

AUTOREFERAT

Dr n. med. w zakresie biologii medycznej

Renata Walczak-Jędrzejowska

Zakład Endokrynologii Płodności

Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności

Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, czerwiec 2015

Imię i Nazwisko: Renata Walczak-Jędrzejowska (do roku 1998 Renata Walczak)

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

04.07.1991 r. - magister biologii (specjalizacja biologia molekularna), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki, tytuł pracy magisterskiej: „Glikoproteiny jądrowe komórek o odmiennym indeksie mitotycznym”, promotor – prof. dr hab. Anna Lipińska.

25.05.2000 r. – doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, tytuł rozprawy doktorskiej „Hormon folikulotropowy (FSH), estradiol, testosteron i prolaktyna a wzrost jądra i spermatogoniogeneza w okresie dojrzewania płciowego”, promotor – prof. dr hab. n. med. Krzysztof Kula, recenzenci – prof. dr hab. Barbara Bilińska, Uniwersytet Jagielloński, prof. dr hab. n. med. Marek Pawlikowski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1990-1991 – pracownik naukowo-techniczny, Zakład Cytobiochemii, Instytut Biochemii, Uniwersytet Łódzki (w trakcie V roku studiów)

1991-1997 – młodszy asystent, Pracownia Andrologii Klinicznej, Szpital Kliniczny AM nr 3 w Łodzi

1997–2002 – asystent, Samodzielna Pracownia Andrologii i Endokrynologii Płodności, Instytut Endokrynologii, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Łodzi

2002-2012 – adiunkt, Samodzielna Pracownia Andrologii i Endokrynologii Płodności, Instytut Endokrynologii, od 2003 Zakład Andrologii, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2012-2013 – starszy wykładowca, Zakład Andrologii, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2013-nadal – adiunkt, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

**WPLYW STEROIDÓW PŁCIOWYCH ORAZ KSENOESTROGENÓW NA
ZAPOCZĄTKOWANIE DOJRZEWANIA KANALIKÓW
PLEMNIKOTWÓRCZYCH SZCZURA**

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

Impact Factor oraz punkty MNiSW podane są z roku publikacji oraz z roku 2014, liczba cytowań zgodnie z ISI Web of Science z maja 2015 roku.

1. **Walczak-Jędrzejowska R**, Słowikowska-Hilczer J, Marchlewska K, Kula K. Maturation, proliferation and apoptosis of seminal tubule cells at puberty after administration of estradiol, follicle stimulating hormone or both. *Asian J Androl* 2008; 10(4):585-592
IF 2008=2,059; 2014=2,540; MNiSW 2008=20; 2014=25
Liczba cytowań: 9; Liczba cytowań bez autocytowań: 4
2. **Walczak-Jędrzejowska R**, Kula K, Oszukowska E, Marchlewska K, Kula W, Słowikowska-Hilczer J. Testosterone and oestradiol in concert protect seminiferous tubule maturation against inhibition by GnRH-antagonist. *Int J Androl* 2011; 34: e378-e385
IF 2011=3,591; 2014=3,216; MNiSW 2011=50; 2014=50
Liczba cytowań: 5; Liczba cytowań bez autocytowań: 4
3. **Walczak-Jędrzejowska R**, Słowikowska-Hilczer J, Oszukowska E, Marchlewska K, Filipiak E, Kula K. Oestradiol and testosterone inhibit rat seminiferous tubule development in hormone-specific ways. *Reprod Biol* 2013; 13(3):243-250
IF 2013=1,048; 2014=1,048; MNiSW 2013=15; 2014=15
Liczba cytowań: 1; Liczba cytowań bez autocytowań: 1
4. Filipiak E, **Walczak-Jędrzejowska R**, Oszukowska E, Gumińska A, Marchlewska K, Kula K, Słowikowska-Hilczer J. Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47(5):S113-120
IF 2009=1,081; 2014=1,000; MNiSW 2008=13; 2014=15
Liczba cytowań: 6; Liczba cytowań bez autocytowań: 4

5. Filipiak E, **Walczak-Jędrzejowska R**, Krupiński M, Oszukowska E, Marchlewska K, Długoński J, Kula K, Słowikowska-Hilczler J. Di(n-butyl) phthalate has no effect on the rat prepubertal testis despite its estrogenic activity in vitro. *Folia Cytochem Cytobiol* 2011; 49(4):685-689

IF 2011=0,807; 2014=1,000; MNiSW 2011=15; 2014=15

Liczba cytowań: 4; Liczba cytowań bez autocytowań: 4

ROZDZIAŁ W KSIĄŻCE:

6. **Walczak-Jędrzejowska R** i Kula K. „Rola steroidowych hormonów jądra i ich interakcji przy wywołaniu dojrzewania kanalików plemnikotwórczych” w: Układ płciowy męski, Badania kliniczne i doświadczalne. Pod redakcją M. Piaseckiej. Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. 2013; 292-309

Sumaryczny Impact Factor prac oryginalnych zgłoszonych jako osiągnięcie **IF=8,586** z roku publikacji (8,804 z roku 2014), a w punktach **MNiSW=113** z roku publikacji (120 z roku 2014). Jedna z przedstawionych publikacji oryginalnych została opublikowana w *Folia Histochemica et Cytobiologia*, 2009, 47 (5) (publikacja 4), recenzowanym suplemencie do czasopisma. Punktacja po wyłączeniu pracy z suplementu wynosi: **IF=7,505** z roku publikacji (7,804 z roku 2014), a w punktach **MNiSW=100** z roku publikacji (105 z roku 2014). Całkowita liczba cytowań wynosi 25, bez autocytowań 17 (źródło JCR, maj 2015 r.)

Oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład w powstanie publikacji naukowych dołączono w załączniku 5.

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

Wstęp

Spermatogeneza to złożony proces podziałów i przekształceń komórkowych, w którym z pierwotnych komórek plemnikotwórczych, spermatogonii, powstają dojrzałe gamety męskie, plemniki. Proces ten odbywa się w nabłonku plemnikotwórczym kanalika jądra w środowisku utworzonym przez somatyczne komórki kanalika tzw. komórki Sertoliego. Komórki Sertoliego pełnią funkcję podporową, odżywczą i regulacyjną w stosunku do komórek spermatogenezy. Spermatogeneza zapoczątkowana w okresie dojrzewania płciowego lub natychmiast po urodzeniu (u szczura) trwa do końca życia u wszystkich znanych gatunków, w tym u człowieka, dzięki namnażaniu i samoodnowie spermatogonii. Za główne hormony regulujące spermatogenezę uważa się przysadkowy hormon folikulotropowy (FSH, ang. *Follicle Stimulating Hormone*) oraz testosteron.

Testosteron wytwarzany jest w komórkach Leydiga jąder pod wpływem przysadkowego hormonu luteotropowego (LH, ang. *Luteinizing Hormone*). Zarówno FSH jak i testosteron działają za pośrednictwem komórek Sertoliego, komórki plemnikotwórcze nie mają własnych receptorów dla tych hormonów.

Stosunkowo niedawno odkryto, że spermatogeneza jest regulowana z udziałem estradiolu [1], hormonu uważanego za „żeński” bo wytwarzanego m.in. w jajniku. Estradiol reguluje cykl płciowy samicy. Receptory estrogenowe zarówno te klasyczne, jądrowe (ER α i ER β , ang. *Estrogen Receptor*), jak i błonowe (GPER, ang. *G Protein-coupled Estrogen Receptor*) obecne są w wielu różnych typach komórek jądra począwszy od komórek Leydiga i Sertoliego po komórki plemnikotwórcze [2]. Jądro nie jest jedynie miejscem docelowym dla działania estrogenów, ale jest też źródłem ich wytwarzania [3]. Jądra szczurze mają zdolność wytwarzania estradiolu począwszy od 17 doby życia płodowego. Głównym miejscem biosyntezy estrogenów w jądrze w okresie przeddojrzewaniowym są komórki Sertoliego w procesie stymulowanym przez FSH. Około 15 dnia życia szczura aktywność aromatazy, enzymu przekształcającego androgeny do estrogenów, przemieszcza się z komórek Sertoliego do komórek Leydiga, które stanowią główne źródło estrogenów w okresie dojrzałości płciowej. Aromataza obecna jest także w komórkach plemnikotwórczych.

Zapoczątkowanie spermatogenezy u szczura następuje tuż po urodzeniu. Wtedy płodowe komórki płciowe, gonocyty, ponownie rozpoczynają namnażanie i około 5 dnia życia, różnicują się do pierwszych spermatogonii. Spermatogonie dzieląc się i samoodnawiając ustanawiają wielkość swojej stałej populacji. Zapewnia to ciągłość spermatogenezy. Namnażanie i samoodnowa spermatogonii są krytyczne dla jej ilościowego aspektu w ciągu całego życia. Pierwsze spermatocyty w stadium preleptotenu I. podziału mejotycznego, zwane także spermatocytami spoczynkowymi, pojawiają się w kanalikule plemnikotwórczym 9 dnia życia szczura. Około 15. dnia pojawiają się pierwsze spermatocyty w kolejnym stadium podziału mejotycznego, stadium pachytenu. Pierwsze plemniki pojawiają się w jądrze szczura już około 45 dnia życia. Komórki Sertoliego, które rozpoczęły namnażanie jeszcze w okresie życia płodowego, kontynuują mitozy przez około dwa tygodnie po urodzeniu, następnie dojrzewają czynnościowo, a ich główną rolą staje się utrzymanie środowiska dla przebiegu spermatogenezy. Zakończenie podziałów komórek Sertoliego występuje około 15 dnia życia i łączy się z powstaniem ich stałej, niezmiennej liczbowo populacji. Decyduje to o końcowej objętości jąder i liczbie

wytwarzanych plemników. Jedna komórka Sertoliego wspiera bowiem określoną liczbę komórek plemnikotwórczych.

Cechą charakterystyczną pierwszej spermatogenezy jest wzmożona apoptoza komórek plemnikotwórczych [4]. Jest ona niezbędna dla usunięcia komórek nadliczbowych i utrzymania prawidłowych relacji ilościowych oraz prawidłowych interakcji pomiędzy dojrzewającymi komórkami plemnikotwórczymi a komórkami Sertoliego.

Badania dotyczące hormonalnej regulacji zainicjowania spermatogenezy prowadzone są od wielu lat z wykorzystaniem różnych modeli doświadczalnych i wskazują jednoznacznie na zaangażowanie w tym procesie FSH i testosteronu. Przy zapoczątkowaniu spermatogenezy FSH jest głównie odpowiedzialne za namnażanie komórek Sertoliego oraz rozwój spermatogonii, podczas gdy działanie testosteronu jest kluczowe dla przebiegu i zakończenia pierwszego podziału mejotycznego [5]. Udział estrogenów nie jest jeszcze do końca poznany. Uważno, że estradiol ma być odpowiedzialny za hamowanie czynności jądra, a mechanizm ujemnego działania estradiolu ma zależeć zarówno od hamowania wydzielania FSH z przysadki, jak i od hamowania wydzielania testosteronu w samym jądrze.

Coraz więcej badań wskazuje na wpływ związków chemicznych o aktywności hormonalnej zaburzających wydzielanie lub czynność endogennych androgenów, co uważane jest za działanie estrogeno-podobne. Są to tzw. EDC (ang. *Endocrine Disrupting Chemicals*), które hamują rozwój jądra, a także wpływają na jego czynność w okresie dojrzałości płciowej. Uważa się, że EDC mogą być przyczyną wielu zaburzeń męskiego układu płciowego, w tym nowotworów jąder, a także zaburzeń płodności. Szczególne znaczenie mają ksenoestrogeny, substancje środowiskowe, które wykazują aktywność estrogeną i/lub anti-androgenową [6].

Moje zainteresowania badawcze ukierunkowane były na poszerzenie wiedzy na temat roli FSH, testosteronu i estrogenów w regulacji zapoczątkowania spermatogenezy. Badałam wpływ tych hormonów na wzrost jądra, dojrzewanie i czynność komórek Sertoliego oraz równowagę pomiędzy namnażaniem, różnicowaniem i apoptozą komórek plemnikotwórczych. Ze względu na rosnący problem społeczny, jakim jest zanieczyszczenie środowiska ksenoestrogenami, interesował mnie również wpływ ksenoestrogenów na zapoczątkowanie spermatogenezy.

Trzy spośród pięciu publikacji oryginalnych wchodzących w skład cyklu naukowego (publikacje nr 1, 4, 5) są wynikiem realizacji własnego projektu badawczego

finansowanego w ramach środków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, którego byłam kierownikiem (tzw. Praca Własna Uniwersytetu Medycznego, *załącznik 4; poz. II I, 17.*)

Modele badawcze

W pracach zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe wykorzystywałam model doświadczalny z zastosowaniem noworodków samców szczura białego rasy Wistar. W czasie korespondującym z zapoczątkowaniem spermatogenezy, zwierzęta te poddawane były, codziennym wstrzyknięciom preparatów hormonalnych. Estrogeny podawane były w postaci naturalnego 17 β -estradiolu, benzoesanu estradiolu i dietylstilbestrolu (DES, *ang. Diethylstilbestrol*), testosteron w postaci propionianu, a FSH jako organopreparat uzyskiwany z moczu kobiet po menopauzie (Metrodin, Serono, Middlesex, UK). Hamowanie wydzielania endogennych gonadotropin dokonywane było poprzez podawanie antagonisty receptora gonadoliberyny (GnRH, *ang. Gonadotropin Releasing Hormone*) (Cetrorelix, Merck Serono Europe Ltd, Londyn, UK). Ksenoestrogeny reprezentowane były przez zearalenon (ZEA, *ang. Zearalenone*) i ftalan di(n)butylu (DBP, *ang. Di-n-butyl phthalate*).

Doświadczenia prowadzono w okresie rozwoju spermatogonii tj. namnażania i różnicowania pierwszych spermatogonii, równoległym do ustanowienia niezmiennej, dojrzałej populacji komórek Sertoliego w jądrze. Model ten wprowadzony został w naszej jednostce w latach osiemdziesiątych [1]. Wprowadziłam w nim istotne innowacje. Zmodyfikowałam metodę analizy morfometrycznej wzrostu jądra, umożliwiającą ocenę całkowitej objętości i długości kanalików plemnikotwórczych w jądrze. Wprowadziłam morfologiczną ocenę dojrzałości czynnościowej komórek Sertoliego, która obejmowała: a) zmiany w wielkości powierzchni ich jądra komórkowego oceniane z wykorzystaniem komputerowego systemu do analizy obrazu, b) częstość występowania światła kanalika, które jest wypadkową tworzenia połączeń barierowych między przylegającymi komórkami Sertoliego i wydzielania przez nie płynu kanalikowego, oraz c) zmiany aktywności proliferacyjnej komórek Sertoliego. Do ilościowej analizy komórek nabłonka plemnikotwórczego wprowadziłam metody stereometryczne, co pozwoliło na ocenę populacji komórkowych w całym jądrze. Stan zróżnicowania komórek opierałam na cechach morfologii oraz umiejscowieniu komórek w nabłonku plemnikotwórczym. Wprowadziłam także metodę immunohistochemicznej analizy proliferacji komórek z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko jądrowemu antygenowi proliferacji komórkowej (PCNA, *ang. Proliferating Cell Nuclear Antigen*), oraz metodę TUNEL (*ang.*

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated D-UTP Nick End-Labeling) w celu identyfikacji komórek podlegających zaprogramowanej śmierci (apoptozie).

Publikacja nr 1

Walczak-Jędrzejowska R, Słowikowska-Hilczer J, Marchlewska K, Kula K. Maturation, proliferation and apoptosis of seminal tubule cells at puberty after administration of estradiol, follicle stimulating hormone or both. Asian J Androl 2008; 10(4):585-592

Wyniki pierwszej z przedstawionych jako osiągnięcie prac z jednej strony potwierdziły znany, stymulujący wpływ FSH na proliferację komórek Sertoliego, a z drugiej po raz pierwszy wykazały, że estradiol (podawany w postaci benzoesu) hamuje ten proces. Ponieważ wcześniej wykazałam, że stosowana dawka benzoesu estradiolu u noworodków szczura nie obniżała poziomu FSH we krwi [7], to hamujący wpływ estradiolu na namnażanie komórek Sertoliego można uznać za bezpośredni. Hamując proliferację komórek Sertoliego, estradiol może determinować ostateczną masę jąder. Dotychczas uznawano, że rolę taką spełnia jedynie hormon tarczycy. Uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią znaczący wkład do wiedzy na temat roli estradiolu w regulacji liczebności komórek Sertoliego. Rzeczywiście w tym samym roku wykazano *in vitro* możliwość bezpośredniej regulacji namnażania komórek Sertoliego pobranych od niedojrzałych płciowo szczurów przez estradiol [8].

W omawianej pracy wykazałam także, że estradiol wzmaga apoptozę komórek Sertoliego. Prawdopodobnie estradiol może działać tutaj pośrednio poprzez znany hamujący wpływ na wydzielanie testosteronu przez komórki Leydiga. Estradiol zastosowany w postaci benzoesu, w tej samej dawce, hamował wydzielanie testosteronu [7]. Z kolei, w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem fragmentów kanalików plemnikotwórczych człowieka wykazano, że niedobór testosteronu stymulował apoptozę komórek Sertoliego [9].

W mojej pracy podawanie samego estradiolu powodowało również zahamowanie dojrzewania komórek Sertoliego ocenianego wzrostem powierzchni ich jądra komórkowego oraz tworzeniem światła kanalika. Niespodziewanie, mimo hamującego wpływu samego estradiolu, przy łącznym jego podawaniu z FSH wystąpiło wzmocnienie dodatniego działania FSH na dojrzewanie komórek Sertoliego. Obserwacja ta jest oryginalna, jej mechanizm pozostaje nadal nieznan, choć stanowi istotny wkład w poznanie hormonalnej kontroli dojrzewania jądra.

W przypadku komórek plemnikotwórczych uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdziły znany, hamujący wpływ estradiolu na ich przeżywalność oraz stymulujący wpływ FSH na ich namnażanie. Jednak, oprócz apoptozy, estradiol powodował także wzrost namnażania komórek plemnikotwórczych, porównywalny do działania FSH. Chociaż wydaje się, że proliferacja i apoptoza komórek są procesami przeciwstawnymi, to jednak wykazałam, że w przypadku spermatogenezy oba te procesy mogą mieć wspólny czynnik pobudzający. Estradiol może być czynnikiem zaangażowanym w regulację równocześnie proliferacji i apoptozy komórek plemnikotwórczych. Jest to obserwacja oryginalna nie publikowana wcześniej.

Najważniejszym osiągnięciem omawianej publikacji i całego przedstawionego cyklu prac było wykazanie, że tylko łączne działanie estradiolu i FSH powodowało wzrost przeżywalności komórek plemnikotwórczych. Prawdopodobnie efekt ten wynikał z nieznanego dotychczas współdziałania estradiolu i FSH na dojrzałość czynnościową komórek Sertoliego.

Publikacja nr 2

Walczak-Jędrzejowska R, Kula K, Oszukowska E, Marchlewska K, Kula W, Slowikowska-Hilczer J. Testosterone and oestradiol in concert protect seminiferous tubule maturation against inhibition by GnRH-antagonist. Int J Androl 2011; 34: e378-e385

Celem kolejnej z prac prezentowanych jako osiągnięcie naukowe była próba zbadania, czy, podobnie jak z FSH, estrogeny mogą współdziałać z testosteronem przy kontroli rozwoju jądra. Dla zbadania bezpośredniego wpływu hormonów steroidowych na jądro, wymagane jest m.in. wyeliminowanie działania endogennych hormonów tropowych przysadki (FSH i LH), pobudzających wydzielanie hormonów jądra. Historycznie dokonywano tego za pomocą usunięcia przysadki lub przez podawanie estrogenów, hamujących wydzielanie FSH i LH. W naszym modelu doświadczalnym zastosowałam antagonistę receptora GnRH, który hamuje wydzielanie gonadotropin przez przysadkę.

Antagonista GnRH podawany był noworodkom samców szczura pomiędzy 5 a 15 dobą życia. Wydzielanie FSH i testosteronu ulegało obniżeniu. Równocześnie z antagonistą podawane były propionian testosteronu i benzoestan estradiolu, zarówno oddzielnie jak i łącznie. Antagonista GnRH wywołał zahamowanie wzrostu jądra, spadek liczby komórek Sertoliego oraz zahamowanie ich dojrzewania. Jednak częściowe przeciwdziałanie hamującemu wpływowi antagonisty GnRH objawiające się

podtrzymaniem wzrostu jądra i prawidłowej liczby komórek Sertoliego (mimo względnego deficytu FSH), możliwe było przez równoczesne podawanie testosteronu. Wskazuje to na możliwość zastępczego (kompensacyjnego) działania testosteronu przy względnym niedoborze FSH. Niespodziewanie, równoczesne podawanie testosteronu z estradiolem utrzymywało wzrost jądra i liczby komórek Sertoliego oraz w pełni przeciwdziało hamowaniu ich dojrzewania przez antagonistę. Wskazuje to na możliwość współdziałania estradiolu z testosteronem dla wywołania dojrzewania komórek Sertoliego. Tak więc, estradiol okazał się hormonem, którego współdziałanie zarówno z FSH (**Publikacja nr 1**), jak i testosteronem, wywołuje dojrzewanie komórek Sertoliego. Może to mieć podstawowe znaczenie fizjologiczne dla dojrzewania jądra lub uruchamiać się jako alternatywny mechanizm w obliczu niedoboru FSH lub testosteronu.

Przy względnym niedoborze FSH (po zastosowaniu antagonisty GnRH) występowało zmniejszenie liczebności komórek plemnikotwórczych. Ocena proliferacji i przeżywalności spermatogonii i spermatocytów wykazały, że zmniejszenie ich liczby było wynikiem wzrostu apoptozy, a nie zahamowania proliferacji. Najważniejszym wynikiem tej pracy było wykazanie po raz pierwszy, że tylko łączne działanie estradiolu i testosteronu było w stanie całkowicie wyeliminować hamujący wpływ antagonisty GnRH. Udało się także określić swoistość działania obu steroidów płciowych. I tak, utrzymanie na prawidłowym poziomie liczby komórek płciowych wynikało z dodatniego wpływu estrogenów na namnażanie spermatogonii, a testosteron działał ochronnie zmniejszając apoptozę spermatocytów. Wyniki te stanowią istotne rozszerzenie wiedzy na temat względnych ról estradiolu i testosteronu przy zapoczątkowaniu spermatogenezy odkrywając pobudzającą rolę współdziałania estrogenów i androgenów, hormonów uznawanych dotychczas jako działające przeciwstawnie.

Istnieją dane mówiące, że testosteron może ujemnie regulować (hamować) spermatogenezę na poziomie spermatogonii, a nawet na etapie wcześniejszym niż spermatogonie [1]. Kontynuując badania na wyżej wymienionym modelu doświadczalnym na szczurach, którym hamowano wydzielane endogennych gonadotropin za pomocą antagonisty GnRH, wykazałam również, że wraz z przedwczesnym wzrostem ekspresji receptorów androgenowych (AR) na komórkach Sertoliego oraz okołokanalikowych komórkach mioidalnych pod wpływem równoczesnego do antagonisty podawania propionianu testosteronu zmniejsza się liczba najwcześniejszych spermatogonii (spermatogonii typu A) i odwrotnie, wraz z obniżeniem ekspresji AR (pod wpływem równoczesnego do antagonisty podawania benzoesu estradiolu) ilość tych komórek

wzrasta. Wskazuje to, że przedwczesna aktywacja AR może negatywnie regulować liczebność spermatogonii najwcześniejszego typu, z kolei jej opóźnienie wywołuje efekt odwrotny. Wyniki te zostały przedstawione na 8. Międzynarodowym Kongresie Andrologicznym, który odbył się w Barcelonie (15-17.10.2014 r.) i wyróżnione Nagrodą The Best Poster Prize przyznaną przez Institut Biochimique SA International i Komitet Organizacyjny Kongresu (załącznik 4, poz. II J, 16).

Publikacja nr 3

Walczak-Jędrzejowska R, Slowikowska-Hilczer J, Oszukowska E, Marchlewska K, Filipiak E, Kula K. Oestradiol and testosterone inhibit rat seminiferous tubule development in hormone-specific ways. *Reprod Biol* 2013; 13(3):243-250

Kontynuując swoje badania nad regulacją hormonalną zapoczątkowania spermatogenezy postanowiłam ocenić wpływ podawania steroidów płciowych w okresie jeszcze wcześniejszym, począwszy od 1. dnia życia szczura, obejmującym także namnażanie i różnicowanie płodowych komórek płciowych, gonocytów, do pierwszych spermatogonii. W badaniu tym zwierzęta podlegały manipulacji hormonalnej w dwóch okresach życia. W pierwszym z nich steroidy płciowe podawane były od 1. do 5. doby, a następnie przez 10 kolejnych dni podawany był tylko rozpuszczalnik dla hormonów. W drugim, steroidy płciowe podawane były od 1. do 15. doby życia. Oprócz oceny całkowitej liczby komórek plemnikotwórczych w jądrze, ocenione zostały także liczby spermatogonii i spermatocytów w relacji do komórek Sertoliego. Umożliwiło to ocenę kompetencji komórek Sertoliego w zakresie wspierania rozwoju komórek plemnikotwórczych.

Podawanie steroidów płciowych tylko przez pierwszych 5 dni życia szczura powodowało zahamowanie wzrostu jądra oraz zmniejszenie liczebności komórek Sertoliego i komórek plemnikotwórczych w 16. dniu życia. Jednakże, chociaż liczba komórek plemnikotwórczych w jądrze była obniżona, to ich stosunek liczbowy do komórek Sertoliego nie był zmieniony. Obserwowany w tych grupach wzrost apoptozy komórek plemnikotwórczych, przy zachowanej proliferacji, odpowiadał prawdopodobnie za stabilizację liczby obu typów komórek.

Przedłużenie ciągłego podawania hormonów do 15. dnia życia powodowało dalsze upośledzenie rozwoju komórek plemnikotwórczych. Udało się tutaj zaobserwować

specyficzne dla danego hormonu efekty. Podczas gdy estradiol hamował ilościowy aspekt rozwoju spermatogonii, prawdopodobnie działając bezpośrednio na same komórki płciowe i stymulując ich apoptozę, testosteron obniżał liczbę spermatocytów. Testosteron nie zmieniał, a estradiol zwiększał wydzielanie FSH. Wyniki tych badań wskazują, że działanie steroidów płciowych nawet w okresie przeddojrzewaniowym jest zależne od wieku, oraz że względna przewaga dostępności jednego ze steroidów płciowych swoiście negatywnie wpływa na rozwój jąder, jeżeli występuje tuż po urodzeniu. Mechanizmy hamowania obecne w najwcześniejszym okresie życia są specyficzne dla każdego hormonu steroidowego i nie zależą od hamowania wydzielania FSH.

Podsumowanie badań nad fizjologicznym wpływem steroidów płciowych na rozwój kanalika

W okresie dojrzewania płciowego FSH pobudza wzrost kanalików plemnikotwórczych, ale jego wpływ na przeżywalność komórek plemnikotwórczych jest potęgowany estradiolem. Testosteron wydaje się modulować wzrost kanalika jądra. Wzrost ten jest hamowany przez testosteron w okresie rozpoczęcia spermatogenezy i pojawiania się spermatogonii, a pobudzany w okresie rozwoju spermatogonii nawet przy względnym niedoborze FSH. Testosteron bierze wtedy udział w podtrzymywaniu liczebności komórek Sertoliego, wzrostu kanalika plemnikotwórczego oraz przeżywalności pierwszych komórek ulegających mejozie (spermatocytów). Jednak pełne ilościowo, prawidłowe dojrzewanie kanalików jądra w okresie rozwoju spermatogonii występuje, kiedy testosteron współdziała z estradiolem.

Wywołanie pierwszego rozwoju spermatogonii aż do mejozy wymaga współdziałania estradiolu z FSH lub z testosteronem, i tym samym estradiol wydaje się być uniwersalnym sygnałem hormonalnym dla wywołania czynności plemnikotwórczej jądra. Platformą dla dodatniego współdziałania tego zespołu hormonów są komórki Sertoliego. Przyjmując, że głównym hormonem odpowiedzialnym za wzrost i dojrzewanie kanalików plemnikotwórczych jest FSH, jego działanie może zależeć zarówno od swoistej aktywacji receptora błonowego dla FSH na komórkach Sertoliego, jak i od modulacji biosyntezy estradiolu w tych komórkach. Testosteron i estradiol wykazują też swoiste działania hamujące. Estradiol hamował rozwój komórek plemnikotwórczych, a testosteron - spermatocytów. Oba efekty ujawniają się w najwcześniejszym etapie spermatogenezy, czyli różnicowania się pierwszych spermatogonii i nie zależą od hamowania wydzielania FSH.

Publikacja nr 4

Filipiak E, Walczak-Jedrzejska R, Oszukowska E, Guminska A, Marchlewska K, Kula K, Slowikowska-Hilczner J. *Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. Folia Histochem Cytobiol 2009; 47(5):S113-120*

Publikacja nr 5

Filipiak E, Walczak-Jedrzejska R, Krupinski M, Oszukowska E, Marchlewska K, Długonski J, Kula K, Slowikowska-Hilczner J. *Di(n-butyl) phthalate has no effect on the rat prepubertal testis despite its estrogenic activity in vitro. Folia Cytochem Cytobiol 2011; 49(4):685-689*

Dwie kolejne prace dotyczą badania wpływu środowiskowych związków o aktywności estrogennej, tzw. ksenoestrogenów, na rozwój kanalika plemnikotwórczego. Przypuszcza się, że wzrost częstości występowania zaburzeń w obrębie męskiego układu płciowego związany jest z działaniem ksenoestrogenów pochodzących ze środowiska [6]. Jednakże w badaniach doświadczalnych, oprócz negatywnego wpływu związków o działaniu estrogennym na męski układ płciowy zaobserwowano także ich efekt pozytywny, co uzależnione było m.in. od dawki stosowanych związków [10-12]. Dlatego też postanowiliśmy zbadać działanie różnych dawek wybranych ksenoestrogenów w naszym modelu badawczym.

W pierwszej publikacji (**Publikacja nr 4**) zastosowaliśmy oprócz czystego chemicznie estradiolu dwa ksenoestrogeny o różnym pochodzeniu środowiskowym: DES, syntetyczny estrogen stosowany w przeszłości jako środek farmaceutyczny lub jako anaboli w hodowli drobiu i bydła, i ZEA - mykoestrogen produkowany przez pleśń *Fusarium species*. O ile narażenie środowiskowe u ludzi na DES obecnie praktycznie nie istnieje, to ZEA jest częstym zanieczyszczeniem żywności, a jego głównym źródłem są ziarna zbóż i kukurydzy oraz suszone owoce i warzywa. Wpływ DES na męski układ rozrodczy w okresie dojrzewania był już wcześniej badany. Z kolei ocena wpływu ZEA na rozwój jąder u szczura stanowi oryginalny wkład w rozwój wiedzy, gdyż wcześniejsze pojedyncze publikacje dotyczyły wpływu tego związku głównie u dorosłych samców [13, 14]. DES jest związkiem o udokumentowanym silnym działaniu estrogennym [15, 16]. Z kolei ZEA w teście *in vitro* aktywacji transkrypcyjnej ER wykazuje 10^2 razy niższą zdolność wiązania z receptorem w porównaniu z czystym chemicznie estradiolem, czy DES [16].

W naszym badaniu związki te podawane były niedojrzałym samcom szczura w dwóch różnych dawkach. Dawki wyższe DES i czystego chemicznie estradiolu zostały wybrane poprzez analogię do dawki benzoesanu estradiolu wykorzystywanej w naszych poprzednich badaniach (**Publikacje nr 1 - 3**). Dawki niższe, stanowiły 0,1 dawki wyższej i zostały wybrane poprzez analogię do badań, w których substancje te w podobnych lub niższych dawkach nie wykazywały żadnego lub wykazywały wpływ dodatni na wzrost jąder lub spermatogenezę w okresie rozwojowym u samca [10, 17]. Dawki ZEA opracowane zostały w oparciu o jego powinowactwo do ER [15] i były 10^2 i 10^3 razy wyższe od dopuszczalnego dziennego spożycia tego ksenoestrogenu dla ludzi.

Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze doniesienia dotyczące negatywnego wpływu DES i estradiolu na spermatogenezę i wzrost jąder szczurów, oraz po raz pierwszy wykazały także negatywny wpływ ZEA (w wyższej dawce) na badane parametry. Pod wpływem wszystkich analizowanych substancji dochodziło przede wszystkim do zahamowania wzrostu jądra (zmniejszenie masy jądra, średnicy i całkowitej długości kanalików plemnikotwórczych) oraz zmniejszenia liczebności komórek Sertoliego. Wyniki te pozostają w zgodzie z naszymi badaniami nad fizjologią rozwoju jądra, gdzie benzoesan estradiolu (zastosowany w tej samej dawce co dawki wyższe dla DES i czystego chemicznie estradiolu) wywoływał też efekt hamujący (**Publikacja nr 3**), prawdopodobnie w wyniku zwiększonej apoptozy komórek Sertoliego (**Publikacja nr 1**). Jeśli chodzi o wpływ badanych substancji na liczebność komórek plemnikotwórczych to największy spadek obserwowany był po DES, niezależnie od dawki, oraz po wyższej dawce czystego chemicznie estradiolu. Z kolei niższa dawka czystego chemicznie estradiolu i wyższa dawka ZEA obniżyły znamienne tylko liczbę spermatogonii. Obniżenie liczby komórek plemnikotwórczych, prawdopodobnie na skutek apoptozy (**Publikacja nr 1 i 3**), może być związane ze zmniejszeniem liczby komórek Sertoliego, a tym samym z potrzebą liczbowego dopasowania obu typów komórek. Może to sugerować, że w okresie dojrzewania szczura komórki Sertoliego stanowią główny cel negatywnego działania estradiolu, jak i badanych ksenoestrogenów. Jednakże w świetle poprzednich naszych wyników, nie można wykluczyć, że związki wykazujące działanie estrogenne mogą także bezpośrednio wpływać na komórki plemnikotwórcze. Estradiol (podawany w postaci benzoesanu) oprócz zahamowania wzrostu jądra i zmniejszenia liczebności komórek Sertoliego powodował także upośledzenie rozwoju spermatogonii, co objawiało się zaburzeniem stosunku liczbowego komórek plemnikotwórczych do komórek Sertoliego (**Publikacja nr 3**).

Poza ZEA także DBP jest związkami zanieczyszczającym środowisko naturalne o działaniu estrogenopodobnym i stanowiącym przez to potencjalne zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Jest to substancja syntetyczna, wykorzystywana głównie jako plastyfikator, środek do impregnacji tekstyliów, czy rozpuszczalnik w farbach drukarskich. Najlichniesze są prace na temat negatywnego wpływu DBP na męski układ rozrodczy w okresie rozwoju płodowego. DBP w wysokich dawkach działa negatywnie na jądra płodów szczurzych powodując zwiększoną agregację komórek Leydiga oraz zmniejszenie produkcji wewnątrzjądrowego testosteronu [18, 19]. Powoduje także inne zaburzenia rozwoju układu rozrodczego samców, takie jak dysgenезja gonad, spodziectwo, wnetrostwo, bezplodność [12]. Jedyna wcześniejsza praca, która badała wpływ DBP na męski układ płciowy w okresie dojrzewania szczura, wskazywała raczej na jego negatywne antyandrogenne, a nie estrogenne działanie, przy czym stosowane w tym doświadczeniu dawki oscylowały między 250 a 1000 mg/kg m.c. [20]. Z drugiej strony Ge i wsp. [21] wykazali, że inny ftalan, o podobnej do DBP strukturze chemicznej, ftalan dietylheksylu (DEHP, ang. *Di(2-ethylhexyl) phthalate*) działa negatywnie na dojrzewanie płciowe szczura w dawce odpowiadającej 750 mg/kg m.c. Natomiast w dawce niskiej, wynoszącej 10 mg/kg m.c., DEHP wywołuje efekt przyspieszający dojrzewanie płciowe, podwyższa stężenie testosteronu we krwi i zwiększa masę pęcherzyków nasiennych.

W kolejnej pracy (**Publikacja nr 5**), w tym samym modelu doświadczalnym, analizowany był wpływ niskich dawek DBP (analogicznych do w/w niskiej dawki DEHP) na wzrost jądra i zapoczątkowanie spermatogenezy. Podobnie jak w przypadku ZEA (**Publikacja nr 4**) zastosowane dawki DBP były 10^2 i 10^3 razy wyższe od tolerowanego dziennego spożycia tego ksenoestrogenu dla ludzi. Ponieważ prace oceniające działanie estrogenne DBP i DEHP nie są do końca jednoznaczne [22-24] to dodatkowo, we współpracy z prof. Jerzym Długońskim i dr Mariuszem Krupińskim z Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego, zbadaliśmy także estrogenność DBP w drożdżowym teście YES (ang. *Yeast Estrogen Screen*). Stosowany w tym teście szczep drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* posiada w swoim genomie gen kodujący ludzki ER typu α (hER α), którego aktywacja powoduje ekspresję genu reporterowego *lacZ* i produkcję β -galaktozydazy metabolizującej w podłożu żółty indykator do czerwonego produktu. Stężenie β -galaktozydazy ocenia się spektrofotometrycznie.

W naszym doświadczeniu żadna z badanych dawek DBP nie wpłynęła negatywnie na wzrost jądra, rozwój kanalików plemnikotwórczych, liczbę komórek płciowych i

Sertoliego oraz poziomy hormonów płciowych we krwi. Nie zaobserwowano także dodatniego wpływu niskich dawek DBP na rozwój jądra, tak jak to miało miejsce dla innego ksenoestrogenu DEHP [21]. Pomimo tego wyniki uzyskane w teście YES potwierdziły estrogenność DBP. Zdolność jego wiązania do hER α okazała się jednak niska w porównaniu do czystego chemicznie estradiolu i zachodziła dopiero w stężeniach 10^7 razy wyższych. Jednakże należy pamiętać, że środowiskowy wpływ związków o aktywności estrogennej nie powinien być rozważany jako oddziaływanie tylko pojedynczego związku na organizm. Na przykład mieszanina DBP i czystego chemicznie estradiolu [23], czy też kilku różnych związków o niskim potencjale estrogennym w dawkach poniżej najwyższego stężenia, które nie powoduje żadnych spostrzegalnych zmian w testowanym organizmie (NOEC, ang. *No Observed Effect Concentration*) [25], wykazują addytywny efekt w drożdżowym teście YES *in vitro*.

Podsumowanie badań nad działaniem ksenoestrogenów

Wykazaliśmy, że podobnie jak w badaniach nad fizjologią rozwoju jąder, działanie ksenoestrogenów, jak i czystego chemicznie estradiolu, w okresie dojrzewania samca szczura powoduje hamowanie wzrostu jądra, zmniejszenie liczebności komórek Sertoliego oraz komórek plemnikotwórczych. Siła efektu ksenoestrogenu uzależniona była od dawki oraz aktywności estrogennej związku. Nasze wyniki, oprócz potwierdzenia niekorzystnego wpływu DES na rozwój kanalików plemnikotwórczych w okresie dojrzewania po raz pierwszy wykazały także negatywny wpływ ZEA w stosowanych przez nas dawkach (10^2 i 10^3 razy wyższe od dopuszczalnego dziennego spożycia tego ksenoestrogenu dla ludzi). Z kolei DBP, podawane także w dawkach 10^2 i 10^3 razy wyższych od dopuszczalnego dziennego spożycia tego ksenoestrogenu dla ludzi, nie wywołało żadnych zmian w badanych parametrach pomimo potwierdzonej w teście YES estrogenności tego związku. Jednakże należy pamiętać, że środowiskowy wpływ związków o aktywności estrogennej nie powinien być rozważany jako oddziaływanie tylko pojedynczego związku na organizm, gdyż w otoczeniu człowieka występuje zwykle kilka takich substancji, które mogą wykazywać efekt addytywny. Należy podkreślić, że o ile narażenie środowiskowe u ludzi na DES obecnie praktycznie nie istnieje, to ZEA i DBP są substancjami, które często można spotkać w środowisku.

Publikacja nr 6

Walczak-Jędrzejowska R, Kula K. „Rola steroidowych hormonów jądra i ich interakcji przy wywołaniu dojrzewania kanalików plemnikotwórczych”. W: *Układ płciowy męski, Badania kliniczne i doświadczalne. Pod redakcją M. Piaseckiej. Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. 2013; 292-309*

Uzupełnieniem cyklu moich prac jest rozdział w książce, w którym podsumowałam aktualny stan wiedzy na temat regulacji hormonalnej procesu spermatogenezy przy wywołaniu dojrzewania kanalików plemnikotwórczych. Na podstawie danych literaturowych oraz wyników badań własnych przedstawiłam nowe poglądy na temat roli FSH, testosteronu i estradiolu oraz ich wzajemnych interakcji w tym procesie.

Bibliografia

1. Kula K. Induction of precocious maturation of spermatogenesis in infant rats by human menopausal gonadotropin and inhibition by simultaneous administration of gonadotropins and testosterone. *Endocrinology*. 1988 ; 122(1):34-39
2. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22 (3):289-318
3. Bilińska B, Wiszniewska B, Kosiniak-Kamysz K, Kotula-Balak M, Gancarczyk M, Hejmej A, Sadowska J, Marchlewicz M, Kolasa A, Wenda-Rózewicka L Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. *Reprod Biol* 2006; 6 Suppl 1:43-58
4. Jahnukainen K., Chrysis D., Hou M., Parvinen M., Eksborg S. and Soder O. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod* 2004; 70:290-296
5. O'Shaughnessy PJ. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29:55-65
6. Słowikowska-Hilczer J. Xenobiotics with estrogenic and antiandrogenic action – disruptors of the Male reproductive system. *CEJMed* 2006; 1(3): 205-227
7. Kula K, Walczak-Jędrzejowska R, Słowikowska-Hilczer J, Oszukowska E. Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178 (1-2): 89-97
8. Lucas TF, Siu ER, Esteves CA, Monteiro HP, Oliveira CA, Porto CS, Lazari MF. 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 2008; 78(1): 101-114
9. Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 2002; 17: 1811-1819
10. Atanassova N, McKinnell C, Turner KJ, Walker M, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe RM. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the

- relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 2000; 141: 3898-3907
11. Putz O, Schwartz C, LeBlanc G, Cooper R, Prins G. Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: II. Effects on male puberty and the reproductive tract *Biol Reprod* 2001; 65: 1506–1517
 12. Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003; 18: 1383-1394
 13. Kim, I. H., Son, H. Y., Cho, S. W., Ha, C. S., i Kang, B. H. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Lett* 2003; 138: 185-192
 14. Yang JY, Wang GX, Liu JL, Fan JJ, Cui S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. . *Reprod Toxicol* 2007; 24: 381-387
 15. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138: 863-870
 16. Jefferson WN, Padilla-Banks E, Clark G, Newbold RR. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 777: 179-189
 17. Gancarczyk M, Paziewska-Hejmej A, Carreau S, Tabarowski Z, Bilińska B. Dose- and photoperiod-dependent effects of 17beta-estradiol and the anti-estrogen ICI 182,780 on testicular structure, acceleration of spermatogenesis, and aromatase immunoreexpression in immature bank voles. *Acta Histochem* 2004; 106: 269-278.
 18. Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, Walker M, Fisher JS, Sharpe RM. Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis. *Endocrinology* 2005; 146: 613-623
 19. Hallmark N, Walker M, McKinnell C, Mahood IK, Scott H, Bayne R, Coutt S, Anderson RA, Greig I, Morris K, Sharpe RM. Effects of monobutyl and di(n-butyl) phthalate in vitro on steroidogenesis and Leydig cell aggregation in fetal testis explants from the rat: comparison with effects in vivo in the fetal rat and neonatal marmoset and in vitro in the human. *Environ Health Persp* 2007; 115: 390-396
 20. Kim HS, Kim TS, Shin JH, Moon HJ, Kang IH, Kim IY, Oh JY, Han SY. Neonatal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductive-tract development. *J Toxicol Environ Health A* 2004; 67: 2045-2060
 21. Ge RS, Chen GR, Dong Q, Akingbemi B, Sottas CM, Santos M, Sealfon SC, Bernard DJ, Hardy MP. Biphasic effects of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. *J Androl* 2007; 28: 513-520
 22. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 582-587
 23. Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter, JP. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 802-811
 24. Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB. Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol Sci* 1998; 46: 282-293
 25. Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from "nothing"—eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol* 2002; 36(8): 1751-1756

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Ukończyłam studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego w roku 1991 (kierunek biologia, specjalizacja biologia molekularna). W latach 1991-1997 pracowałam na etacie Szpitala Klinicznego nr 3 w Łodzi (obecnie Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. WAM - Centralny Szpital Weteranów) jako asystent w Pracowni Andrologii Klinicznej Instytutu Endokrynologii. W tym czasie zajmowałam się głównie reorganizacją laboratorium semiologicznego i histopatologicznego, a także organizowałam od podstaw laboratorium immunohistochemiczne. Między innymi moim zadaniem było, i jest obecnie, dostosowywanie procedur badania nasienia do zmieniających się wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia, które pojawiały się cyklicznie co kilka lat (1992, 1999 i 2010). Zajmowałam się też wdrożeniem diagnostyki immunohistochemicznej wczesnych zmian nowotworowych w jądrze oraz stereologicznych metod ilościowej analizy nabłonka plemnikotwórczego i gruczołu śródmięzszowego jądra. Wprowadzane przez mnie metody były w następnych latach wykorzystywane w działalności naukowej prowadzonej w naszej jednostce. Uczestniczyłam też w badaniach doświadczalnych na zwierzętach, co umożliwiło mi zapoznanie się z procedurami, które następnie wykorzystałam przy planowaniu i realizacji badań będących podstawą mojej dalszej pracy naukowej.

W okresie tym brałam także udział w działalności naukowej jednostki. Badania, w których uczestniczyłam dotyczyły diagnostyki andrologicznej, hormonalnej regulacji zapoczątkowania spermatogenezy oraz stanu przedrakowego w jądrze ludzkim (CIS, *łac. Carcinoma in situ*). Wynikiem tej działalności jest praca oryginalna (*załącznik 4, poz. II D, 1*) dotycząca diagnostyki andrologicznej, która porównuje dwie metody oceny żywotności plemników w relacji do pozostałych parametrów badania nasienia. Jestem też współautorem 7 doniesień naukowych przedstawianych na konferencjach krajowych i zagranicznych, (*załącznik 4, poz. III B, 1-7*) i jednego rozdziału o stanie przednowotworowym w jądrze w podręczniku „Patologia jądra i moszny” (*załącznik 4, poz. II E, 1*). W roku 1996 jedna z naszych prac, dotycząca zmian hormonalnych u dzieci z zaburzeniami rozwoju płciowego przy zwiększonym występowaniu w jądrze płodowych komórek płciowych (gonocytów), które uległy transformacji nowotworowej (*załącznik 4, poz. III B, 4*), otrzymała wyróżnienie na 9th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis w Geilo w Norwegii (*załącznik 4, poz. II J, 1*).

W roku 1996 rozpoczęłam własne badania doświadczalne nad hormonalną kontrolą spermatogenezy pod kierunkiem prof. dr. hab. n. med. Krzysztofa Kuli, których wynikiem

była moja rozprawa doktorska obroniona w roku 2000 pt.: „Hormon folikulotropowy (FSH), estradiol, testosteron i prolaktyna a wzrost jądra i spermatogoniogeneza w okresie dojrzewania płciowego”. W pracy tej wykazałam po raz pierwszy, że w okresie przeddojrzewaniowym u szczurów estradiol hamuje dojrzewanie jądra, ale podany łącznie z FSH nasila stymulujący wpływ FSH na zainicjowanie spermatogenezy. W roku 1997 wstępne wyniki mojej pracy doktorskiej zaprezentowane zostały w formie doniesienia naukowego na 6. Międzynarodowym Kongresie Andrologii w Salzburgu (Austria) (*załącznik 4, poz. III B, 9*), gdzie zostały nagrodzone Nagrodą Indywidualną Komitetu Naukowego Kongresu (*załącznik 4, poz. II J, 2*). Końcowe wyniki mojej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w roku 2001 w czasopiśmie *Molecular and Cellular Endocrinology* (*załącznik 4, poz. II A, 1*). Publikacja ta została następnie nagrodzona w roku 2002 Nagrodą Polskiego Towarzystwa Endokrynologów Dziecięcych za najlepszą pracę badawczą opublikowaną w roku 2001 (*załącznik 4, poz. II J, 5*).

Od roku 1997 zatrudniona jestem w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w tej samej jednostce organizacyjnej - obecnie Katedrze Andrologii i Endokrynologii Płodności. W ramach swojej działalności naukowej uczestniczyłam w projektach badawczych, których zakres dotyczył m.in. hormonalnej kontroli spermatogenezy, patogenezy zmian nowotworowych w jądrze; czynników endokrynologicznych, genetycznych i psychosocjalnych starzenia się mężczyzn; endokrynologicznych, molekularnych i psychologicznych aspektów zaburzeń różnicowania płciowego; przyczyn i diagnostyki zaburzeń płodności mężczyzn.

Hormonalna kontrola zapoczątkowania spermatogenezy – badania doświadczalne

W ramach badań doświadczalnych nad hormonalną kontrolą spermatogenezy, oprócz tych których efektem była moja praca doktorska oraz cykl prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe (*załącznik 4, poz. I B, 1-6*), w latach 1999-2001, 2003-2005 i 2008-2010 uczestniczyłam w trzech pracach własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, jako wykonawca (2 projekty) i kierownik (1 projekt). Badania te dotyczyły wpływu podawania hormonów tarczycy oraz FSH, a także testosteronu, estradiolu i ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG, *ang. human Chorionic Gonadotropin*) na: 1) rozwój jądra w okresie płodowym oraz różnicowanie płodowych komórek płciowych, gonocytów, do spermatogonii, 2) zapoczątkowanie procesu spermatogenezy i różnicowanie pierwszych spermatogonii do komórek plemnikotwórczych wyższych

etapów, 3) namnażanie i dojrzewanie komórek Sertoliego oraz 4) formowanie międzykomórkowych połączeń szczelinowych w nabłonku plemnikotwórczym.

Wyniki badań pracy własnej kierowanej przez prof. Jolantę Słowikowską-Hilczer (*Badania nad rolą hormonów tarczycy w rozwoju kanalik plemnikotwórczego w okresie przeddojrzewaniowym u szczur;*, załącznik 4, poz. II I, 12) wykazały, że okres między 19 dobą życia płodowego a 8 dobą życia po urodzeniu u szczura jest krytyczny dla rozwoju kanalików jądra i różnicowania płodowych komórek płciowych, gonocytów, do spermatogonii. Brak hormonów tarczycy na tym etapie rozwoju powoduje zahamowanie różnicowania gonocytów i zmiany przypominające dysgenezę gonad u ludzi. Wskazuje to, że hormony tarczycy biorą udział w regulacji pierwszej spermatogenezy, a ich niedobór powoduje patologiczną akumulację gonocytów (załącznik 4, poz. II D, 27). Wyniki te zostały przedstawione na I Europejskim Kongresie Andrologicznym, w L'Aquila we Włoszech w roku 2000 (załącznik 4, poz. III B, 20), gdzie otrzymały Nagrodę Europejskiej Akademii Andrologii (załącznik 4, poz. II J, 4).

Wyniki kolejnej pracy własnej, której byłem kierownikiem (*Alternatywne i synergistyczne działanie gonadotropin, testosteronu, estradiolu i trijodotyroniny na zapoczątkowanie spermatogenezy;* załącznik 4, poz. II I, 13) wykazały, że podawanie niedojrzałym szczurom estradiolu i testosteronu łącznie przyspiesza wzrost jądra, oraz dojrzewanie komórek Sertoliego, a także zwiększyło liczbę komórek plemnikotwórczych. Z kolei podawanie szczurom hCG hamowało zapoczątkowanie pierwszej spermatogenezy prawdopodobnie w wyniku obniżenia biosyntezy estradiolu i/lub podwyższenia wytwarzania testosteronu i tym samym zachwiania równowagi między poziomami wytwarzanych steroidów płciowych (załącznik 4, poz. II D 28, 29). Dodatkowo, w ramach tej pracy własnej powstał jeden artykuł poglądowy (załącznik 4, poz. II D, 12).

Wyniki trzeciej z prac własnych, której kierownikiem była dr n. med. Katarzyna Marchlewska (*Wpływ trijodotyroniny oraz trijodotyroniny podawanej łącznie z FSH, testosteronem i estradiolem w okresie dojrzewania płciowego na zainicjowanie spermatogenezy oraz spermatogenezę u dojrzałych płciowo szczurów;* załącznik 4, poz. III I, 18) wykazały, że trijodotyronina, działając przez krótki okres przy zapoczątkowaniu spermatogenezy (od urodzenia do 5 doby życia szczura), przyspiesza rozwój pierwszych spermatogonii, przy równoczesnym wzmożeniu różnicowania, proliferacji oraz degeneracji komórek plemnikotwórczych. Doprowadza to w 16 dobie życia do przedwczesnego zakończenia pierwszych etapów spermatogenezy. Zmiany te ulegają normalizacji, kiedy trijodotyronina jest podawana w sposób ciągły (od urodzenia do 15 doby życia szczura).

Dodatkowo, hormon ten wykazuje dwufazowy wpływ na namnażanie komórek Sertoliego. Efekt pobudzający jest ograniczony do kilku pierwszych dni po urodzeniu szczura, podczas gdy efekt hamujący pojawia się podczas dalszego rozwoju jądra (*załącznik 4, poz. II A, 5*). Badano też wpływ trijodotyroniny na ekspresję koneksyny 43, białka międzykomórkowych połączeń szczelinowych, w okresie dojrzewania jądra i zapoczątkowania spermatogenezy. Wyniki wykazały, że podawanie trijodotyroniny niedojrzałym szczurom powodowało przyspieszone formowanie i dojrzewanie połączeń szczelinowych co wiązało się ze zmianą ich lokalizacji między przylegającymi komórkami Sertoliego. Z kolei podawanie trijodotyroniny z FSH wywoływało efekt hamujący doprowadzając do uszkodzenia połączeń, co wiązało się ze wzrostem degeneracji komórek plemnikotwórczych (*załącznik 4, poz. II A, 6, 7, 14*). Oprócz wymienionych publikacji uzyskane wyniki były także prezentowane w formie doniesień naukowych na międzynarodowych i krajowych konferencjach.

Patogenezy zmian nowotworowych w kanalikule plemnikotwórczym jądra

W latach 1996-1999 i 2005-2007 byłam wykonawcą w dwóch pracach własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (*Badania nad występowaniem płodowych komórek rozrodczych (carcinoma in situ) w gonadach chłopców i mężczyzn z wysokim ryzykiem rozwoju raka jądra; Badanie stanu czynnościowego komórek Sertoliego i Leydiga w zespole dysgenetycznych jąder; załącznik 4, poz. II I, 11, 14; kierownik prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer*), oraz w granie Komitetu Badań Naukowych (*Badania doświadczalne i kliniczne nad rolą hormonów w dojrzewaniu jądra, w patologii spermatogenezy oraz promocji rozwoju raka jądra; załącznik 4, poz. II I, 2; kierownik prof. dr hab. med. Krzysztof Kula*), będących kontynuacją badań nad przedinwazyjnym nowotworem jądra wywodzącym się z komórek płciowych.

Badania prowadzone były na materiale archiwalnym biopsji ludzkich jąder z zastosowaniem procedur histologicznych i immunohistochemicznych. Płodowe komórki płciowe wykrywane były przez ocenę histopatologiczną oraz reakcję immunohistochemiczną na obecność wspólnego markera dla gonocytów i komórek CIS, jakim jest fosfataza alkaliczna typu łożyskowego (PLAP, *ang. Placental-like alkaline phosphatase*). Przeprowadzono także reakcje immunohistochemiczne na obecność innych antygenów płodowych - TRA-1-60 i M2A. Potencjał proliferacyjny płodowych komórek płciowych oceniany był przy pomocy reakcji immunohistochemicznej na obecność jądrowego antygeny proliferacji komórkowej (PCNA). W kanalikach jądra prowadzona była ilościowa analiza

komórek plemnikotwórczych i komórek Sertoliego oraz morfometria kanalików jądra z zastosowaniem komputerowego systemu do analizy obrazu.

Na podstawie uzyskanych wyników między innymi udało się określić częstość występowania płodowych komórek płciowych (PLAP-dodatnie gonocyty) w różnych grupach ryzyka rozwoju nowotworów jawnych wywodzących się z komórek płciowych (GCT, ang. *Germ Cell Tumours*). Po raz pierwszy wykazaliśmy, że u dzieci z zaburzeniami różnicowania płciowego częstość ta jest wysoka i sięga ok. 43% (załącznik 4, poz. II A, 1). Następnie badana była obecność antygenów płodowych w komórkach CIS i GCT w jądrach dzieci z dysgenезją gonad i biopsjach z jąder mężczyzn operowanych wcześniej z powodu GCT jednego jądra. Przy dysgenезji gonad u dzieci w wieku od 1 do 3 lat i u mężczyzn z GCT obecne były w komórkach CIS wszystkie antygeny płodowe. Ekspresja antygenów była natomiast nieobecna w gonadach dzieci w wieku od 5 do 8 lat. Wynika z tego, że płodowy fenotyp antygenowy komórek CIS może ulec samoistnemu zanikowi wraz z wiekiem. U mężczyzn z GCT płodowe antygeny komórek CIS przetrwały poza okres rozwojowy w drugim jądrze, co wspiera teorię, że GCT pochodzi z komórek CIS oraz, że CIS utrzymuje się w jądrach u dorosłych mężczyzn i może dać początek GCT (załącznik 4, poz. II D, 2). Dalsze badania ukierunkowane były na poszukiwanie powiązań pomiędzy stopniem rozwoju kanalików plemnikotwórczych i zaawansowaniem procesu spermatogenezy a występowaniem GCT i jego formy przedinwazyjnej (CIS) u dorosłych mężczyzn z zaburzeniami organogenezy jąder (tzw. zespół dysgenetycznych jąder - TDS, ang. *Testicular Dysgenesis Syndrome*). Do badań włączeni byli pacjenci z rozpoznaniem nowotworem jądra (analizowana biopsja z pozostawionego jądra przeciwległego), z wnetrostwem leczonym chirurgicznie w dzieciństwie oraz zaburzeniem płodności, objawiającym się brakiem lub małą liczbą plemników w nasieniu (azoospermia, oligozoospermia). Wstępne badania z zastosowaniem precyzyjnych metod oceny histologicznej tkanki jądra oraz metod immunohistochemicznej detekcji markerów dojrzałości komórek Sertoliego pozwoliły na wykazanie, że zaburzenie rozwoju/dojrzenia kanalików plemnikotwórczych występuje w jądrze aż u 83% mężczyzn z historią operowanego w dzieciństwie wnetrostwa. W jądrach stwierdzono zahamowanie spermatogenezy, obecność kanalików z niedojrzałymi komórkami Sertoliego, zmniejszenie średnicy kanalików, pogrubienie błony podstawnej kanalika oraz powiększenie przestrzeni międzykanalikowych. Upośledzenie rozwoju kanalików plemnikotwórczych wiązało się z występowaniem zwiększonego odsetka zmian nowotworowych w jądrze sugerując, że sprowadzenie jąder do moszny może nie zapobiec

wystąpieniu cech dysgenezy jąderek i związanego z tym ryzyka rozwoju GCT (*załącznik 4, poz. II D, 31*). Publikacja opisująca te wyniki została nagrodzona Nagrodą Młodych Polskiego Towarzystwa Andrologicznego w roku 2008 (*załącznik 4, poz. II J, 9*).

Analiza gonad pochodzących od mężczyzn ze zdiagnozowanym już nowotworem jąderek oraz zaburzeniem płodności pozwoliła jednoznacznie wykazać, że zmiany nowotworowe obserwowane są tylko przy współistniejących zaburzeniach procesu spermatogenezy oraz cechach dysgenezy jąderek sugerując, że cechy dysgenezy jąderek determinują ryzyko rozwoju GCT. Jednakże, występowanie zaawansowanych cech dysgenezy jąderek nie powodowało zwiększenia ryzyka wystąpienia GCT, a wręcz przeciwnie zmniejszało ryzyko. Sugeruje to, że transformacja nowotworowa wymaga obecności dobrze rozwiniętych kanalików plemnikotwórczych (*załącznik 4, poz. II A, 4*).

Obecnie jestem wykonawcą w projekcie naukowym Narodowego Centrum Nauki, który realizowany jest w latach 2013-2016 (*Ocena integralności chromatyny plemnikowej oraz dojrzałości czynnościowej plemników u mężczyzn ze zmianami nowotworowymi w jądrach; załącznik 4, poz. II I, 8*; kierownik projektu prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczler). Projekt ten ma na celu zbadanie wpływu procesu nowotworowego w gonadzie męskiej na jakość plemników. Ocena czynności plemników w nasieniu mężczyzn, którzy chorują na raka jądra lub posiadają komórki CIS w kanalikach plemnikotwórczych pozwoli na wnioskowanie o jakości podziału redukcyjnego komórek spermatogenezy oraz procesie różnicowania i dojrzewania plemników. Istotnym aspektem tych badań jest także zbadanie czy proces nowotworowy zachodzący w gonadzie wpływa na integralność chromatyny plemnikowej.

Badania nad czynnikami hormonalnymi, genetycznymi i psychosocjalnymi starzenia się mężczyzn

W latach 2002-2009 jako wykonawca uczestniczyłam w badaniach wielośrodkowych w ramach programu badawczego Komisji Europejskiej (5. Program Ramowy) (*Badania nad starzeniem się mężczyzn w Europie: częstość występowania i rozkład geograficzny objawów starzenia się mężczyzn oraz ich zależność od czynników endokrynologicznych, genetycznych i psychosocjalnych. akronim EMAS; załącznik 4, poz. II I, 4*; kierownikiem projektu ze strony polskiej: prof. dr hab. med. Krzysztof Kula). W ramach tego projektu współpracowałam z następującymi ośrodkami zagranicznymi w Europie:

- Department of Endocrinology, Manchester Royal Infirmary, Victoria University of Manchester, Wielka Brytania,
- Scanian Andrology Centre, Department of Urology, Malmö University Hospital, Malmö, Szwecja,
- Andrology Unit, United Laboratories of Tartu University Clinics, Tartu, Estonia,
- Department of Obstetrics, Gynaecology and Andrology, Albert Szent-Gyorgy Medical University, Szeged, Węgry,
- Department of Andrology and Endocrinology, Centre of Metabolic Bone Diseases, Catholic University of Leuven, Belgia,
- Department Medicina, Laboratorio de Endocrinology Molecular, Universidade de Santiago de Compostela, Hiszpania,
- Andrology Unit, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Włochy.

W badaniu tym wzięło w sumie udział 3300 mężczyzn, którzy na początku badania byli w wieku 40-79 lat. W naszym ośrodku zbadano 408 mężczyzn w I fazie i 330 po upływie 4 lat (faza II). U wszystkich mężczyzn wykonane były następujące badania: 1) kwestionariusze dotyczące danych socjodemograficznych, stanu zdrowia, jakości życia seksualnego, nawyków żywieniowych oraz stosowanych używek, 2) ocena sprawności fizycznej oraz intelektualnej/poznawczej przy zastosowaniu odpowiednich testów, 3) pomiary antropometryczne, 4) pomiary ciśnienia krwi, 5) wskaźnik kostka-ramię, 6) pomiary ultrasonograficzne kości piętowej, 7) badania laboratoryjne: morfologia krwi, biochemia, stężenia hormonów we krwi (płciowych, oraz innych hormonów i czynników związanych z metabolizmem), oraz 8) badania molekularne. Wyniki uzyskane w ramach tego projektu wykazały m.in. że otyłość i choroby ogólnoustrojowe są najważniejszymi czynnikami warunkującymi zależne od wieku obniżenie poziomu testosteronu we krwi. Dzięki projektowi udało się też opracować minimalne kryteria rozpoznania hipogonadyzmu wieku późnego (LOH, ang. *Late Onset Hypogonadism*) u zdrowych mężczyzn. Są nimi: 1) symptomy kliniczne związane z aktywnością seksualną mężczyzn, oraz 2) niskie stężenie testosteronu całkowitego we krwi (<11 nmol/L) lub testosteronu wolnego (220 pmol/L). Okazało się, że przy zastosowaniu tych kryteriów występowanie LOH w ogólnej populacji starszych mężczyzn w Europie wynosiło 2,1%. Wyniki te zostały opublikowane w prestiżowym brytyjskim czasopiśmie *New England Journal of Medicine* w 2010 roku (załącznik 4, poz. II A, 22). Wynikiem realizacji tego projektu jest

seria 32 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, z moim udziałem jako członka grupy badawczej EMAS Study Group o łącznym IF=205,385 i sumie punktów MNiSW = 1071 (załącznik 4, poz. II A, 16-47). Oprócz tego jestem współautorem 6 doniesień zjazdowych prezentujących wyniki tych badań (załącznik 4, poz. III B, 33, 34, 36, 40, 41, 43). Udział mój w projekcie został nagrodzony w 2010 roku Nagrodą Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za osiągnięcia promujące Uczelnię (załącznik 4, poz. II J, 10).

W latach 2005-2006 brałam udział jako wykonawca w grantie Prezydenta Miasta Łodzi (*Ocena ryzyka i przyczyn rozwoju zaburzeń metabolicznych sprzyjających starzeniu się mężczyzn mieszkańców Łodzi, ze szczególnym uwzględnieniem grupy wiekowej 20-39 lat*; załącznik 4, poz. II I, 5; kierownik: prof. Jolanta Słowikowska-Hilczer). Głównym celem projektu była ocena wpływu stylu życia na stan zdrowia fizycznego, psychicznego i seksualnego młodych mężczyzn. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać m.in., że 1) u młodych mężczyzn z aglomeracji łódzkiej, w porównaniu z innymi regionami Polski, obserwuje się zwiększoną częstość występowania czynników ryzyka miażdżycy (załącznik 4, poz. II D, 5), 2) u mężczyzn poniżej 40 roku życia zaburzenia erekcji występują głównie w postaci łagodnej, ale z częstością znacznie wyższą niż publikowano dotychczas, 3) zmniejszanie indeksu wolnego testosteronu (ang. *free testosterone index* – FTI) wraz z wiekiem oraz duża częstość występowania czynników ryzyka miażdżycy stanowią potencjalne zagrożenie rozwojem cięższych postaci zaburzeń erekcji u starszych mężczyzn (załącznik 4, poz. II D, 6), 4) u zdrowych, młodych mężczyzn (20-39 lat) niskie stężenie lipidów we krwi może wpływać na samopoczucie, podczas gdy obniżone stężenie testosteronu powoduje obniżenie samopoczucia u mężczyzn starszych (40-49 lat) (załącznik 4, poz. II A, 3), 5) u młodych mężczyzn otyłość może prowadzić do pogorszenia erekcji na skutek obniżenia stężenia testosteronu we krwi jako jedynej przyczyny (załącznik 4, poz. II A, 11), 6) u młodych mężczyzn wpływ hormonów płciowych gonad na kości może zależeć od wieku i stężenia krążącego we krwi estradiolu (załącznik 4, poz. II A, 10).

W latach 2005-2006, w ramach współpracy z prof. dr hab. med. Jerzym K. Wranczem z Katedry Kardiologii i Kardiochirurgii UM w Łodzi, badaliśmy korelacje pomiędzy stężeniami steroidów płciowych we krwi, profilem lipidowym a stopniem zwężenia światła naczyń wieńcowych w przebiegu choroby niedokrwiennej serca. Wyniki tych badań wskazują, że o ile zwiększone stężenia zarówno testosteronu, jak i estradiolu, we krwi mogą predysponować do wystąpienia miażdżycowego profilu lipidowego i

stanowią czynnik predykcyjny w stosunku do liczby i stopnia zwężeń naczyń w przebiegu choroby niedokrwiennej serca, o tyle podwyższone stężenie samego testosteronu we krwi związane było ze zmniejszeniem liczby zwężeń naczyń, co może wskazywać na korzystny wpływ testosteronu na naczynia wieńcowe (*załącznik 4, poz. II D, 4*). Jestem także współautorem 2 prac poglądowych (*załącznik 4, poz. II D, 14, 15*) i jednego doniesienia zjazdowego na ten temat (*załącznik 4, poz. III B, 46*).

Endokrynologiczne, molekularne i psychologiczne aspekty zaburzeń różnicowania płciowego (ZRP)

W latach 2010-2013 brałam udział jako wykonawca w grantie MNiSW (*Molekularne uwarunkowania zaburzeń różnicowania i rozwoju gonad oraz ich klinicznych konsekwencji; załącznik 4, poz. II I, 6*; kierownik: prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer). Celem realizowanego projektu było poszukiwanie zmian genetycznych odpowiedzialnych za ZRP, a także ocena rozwoju fizycznego i stanu psychicznego u dorosłych osób z ZRP oraz poznanie historii naturalnej zmian patologicznych w ich gonadach, w szczególności występowania przedinwazyjnych i inwazyjnych zmian nowotworowych oraz cech dysgenezy gonad. Grant był realizowany we współpracy z prof. Ewą Rajpert de Meyts z Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet w Kopenhadze (Dania). Do tej pory, przy wykorzystaniu TruSeq Custom Amplicons, u 70 pacjentów wykonana była analiza sekwencji kodujących (genotypowanie) 80 różnych genów biorących udział w rozwoju układu płciowego (tzw. panel „DSD”) w poszukiwaniu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). Uzyskane dane były wstępnie analizowane przy pomocy programu GATK w celu wyszukania rzadkich wariantów SNP (<0.01 w 1 kG sekwencji) i uchwycenia ewentualnej asocjacji z zaburzeniem genetycznym. Najwięcej rzadkich wariantów znalezionych zostało w następujących genach *CYP21A2, AR, HSD3B1, FGFR3, JMJD1C, MAP3K1, WWOX, CGB8 19, DHCR7, GPRC6A, INSR 19, KALI X, HSD17B3*. Uzyskane wyniki będą w najbliższym czasie weryfikowane z wynikami pochodzącymi z materiału biologicznego od zdrowych członków rodziny, aby wykluczyć, że wykryte polimorfizmy SNP są populacyjno-specyficzne.

Istotnym aspektem tych badań była także ocena stanu psychicznego osób z ZRP, które z powodu kontrowersji co do postępowania diagnostycznego i terapeutycznego, braku algorytmów oraz indywidualnego podejścia do każdego przypadku mają często obniżoną samoocenę i stany depresyjne (*załącznik 4, poz. II D, 8*).

Kolejnym projektem, związanym z tym tematem badawczym, realizowanym w latach 2012-2016, w którym biorę udział jako badacz, jest projekt Komisji Europejskiej (7 Program Ramowy, HEALTH.2012.2.4.4, *Observational trials in rare diseases*) (*Clinical European study on the outcome of surgical and hormonal therapy and psychological intervention in disorders of sex development (DSD)*); akronim *DSD-life*; załącznik 4, poz. II I, 7; kierownik projektu ze strony polskiej: prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer). W ramach realizacji programu współpracuję z następującymi ośrodkami zagranicznymi w Europie:

- Charite – Universitaetsmedizin, Berlin, Niemcy
- Erasmus Universitair Medisch Centrum, Rotterdam, Holandia
- Karolinska Institutet, Sztokholm, Szwecja
- Universitaet Zu Luebeck, Lubeka, Niemcy
- The University Of Birmingham, Birmingham, Wlk. Brytania
- Instytut „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

Głównym celem realizowanego projektu jest poprawa leczenia i opieki nad osobami z różnymi chorobami spowodowanymi zaburzeniami hormonalnymi gonad i nadnerczy (pacjenci m.in. z zespołem Turnera, zespołem Klinefeltera, mieszaną dysgenezą gonad, zespołem niewrażliwości na androgeny, dysgenezą gonad z kariotypem XY i XX, zaburzeniami biosyntezy androgenów, wrodzonym przerostem nadnerczy i spodziectwem). Oprócz oceny stanu fizycznego i psychicznego uczestników ocenie podlegać będzie także stopień satysfakcji z dotychczasowego leczenia osób z ZRP. Umożliwi to poznanie ich poglądu na temat tego, w jaki sposób społeczeństwo i w szczególności pracownicy opieki zdrowotnej, odnoszą się do ich choroby. Konsekwencją tych badań będzie edukacja lekarzy, pielęgniarek, nauczycieli i całego społeczeństwa na temat potrzeb i sposobu opieki nad osobami z tymi rzadkimi zaburzeniami poprzez stworzenie wiarygodnych materiałów informacyjnych.

Przyczyny i diagnostyka zaburzeń płodności mężczyzn

Od samego początku moja działalność naukowa wiązała się także z diagnostyką zaburzeń męskiej płodności. Moje zainteresowania skupiały się głównie na problemie standaryzacji badania nasienia w laboratoriach seminologicznych w kraju. W ramach powołanej przez Polskie Towarzystwa Andrologiczne Komisji do Spraw Konsensusu Lekarsko-Diagnostycznego, której jestem członkiem, w 2010 roku po raz pierwszy w kraju

zostały opracowane standardy wykonywania badania nasienia metodą manualną wg aktualnych rekomendacji Światowej Organizacji Zdrowia (*załącznik 4, poz. IID, 19*). Obecnie na zaproszenie Prezesa Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych w ramach tej samej Komisji opracowane zostały rekomendacje dotyczące badania nasienia dla polskich laboratoriów seminologicznych (*załącznik 4, poz. II D, 25*).

W latach 2011-2012 byłam współautorem badania ankietowego nt. procedur wykonywania badania nasienia, które zostało przeprowadzone wśród 55 pracowników laboratoriów seminologicznych w Polsce. Badanie to wykazało, że tylko w jednym z 55 ankietowanych laboratoriów wszystkie procedury wykonywane były wg rekomendacji WHO, co jednoznacznie wskazuje na niską jakość diagnostyki seminologicznej dostępnej w naszym kraju. Wyniki tych badań zostały opublikowane w roku 2013 w postaci pracy oryginalnej (*załącznik 4, poz. II A, 9*). Jest to pierwsza taka analiza w kraju poruszająca ten istotny problem. Jak ważny jest to problem, także na świecie, może świadczyć fakt, że w roku 2014 Komitet Naukowy Royan International Research Award zaprosił autorów publikacji do złożenia wniosku do konkursu o w/w nagrodę. Jestem także współautorem dwóch innych prac oryginalnych dotyczących diagnostyki seminologicznej. W pierwszej z nich porównywana była precyzja w ocenie koncentracji plemników przy wykorzystaniu komory Maklera oraz rekomendowanej przez WHO udoskonalonej komory Neubauera (*załącznik 4, poz. II D, 7*). W drugiej pracy analizowany był wpływ występowania różnych szczepów bakterii w próbie nasienia na parametry badania nasienia (*załącznik 4, poz. II A, 12*). W przygotowaniu są olejne prace oryginalne dotyczące m.in.: 1) analizy relacji pomiędzy komórkami okrągłymi występującymi w nasieniu a parametrami nasienia, 2) standaryzacji badania nasienia w polskich laboratoriach, w szczególności procesu wprowadzania do laboratoriów zalecanych procedur, 3) dostępności w polskich laboratoriach badań dodatkowych wykonywanych w nasieniu. Obecnie tematyka, która jest dla mnie szczególnie interesująca dotyczy roli stresu oksydacyjnego w niepłodności męskiej oraz możliwości oceny jego występowania w plazmie nasienia i uszkodzeń oksydacyjnych w plemnikach. Jestem współautorem oraz autorem 3 publikacji poglądowych o tej tematyce (*załącznik 4, poz. II D, 21, 23, 24*). Byłam opiekunem 1 pracy magisterskiej i promotorem 2 prac magisterskich studentów z Oddziału Analityki Medycznej Wydziału Farmacji UM w Łodzi, których tematyka koncentrowała się na doskonaleniu diagnostyki seminologicznej.

W roku 2013, rozpoczęłam współpracę z dr inż. Katarzyną Andraszek i dr inż. Dorotą Banaszewską z Instytutu Bioinżynierii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu

Humanistyczno-Przyrodniczego w Siedlcach. We wspólnych badaniach analizowana była budowa morfologiczna oraz rozmiary morfometryczne plemników różnych gatunków zwierząt hodowlanych oraz dzikich przy wykorzystaniu metody barwienia z zastosowaniem azotanu srebra. Zastosowana metoda barwienia umożliwiła precyzyjne rozróżnienie poszczególnych elementów budowy plemników badanych zwierząt i może stanowić tanią, łatwą w wykonaniu i powtarzalną alternatywę dla obecnie stosowanych metod barwienia (*załącznik 4, poz. II A, 13*). Dalsze badania będą ukierunkowane na możliwość zastosowania tej metody także w nasieniu ludzkim. W przygotowaniu są kolejne prace. Jedna z nich została przyjęta do druku w periodyku *Medycyna Weterynaryjna* i będzie opublikowana w III kwartale 2015 roku (*załącznik 4, poz. II A, 15*).

W roku 2014 rozpoczęłam współpracę z prof. dr hab. med. Wojciechem Hanke i dr hab. n. med. Joanną Jurewicz z Zakładu Epidemiologii Środowiskowej Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi. Efektem tej współpracy jest wspólny projekt badawczy finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 7; *Ocena wpływu ekspozycji środowiskowej na powszechnie stosowane syntetyczne związki chemiczne zaburzające wydzielanie wewnętrzne na stężenie hormonów związanych z czynnością układu podwzgórze-przysadka-jądro wśród młodych mężczyzn, załącznik 4, poz. II I, 9*), który realizowany będzie w latach 2015-2018 (kierownik Prof. Hanke). W projekcie jestem jednym z głównych wykonawców. Celem projektu jest ocena relacji pomiędzy ekspozycją środowiskową na powszechnie stosowane syntetyczne związki chemiczne potencjalnie zaburzające wydzielanie gruczołów wewnętrznych na stężenie hormonów związanych z czynnością układu podwzgórze-przysadka-jądro u młodych mężczyzn. Badaniem zostanie objętych 350 mężczyzn w wieku 19-30 lat, u których wykonane zostaną 1) pomiary stężeń w surowicy krwi hormonów związanych z czynnością układu podwzgórze-przysadka-jądro (testosteron, dihydrotestosteron, estradiol, prolaktyna, inhibina B, FSH, LH, hormon antymullerowski) oraz białka wiążącego steroidy płciowe, 2) pomiary stężenia w moczu wybranych metabolitów ftalanów, pyretroidów oraz parabenów i bisfenolu A, oraz 3) ocena czynników związanych ze stylem życia (palenie, picie alkoholu, aktywność fizyczna, dieta, stres, inne narażenia – jako czynników zakłócających) na podstawie przeprowadzonych kwestionariuszy. Proponowane badanie jest pierwszym tego rodzaju badaniem w Polsce i pozwoli odpowiedzieć na pytanie czy czynniki środowiskowe, zaburzające czynność układu podwzgórze-przysadka-jądro mogą mieć wpływ na poziom hormonów u młodych mężczyzn, a tym samym na obniżenie ich płodności przy uwzględnieniu potencjalnych czynników zakłócających. Dodatkowo

proponowany projekt jako pierwszy dostarczy informacji na temat wielkości ekspozycji na parabeny i bis fenol A dla polskiej populacji.

Obecnie, jako główny wykonawca, jestem zaangażowana w naszej jednostce w realizację projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki, którego kierownikiem jest prof. dr hab. med. Krzysztof Kula (OPUS 7, *Ekspresja genów dla aromatazy i receptorów estrogenowych w tkankach jądra u mężczyzn z prawidłową i uszkodzoną spermatogenezą, załącznik 4, poz. III, 10*). Projekt realizowany będzie w latach 2015-2018 we współpracy z prof. dr hab. Magdaleną Bryś i dr Ewą Forma z Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego oraz prof. Ewą Rajpert-de Meyts i dr Anne Joregensen z Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet w Kopenhadze (Dania). Celem projektu jest analiza związków pomiędzy stanem ekspresji genu dla aromatazy, enzymu przekształcającego androgeny do estrogenów, oraz genów dla receptorów estrogenowych w jądrach mężczyzn z prawidłową i uszkodzoną spermatogenezą a czynnością komórek płciowych oraz komórek somatycznych jądra (komórki Sertoliego i Leydiga). W badaniach użyte zostaną archiwalne biopsje jąder mężczyzn z prawidłową spermatogenezą oraz idiopatycznym, pierwotnym uszkodzeniem spermatogenezy. Wykorzystanie techniki mikrodyssekcji laserowej tkanek do uzyskania oddzielnie kanalików plemnikotwórczych i przestrzeni międzykanalikowych wraz z komórkami Leydiga pozwoli na precyzyjne zlokalizowanie zmian w ekspresji badanych genów w obrębie jądra. Odrębna morfometryczna analiza tkanki jądra, ilościowa analiza komórek jądra oraz analiza dotycząca dojrzałości komórek Sertoliego, Leydiga i czynności komórek plemnikotwórczych (apoptoza, proliferacja) umożliwi powiązanie zmian w ekspresji w/w genów z czynnością plemnikotwórczą i steroidogenną jądra. Uzyskane wyniki mogą odpowiedzieć na pytanie czy zmiany ekspresji genów dla aromatazy i receptorów estrogenowych są istotne dla regulacji prawidłowej i zaburzonej spermatogenezy u człowieka.

Efekty mojej dotychczasowej pracy naukowej obejmują współautorstwo 26 publikacji oryginalnych, w tym 18 w czasopismach naukowych posiadających Impact Factor, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) oraz 16 publikacji poglądowych. **Sumaryczny IF według roku publikacji wynosi 32,46 (w tym 9,228 przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne), a suma punktów MNiSW wynosi 477 (w tym 120 przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne). Indeks Hirscha wynosi 5 (WoS Core Collection). Łącznie liczba cytowań prac wynosi 108, 80 bez autocytowań (WoS Core Collection z dnia 19.05.2015 r.)**

Dodatkowo, efektem badań wielośrodkowych, w których byłam wykonawcą i jestem wymieniona jako członek zespołu badawczego (EMAS Study Group) są 32 prace oryginalne opublikowane w czasopiśmie z bazy JCR o łącznym IF 205,385 i sumie punktów MNiSW 1071.

Brałam udział w 20 projektach badawczych, w tym:

- ośmiu krajowych finansowanych ze środków zewnętrznych (w 2 jako główny wykonawca, 6 jako wykonawca): Grant KBN (2); Grant MNiSW (1); Grant NCN (3); Grant Prezydenta Miasta Łodzi (2);

- dwóch zagranicznych: Grant Komisji Europejskiej (5FP i 7FP, jako wykonawca)

- dziesięciu finansowanych ze środków MNiSW na działalność statutową (tzw. Prace własne UM; w 2 jako kierownik i 8 jako wykonawca).

Za swoją działalność naukową zostałam kilkakrotnie nagrodzona przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Nagrodą dla Nauczycieli Akademickich za osiągnięcia naukowe (2011, 2012 – nagroda zespołowa I-go stopnia; 2013 – nagroda zespołowa II-go stopnia) oraz Nagrodą za Osiągnięcia Promujące Uczelnię (2010). Dziewięciokrotnie prezentacje zjazdowe, których byłam współautorem otrzymały wyróżnienia i nagrody przyznawane przez Komitety Naukowe sympozjów. Dwa artykuły oryginalne, których byłam współautorem zostały nagrodzone przez Towarzystwa Naukowe (2002 – Nagroda Polskiego Towarzystwa Endokrynologów Dziecięcych; 2008 – Nagroda Młodych Polskiego Towarzystwa Andrologicznego).

Pełny wykaz opublikowanych prac naukowych oraz prac prezentowanych na konferencjach zagranicznych i krajowych, a także informacje dotyczące osiągnięć dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki zamieszczone zostały w załączniku nr 4.

Łódź, dnia 08.06. 2015 r.

Renata Haluch-Jakubowska