
**AUTOREFERAT
OPIS
DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ
NAUKOWYCH**

DR MARIUSZ TOMASZ SKOWROŃSKI

KATEDRA FIZJOLOGII ZWIERZĄT
WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

OLSZTYN 2011

1. Życiorys naukowy.....	3
1.1. Wykształcenie.....	4
1.2. Doświadczenie zawodowe.....	4
2. Główne kierunki prowadzonych badań.....	5
3. Ważniejsze osiągnięcia w zakresie prowadzonych badań.....	6
4. Prace stanowiące szczególne osiągnięcia naukowe pod tytułem „Ekspresja akwaporyny 1, 5 i 9 (AQP1, 5 i 9) w układzie rozrodczym świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży”.....	9
5. Opis szczególnych osiągnięć naukowych pod tytułem: „Ekspresja akwaporyny 1, 5 i 9 (AQP1, 5 i 9) w układzie rozrodczym świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży”.....	11

Załącznik

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

1. Życiorys naukowy

Urodziłem się 8 czerwca 1966 roku w Sławnie. Po ukończeniu w 1986 roku Technikum Hodowlanego o specjalności hodowla zwierząt i roku pracy w Zakładach Drobiarskich w Sławnie, rozpocząłem studia na Wydziale Weterynaryjnym Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie. Po ukończeniu studiów w 1993 roku, odbyłem 8-miesięczny staż w Wojewódzkim Zakładzie Weterynarii w Gdańsku. Podczas stażu uczestniczyłem w dwóch dwutygodniowych szkoleniach w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu i Zakładzie Analizy i Oceny Jakości Żywności na Wydziale Chemii Politechniki Gdańskiej. W styczniu 1994 roku, zostałem zatrudniony w ZHW w Gdańsku na stanowisku kierownika Zespołu Pracowni Toksykologicznych.

Kierowana przeze mnie jednostka była jedną z sześciu pracowni w Polsce, monitorujących jakość importowanej i eksportowanej żywności. Byłem odpowiedzialny za kontrolę obecności pozostałości leków w żywności z wykorzystaniem chromatografii cieczowej. Co kwartał przechodziłem w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach test weryfikujący moje zdolności monitorujące.

Podczas pracy w ZHW w Gdańsku, nawiązałem kontakt z Profesorem Mirosławem Kleczkowskim z SGGW w Warszawie. Wynikiem naszej współpracy były dwie publikacje. W roku 1997, z rekomendacji Profesora Kazimierza Kochmana zostałem przyjęty na studia doktorskie przez Profesora Hajime Ishida, Uniwersytet Tokushimia w Japonii. Zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze Farmakologii Wydziału Stomatologii. Podczas realizacji pracy doktorskiej uczestniczyłem również w badaniach prowadzonych w Katedrze Farmakologii, kierowanej przez Profesora Hajime Ishida.

Stopień doktora nauk uzyskałem w maju 2000 roku. W sierpniu 2000 roku wróciłem do kraju i w październiku podjąłem pracę w Katedrze Fizjologii Zwierząt, Wydziału Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Początkowo zostałem zatrudniony na etacie naukowo-technicznym, a po nostryfikacji dyplomu na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (w grudniu 2000 roku), awansowałem na stanowisko adiunkta. Pracuję w zespole naukowym kierowanym przez Profesora Stanisława Okrasę.

Olsztyn, 26.11.2011r.

Dr Mariusz T. Skowroński



1.1. Wykształcenie

- 1993 – ukończone studia, Wydział Weterynaryjny, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie,
- 2000 – Doktorat, Uniwersytet Tokushima, Wydział Stomatologii, Katedra Farmakologii, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima, 770-8504, Japonia,
Tytuł pracy doktorskiej: „Enhancement by epinephrine of benzylpenicillin transport in rat small intestine”,
promotor Prof. Hajime Ishida,
nostryfikacja 2000, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

1.2. Doświadczenie zawodowe

- 1994–1997 Kierownik Zespołu Pracowni Toksykologicznych, Wojewódzki Zakład Weterynarii w Gdańsku, Zakład Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku, 39 m-cy,
- 1997–2000 asystent, Uniwersytet Tokushima; Wydział Stomatologii, Katedra Farmakologii, Tokushima, Japonia, 40 m-cy. Prof. Hajime Ishida i Prof. Yasuko Ishikawa,
- 2000–obecnie adiunkt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; Wydział Biologii, Katedra Fizjologii Zwierząt,
- 2001 Katedra Farmakologii, Wydział Stomatologii, Uniwersytetu Tokushima, Japonia. Fuji-Otsuka International Exchange Program. Stypendium naukowe, 3 miesiące,
- 2004-2005 The Water and Salt Research Center, Instytut Anatomii, Uniwersytet Aarhus, Dania. Staż naukowy, 17 miesięcy. Prof. Soren Nielsen,
- 2006 The Water and Salt Research Center, Instytut Anatomii, Uniwersytet Aarhus, Dania. The Human Frontier Science Program Organization (HFSP). Stypendium naukowe, 3 miesiące.

2. Główne kierunki prowadzonych badań

- 2.1. Ekspresja akwaporyny 1, 5 i 9 (AQP1, AQP5 i AQP9) w układzie rozrodczym świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży.
- 2.2. Regulacja funkcji wydzielniczych ślinianek przyusznych szczura ze szczególnym uwzględnieniem roli akwaporyny 5 (AQP5) i drogi jej przemieszczania w komórkach ślinianki.
 - Poznanie wewnątrzkomórkowych mechanizmów stymulujących wydzielanie amylazy przez komórki ślinianki przyusznej.
- 2.3. Ekspresja białka akwaporyn (AQPs) w jądrach i nasieniowodach gęsi.
- 2.4. Określenie roli akwaporyny 7 i 9 z wykorzystaniem myszy z wyciszonym genem AQP7 i AQP9 (AQP7 KO i AQP9 KO).
- 2.5. Rola neuroprzekazników w transporcie antybiotyków beta-laktamowych w jelicie cienkim szczura.
- 2.6. Ekspresja genów: kodujących prekursorów endogennych peptydów opioidowych w strukturach jądnika loszek w różnych okresach cyklu rujowego.
- 2.7. Udział oksytocyny w regulacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza u świni w cyklu rujowym.

3. Ważniejsze osiągnięcia w zakresie prowadzonych badań

- 3.1. W cyklu prac określono ekspresję akwaporyny 5 (AQP5) w śliniankach szczura i ustalono, że subkomórkowa dystrybucja AQP5 jest kontrolowana przez acetylocholinę, poprzez oddziaływanie na receptory muskarynowe M_3 i adrenalinę oddziaływanie na receptory α_1 -adrenergiczne. W wyniku pobudzenia tych receptorów następuje translokacja białka AQP5 z błon wewnątrzkomórkowych do części szczytowej komórek ślinianki przyusznej i wzrost wydzielania wody. Ponadto wykazano, że adrenalina pobudza ten proces przez uwalnianie jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów w wyniku stymulacji receptorów inozytolotrifosforanów i receptorów rianodynowych. Dodatkowo wykazano istotną rolę elementów cytoszkieletu w migracji AQP5 do szczytowej części błony komórkowej komórek ślinianki przyusznej. Były to pierwsze badania dotyczące regulacji ekspresji AQP5 i jej dystrybucji

wewnątrzkomórkowej pod wpływem acetylocholiny i adrenaliny. (*Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-1, A-3, B-3, C-1*)

3.2. Po raz pierwszy dostarczono doświadczalnych dowodów, że AQP5, która jest zlokalizowana wewnątrzkomórkowo, pod wpływem stymulacji receptorów muskarynowych M_3 i jonów wapnia jest transportowana w raftach lipidowych i dysocjuje do błony apikalnej komórek międzypłacikowych ślinianki przyusznej, a przy braku stymulacji następuje transport powrotny tego białka do cytoplazmy. (*Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-10, C-1*)

3.3. Wykazano, że preparat SNI-2011 (obecnie cevimelina) agonista receptorów muskarynowych M_3 wydłuża w czasie ekspresję AQP5 w części apikalnej komórek ślinianki przyusznej szczura i w efekcie pobudza wydzielanie śliny. Badania te miały istotne znaczenie aplikacyjne, ponieważ powyższy preparat pod nazwą handlową Evoxac został wdrożony w leczeniu kserostomii (suchości jamy ustnej). (*Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-5, C-1*)

3.4. Wykryto, że izoforma neuronalna syntazy tlenku azotu (nNOS) jest endogennie obecna w komórkach pęcherzykowych ślinianki przyusznej szczura i aktywacja szlaku nNOS przez metacholinę, agonistę receptorów M_3 , powoduje szybki wzrost NO, który pobudza wydzielanie amylazy z komórek ślinianki. (*Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-6*)

3.5. Po raz pierwszy wykazano ekspresję AQP7 w śródbłonku naczyń włosowatych białej i brązowej tkanki tłuszczowej, mięśnia sercowego i szkieletowego. Wykryto, że u myszy głodzonych i z farmakologicznie wywołaną cukrzycą ekspresja AQP7 w tkance tłuszczowej jest istotnie wyższa niż u myszy kontrolnych. Ponadto wykazano, że myszy nokauty AQP7 (AQP7 KO) wykazywały około 24-krotnie wyższą utratę glicerolu z moczem w porównaniu z typem dzikim, mimo braku różnic w poziomie glicerolu w surowicy krwi pomiędzy badanymi genotypami. (*Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-13*)

- 3.6. Uzyskanie po raz pierwszy i jedyny jak do tej pory myszy pozbawionych genu AQP9 (współpraca z Uniwersytetem Aarhus, Dania) pozwoliło na wykazanie, że AQP9 jest istotna dla metabolizmu glukozy w wątrobie i może odgrywać znaczącą rolę w metabolizmie glicerolu i glukozy w cukrzycy, ponieważ myszy AQP9 KO miały wyższy poziom glicerolu we krwi. *(Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-15)*
- 3.7. Wykazano ekspresję AQP1, 5 i 7 w układzie rozrodczym samca gęsi. Ekspresję AQP1 stwierdzono w śródbłonku naczyń włosowatych jądra i nasieniowodu, AQP5 w komórkach Leydiga oraz w komórkach podstawnych nasieniowodów, a AQP7 w witkach spermatyd i plemników. Była to pierwsza informacja o ekspresji akwaporyn w układzie rozrodczym samca gęsi.
- *Praca wyróżniona na drugim miejscu listy Top 10 BioMedLib przez BioMedical Library, Uniwersytetu Minnesota w USA, która kwalifikuje najlepsze publikacje z tego samego obszaru nauki w 2011 roku (załącznik). (Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-18)*
- 3.8. Wykazano, że adrenalina (epinefryna) istotnie zwiększa transport benzylopenicyliny poprzez stymulację receptorów $\alpha 1$ - i $\alpha 2$ -adrenergicznych w komórkach nabłonkowych jelita szczura. Główna rola adrenaliny polegała z jednej strony na utrzymaniu odpowiedniego gradientu jonów H^+ w części szczytowej komórek nabłonkowych jelita, a z drugiej strony, poprzez receptory $\beta 2$ -adrenergiczne, zwiększała ilość transporterów peptydowych w komórkach nabłonkowych jelita cienkiego. *(Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-4, B-4)*
- 3.9. W doświadczeniach na owarietomizowanych loszkach wykazano, że estradiol moduluje zawartość galaniny, beta-endorfiny i gonadoliberyny w jajowodzie i macicy, co sugeruje włączenie tych peptydów w regulację ich funkcji w okresie okołoolulacyjnym. *(Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-7)*
- 3.10. Po raz pierwszy wykazano, że oksytocyna może być przejściowo (w zależności od fazy cyklu rujowego) włączona w modulacje osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej bowiem iniekcje tego hormonu w fazie lutealnej cyklu istotnie podwyższały

poziom kortyzolu i kortykosteronu we krwi. W badaniach *in vitro* oksytocyna również podwyższała sekrecję kortyzolu przez komórki nadnerczy pobrane od zwierząt w fazie lutealnej cyklu rujowego. Oksytocyna podwyższała także sekrecję ACTH, β -endorfiny, LH i prolaktyny przez komórki przysadki pochodzące od loszek z fazy lutealnej. Nie miała natomiast wpływu na komórki przysadki z fazy folikularnej cyklu. Powyższe wyniki jednoznacznie wskazują na przejściowe włączenie oksytocyny w modulowanie sekrecji hormonów kory nadnerczy i przysadki. (*Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-8, A-14*)

3.11. Wykazano po raz pierwszy ekspresję genów prekursorów opioidowych: proopiomelanokortyny (POMC), proenkefaliny (PENK) i prodynorfiny (PDYN) w komórkach osłonki wewnętrznej i ziarnistych pęcherzyka jajnikowego oraz komórkach ciała żółtego świni. Gonadotropiny (LH i FSH) modulowały ekspresję genów wymienionych prekursorów. FSH indukowało ekspresję genu PDYN w komórkach ziarnistych z małych i dużych pęcherzyków oraz POMC w komórkach z dużych pęcherzyków. Natomiast LH regulowało ekspresję POMC i PENK w komórkach lutealnych. (*Publikacje wg Wykaz osiągnięć naukowo-badawczych A-12, A-16*)

4. Prace stanowiące szczególne osiągnięcia naukowe pod tytułem: „Ekspresja akwaporyny 1, 5 i 9 (AQP1, 5 i 9) w układzie rozrodczym świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży

4.1. Skowronski MT, Kwon TH, Nielsen S. Immunolocalization of aquaporin 1, 5, and 9 in the female pig reproductive system. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **2009** 57: 61-7.

IF₂₀₀₉ = 2,372, pkt MNiSW = 20,

4.2. Skowronski MT. Distribution and quantitative changes in amounts of aquaporin 1, 5 and 9 in the pig uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **2010** 8:109: 1-11.

IF₂₀₁₀ = 2,077, pkt MNiSW = 27,

4.3. Skowronski MT, Skowronska A, Nielsen S. Fluctuation of aquaporin 1, 5 and 9 expression in the pig oviduct during the estrous cycle and early pregnancy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **2011** 59: 419-427.

IF₂₀₁₁ = 2,372, pkt MNiSW = 20,

4.4. Skowronski MT, Frackowiak L, Skowronska A. Expression of aquaporin 1 in the pig periovarian vascular complex during the estrous cycle and early pregnancy. *Reproductive Biology*. **2011** 11 3: 210-223.

IF₂₀₁₁ = 1,500, pkt MNiSW = 20,

Prace: 4.1., 4.2., i 4.3. zostały wyróżnione w 2011 roku na - pierwszym, trzecim i czwartym miejscu listy Top 10 BioMedLib przez BioMedical Library, Uniwersytetu Minnesota w USA, która kwalifikuje 10. najlepszych publikacji z tego samego obszaru nauki (załącznik).

Prace finansowano z projektu badawczego habilitacyjnego pt: „Ekspresja akwaporynowych kanałów wodnych AQP1, AQP5 i AQP9 w tkankach macicy świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży” Nr N N308 0042 33 (2007-2010) przyznanego przez MNiSW, kierownik dr Mariusz T. Skowronski i badań statutowych 0206.0805 UWM w Olsztynie.

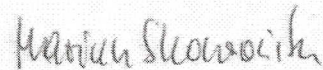
Oświadczenie o udziale własnym dr. Mariusza T. Skowrońskiego w przygotowaniu publikacji stanowiących szczególne osiągnięcia naukowe

Oświadczam, że we wszystkich publikacjach stanowiących szczególne osiągnięcia naukowe byłem autorem koncepcji badań i głównym wykonawcą. Badania były realizowane w ramach projektu habilitacyjnego, którego byłem kierownikiem. Tytuł projektu „*Ekspresja akwaporynowych kanałów wodnych AQP1, AQP5 i AQP9 w tkankach macicy świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży*” Nr N N308 0042 33 (2007-2010) przyznanego przez MNiSW.

Swój udział w powstawaniu publikacji 4.1., 4.3. i 4.4. oceniam na 70%, a w publikacji 4.2. na 100%.

Olsztyn, 26.11.2011r.

Dr Mariusz T. Skowroński



5. Opis szczególnych osiągnięć naukowych pod tytułem: „Ekspresja akwaporynowych kanałów wodnych AQP1, 5 i 9 w układzie rozrodczym świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży”

Wprowadzenie

Akwaporyny (AQPs) są rodziną małych hydrofobowych integralnych białek błonowych o masie od 25 do 34 kDa. U ssaków wykazano 13 izoform akwaporyn (AQP0–AQP12). AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 i 8 uważane są za selektywne kanały dla wody, AQP3, 7, 9 i 10 zwane są akwagliceroporynami, ponieważ oprócz wody, transportują glicerol, mocznik i inne małe rozpuszczalne cząstki jak na przykład Cl^- i Hg^{2+} (Sugiya i wsp. 2008). AQP11 i 12 to tzw. superakwaporyny (Ishikawa i wsp. 2006). Ostatnio wykazano, że AQP1 uczestniczy także w transporcie CO_2 i NO i jej ekspresja w oocytach zwiększa transport CO_2 o 40%, a NO około 4 razy (Carbrey i Agre, 2009).

Ekspresja AQPs różni się w zależności od tkanki, ponadto w jednej komórce może występować kilka izoform, często zlokalizowanych na przeciwległych biegunach komórki, w części apikalnej i bazolateralnej. Przykładowo AQP3 zlokalizowano w części bazolateralnej, a AQP5 w części apikalnej komórek ślinianek przyusznych szczura, dodatkowo wykazano, że jony Ca^{2+} mogą indukować transport AQP5 z mikrodomenami (tzw. raftami) lipidowymi z cytoplazmy do apikalnej części błony oraz jej wbudowywanie w błonę komórkową (Ishikawa i wsp. 2006). Ma to kluczowe znaczenie nie tylko dla przezbłonowego, ale także śródkomórkowego transportu wody. Ponadto wykazano, że AQPs są obecne nie tylko w błonie komórkowej, ale również w błonach cytoplazmatycznych oraz jądrze komórki (Qu i wsp. 2010). Są także wydzielane do płynów, na przykład AQP2 do moczu i jest wskaźnikiem działania wazopresyny w kanalikach zbiorczych (Chung i wsp. 2010). Większość dotychczasowych badań skoncentrowana była na wykazaniu obecności AQPs w tkankach, poznaniu ich budowy i częściowo roli fizjologicznej. Korzystano z modelu myszy z wyciszonymi genami AQPs i wykazano, że AQP1 jest włączona w migrację komórek śródbłonka, która przebiega znacznie wolniej u nokautów w porównaniu z typem dzikim. Ilość płynu mózgowo rdzeniowego i ciśnienie wewnątrzczaszkowe były także niższe u nokautów (Carbrey i Agre 2009).

Akwaporynowe kanały wodne są obecne we wszystkich błonach plazmatycznych komórek zwierzęcych i tworzą główny mechanizm regulacji wodnej organizmu. Do tej pory poznano dość dobrze rolę AQPów w nerkach, śliniankach, płucach, mózgu oraz przewodzie pokarmowym. Jednak ich rola w układzie rozrodczym świnii podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży obejmujący krytyczny okres implantacji nie jest znana.

Pierwsze informacje o obecności AQPów w układzie rozrodczym pochodzą z pracy Li i wsp. (1997), którzy wykazali obecność mRNA AQP1 w macicy szczura. W następnych latach ukazały się prace, w których stwierdzono obecność AQPów w różnych strukturach układu rozrodczego człowieka, szczura i myszy (Huang i wsp. 2006). Jabłoński i wsp. (2003) stwierdzili ekspresję AQP1 w warstwie mięśniowej macicy owariotomizowanych myszy i wykazali stymulujący wpływ 17β -estradiolu (E2) i progesteronu (P4) na ten proces.

Powyższe obserwacje prowadzone głównie na zwierzętach laboratoryjnych wskazują, że w macicy ekspresja genów akwaporyn zmienia się w zależności od aktywności układu rozrodczego samicy i może być powiązana z odpowiednim przygotowaniem tego narządu do implantacji, co z kolei w istotnym stopniu wpływa na wyniki osiągnięte w rozrodzie zwierząt. Powszechnie wiadomo, że zarówno u ludzi jak u zwierząt dochodzi do zaburzeń w okresie implantacji.

Generalnie, panuje zgodność wśród autorów, że 30-40% embrionów u świń jest tracona pomiędzy 12-18 dniem ciąży. Jest to zatem krytyczny okres dla zarodków, który nie został w pełni poznany. W tym czasie ma miejsce okresowe pobudzenie lub wyciszenie ekspresji genów w różnych strukturach układu rozrodczego, których produkty mają istotne znaczenie dla przeżycia zarodków.

Badania własne miały na celu:

1. określenie ekspresji i lokalizacji białek akwaporynowych kanałów wodnych (AQP) w pęcherzykach jajnikowych, jajowodzie i macicy świń w fazie folikularnej cyklu rujowego (dzień 17-19),
2. badanie ekspresji i lokalizacji AQP1, AQP5 i AQP9 w błonie śluzowej i mięśniowej macicy w czasie cyklu rujowego (dni 2-4, 10-12, 14-16 i 18-20) i wczesnej ciąży (dni 14-16 i 30-32) oraz w trofoblaście,

3. zbadanie ekspresji i lokalizacji AQP1, AQP5 i AQP9 w jajowodzie w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży, w tych samych dniach jak w pkt. 2 ,
4. zbadanie poziomu ekspresji AQP1 w okołojajnikowym kompleksie naczyniowym (PVC) w którym ma miejsce zwrotny (do jajnika) i lokalnie docelowy (do macicy i jajowodu) transfer hormonów steroidowych w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży, w tych samych dniach jak w pkt. 2.

Materiał do badań i stosowane procedury

Eksperymenty opisane w prezentowanych publikacjach zatwierdzone zostały przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Do zbadania ekspresji akwaporyn pobierano tkanki: macicy, jajowodu, jajnika, splotu okołojajnikowego i trofoblastu świń (o masie 90-110 kg), w ściśle określonych dniach cyklu rujowego (2-4, 10-12, 14-16, 17-19 i 18-20) i wczesnej ciąży (14-16 i 30-32). U wszystkich zwierząt dni cyklu i ciąży były sprawdzane i kontrolowane. W badaniach stosowano metodę immunohistochemiczną do lokalizacji białka AQP1, AQP5 i AQP9 i metodę Western blot do określenia poziomu ekspresji białka badanych akwaporyn. Uzyskane wyniki były analizowane z użyciem jednoczynnikowej analizy ANOVA i testu LSD. Do analizy statystycznej użyto programu Statistica StatSoft, Tulsa, USA.

Na podstawie badań prezentowanych w publikacji 4.1. wykazano:

- po raz pierwszy ekspresję AQP1 w śródbłonku naczyń krwionośnych jajnika, jajowodu i macicy świń w fazie folikularnej cyklu rujowego (17-19 dzień),
- białko AQP5 zlokalizowano w komórkach ziarnistych dojrzewających pęcherzyków jajnikowych i w komórkach pierwotnych pęcherzyków jajnikowych. W jajowodzie, ekspresję AQP5 wykazano w błonie komórkowej komórek mięśniowych i w części szczytowej błony komórkowej komórek błony śluzowej. W macicy, AQP5 stwierdzono w błonie komórkowej komórek mięśni gładkich i części szczytowej komórek nabłonka luminalnego i gruczołowego,

- białko AQP9 zaobserwowano w komórkach ziarnistych dojrzałych pęcherzyków jajnikowych. W jajowodzie, immunoreaktywność AQP9 została wykryta w części szczytowej błony komórkowej błony śluzowej, natomiast w macicy w części szczytowej komórek nabłonka luminalnego i gruczołowego,
- ekspresję białka AQP1, AQP5 i AQP9 w jajniku, jajowodzie i macicy potwierdzono metodą Western blot. Analiza ta wykazała białko AQP1 jako produkt o masie molekularnej 28 kDa, AQP5 29 kDa i AQP9 32 kDa. Sprawdzone również lokalizację innych akwaporyn (AQP2, 3, 4, 7, 8 i 11) w układzie rozrodczym świni, ale nie stwierdzono ich obecności, stąd w kolejnych pracach badano tylko ekspresję AQP1, AQP5 i AQP9 (*Skowronski MT, Kwon TH, Nielsen S. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2009 57: 61-7.*)

Powyższe badania zostały docenione i wyróżnione przez *BioMedical Library, Uniwersytetu Minnesota w USA, która umieściła tę pracę na drugim miejscu wśród 10. najlepszych publikacji w ocenianym obszarze badań w roku 2011 (załącznik).*

W kolejnej pracy (4.2.) której celem było zbadanie ekspresji AQP1, AQP5 i AQP9 w macicy i w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży oraz w trofoblaście wykazano, że:

- ekspresja AQP1 nie zmieniała się znacząco w endometrium i miometrium loszek w 2-4, 10-12 i 14-16 dniu cyklu. Podobnie, nie stwierdzono zmian w ekspresji AQP1 w błonie śluzowej i mięśniowej macicy podczas wczesnej ciąży (14-16 i 30-32 dzień). Wykazano natomiast statystycznie istotny wzrost ekspresji tego białka w endometrium i miometrium w czasie ciąży w porównaniu do fazy lutealnej cyklu (10-12 i 14-16 dzień),
- ekspresja AQP5 w endometrium zwierząt cyklicznych była niska w dniach 2-4 i 10-12, ale wzrastała znacząco w dniach 14-16 i 18-20. W błonie mięśniowej ekspresja tego białka nie zmieniała się podczas cyklu rujowego, natomiast w czasie wczesnej ciąży wykazano istotny wzrost ekspresji AQP5 zarówno w endometrium jak i miometrium w porównaniu do fazy lutealnej cyklu rujowego,
- ekspresję białka AQP9 w odróżnieniu od AQP5 stwierdzono tylko w błonie śluzowej macicy świni w czasie cyklu rujowego i ciąży (część apikalna błon komórkowych). W endometrium zwierząt cyklicznych, ekspresja AQP9 była na

podobnym poziomie w 2-4 i 10-12 dniu, natomiast wzrastała znacząco w dniach 14-16 i 18-20,

- ekspresja AQP9 nie zmieniała się u zwierząt ciężarnych, natomiast udowodniono istotny wzrost ekspresji tego białka w porównaniu z cyklem rujowym,
- ekspresja AQP5 i AQP9 występuje w części apikalnej komórek trofoblastu.

Były to pierwsze informacje w odniesieniu do rozmieszczenia i zmian w poziomie ekspresji AQP1, AQP5 i AQP9 w macicy podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży oraz AQP5 i AQP9 w trofoblaście u świń (*Skowronski MT. Reproductive Biology and Endocrinology. 2010 8:109: 1-11*).

Badania te zostały także wyróżnione przez *BioMedical Library, Uniwersytetu Minnesota w USA, która umieściła tę pracę na czwartym miejscu wśród 10. najlepszych publikacji w ocenianym obszarze badań w roku 2011 (załącznik)*.

W następnej pracy (4.3.) badano ekspresję białka AQP1, AQP5 i AQP9 w jajowodzie świń w różnych dniach cyklu rujowego i wczesnej ciąży i wykazano:

- obecność białka AQP1 w śródbłonku naczyń krwionośnych jajowodu. Analiza Western blot wykazała, że ekspresja AQP1 podczas cyklu nie różniła się między 10-12 i 14-16 dniem, ale była istotnie wyższa w dniach 2-4 i 18-20. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji białka AQP1 w jajowodzie podczas ciąży (14-16 i 30-32 dzień) w porównaniu do środkowej i późnej fazy lutealnej cyklu,
- obecność białka AQP5 stwierdzono w części apikalnej komórek błony śluzowej i w błonie komórek mięśniowych jajowodu. Istotny wzrost ekspresji AQP5 wykazano w 2-4 i 18-20 dniu cyklu rujowego w porównaniu do 10-12 i 14-16 dnia. Ekspresja AQP5 w czasie ciąży była na poziomie zbliżonym do 10-12 i 14-16 dnia cyklu,
- obecność białka AQP9 stwierdzono wyłącznie w części apikalnej komórek błony śluzowej jajowodu. Poziom ekspresji tego białka był zależny od cyklu rujowego i był najwyższy w 2-4 i 18-20 dniu. W czasie ciąży, ekspresja AQP9 ulegała obniżeniu i była na poziomie zbliżonym do 10-12 i 14-16 dnia cyklu.

Była to pierwsza charakterystyka ekspresji AQP1, AQP5 i AQP9 w jajowodzie świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży (*Skowronski MT, Skowronska A, Nielsen S. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2011 59: 419–427*). Praca ta została wyróżniona przez *BioMedical Library, Uniwersytetu Minnesota w USA, na trzecim miejscu wśród 10. najlepszych publikacji w ocenianym obszarze badań w roku 2011 (załącznik)*.

W kolejnej publikacji (4.4.) badano ekspresję AQP1 i AQP5 w okołojajnikowym kompleksie naczyniowym (PVC) i wykazano:

- obecność tylko białka AQP1 w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych i krwionośnych PVC w czasie cyklu rujowego i ciąży, natomiast nie stwierdzono ekspresji AQP5,
- stwierdzono istotny wzrost ekspresji AQP1 w 2-4 i 18-20 dniu cyklu w porównaniu do 10-12 i 14-16 dnia. Na początku okresu implantacji i pod koniec ekspresja AQP1 utrzymywała się na poziomie zbliżonym do środkowej i późnej fazy lutealnej,
- uzyskane wyniki sugerują, że estrogeny i progesteron uczestniczą w ekspresji AQP1 w PVC (*Skowronski MT, Frackowiak L, Skowronska A. Reproductive Biology 2011 11 3: 210-223*).

Podsumowując, wykazano obecność AQP1, 5 i 9 w układzie rozrodczym świń w cyklu rujowym i ciąży. Immunolokalizację AQP1 stwierdzono w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych jajnika, jajowodu i macicy, AQP5 - w komórkach granulozy pęcherzyków rosnących, komórkach pęcherzyków pierwotnych oraz w komórkach nabłonka i mięśniówki jajowodu i macicy, natomiast AQP9 – w komórkach granulozy pęcherzyków przedowulacyjnych i komórkach nabłonkowych jajowodu i macicy. Stwierdzono, że ekspresja białka AQP1, 5 i 9 w endometrium i miometrium macicy świń w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży jest zróżnicowana. Wykazano istotnie wyższą ekspresję białka AQP1 w czasie ciąży w komórkach endometrium i miometrium, podobnie wyższą ekspresję białka AQP5 i 9 w endometrium w 14-16 i 18-20 dniu cyklu w porównaniu z 2-4 i 10-12 dniem. W początkowym okresie implantacji (14-16 dzień) oraz pod koniec (30-32 dzień) ekspresja AQP5 i 9 w endometrium oraz AQP5 w miometrium była istotnie

wyższa w porównaniu do 10-12 i 14-16 dnia cyklu. Podobnie zróżnicowaną ekspresję białka AQP1, AQP5 i AQP9 wykazano w jajowodzie świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Ekspresją AQP1, AQP5 i AQP9 była najwyższa w dniach 2-4 i 18-20 cyklu rujowego. Stwierdzono również ekspresję AQP5 i AQP9 w części apikalnej komórek trofoblastu.

Scharakteryzowany po raz pierwszy specyficzny wzór ekspresji AQP1, AQP5 i AQP9 wskazuje, że uczestniczą one w utrzymaniu odpowiedniego nawodnienia i zdolności regeneracyjnych dróg rodnych w czasie cyklu rujowego i ciąży. Specyficzna lokalizacja akwaporyn w komórkach macicy, a szczególnie AQP5 i AQP9 w komórkach nabłonka błony śluzowej macicy wskazuje na ich istotną rolę w przygotowaniu odpowiedniego środowiska dla implantacji zarodków i ich odżywiania w czasie ciąży. Natomiast akwaporyny obecne w jajowodzie prawdopodobnie uczestniczą w transporcie płynów do światła jajowodu i ułatwiają transport jaja w kierunku macicy. Badania te stanowią istotne nowum w rozpatrywanym obszarze wiedzy i analizowane łącznie z innymi danymi pochodzącymi z piśmiennictwa istotnie wzbogacają naszą wiedzę dotyczącą procesu implantacji i ewentualnych przyczyn wysokiej śmiertelności zarodków.

Dokładne poznanie ekspresji akwaporyn 1, 5 i 9 w układzie rozrodczym świni pozwoliło zaplanowanie dalszych badań nad mechanizmem ich działania, rolą hormonów w regulacji ekspresji i przemieszczania w komórkach. Realizację powyższych badań rozpoczęto w ramach projektu pt: „Rola hormonów steroidowych oraz cyklicznego AMP i kinazy białkowej A w regulacji ekspresji akwaporyny 1, 5 i 9 w macicy świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży” finansowanego przez MNiSW w latach 2011-2014, którego jestem kierownikiem.

Olsztyn, 26.11.2011r.

Dr Mariusz T. Skowroński



Piśmiennictwo

Carbrey JM, Agre P. Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb Exp Pharmacol.* 2009 (190):3-28.

Chung SH, Jun DW, Kim KT, Chae JD, Park EK, Son BK, Kim SH, Jo YJ, Park YS. Aquaporin-2 urinary excretion in cirrhosis: relationship to vasopressin and nitric oxide. *Dig Dis Sci.* 2010 55(4):1135-41.

Huang HF, He RH, Sun CC, Zhang Y, Meng QX, Ma YY. Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum Reprod Update.* 2006 12(6):785-95.

Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Skowronski MT, Pan Y, Ishida H. Water channels and zymogen granules in salivary glands. *J Pharmacol Sci.* 2006 100(5):495-512.

Jablonski EM, McConnell NA, Hughes FM Jr, Huet-Hudson YM. Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biol Reprod.* 2003 69(5):1481-7.

Li XJ, Yu HM, Koide SS. Regulation of water channel gene (AQP-CHIP) expression by estradiol and androstadiol in rat uterus. *Yao Xue Xue Bao.* 1997 32(8):586-92.

Qu F, Wang FF, Lu XE, Dong MY, Sheng JZ, Lv PP, Ding GL, Shi BW, Zhang D, Huang HF. Altered aquaporin expression in women with polycystic ovary syndrome: hyperandrogenism in follicular fluid inhibits aquaporin-9 in granulosa cells through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Hum Reprod.* 2010 25(6):1441-50.

Sugiya H, Matsuki-Fukushima M, Hashimoto S. Role of aquaporins and regulation of secretory vesicle volume in cell secretion. *J Cell Mol Med.* 2008 12(5A):1486-94.

Adres do korespondencji

Dr Mariusz T. Skowroński

Katedra Fizjologii Zwierząt

Wydział Biologii

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 1A

10-917 Olsztyn

email: skowron@uwm.edu.pl