bartholome i wsp., 2004)<sup>16</sup>. [Niegenomowe działanie sterydów przedstawiono w/g klasyfikacji z Mannheim (Falkenstein i wsp., 2000).]

Badania przedstawione w czwartej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.4*), przeprowadzono na dorosłych osobnikach babki byczej obu płci (n=74). Wszystkie

---

<sup>14</sup> Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones, a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513–556.

<sup>15</sup> Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. 2006. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147:5549–5556.

<sup>16</sup> Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, et al. 2004. Membrane glucocorticoid receptors [mGCR] are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 18:70–80.



doświadczenia i analizy wykonano w Pracowni Fizjologii Organizmów Morskich Zakładu Genetyki i Biotechnologii Morskiej IOPAN w Sopocie. Wybór gatunku do badań był podyktowany jego dostępnością oraz odpowiednim wymiarem umożliwiającym przeprowadzenie badań *in vitro* oraz pobór krwi. W osoczu mierzono stężenie kortyzolu w celu ustalenia odpowiedniej dawki tego sterydu do badań *in vitro*. Oznaczenia przeprowadzono zmodyfikowaną przez autorkę metodą immunoenzymatyczną (EIA) używając zestawu firmy Cayman (Ann Arbor, MI, USA) (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.2*). Do badań, użyłam opisanej w trzeciej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.3*), gradientowej metody hodowli perfuzyjnej (3D) przy zastosowaniu zestawu 2. Eksplanty podwzgórze – przysadka mózgową (H-P) były perfundowane buforem Ringera o składzie ustalonym w poprzednich badaniach opisanych w trzeciej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.3*) z dodatkiem różnych czynników (kortyzolu, Mifepristonu (RU486), Spirolaktonu (C03DA01) and Aktynomycyny D). Mifepriston jest antagonistą GR i wpływa na szereg procesów fizjologicznych i behawioralnych (metabolizm, rozród, stres osmotyczny, wydawanie odgłosów i agresję u ryb). Spirolakton jest antagonistą MR i blokuje wychwyt jonów w procesie osmoregulacji oraz zmniejsza agresję podczas interakcji społecznych u ryb. Aktynomycyna D jest inhibitorem transkrypcji, który wiąże się specyficznym z 2-niciowym DNA, uniemożliwiając jego użycie jako matrycy w syntezie RNA co w konsekwencji prowadzi do hamowania syntezy białka.

Przetestowano 3 dawki kortyzolu ( $1,4 \times 10^{-7}$  M;  $2,8 \times 10^{-7}$  M;  $0,4 \times 10^{-6}$  M). Wybrano je na podstawie wykonanych analiz, poprzednich eksperymentów (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.3*) i danych literaturowych. Natomiast, dawki inhibitorów wybrano na podstawie dostępnej literatury. Jednakże przed przystąpieniem do badań, dawki RU486 ( $1,04 \times 10^{-5}$  M;  $0,3 \times 10^{-6}$  M), C03DA01 ( $1,08 \times 10^{-5}$  M;  $0,36 \times 10^{-6}$  M) i Aktynomycyny D ( $1 \times 10^{-6}$  M;  $1 \times 10^{-7}$  M) były również testowane. Do eksperymentów wybrano kortyzol w dawce  $0,4 \times 10^{-6}$  M w kombinacji z RU486 ( $0,3 \times 10^{-6}$  M) lub C03DA01 ( $0,36 \times 10^{-6}$  M) lub Aktynomycyny D ( $1 \times 10^{-7}$  M). W zebranych podczas perfuzji frakcjach oznaczano poziom AVT i IT za pomocą HPLC z detekcją fluorescencji, zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Gozdowskiej (2006). (*Szczegółowe informacje dotyczące metody perfuzji oraz analizy HPLC znajdują się w czwartej omawianej publikacji; Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.4; załącznik 9*)

W czwartej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.4*), przedstawiłam po raz pierwszy prawdopodobny mechanizm działania kortyzolu na uwalnianie AVT i IT z kompleksu H-P u babki byczej. Zaobserwowałam, że działanie kortyzolu na uwalnianie AVT z eksplantów H-P jest zależne od dawki, podobnie jak to wykazałam u dorady w pierwszej z omawianych



publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1*). U szczurów zaobserwowano zależne od dawki działanie kortyzolu na uwalnianie AVT z fragmentów podwzgórza.

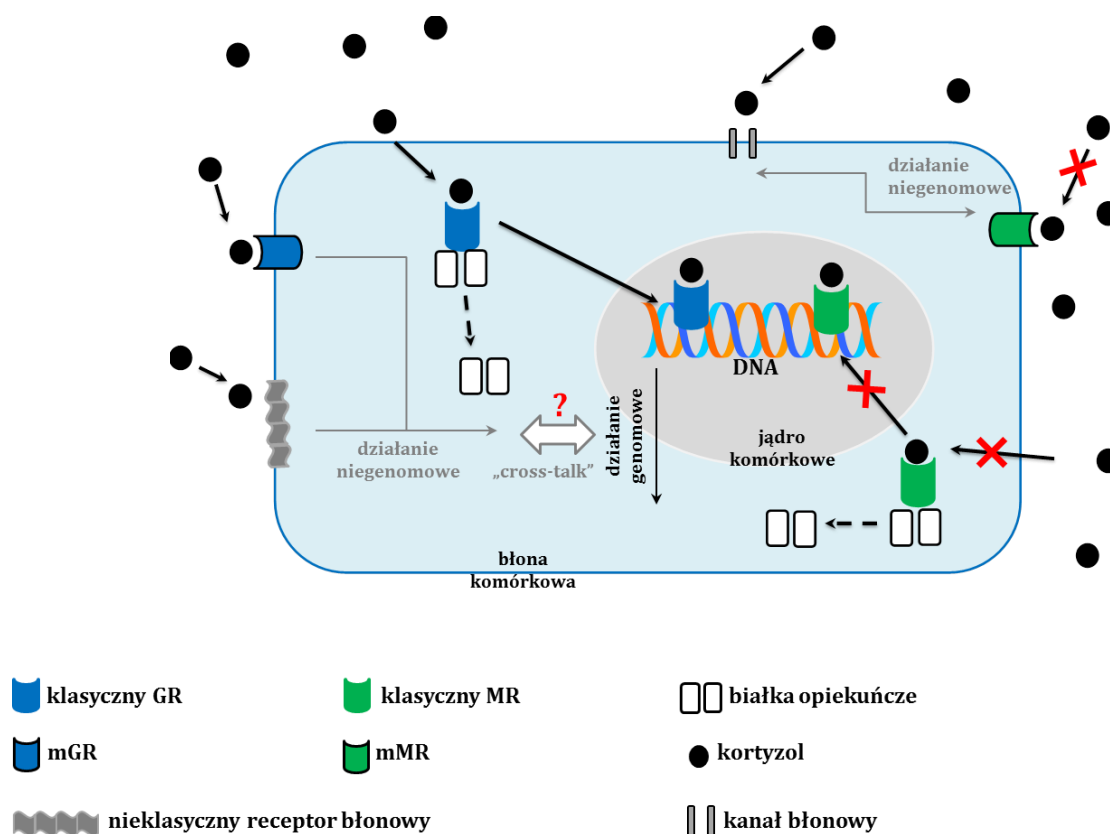
Wyniki moich badań wskazują, że stymulujące działanie kortyzolu na AVT odbywa się prawdopodobnie poprzez GR. Wiadomo też, że ekspresja mRNA dla GR1 i GR2 oraz GR-ir występuje w NPO, gdzie produkowane są AVT i IT oraz w przysadce, gdzie włókna AVT-ergiczne dają swoje projekcje. U ryb sugerowano, że kortyzol wydzielany w odpowiedzi na mały lub łagodny stres wiąże się z GR2 podczas gdy, w odpowiedzi na ekstremalnie duży stres wiąże się z GR1 i GR2. Prawdopodobnie obydwie izoformy GR są zaangażowane w działanie kortyzolu na uwalnianie AVT z kompleksu H-P. Jednakże, dwufazowa odpowiedź ze strony AVT może odzwierciedlać wstępne uwalnianie dojrzałej formy AVT magazynowanej w ziarnistościach wydzielniczych i następujące po nim uwalnianie nowo-dojrzewających cząsteczek po ich oddysocjowaniu od niekowalencyjnych kompleksów. Dwufazowy efekt działania kortyzolu na uwalnianie czynników zapalnych takich jak, czynnik martwicy nowotworu-alfa, interleukina-6, białka ostrej fazy i osoczowe inhibitory migracji makrofagów zaobserwowano u ryb jak również u innych kręgowców. Wyniki przedstawione w czwartej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.4*) wskazują, że kortyzol stymuluje uwalnianie AVT poprzez GR z wykorzystaniem obu szlaków genomowego i niegenomowego. Antagonista receptorów glikortykoidowych RU486 jak również inhibitor transkrypcji Aktynomycyna D blokują dwufazową odpowiedź AVT na kortyzol. U ryżanki indyjskiej (*Oryzias dancena*), RU468 blokuje aktywność transkrypcyjną obu isoform GR w odpowiedzi na kortyzol. Genomowe działanie poprzez GR sugerowano przy zastosowaniu kortyzolu w badaniach *in vitro* w stresie immunologicznym i w badaniach *in vivo* przy zakłócaniu spokoju u ryb. Ponadto, wykazano genomowe działanie kortyzolu poprzez GR (*in vivo*) na glukoneogenezę i aktywność enzymów metabolicznych u niektórych gatunków ryb. RU468 blokuje także szybkie niegenomowe działanie kortyzolu w którym pośredniczą receptory błonowe u ryb. Prawdopodobnie, mGR są zaangażowane w pierwszą fazę dwufazowej odpowiedzi AVT na kortyzol u babki byczej. Oczywiście, kortyzol może wykazywać niegenomowe działanie także poprzez specyficzne receptory błonowe takie jak, receptory związane z białkami G lub bez udziału receptorów przez oddziaływanie na regulację błonowych kanałów jonowych co udokumentowano u ssaków i ryb. Postulowano, że mechanizm działania kortykosteroidów może integrować szlaki genomowe i niegenomowe u wyższych kręgowców i ryb. Przykładowo u gryzoni, współdziałanie mechanizmu genomowego i niegenomowego zaobserwowano w neuronach ciała migdałowatego, hipokampu i kory mózgowej w odpowiedzi na stres i podawanie kortykosteronu.

Wyniki prezentowanych badań wykazują, że sekrecja IT wywołana przez kortyzol pojawia się w ciągu 20 minut i trwa przez następne 100 minut ale nie wykazuje dwufazowego charakteru. U tilapii (*Oreochromis mossambicus*), niegenomowe stymulujące działanie kortyzolu *in vivo* na aktywność skrzelowej  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Ca}^{2+}$  ATPazy pojawiało się po 30 minutach i trwało przez 120 minut. Podobne obserwacje dotyczące szybkiego i długotrwałego działania kortykosteroidów *in vitro* na pobudliwość różnych obszarów mózgu odnotowano u gryzoni. U babki byczej, kortyzol wpływa na uwalnianie IT poprzez GR, wykorzystując prawdopodobnie szlak niegenomowy bez aktywacji transkrypcji. Zaobserwowałam bowiem, że działanie kortyzolu hamowane jest przez RU468 a nie przez Aktynomycynę D. W przeciwieństwie do wyników uzyskany u babki byczej, badania *in vitro* na komórkach przysadki dorady prezentowane w pierwszej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.1*) wykazały, że kortyzol hamuje uwalnianie IT z zakończeń nerwowych. Babki bycze użyte w doświadczeniu były poza sezonem rozrodczym podczas gdy dorady były tuż przed rozpoczęciem sezonu rozrodczego. Wynika z tego, że odpowiedź IT na działanie kortyzolu jest uzależniona od gatunku lub/i statusu fizjologicznego ryb.

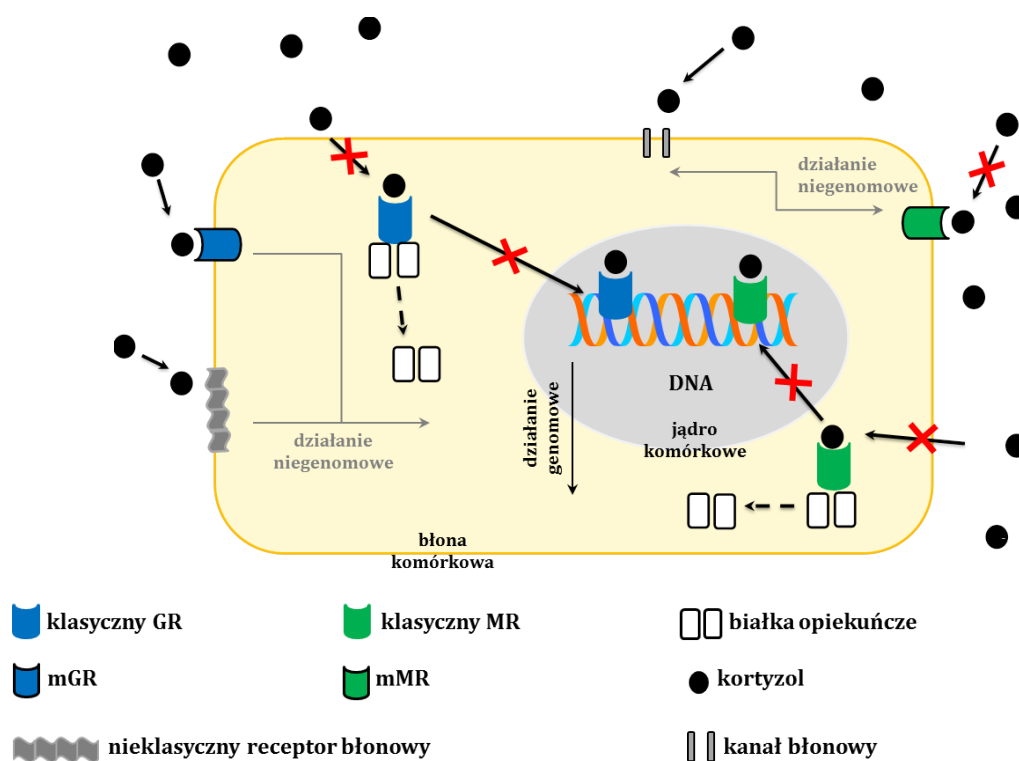
Wiadomo, że w działaniu kortyzolu u ryb mogą pośredniczyć nie tylko GR ale i MR (Wendelaar Bonga, 1997). Jednakże moje badania sugerują, że MR nie pośredniczą w działaniu kortyzolu na uwalnianie AVT i IT z kompleksu H-P u babki byczej. Omawiane wyniki ukazują, że antagonistą MR, C03DA01 nie hamuje uwalniania AVT i IT wywołanego przez kortyzol.

Uzyskane wyniki potwierdziły założenia przyjęte w czwartej publikacji (*Publikacje wg Autoreferatu: 4.B.4*). Jako pierwsza przedstawiłam prawdopodobny mechanizm działania kortyzolu na uwalnianie AVT i IT z kompleksu podwzgórze-przysadka u babki byczej. Wykazałam że:

- ✓ Kortyzol wpływa na sekrecję AVT i IT z kompleksu podwzgórze – przysadka mózgowa u babki byczej,
- ✓ Kortyzol pobudza uwalnianie obu nonapeptydów, jednakże pobudzenie uwalniania AVT jest zależne od dawki zastosowanego sterydu,
- ✓ Odpowiedź AVT na działanie kortyzolu jest dwufazowa, podczas gdy odpowiedź IT jest jednofazowa,
- ✓ W regulację uwalniania AVT i IT z kompleksu podwzgórze – przysadka mózgowa u babki byczej są GR bez udziału MR,
- ✓ Oba szlaki genomowy i niegenomowy pośredniczą w działaniu kortyzolu na AVT,
- ✓ W przypadku IT tylko niegenomowy szlak pośredniczy w działaniu kortyzolu.



Rys 2. Mechanizm działania kortyzolu na uwalnianie wazotocyny argininowej u babki byczej.



Rys 3. Mechanizm działania kortyzolu na uwalnianie izotocyny u babki byczej.

## Podsumowanie

Celem przedstawionych badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego było zdobycie nowej wiedzy na temat udziału wazotocyny argininowej (AVT) i izotocyny (IT) w regulacji odpowiedzi na stres u ryb. Podstawą badań było założenie, że oba nonapeptydy mogą stanowić ważny element osi stresu u ryb. Jak dotąd nikt nie podjął się wyjaśnienia funkcjonalnego związku istniejącego pomiędzy kortyzolem a wymienionymi nonapeptydami u ryb na drodze badań eksperymentalnych z użyciem technik *in vitro* hodowli komórkowej i tkankowej hodowli perfuzyjnej. W badaniach zastosowano unikalną technikę – gradientowej hodowli perfuzyjnej (3D) opracowaną przez autorkę na potrzeby tych doświadczeń. Jako pierwsza zastosowałam technikę inżynierii tkankowej firmy MINUCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH do perfuzji eksplantów mózgu, kompleksu podwzgórze – przysadka mózgowa oraz przysadek mózgowych ryb. Chociaż metoda została opracowana do badań AVT i IT w eksplantach ryb, może posłużyć do wielu innych zadań. Badania potwierdziły, że AVT i IT są ważnymi elementami odpowiedzi na stres u ryb. Uzyskane wyniki wskazały na niezależne mechanizmy regulacji uwalniania obu neuropeptydów. Kortyzol wpływał na sekrecję AVT i IT zarówno u dorady (*Sparus aurata*) jak i u babki byczej (*Neogobius melanostomus*). Jednakże jego działanie było uzależnione od gatunku lub/i statusu fizjologicznego ryb. Dorada jest bardzo interesującym gatunkiem do tego typu badań. U dorady w przeciwieństwie do innych ryb kostnoszkieletowych, z powodu braku anatomicznych połączeń, CRF nie jest czynnikiem uwalniającym dla ACTH. Wykazałam, że urotensyna I w zastępstwie CRF bierze udział w regulacji osi podwzgórze – przysadka mózgowa – komórki międzynerkowe u dorady. Z kolei, urotensyna II razem z AVT i IT może kontrolować odpowiedź na różne zasolenia u dorady. Wyniki te potwierdzają fakt, że urotensyny razem z AVT i IT są zaangażowane w regulację odpowiedzi na stres u ryb. Jako pierwsza przedstawiłam prawdopodobny mechanizm działania kortyzolu na uwalnianie AVT i IT z kompleksu podwzgórze – przysadka mózgowa u babki byczej. Wykazałam że, w regulację uwalniania AVT i IT zaangażowane są receptory glikokortykoidowe bez udziału receptorów mineralokortykoidowych. W przypadku AVT oba szlaki genomowy i niegenomowy pośredniczą w działaniu kortyzolu. Podczas gdy, w przypadku IT tylko niegenomowy szlak pośredniczy w tym działaniu. Ponadto, AVT i IT wydają się być dobrymi kandydatami na nowe wskaźniki dobrostanu u ryb. Przedstawione badania są w pełni innowacyjne i będą kontynuowane w przyszłości.

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

### 5.1. GŁÓWNE KIERUNKI BADAŃ

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze, **które nie są podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego**, można podzielić na 4 główne kierunki badań:

- I. Rola argininy wazotocynowej, izotocyny i melatoniny w adaptacji ryb do zmian środowiskowych,
- II. Melatonina jako hormon o wielu funkcjach,
- III. Rola neuropeptydów w biologii rozrodu ryb i wyższych kręgowców,
- IV. Apoptoza w różnych procesach fizjologicznych i patologicznych u ludzi i zwierząt.

### 5.2. WAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA W ZAKRESIE PROWADZONYCH KIERUNKÓW BADAŃ

- I. Rola argininy wazotocynowej, izotocyny i melatoniny w adaptacji ryb do zmian środowiskowych
  - Przedstawiono pierwsze dowody na udział melatoniny w osmoregulacji u ryb. Poziom melatoniny w osoczu u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), storni (*Platichthys flesus*) i dorady (*Sparus aurata*) wykazywał zmiany dobowe. Podczas gdy poziom melatoniny w tkankach związanych z osmoregulacją (skrzela, jelita i nerki) nie zmieniał się w 24 godzinny cykl co sugeruje, że poziom tego hormonu w tkankach jest regulowany niezależnie od jego stężenia w osoczu. Wykazano obecność receptorowych miejsc wiążących 2-[<sup>125</sup>I]Iodomelatoninę we wszystkich badanych tkankach. Ponadto, zaobserwowano, że wiązanie Iodomelatoniny nie zmienia się w ciągu dnia co sugeruje, że działanie melatoniny w tkankach związanych z osmoregulacją jest nie zależne od fotoperiodu. Natomiast, podawanie analogu GTP znacząco obniżyło poziom B<sub>max</sub> wykazując, że receptorowe miejsca wiążące 2-[<sup>125</sup>I]Iodomelatoninę w badanych tkankach są związane z białkami G. Wykazano, że jelito cienkie jest miejscem syntezy melatoniny i/lub jej aktywnej akumulacji z krążenia. Wyniki wskazują na możliwość wchłaniania i wydalania melatoniny w niezmienionej formie w skrzelach i nerkach u niektórych gatunków ryb. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.10; 5.3.11*)
  - Odkryto, że zasolenie wpływa na zawartość melatoniny w osoczu i tkankach obwodowych (jelito, skrzela) oraz na gęstość występowania receptorów

melatoninowych w mózgu i siatkówce u okonia morskiego (*Dicentrarchus labrax*). Badania te po raz pierwszy wykazały różnice w gęstości miejsc wiążących melatoninę w różnych obszarach mózgu ryb poddanych różnemu zasoleniu. Poziom osoczowej melatoniny przy zastosowaniu fazy ciemnej był zróżnicowany w zależności od zasolenia, najniższa wartość występowała w wodach słonych (36‰) a najwyższa w wodach słodkich (0‰). Natomiast, w skrzelach i jelicie, najwyższy poziom melatoniny odnotowano w wodach słonych (36‰). Gęstość miejsc wiążących melatoninę była również zróżnicowana w zależności od zasolenia. Przy niskim zasoleniu, najwyższa gęstość miejsc wiążących melatoninę występowała w pokrywie wzrokowej, mózdzku i podwzgórze. Podobną gęstość miejsc wiążących melatoninę wykazywano w siatkówce przy czym najwyższe wartości obserwowano w wodach słodkich. Stwierdzono więc, że zasolenie może wpływać na produkcję melatoniny i może modulować gęstość miejsc wiążących melatoninę. Ponadto wykazano, że u okonia morskiego, hormon ten może odgrywać rolę w synchronizacji cyklu rocznego, włączając migracją pomiędzy wodami o różnym zasoleniu do miejsc rozrodu i tarła. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.5; 5.4.2*).

- Oceniono, wpływ podawania egzogennej kortyzolu w postaci wolno-uwalniających się implantów na poziom melatoniny w osoczu niedojrzałych płciowo dorad (*Sparus aurata*). Wyniki sugerują, że podawanie kortyzolu naśladuje chroniczny stres (z typowym wysokim poziomem kortyzolu) podobny do opisanego dla tego gatunku podczas pierwszych 3 dni w warunkach dużego zagęszczenia. Wykazano, że melatonina może być zaangażowana w przewlekły stres u dorady. Poziom melatoniny w osoczu był podwyższony u ryb którym podawano kortyzol. Podobne działanie wykazywał przewlekły socjalny stres któremu poddano pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Podczas gdy ostry stres niepokojenia u tego gatunku spowodował obniżenie poziomu melatoniny w osoczu. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że odpowiedź melatoniny na czynniki stresowe jest zależna od rodzaju stresu i gatunku ryb. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.4.1*).
- Podjęto pierwsze badania nad rolą wazotocyny argininowej (AVT), izotocyny (IT) i melatoniny w procesie aklimatyzacji niedojrzałych płciowo dorad (*Sparus aurata*) do różnego zasolenia (woda morska 38‰; woda o niskim zasoleniu 5‰; woda o wysokim zasoleniu 55‰). Zaobserwowano, że AVT w osoczu wzrasta wraz ze



wzrostem zasolenia. Stężenie IT w przysadce u ryb aklimatyzowanych do wysokiego zasolenia było wyższe niż w grupie o niskim zasoleniu. U dorady, system AVT/IT wydaje się być zaangażowany w mechanizm długoterminowej aklimatyzacji do różnego zasolenia. Sugerowano odrębną rolę i mechanizm kontroli dla obu neuropeptydów. Stężenie melatoniny w osoczu dorad aklimatyzowanych do niskiego zasolenia było wyższe niż w pozostałych grupach. Otrzymane wyniki potwierdzają, że poziom obu neuropeptydów i melatoniny zmieniał się w odpowiedzi na zmianę zasolenia co wskazuje na rolę tych hormonów w osmoregulacji. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.9; 5.4.20*).

- Wskazano na rolę AVT, IT i melatoniny w odpowiedzi na stres związany z dużym zagęszczeniem u dorady. W tym doświadczeniu zbadano wpływ dwóch czynników stresowych, dużego zagęszczenia i ograniczenia pokarmu. Mimo, że ograniczenie pokarmu nie wpłynęło na poziom AVT i IT w osoczu to mogło mieć wpływ na syntezę obu neuropeptydów w podwzgórzu. Równoczesna odpowiedź ze strony obu neuropeptydów na ograniczenie pokarmu i wysokie zagęszczenie była związana z wspólnym mechanizmem regulacji. Ponadto, wykazano że synteza melatoniny w układzie pokarmowym prawdopodobnie zależy od obecności pożywienia w miejscu syntezy hormonu. Sugerowano, że AVT, IT i melatoninę można traktować jako wskaźniki kondycji i dobrostanu ryb. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.6; 5.3.19; 5.3.20*).
- Zaobserwowano najwyższe stężenie AVT i kortyzolu u samców babki byczej (*Neogobius melanostomus*) nie wykazujących agresji, poddanych stresowi zagęszczeniowemu. Z drugiej strony, poziom IT wzrastał wraz z zagęszczeniem a samce wykazywały agresję co zwykle jest oznaką gotowości do rozrodu. Zauważono, że poziom AVT i IT w mózgu i kortyzolu w osoczu wraz z obserwacjami zachowań mogą być stosowane jako specyficzne gatunkowe wskaźniki dobrego samopoczucia samców tego gatunku. Dlatego też AVT i IT wydają się być dobrymi wskaźnikami dobrostanu ryb. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.2; 5.3.20*).

## II. Melatonina jako hormon o wielu funkcjach

- Zaobserwowano wysoki poziom melatoniny w pierwszych 10 dniach rozwoju larwalnego dorady (*Sparus aurata*) co sugeruje że, melatonina jest jednym z



czynników kontrolujących rozwój osobniczy we wczesnym etapie rozwoju larwalnego tego gatunku. Podwyższone stężenie tego hormonu w okresie wczesnej ontogenezy, wydaje się mieć związek z działaniem ochronnym przed wolnymi rodnikami, które powstają licznie w wyniku intensywnych procesów metabolicznych. Działanie melatoniny jako „dawcy czasu” rozwija się dopiero później. Podczas przeobrażenia larwy w postać młodocianą (pomiędzy 50 a 70 dniem od wylęgu) zaobserwowano wzrost stężenia tyroksyny przy jednoczesnym spadku stężenia melatoniny, co sugeruje odwrotną zależność między tyroksyną a melatoniną. Istotnym poza szyszynkowym i poza siatkówkowym źródłem melatoniny w organizmie larw wydaje się być przewód pokarmowy, który produkuje hormon niezależnie od pory dnia. Zaobserwowano, że rytm syntezy melatoniny u dorady do 67 dnia ma charakter egzogeny, podczas gdy u form młodocianych (ok. 40 g) posiada już wszystkie cechy rytmu endogenego, co prawdopodobnie ma związek z rozwojem ośrodkowego układu nerwowego. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.4*)

- Przedstawiono nowe dane dotyczące związku pomiędzy produkcją melatoniny a metabolizmem wapnia u form młodocianych dorady podczas pośredniego i bezpośredniego ograniczenia wapnia. Wykazano, że ograniczenie wapnia w wodzie, spowodowało wzrost produkcji melatoniny. Natomiast pośrednie (brak witaminy D w diecie) lub bezpośrednie wywołane dietą ograniczenie wapnia spowodowało spadek produkcji melatoniny. Ten przeciwny efekt był zniesiony przez ograniczenie wapnia zarówno w diecie jak i w wodzie. Dodatnia korelacja pomiędzy poziomem melatoniny i jonów wapnia w osoczu wskazuje, że synteza melatoniny odbywa się pod wpływem jonów wapnia z osocza. Hiperkalcemiczne czynniki takie jak peptyd PTH-podobny (PTHrP) i kalcytriol wydają się być negatywnie skorelowane z melatoniną co wskazuje na jej zaangażowanie w modulowanie endokrynnej odpowiedzi na hypokalcemię. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.7*)
- Badania przeprowadzone na dwóch wolno żyjących populacjach ciernika (*Gasterosteus aculeatus*) z Wisły (zasolenie 5–6‰) i z potoku oliwskiego (woda słodka) wykazały, że stężenie melatoniny w mózgu zmienia się w ciągu roku. Niezwykle wysoki poziom melatoniny zaobserwowany wczesną wiosną (marzec) i jesienią (październik) wydaje się wyznaczać ramy czasowe dla tarła u cierników. Sezonowe zmiany w produkcji melatominy w odniesieniu do stadiów rozwoju gonad

[indeksy: gonadosomatyczny (GSI), nefrosomatyczny (NSI) i hepatosomatyczny (HSI)] sugerują potencjalny hamujący efekt tego hormonu na rozród ciernika przy skracającym się fotoperiodzie i stymulujący efekt przy wydłużającym się fotoperiodzie. Wyniki wskazują na melatoninę jako element wewnętrzny kalendarza, który prawdopodobnie kontroluje sezonowy rozród u tego gatunku. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.12*)

- Wykazano, że stężenie melatoniny w skórze dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua*) o unikalnej złotej pigmentacji (z Svalbard Bank) nie było skorelowane z jego nietypowym ubarwieniem. Wysokie stężenie melatoniny w części grzbietowej „złotego” dorszem oraz dorsza wybrwionego standardowo, wskazywało na antyoksydacyjną rolę melatoniny jako zmiatacza wolnych rodników i czynnika chroniącego skórę. Poza tym, ekstremalnie wysokie stężenie melatoniny w skórze obu gatunków może świadczyć o lokalnej syntezie tego hormonu. Brak różnic w stężeniu melatoniny pomiędzy „złotym” dorszem a dorszem wybrwionym standardowo wskazywał, że nietypowa pigmentacja może być spowodowana innymi czynnikami. Analiza DNA wykluczyła możliwość hybrydyzacji międzygatunkowej z płamiakiem (*Melanogrammus aeglefinus*). Analiza trzech mitochondrialnych markerów (D-loop, cytochrom *b* i dehydrogenaza *NADH*) nie wykazała różnic pomiędzy badanymi osobnikami. Prawdopodobnie „złoty” dorsz posiada bardzo rzadki genotyp, co nie wyklucza jednak hormonalnego uwarunkowania tego ubarwienia. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.3*)

Zagadnienia związane z rolą melatoniny w skórze ryb są obecnie realizowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki „*Hormony stresu w skórze ryb*”, numer projektu: 2012/07/B/NZ9/02144. Jako wykonawca w tym grantcie, opracowuję modele 3D hodowli eksplantów skóry z wytrząsaniem oraz hodowli perfuzyjnej eksplantów skóry (*Wg Wykazu Osiągnięć: II.G.2*). Ponadto, tematyka związana z rolą melatoniny w skórze ryb była realizowana w ramach pracy magisterskiej Iwony Hilla “*Sezonowe zmiany poziomu melatoniny w tkance mięśniowej i skórze babki byczej*”, której byłam opiekunem naukowym. (*Wg Wykazu Osiągnięć: II.I.1*).

- Wybrane markery endokrynne takie jak melatonina i tyroksyna zastosowano w celu określenia kondycji piskląt bociana białego (*Ciconia ciconia*) żyjącego w różnych środowiskach; małych wioskach w otoczeniu lasów i pól uprawnych, w pobliżu miasta oraz w pobliżu huty miedzi. Poziom tyroksyny był istotnie niższy w osoczu piskląt narażonych na zanieczyszczenia pochodzące z huty miedzi. Podczas gdy, melatonina znana jako „zmiatacz” wolnych rodników, wzrosła właśnie w osoczu piskląt z obszaru

huty miedzi. Badania wykazały, że zmiana poziomu tyroksyny i melatoniny może być użytecznym markerem ekspozycji piskląt bociana białego na różnego rodzaju substancje toksyczne w badaniach terenowych. Ponadto, wykazano, że melatonina jest cząsteczką pierwszej linii obrony w procesach ochronnych organizmu. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.8; 5.3.21*).

Podjęta tematyka była realizowana również w ramach pracy magisterskiej *Michała Kuriaty*, której byłam opiekunem naukowym. (*Wg Wykazu Osiągnięć: II.I.2*). Ponadto tematyka związana z wyżej wymienionymi endokrynnymi markerami zanieczyszczeń jest realizowana w ramach pracy doktorskiej mgr *Tatiany Guellard* której jestem promotorem pomocniczym. (*Wg Wykazu Osiągnięć: II.J.2*).

### III. Rola neuropeptydów w biologii rozrodu ryb i wyższych kręgowców:

#### 1. Rola neuropeptydów w biologii rozrodu ryb

- Wykazano, że arginina wazotocynowa (AVT) i hormony sterydowe (17 $\beta$ -estradiol i 11-ketotestosteron) są zaangażowane w proces maskulinizacji u samic molinezji ostroustej odmiany Black Molly (*Poecilia sphenops*). Ponadto stwierdzono, że zachowanie seksualne względem tej samej płci jakie wykazują niedoświadczone płciowo osobniki męskie są związane z poziomem AVT i izotocyny (IT) w mózgu a nie z poziomem hormonów sterydowych w gonadach. Wykazano, że pojawienie się osobników zmaskulinizowanych wykazujących typowo męskie zachowanie pozwala samicom na zdobycie seksualnego doświadczenia w sytuacjach braku naturalnych partnerów seksualnych w grupie. Zaobserwowano, że akty kopulacji w obrębie tej samej płci pojawiają się zarówno w grupach niedoświadczonych płciowo osobników męskich jak i doświadczonych samców, przy czym w tej ostatniej grupie zanotowano zachowania agresywne. Zauważono, że samce mają przejściowe predyspozycje do tej samej płci, po wprowadzeniu ich do grupy mieszanej zarówno doświadczone jaki i niedoświadczone seksualnie samce kopulują wyłącznie z samicami. Po raz pierwszy wykazano, że u niższych kręgowców AVT i IT są zaangażowane w regulację aktów seksualnych, które nie są bezpośrednio związane z prokreacją i sukcesem reprodukcyjnym. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.1*).

Podjęta tematyka była realizowana w ramach pracy doktorskiej mgr *Marty Nietrzeba* której byłam opiekunem naukowym (*Wg Wykazu Osiągnięć: II.J.1*). Zagadnienia związane z rolą AVT i IT w rozrodzie ryb są obecnie realizowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (numer projektu: 2012/07/B/NZ9/02144). Jestem kierownikiem tego grantu (*Wg Wykazu Osiągnięć: II.G.1*).

#### 2. Rola neuropeptydów w biologii rozrodu wyższych kręgowców

- Odkryto, że najwyższe stężenie  $\beta$ -endorfiny ( $\beta$ -END), neuropeptydu Y (NPY), galaniny (GAL), wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP) oraz GnRH występuje w szypule wyniosłości pośrodkowej (SME) w 5, 10, 15 i 20 dniu cyklu płciowego u świni. Wykazano, że zmiany w stężeniach badanych neuropeptydów w różnych obszarach podwzgórza świni [pole przedwzrokowe (POA), przyśrodkowo-podstawna część podwzgórza (MBH) i SME] są związane z fazą cyklu płciowego i że GAL może być zaangażowana w kontrolę przedowulacyjnego wyrzutu LH u świń. Podczas indukowanego estradiolem wyrzutu LH zaobserwowano obecność GnRH-, NPY-, VIP- i  $\beta$ -END-immunoreaktywnych (-ir) neuronów w różnych obszarach przodomózgowia świni. Dużą ilość GnRH-ir neuronów i włókien odnotowano w POA i wyniosłości pośrodkowej (ME) a zauważalne różnice znaleziono w jądrze łukowatym (ARC) i jądrze brzuszno-przyśrodkowym (NVM) po 24 godzinach od podania benzoesu estradiolu. Z kolei, 40 i 72 godziny od momentu podania benzoesu estradiolu ilość GnRH-ir neuronów i włókien była wyższa w ARC i NVM przy zupełnym braku zmian w POA i ME. Natomiast, koncentracja prawie wszystkich neuropeptydów (z wyjątkiem VIP w SME) była podobna w przodomózgowiu u świni. Wykryto, że poziom wszystkich badanych neuropeptydów był podobny w POA i MBH a zawartość NPY, Gal i  $\beta$ -END była bardzo wysoka w SME podczas indukowanego estradiolem wyrzutu LH u świni. Dynamiczne zmiany zawartości NPY, GAL, VIP i  $\beta$ -END w podwzgórzu świni podczas indukowanego estradiolem negatywnego i pozytywnego sprzężenia zwrotnego wskazuje na ich potencjalną rolę w modulowaniu uwalniania GnRH z wyniosłości pośrodkowej. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.13; 5.3.14*).

Badania były realizowane w ramach polsko-amerykańskiego grantu finansowanego z Fundacji M. Skłodowskiej-Curie (numer grantu: MR/USDA-96-237) (byłam wykonawcą w tym grantcie) oraz ramach badań własnych finansowanych z Komitetu Badań Naukowych (numer tematu: 2030 205) (*Wg Wykazu Osiągnięć: II.G.9; II.G.10*).

- Wykazano, że nalokson (NAL; antagoista  $\mu$  receptorów opiodowych) stymulował uwalnianie GnRH z eksplantów szypuły wyniosłości pośrodkowej (SME) *in vitro* u loszek w fazie pecherzykowej (10-11 dzień) i lutealnej (19 dzień) cyklu płciowego oraz u loszek owarietomizowanych (OVX) otrzymujących hormony steroidowe [benzoesan estradiolu (EB) i progesteron ( $P_4$ )]. Odpowiedź GnRH na podawanie *in vitro* naloksonu była najwyższa u OVX loszek przyjmujących EB. Zaobserwowano, że morfina podawana w niskiej dawce ( $2 \times 10^{-6}M$ ) znacznie podwyższała spontaniczne

uwalnianie GnRH u OVX loszek otrzymujących P<sub>4</sub> lub *vehiculum*, podczas gdy podawanie morfiny w wysokiej dawce (10<sup>-3</sup>M) hamowało uwalnianie GnRH u OVX loszek otrzymujących P<sub>4</sub>. Stwierdzono, że u świń, zakończenia nerwowe uwalniające GnRH w obrębie SME są do pewnego stopnia wrażliwe na sygnały pochodzące z systemu opioidowego w sposób zależny lub niezależny od hormonów steroidowych (mogą wzmocnić lub modulować działanie opioidów na uwalnianie GnRH). Połączenie układu opioidowego z GnRH-ergicznym w obrębie SME jest bardzo podatne (od hamowania do stymulacji) na modulujące działanie hormonów steroidowych. Zaobserwowano, że interakcje w obrębie SME wydają się być jedynie częścią złożonego mechanizmu za pomocą którego układ opioidowy wpływa na produkcję i uwalnianie GnRH. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.16*).

- Zaobserwowano, że stopień zaangażowania endogennych opioidów (EOP) w regulację sekrecji LH u loszek zmienia się w zależności od okresu aktywności rozrodczej. Wydaje się, że jest to również uzależnione od dojrzałości mózgu. I tak, system opioidowy nie bierze udziału w hamowaniu sekrecji LH u niedojrzałych płciowo loszek. Wykazano, że u dojrzałych loszek EOP ewidentnie wpływa na układ wydzielniczy GnRH/LH w fazie lutealnej podczas gdy rola EOP w fazie folikularnej pozostaje niejasna. Podawanie naloksonu i analogu met-enkefalin (FK 33-824) w pojedynczej dawce nie wpłynęło na sekrecję LH we wczesnej fazie pęcherzykowej. Jednakże ciągle podawanie FK 33-824 obniżyło sekrecję LH w czasie infuzji 19 dnia cyklu. Wykryto, że EOP mogą redukować sekrecję LH podczas późnej fazy folikularnej i wpływają na indukowany estrogenem wyrzut LH u owarietomizowanych loszek. Ponadto, znaczne zaangażowanie EOP w regulację wydzielania LH w pierwszej połowie ciąży, zmniejsza się lub ulega zmniejszeniu podczas późniejszych etapów ciąży. Wykazano również, że hamowanie LH przez EOP obserwowane we wczesnym okresie po porodzie powoli słabnie wraz z rozwojem laktacji i zanika po odstawieniu prosiąt. Ponadto, badania *in vitro* wskazały, że wpływ EOP na wydzielanie LH odbywa się także na poziomie szczyły wyniosłości pośrodkowej (SME). (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.15; 5.3.18*).

#### IV. Apoptoza w różnych procesach fizjologicznych i patologicznych u ludzi i zwierząt.

##### 1. Apoptoza w procesach fizjologicznych u zwierząt.

- Wykazano, że śmierć komórek warstwy ziarnistej podczas atrezji pęcherzyka jajnikowego następuje w wyniku apoptozy. Analiza DNA pochodzącego z warstw granulozy i osłonki świńskiego pęcherzyka jajnikowego wykazała, że wewnątrz jądrowa fragmentacja DNA pojawiła się tylko w atretycznych komórkach granulozy. Ponadto zdrowe komórki osłonki i granulozy we wszystkich stadiach rozwoju pęcherzyków nie wykazały apoptozy. Wydaje się, że mechanizm apoptozy może być związany z atrezią pęcherzyków świńskiego jajnika i jej endokrynną, para- i/lub autokrynną regulacją. Te same czynniki, które są odpowiedzialne za stymulację apoptozy w komórkach warstwy ziarnistej pęcherzyka mogą również wywoływać atrezię. Wykazano, że śmierć ściany świńskiego pęcherzyka jajnikowego może być spowodowana różnymi procesami i w przeciwieństwie do apoptozy komórek granulozy może nie dotyczyć lub tylko częściowo dotyczyć warstwy osłonki wewnętrznej. (*Publikacje wg Autoreferatu: 5.3.17*).

## 2. Apoptoza w różnych procesach fizjologicznych i patologicznych u ludzi.

- Oceniono korelacje pomiędzy wychwytem Tetrofosminy a markerami oporności na leki takimi jak glikoproteina P (Pgp), p53, apoptoza, topoizomeraza II alfa (Topo II alfa) i czynnikami prognostycznymi takimi jak wiek, wielkość guza, stopień rozwoju guza, receptory estradiolowe (ER) oraz receptory progesteronowe (PR). Scyntygrafia z użyciem Tc-99m Tetrofosminy przeprowadzono u pacjentek w wieku 38-69 lat z rozpoznanymi złośliwymi i niezłośliwymi zmianami piersi. W grupie pacjentek ze złośliwymi zmianami wykazano istotną korelację pomiędzy stosunkiem zliczeń guz/tło (TBR) a Pgp. Ponadto, ekspresja Topo II alfa była skorelowana z niskim poziomem Pgp. Wysoki indeks apoptotyczny przy niskim TBR odnotowano w próbach PR-pozytywnych, wykazujących słabe barwienie w kierunku Pgp. Korelacje te nie były statystycznie istotne co wskazuje na użycie większej liczby pacjentek w celu weryfikacji wyników. Wszystkie przypadki zmian łagodnych charakteryzowały się brakiem wybarwienia w kierunku p53, apoptozy, Topo II alfa oraz powierzchniowym barwieniem dla Pgp w komórkach nabłonka. Sugerowano, że korelacje pomiędzy badanymi czynnikami mogą być związane z wychwytem Tc-99m Tetrofosminy tylko w przypadku złośliwych zmian nowotworowych sutka. Wstępne wyniki badań sugerowały, że wychwyty Tc-99m Tetrofosminy w przeciwieństwie do sestaMIBI nie był zredukowany w guzach Pgp-immunopozytywnych. Wykazano, że



transport Tc-99m Tetrofosminy w którym pośredniczy Pgp był zakończony 30 minut od wstrzyknięcia znacznika i częściowo bądź całkowicie nieaktywny w tym czasie. Prawdopodobnie, wykrycie oporności wielolekowej za pomocą Tetrafosminy może zapobiec podawaniu niepotrzebnej bo nieefektywnej chemioterapii. Jednakże dalsze badania na dużej liczby pacjentów są wymagane w celu weryfikacji która technika obrazowania może być użyteczna w wyznaczaniu pacjentów do chemioterapii. (*Wg Wykazu Osiągnięć: III.B.24; III.B.25*).

Badania były prowadzone w ramach staży naukowych w Imperial Cancer Research Fund, Department of Nuclear Medicine, St. Bartholomew's & the Royal London School of Medicine & Dentistry w Londynie (Wielka Brytania). (*Wg Wykazu Osiągnięć: III.K.3; III.K.4*).

- Zsyntetyzowano dwa peptydy bazując na sekwencji aminokwasów wokół miejsca autofosforylacji (EGFR-1) oraz B-pętli tworzącej strukturę  $\beta$ -kartki (*ang.  $\beta$ -sheet*) w regionie hTGF $\alpha$  (EGFR-2). Oba peptydy wyznakowano jodem 125 za pomocą zmodyfikowanej metody wg Fraker i Speck (1978)<sup>17</sup>. Metodę wiązania radioligandów <sup>125</sup>I EGFR-1 i EGFR-2 przeprowadzono na linii komórek nowotworowych MDA-468 oraz tkankach ludzkiego nowotworu piersi i zanalizowano metodą Scatcharda i SSD. W komórkach MDA-468, wykazano dwie klasy miejsc wiążących <sup>125</sup>I EGFR-2 o wysokim i niskim powinowactwie. Podczas gdy w tkankach ludzkiego nowotworu piersi wykazano obecność jednej klasy miejsc wiążących o wysokim powinowactwie dla EGFR-2 i niskim powinowactwie dla EGFR-1. Wnioskowano, że EGFR-2 może być użyty w diagnostyce pacjentów z rakiem piersi konwencjonalnymi metodami medycyny nuklearnej. Opracowanie czynnika przeciwnowotworowego należącego do rodziny ligandów receptorów epidermalnego czynnika wzrostu może być wykorzystane przy podejmowaniu decyzji o bardziej radykalnej chemioterapii lub operacji we wcześniejszym etapie zanim choroba rozprzestrzeni się w znacznym stopniu. Ponadto zbadano rolę EGFR-2 w wiązaniu komórek MDA-468 oraz określano jego zdolność do wywołania apoptozy. Sugerowano, że indukcja apoptozy w komórkach MDA-468 raka piersi jest zależna od dawki i czasu ekspozycji na EGFR-2. Stężenia  $4 \times 10^{-6}$  M i  $4 \times 10^{-7}$  M EGFR-2 w znacznym stopniu indukowały apoptozę. Po 1 godzinie ekspozycji na EGFR-2 ~ 30% komórek podlegało apoptozie, a po 2 godzinach inkubacji ~ 90% komórek. Badania *in vitro* wykazały, że ten

<sup>17</sup> Fraker P.J., Speck J.C., 1978. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 80 (4): 849-857



chimeryczny peptyd może spowodować uszkodzenie DNA komórek nowotworowych i może stanowić podstawę do badań nowej postaci leku przeciwnowotworowego. (*Wg Wykazu Osiągnięć: III.B.23; III.B.26*).

Badania były prowadzone w ramach staży naukowych w Imperial Cancer Research Fund, Department of Nuclear Medicine, St. Bartholomew's & the Royal London School of Medicine & Dentistry oraz w Medical Physics Department, Royal Free Hospital School of Medicine w Londynie (Wielka Brytania). (*Wg Wykazu Osiągnięć: III.K.4; III.K.5*).

### 5.3. PUBLIKACJE NAUKOWE WG WEB OF SCIENCE W CZASOPISMACH ZNAJDUJĄCYCH SIĘ W BAZIE JOURNAL CITATION REPORTS (JRC)

(*IF podano z roku publikacji a liczbę punktów MNiSzW zgodnie z komunikatem Ministerstwa nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z grudnia 2014*)

1. Kulczykowska E., **Kalamarz-Kubiak H.**, Nietrzeba M., Gozdowska M. 2015. Brain nonapeptide and gonadal steroid responses to deprivation of heterosexual contact in the black molly. *Biology Open*, 4 (1), 69-78.  
**IF = 2,416; 0 pkt. MNiSzW**
2. Sokołowska E., Kleszczyńska A., **Kalamarz-Kubiak H.**, Arciszewski B., Kulczykowska E. 2013. Changes in brain arginine vasotocin, isotocin, plasma 11-ketotestosterone and cortisol in round goby, *Neogobius melanostomus*, males subjected to overcrowding stress during the breeding season. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 165 (2): 237-242.  
**IF = 2,371; 30 pkt. MNiSzW**
3. Kijewska A., Wicaszek B., **Kalamarz-Kubiak H.**, Szulc J., Sobocka E.. 2012. Skin structure studies and molecular identification of the Atlantic cod *Gadus morhua* L. of unique golden pigmentation from the Svalbard Bank. *Journal of Applied Ichthyology* 28 (1): 60-65.  
**IF = 0,902; 20 pkt. MNiSzW**
4. **Kalamarz H.**, Nietrzeba M., Fuentes J., Martinez-Rodriguez G., Mancera J.M., Kulczykowska E. 2009. Melatonin concentrations during larval and postlarval development of gilthead sea bream *Sparus auratus*: more than a time-keeping molecule? *Journal of Fish Biology* 75 (1): 142-155.  
**IF = 1,226; 30 pkt. MNiSzW**
5. Lopez-Olmeda J.F., Oliveira C., **Kalamarz H.**, Martinez-Rodriguez G., Mancera J. M., Kulczykowska E. 2009. Effects of water salinity on melatonin levels in plasma and peripheral tissues and on melatonin binding sites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 152 (4): 486-490.  
**IF = 1,196; 30 pkt. MNiSzW**
6. Mancera JM, Vargas-Chacoff L, Garcia-Lopez A, Kleszczyńska A., **Kalamarz H.**, Martinez-Rodriguez G., Kulczykowska E. 2008. High density and food deprivation affect arginine vasotocin, isotocin and melatonin in gilthead sea bream (*Sparus*

*auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 149 (1): 92-97.

**IF = 1,709; 30 pkt. MNiSzW**

7. Abbink W., Kulczykowska E., **Kalamarz H.**, Guerreiro P., Flik G. 2008. Melatonin synthesis under calcium constraint in gilthead sea bream (*Sparus auratus* L.) *General Comparative Endocrinology* 155 (1): 94-100.

**IF = 2,654; 25 pkt. MNiSzW**

8. Kulczykowska E., Kasprzak M., **Kalamarz H.**, Nierzaba M., Jerzak L. and Kamiński P. 2007. Melatonin and thyroxine response to pollution in white stork nestlings (*Ciconia ciconia*): Aspects of rhythmicity and age. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 146 (3): 392-397.

**IF = 2,345; 30 pkt. MNiSzW**

9. Kleszczyńska A., Vargas-Chacoff L., Gozdowska M., **Kalamarz H.**, Martínez-Rodríguez G., Mancera J.M., Kulczykowska E. 2006. Arginine vasotocin, isotocin and melatonin responses following acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to different environmental salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145 (2): 268-273.

**IF = 1,553; 30 pkt. MNiSzW**

10. Kulczykowska E., **Kalamarz H.**, Warne J., Balment R.J. 2006. Day-night specific binding of 2-[I-125] iodomelatonin and melatonin content in gill, small intestine and kidney of three fish species. *Journal of Comparative Physiology B* 176 (4): 277-285.

**IF = 1,74; 35 pkt. MNiSzW**

11. Kulczykowska E., **Kalamarz H.**, Warne J.M., Balment R.J. 2006. Role of melatonin in fish osmoregulation: Towards a new action of the hormone. *Journal of Experimental Zoology: Part A Ecological Genetics and Physiology* 305 (2): 145.

**IF = 1,354; 30 pkt. MNiSzW**

12. Sokolowska E., **Kalamarz H.**, Kulczykowska E. 2004. Seasonal changes in brain melatonin concentration in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): towards an endocrine calendar. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 139 (3): 365-369.

**IF = 1,635; 30 pkt. MNiSzW**

13. Zięcik A.J., Sienkiewicz W., Okrasa S., **Kalamarz H.**, Lakomy M, Kraeling R. R. 1999. Concentration and distribution of neuropeptide Y, galanin, beta-endorphin, vasoactive intestinal peptide and gonadotrophin-releasing hormone in the hypothalamus of gilts during oestrogen-induced surge secretion of luteinizing hormone. *Reproduction in Domestic Animals* 34 (6): 477-487.

**IF = 0,287; 25 pkt. MNiSzW**

14. Zięcik A.J., Okrasa S., **Kalamarz H.**, Łakomy M., Krealing R.R. 1999. Concentration of neuropeptide Y, galanin,  $\beta$ -endorphin, vasoactive intestinal peptide and gonadotropin-releasing hormone in the hypothalamus of gilts during the estrous cycle. *Neuroendocrinology Letters* 20: 397-403.

**IF = 1,278; 15 pkt. MNiSzW**

15. Okrasa S., **Kalamarz H.** 1996. Involvement of the opioid system in the control of LH secretion in sows. *Reproduction in Domestic Animals* 31 (3): 575-583.  
IF = 0,441; 25 pkt. MNiSzW
16. Okrasa S., **Kalamarz H.**, Ziecik A.J. 1995. Gonadotropin-releasing-hormone release in-vitro from the stalk median-eminence of cyclic and ovariectomized gilts in response to naloxone or morphine. *Animal Reproduction Science* 40 (1-2) : 151-163.  
IF = 0,709; 30 pkt. MNiSzW
17. Derecka K., **Kalamarz H.**, Ziecik A.J. 1995. Does apoptosis occur during follicular atresia in the follicular walls of the porcine ovary? *Reproduction in Domestic Animals* 30 (1): 32-35.  
IF = 0,336; 25 pkt. MNiSzW
18. Okrasa S., **Kalamarz H.**, Tilton J. E., Ziecik A.J. 1992. Influence of opioids on LH secretion in gilts during the estrous cycle. *Journal of Physiology and Pharmacology* 43 (4) Supplement 1: 105-116.  
IF = 0,962; 25pkt. MNiSzW

STRESZCZENIA KONFERENCYJNE W CZASOPISMACH Z BAZY JOURNAL CITATION REPORTS (JRC),  
ZNAJDUJĄCYCH SIĘ W BAZIE WEB OF SCIENCE (WOS):

19. Kulczykowska E., Gozdowska M., Martos-Sitcha J. A., **Kalamarz H.**, Nietrzeba M., Mancera J. M., Martínez-Rodríguez G. 2010. Melatonin, vasotocin and isotocin as biomarkers of the condition of fish., *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156 (1): 18.  
IF = 2,143; 30 pkt. MNiSzW
20. Kulczykowska E., Gozdowska M., **Kalamarz H.**, Kleszczynska A., Nietrzeba M., Martínez-Rodríguez G., Mancera J. M. 2009. Hypothalamic arginine vasotocin and isotocin are involved in stress response in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 154 (1): 26.  
IF = 1,196; 30 pkt. MNiSzW
21. Kulczykowska E., Kasprzak M., Kuriata M., **Kalamarz H.**, Nietrzeba M., Jerzak L., Kaminski P. 2008. Melatonin and thyroxine as biomarkers of condition of white stork nestlings (*Ciconia ciconia*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151 (1): 30.  
IF = 1,709; 30 pkt. MNiSzW

5.4. MONOGRAFIE, PUBLIKACJE NAUKOWE W CZASOPISMACH MIĘDZYNARODOWYCH LUB  
KRAJOWYCH INNYCH NIŻ ZNAJDUJĄCE SIĘ W BAZIE JRC

1. Mancera J.M., Vargas-Chacoff L., Martos J.A., **Kalamarz H.**, Martínez-Rodríguez G., Kulczykowska E. 2009. Cortisol increased plasma melatonin levels in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Wydawnictwo: Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), Oporto ISBN: 978-989-97443-0-1. Rozdział w książce: Avanços em Endocrinologia Comparativa Vol. V: 87-90.*

2. López-Olmeda J.K., Oliveira C., **Kalamarz H.**, Kulczykowska E., Delgado M.L., Sánchez-Vázquez F.J. 2008. Effects of water salinity on melatonin levels in plasma and peripheral tissues and on melatonin receptors in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Wydawnictwo: *Servicio de Publicaciones, Universidad de Cádiz, Spain, ISBN 978-84-9828-152-1. Rozdział w książce : AVANCES en Endocrinología Comparada. IV:139-143.*

#### **5.5. OPRACOWANIA ZBIOROWE, KATALOGI ZBIORÓW, DOKUMENTACJA PRAC BADAWCZYCH, EKSPERTYZ, UTWORÓW I DZIEŁ ARTYSTYCZNYCH**

1. Okrasa S., **Kalamarz H.** 1998. Rozdział “Krew” w skrypcie “Fizjologia zwierząt gospodarskich z elementami anatomii” pod redakcją L. Duszy (str.70-98), Wydawnictwo: *ART. ISBN 83-87443-68-9.*

**SUMARYCZNY IF ZGODNIE Z ROKIEM OPUBLIKOWANIA; (POZYCJE 1 – 18): 25,114  
(POZYCJE 1 – 21): 30,162**

**RAZEM LICZB PUNKTÓW MNiSzW ZGODNIE Z WYKAZEM CZASOPISM Z GRUDNIA; (POZYCJE 1-18) = 465  
(POZYCJE 1-21) = 555**

**LICZBA CYTOWAŃ PUBLIKACJI WEDŁUG BAZY WEB OF SCIENCE; (POZYCJE 1-18) = 175  
(POZYCJE 1-21) = 178**

**INDEKS HIRSCHA WEDŁUG BAZY WEB OF SCIENCE : 7**

*Anna Kalamarz-Gubiole*