

AUTOREFERAT

I. IMIĘ I NAZWISKO

Magdalena Orczyk-Pawiłowicz

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/~~ARTYSTYCZNE~~ – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

2003 - stopień doktora nauk medycznych, specjalność: biologia medyczna; Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii. Tytuł rozprawy: „Glikozylacja białek płynu owodniowego w patofizjologii ciąży”; Promotor: Prof. dr hab. Iwona Kątnik-Prastowska,

1995 - dyplom magistra biotechnologii; Uniwersytet Wrocławski we Wrocławiu, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej. Tytuł pracy: „Izolacja i właściwości lektyny z liści Kosaćca ogrodowego (*Iris hybrida*)”; Promotor: dr Mirosława Ferens-Sieczkowska.

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/~~ARTYSTYCZNYCH.~~

od 2007 - praca naukowo-badawcza i dydaktyczna na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny (wcześniej Akademia Medyczna) im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,

od 1995 - praca naukowo-badawcza i dydaktyczna na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/~~artystycznego~~

Zgodnie z treścią w/w ustawy, osiągnięcie naukowe stanowi cykl ośmiu publikacji pod wspólnym tytułem:

„Analiza fukozylowanych i sjalowanych glikotopów na wybranych glikoproteinach płynów ustrojowych kobiet w czasie ciąży i w okresie postnatalnym”

Cykl obejmuje 8 publikacji, w 7 jestem pierwszym autorem, we wszystkich jestem autorem do korespondencji. Wszystkie publikacje stanowiące cykl z IF, sumaryczny IF wynosi **14,435** (**197** punktów MNiSW).

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

- 4.1. **Orczyk-Pawiłowicz M**, Kątnik-Prastowska I.: Terminal monosaccharide expression on amniotic glycoproteins as biomarkers of fetus maturity. *Biochem.Soc.Trans.* 2011 Vol.39(1);344-348; **IF: 3.711; MNiSW: 27**
- 4.2. **Orczyk-Pawiłowicz M**, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I.: High expression of α 1,2- and α 1,6-linked fucoses on amniotic AGP as a biomarker of fetal postmaturity risk. *J.Immunoassay Immunochem.* 2011 Vol.32(2);103-113; **IF: 0.689; MNiSW: 20**
- 4.3. **Orczyk-Pawiłowicz M**, Augustyniak D, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I.: Degree of sialylation and fucosylation of plasma and amniotic immunoglobulin G changes progressively during normal pregnancy. *Prenat.Diagn.* 2012 Vol.35(5);432-439; **IF: 2.683; MNiSW: 25**
- 4.4. **Orczyk-Pawiłowicz M**, Augustyniak D, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I.: Lectin-based analysis of fucose and sialic acid expressions on human amniotic IgA during normal pregnancy. *Glycoconjugate J.* 2013 Vol.30(6);599-608; **IF: 1.948; MNiSW: 20**
- 4.5. Lis J, **Orczyk-Pawiłowicz M**, Kątnik-Prastowska I.: Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne. *Post.Hig.Med.Dośw.(online)* 2013 Vol.67;529-547; **IF: 0.633; MNiSW: 15**
- 4.6. **Orczyk-Pawiłowicz M**, Hirnle L, Berghausen-Mazur M, Kątnik-Prastowska I.: Lactation stage-related expression of sialylated and fucosylated glycotopes of human milk α -1-acid glycoprotein. *Breastfeed.Med.* 2014 Vol.9(6);313-319; **IF: 1.248; MNiSW: 30**
- 4.7. **Orczyk-Pawiłowicz M**, Berghausen-Mazur M, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I.: O-glycosylation of α -1-acid glycoprotein of human milk is lactation stage related. *Breastfeed.Med.* 2015 Vol.10(5);270-276; **IF: 1.248; MNiSW: 30**
- 4.8. **Orczyk-Pawiłowicz M**, Hirnle L, Berghausen-Mazur M, Kątnik-Prastowska I.: Terminal glycotope expression on milk fibronectin differs from plasma fibronectin and changes over lactation. *Clin.Biochem.* 2015 Vol.48(3);167-173; **IF: 2.275; MNiSW: 30**

Mój udział we wszystkich publikacjach polegał na opracowaniu koncepcji badań, przygotowaniu i wykonaniu doświadczeń, analizie danych eksperymentalnych i analizie statystycznej, ocenie i interpretacji wyników, przygotowaniu i edycji manuskryptu do druku, polemice z recenzentami. Swój udział w pracach szacuję na 80% (**prace nr 4.6-4.8**), 70% (**prace nr 4.1-4.4**) i 60% (**praca nr 4.5**) (**Zał. 1a/II**). Oświadczenia współautorów prac w załącznikach.

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

Celem badań zawartych w przedstawionym cyklu publikacji, jako rozprawa habilitacyjna była ocena względnej zawartości sjalowanych i fukozylowanych glikotopów, oraz obecności antygenów T i Tn na wybranych glikoproteinach obecnych w osoczu kobiet ciężarnych i płynie owodniowym oraz w osoczu i mleku matek podczas laktacji. Monosacharydy zajmujące pozycje końcowe w glikanach glikoprotein i dostępne dla reakcji z lektyną handlową w badaniach *in vitro*, odzwierciedlają reakcje zachodzące z lektynowymi receptorami ustrojowym (np. siglektyny, selektyny, galektyny) *in vivo*. Reakcje rozpoznania biologicznego *in vivo* i *in vitro* zachodzą z uwzględnieniem typu wiązania glikozydowego (odpowiednio, α 2,3- i α 2,6- dla kwasu sjalowego oraz α 1,2-, α 1,3- i α 1,6- dla fukozy) wiążącego glikotop do oligosacharydowej części glikoproteiny.

Do analizy wybrano glikoproteiny o odmiennych funkcjach biologicznych, tj. bezpośrednio zaangażowane w procesy odporności (immunoglobuliny klas IgG i IgA), uczestniczące w modulacji procesów zapalnych (α 1-kwaśna glikoproteina, AGP) oraz w odporności nieswoistej i komunikacji komórka-komórka i komórka-macierz zewnątrzkomórkowa (fibronektyna, FN). Powstaje pytanie, czy sjalizacja i fukozylacja glikoprotein płynu owodniowego i/lub mleka ludzkiego jest taka sama jak glikoprotein obecnych w osoczu matki, oraz czy ogólny wzór sjalizacji i fukozylacji jest stały, czy też zmienia się wraz z progresją ciąży i/lub okresem laktacji. Badaniem objęto kobiety ciężarne w kolejnych etapach ciąży, tj. II i III trymestr, okres okołoporodowy, ciążę przenoszoną i poród oraz mleko kobiet podczas laktacji tj. siara, mleko przejściowe i mleko dojrzałe. W pracach przedstawiono aktualny stan wiedzy, oceniono różnice występujące między analizowanymi płynami biologicznymi oraz związek obserwowanych zmian w sjalizacji i fukozylacji glikoprotein w odniesieniu do stopnia zaawansowania ciąży oraz procesu dojrzewania mleka podczas laktacji.

Materiał do badań i charakterystykę stanu zdrowia pacjentek uzyskano dzięki współpracy z położnikami i neonatologami Katedr Ginekologii i Położnictwa Akademii/Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Na badania uzyskano odpowiednie zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu.

Wprowadzenie

Glikozylacja jest najbardziej rozpowszechnioną potranslacyjną modyfikacją białek. Glikoproteiny zawierają łańcuchy oligosacharydowe, które mogą być przyłączone, jako N- lub/i O-glikany. Część cukrowa glikoprotein nie tylko wpływa na ich właściwości fizykochemiczne takie jak rozpuszczalność, lepkości, ładunek, strukturę przestrzenną, ale chroni przed degradacją i co istotne, strukturalny fragment części oligosacharydowej (glikotop) dzięki swoistej interakcji z receptorem komórkowym uczestniczy w wielu ważnych

procesach biologicznych takich jak: adhezja komórkowa, transport i klirens cząsteczek, aktywacja receptorów, transdukcja sygnału i endocytoza. Glikoproteiny występują zazwyczaj w kilku różnych glikoformach/glikowariantach, których wzajemny stosunek jest względnie stały w płynach biologicznych zdrowych ludzi, natomiast może ulegać zmianom zarówno jakościowym, jak i ilościowym w stanach patologicznych. Ponadto, pojawianie się niektórych glikoform jest tkankowo specyficzne oraz w wielu przypadkach zależy od etapu rozwoju organizmu.¹

Według hipotezy Gabius i wsp. [2004]² glikotopy, najczęściej zajmujące pozycje dystalne w łańcuchu oligosacharydowym i eksponowane w strukturze glikoproteiny, kodują znaczną ilość informacji, istotnej w regulacji przekazywania sygnałów między komórkami i komórkami a białkami. Reakcja ta ściśle zależy od składu, sekwencji i konformacji monosacharydów. Monosacharydy obecne na pozycjach końcowych glikanów, takie jak kwas sialowy (kwas N-acetylo-5-neuraminowy) i fukoza (L-6-deoksy-galaktoza), które nie mogą być już podstawione innym monosacharydem, odgrywają kluczową rolę w układach biologicznych, i są rozpoznawane przez odpowiednie lektyny ssące, takie jak selektyny i/lub siglektyny. Kwas sialowy może być dołączony do galaktozy i/lub GalNAc za pośrednictwem różnych typów wiązań glikozydowych: α 2,3- i/lub α 2,6- oraz α 2,8- w liniowych polimerach kwasu sialowego³. Fukoza natomiast może być przyłączona wiązaniem α 1,6 do GlcNAc części rdzeniowej N-glikanów (fukoza proksymalna, rdzeniowa), oraz α 1,3 lub α 1,4 do subkońcowej cząsteczki GlcNAc na antenach lub wiązaniem α 1,2 do Gal obecnej w części antenowej oligosacharydu (dystalne, odpowiednio, fukoza α 1,3, fukoza α 1,4, i fukoza α 1,2) O- i/lub N-glikanów.⁴

Znaczenie fukozy i kwasu sialowego

Fukoza i/lub kwas sialowy wchodzi w skład antygenów grupowych krwi (fukoza), antygenów grupy Lewis oraz antygenów embrionalnych okresowo swoistych (stage-specific embryonic antigens – SSEAs). Glikotopy zawierające fukozę i/lub kwas sialowy mogą modulować wiele mechanizmów komórkowych, wzrost, rozwój i różnicowanie komórek, migrację i adhezję komórek, przekazywanie sygnałów między komórkami oraz oddziaływań komórka-komórka, komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, jak również komórka i rozpuszczalne ligandy uczestnicząc w ten sposób w procesach rozpoznania biologicznego.⁵ Udział fukozylowanych i/lub sialowanych glikotopów w procesach fizjopatologicznych, takich jak procesach adhezji leukocytów do śródbłonna za pośrednictwem selektyn, zapłodnieniu, embriogenezie, rozwoju płodowym, apoptoza, procesy zapalne, nowotworowe oraz choroby o podłożu immunologicznym zostały potwierdzone. Ponadto, kwas sialowy i fukozy odgrywają ważną rolę w oddziaływaniach między komórką gospodarza oraz patogenami, stanowiąc

¹ Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 1993;3:97-130

² Gabius H-J, Siebert H-C, André S, Jiménez-Barbero J, Rüdiger H. Chemical Biology of the Sugar Code. *ChemBioChem* 2004;5:740-764

³ Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 2008;14:351-360

⁴ Orczyk-Pawiłowicz M. The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease. *Post Hig Med Dośw*, 2007;61:240-252

⁵ Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006;126:855-867

ligand dla receptorów lektynowych niektórych patogenami, i odgrywają kluczową rolę w kolonizacji tkanek przez patogen.⁶ Biologiczna rola kwasu sjałowego i fukozy zależy od typu wiązania glikozydowego, tj. glikotopy zawierające α 2,3-kwas sjałowy, obecny m.in. w glikotopach sjało-Lewis^x, są klasyfikowane jako typ „nowotworowo-płodowy”, natomiast zawierające α 2,6-kwas sjałowy jako typ „dojrzały”. Z kolei α 1,6-fukoza uczestniczy w kontrolowaniu przekazywania sygnałów oraz adhezji między komórkami oraz stymuluje ich wzrost i różnicowanie. Ponadto, wykazano, że struktury te są istotne dla prawidłowego rozwoju płodowego. Z kolei α 1,2- i α 1,3-fukozy są częścią embrionalnych antygenów okresowo-specyficznych (stage-specific embryonic antigens) należących do rodziny glikotopów typu Lewis obecnych na N- i O-glikanach i stanowią ligandy w procesach rozpoznania biologicznego, takich jak adhezja patogenów do komórek gospodarza oraz zależna od selektywności adhezja leukocytów do komórek śródbłonna.

Płyn owodniowy

Płyn owodniowy (AF) zawiera bioaktywne cząsteczki, chroni płód fizycznie i biochemicznie oraz wspomaga rozwój płodu. W 12 tygodniu ciąży, AF zawiera białka, węglowodany, lipidy i fosfolipidy oraz cząsteczki o aktywności biologicznej, czynniki wzrostu, cytokiny. AF jest wytwarzany przez wysięk płynu przez skórę płodu aż do 14 tygodnia ciąży, kiedy rozpoczyna się keratynizacja skóry płodu. Podczas 8-11 tygodnia ciąży płód zaczyna połykać i produkować mocz, dlatego w późniejszym okresie ciąży płyn owodniowy zawiera znaczne ilości moczu płodu. Komórki z warstw owodni i kosmówki wydzielają białka do płynu owodniowego. Skład białkowy i metabolity płynu owodniowego zmieniają się w przebiegu ciąży i odzwierciedlają stan fizjopatologiczny.⁷ Uważa się, że obecne w płynie owodniowym czynniki wzrostu, cząsteczki stanowiące element odporności wrodzonej oraz składniki pochodzenia surowiczego, są zaangażowane w rozwój, wzrost i ochronę płodu przed infekcją. Większość aktywnych biocząsteczek to glikoproteiny wykazujące działanie immunomodulujące. Wiedza dotycząca struktury glikanów i roli glikokoniugatów obecnych w płynie owodniowym i osoczu kobiet ciężarnych w odniesieniu do etapów ciąży jest fragmentaryczna. Dodatkowo, badania są wybiórcze, a dane nie pokazują wyraźnie zmian, które występują między trymestrami.

Przedstawiona do oceny rozprawa habilitacyjna obejmuje cykl 8 publikacji, których omówienie przedstawiono poniżej. Aktualny stan wiedzy dotyczący glikokoniugatów płynu owodniowego oraz potencjalny udział poszczególnych glikoprotein w zapewnieniu homeostazy i dobrostanu płodu podsumowałam w pracy przeglądowej „**Terminal monosaccharide expression on amniotic glycoproteins as biomarkers of fetus maturity**” (2011) [publikacja nr 4.1]. Proces glikozylacji białek w czasie ciąży jest stymulowany i kontrolowany przez zmiany endokrynologiczne⁸, swoiste glikozylotransferazy, jak również

⁶ Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 2003;13:41-53

⁷ Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J. Perinatol.* 2005;25:341-348

⁸ Carson DD, Farrar JD, Laidlaw J, Wright DA. Selective activation of the N-glycosylation apparatus in utero by estrogen. *J. Biol. Chem.* 1990;265:2947-2955

interleukiny.⁹ Niektóre glikoproteiny płynu owodniowego, takie jak glikodelina, transferyna¹⁰, gonadotropina kosmówkowa¹¹, AGP¹², czy FN¹³, reprezentują inny wzór glikozylacji, szczególnie fukozytacji i sjalizacji, w porównaniu z glikoproteinami obecnymi w surowicy matki. Zmiany w ekspozycji kwasu sjalowego i fukozy na poddanych analizie glikokoniugatach płynu owodniowego są dynamiczne, ilościowe i jakościowe i wskazują, że ogólny schemat ekspozycji monosacharydów końcowych na poszczególnych glikoproteinach jest odmienny. Niemniej jednak, zmiany pojawiają się na tych samych etapach ciąży, tj. przełom II i III trymestru, poród, ciąża przenoszona, co pozwoliło na wysunięcie hipotezy, że profil glikozylacji obecnych w płynie owodniowym glikokoniugatów/glikoprotein może stanowić jeden z potencjalnych markerów odzwierciedlających stopień dojrzałości płodu.

Wśród glikoprotein płynu owodniowego najwięcej jest wiadomo o AGP (α 1-kwaśna glikoproteina), glikodelinie A i transferynie, które zawierają w strukturach N-glikanów sjalowane glikotopy Lewis^x. Antygen Lewis^x hamuje adhezję komórkową zależną od E-selektyn, która ma miejsce m.in. podczas ostrego stanu zapalnego.¹⁴ Zmiany profilu sjalizacji i fukozytacji, dla poszczególnych glikoprotein mogą się jednak różnić, co jest ściśle związane zarówno z pochodzeniem glikoprotein i miejscem syntezy (komórki matki, płodu, łożyska), jak również, etapem rozwoju ciąży i stanem fizjopatologicznym. Z tego powodu wzór sjalizacji i fukozytacji glikokoniugatów oraz glikoprotein płynu owodniowego podczas ciąży odzwierciedla wypadkowy, ogólny wzór glikozylacji, na który wpływają różne miejsca syntezy na kolejnych etapach ciąży, a także wymiana cząsteczek o aktywności biologicznej, czynników wzrostu, między matką, płodem i łożyskiem. Warto dodać, że obecna wiedza na temat wzorca glikozylacji glikoprotein płynu owodniowego jest jedynie punktem wyjścia do dalszych badań strukturalnych z zastosowaniem zaawansowanych metod spektralnych.

Z immunologicznego punktu widzenia interesujące wydawało się określenie profilu sjalizacji i fukozytacji immunoglobulin obecnych w płynie owodniowym w odniesieniu do ich osoczowych odpowiedników oraz etapów rozwoju ciąży. Do analizy profilu sjalizacji i fukozytacji immunoglobulin płynu owodniowego zastosowano immunoenzymatyczny test fazy stałej z użyciem specyficznych lektyn (Lektyno-ELISA). W analizach względnej zawartości kwasu sjalowego (ekspresji kwasu sjalowego) zastosowano lektyny specyficzne do α 2,3- i α 2,6-wiązanego kwasu sjalowego, tj. lektyny z *Maackia amurensis* (MAA) i *Sambucus nigra* (SNA), natomiast w badaniach względnej zawartości fukozy (ekspresji fukozy) zastosowano lektyny specyficzne do α 1,2-, α 1,3- i α 1,6-wiązanej fukozy, tj. lektyny z *Ulex europaeus* (UEA),

⁹ Brinkman-Van der Linden ECM, Havenaar EC, Van Ommen ECR, Van Kamp GJ, Gooren LIG, Van Dijk W. Oral estrogen treatment induces a decrease in expression of sialyl Lewis^x on alpha1-acid glycoprotein in females and male-to-female transsexuals. *Glycobiology* 1996;6:407-412

¹⁰ Jeschke U, Xiaoyu W, Volker B, Friese K, Stahn R. Glycodelin and amniotic fluid transferrin as inhibitors of E-selectin-mediated cell adhesion. *Histochem. Cell Biol.* 2003;119:345-354

¹¹ Jeschke U, Stahn R, Goletz C, Wang XY, Briese V, Friese K. HCG in trophoblast tumour cells of the cell line Jeg3 and hCG isolated from amniotic fluid and serum of pregnant women carry oligosaccharides of the sialyl Lewis x and sialyl Lewis a type. *Anticancer. Res.* 2003;23:1087-1092

¹² Orczyk-Pawiłowicz M, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I. The expression of fucose isoforms of amniotic and plasma alpha-1- acid glycoprotein derived from 2nd and 3rd trimester normal pregnancies. *Clin. Biochem.* 2009;42:1517-1523

¹³ Hirnle L, Kątnik-Prastowska I. Amniotic fibronectin fragmentation and expression of its domains, sialyl and fucosyl glycotopes associated with pregnancy complicated by intrauterine infection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007;45:208-214

¹⁴ Jeschke U, Xiaoyu W, Volker B, Friese K, Stahn R. Glycodelin and amniotic fluid transferrin as inhibitors of E-selectin-mediated cell adhesion. *Histochem. Cell Biol.* 2003;119:345-354

Tetragonolobus purpureus (LTA) i *Lens culinaris* (LCA). Takie innowacyjne podejście metodyczne do analizy ekspresji glikotopów zawierających kwas sialowy i/lub fukozę zostało opracowane w Katedrze Chemii i Immunochemii i stanowi użyteczne narzędzie w badaniach zmian profilu sjalizacji i/lub fukozytacji glikoprotein płynów biologicznych, w tym płynu owodniowego. Pozwala na jednoczesną analizę stosunkowo dużej liczby prób materiału biologicznego, i uniknięcie czaso- i kosztochłonnnych procedur związanych z izolacją glikoprotein z analizowanego materiału, która w przypadku Lektyno-ELISA zachodzi bezpośrednio na związanych do fazy stałej dołka płytki polistyrenowej specyficznych przeciwciałach. Jest to szczególnie istotne, w sytuacji, gdy stężenie analizowanej glikoproteiny w badanym materiale biologicznym jest relatywnie niskie i analizy są wykonywane na 50-100 ng glikoproteiny. Przeciwciała wychwytyjące używane w testach Lektyno-ELISA, specyficzne w stosunku do analizowanych glikoprotein, przed przystąpieniem do analizy są poddawane obróbce chemicznej (utlenianie nadjodanem) i enzymatycznej (trawienie neuraminidazą) celem usunięcia monosacharydów końcowych, które mogłyby uczestniczyć w reakcjach krzyżowych z lektynami.

IgG obecna we krwi matki jest aktywnie przenoszona przez łożysko do płodu przez receptory powierzchniowe syncytiotroblastu specyficzne dla fragmentu Fc IgG.¹⁵ We wczesnym okresie ciąży, płód nie jest zdolny do syntetyzowania IgG, jedynie śladowe ilości mogą być syntetyzowane pod koniec trzeciego trymestru. IgG obecne w płynie owodniowym pochodzi głównie z obiegu płodowo-łożyskowego.^{16,17} Glikany IgG są uważane za jeden z najbardziej obiecujących celów modulowania aktywności IgG, uczestniczących w przełączaniu cząsteczkowym w celu zwiększenia prozapalnej lub przeciwzapalnej aktywności IgG. Zmiany w glikozytacji IgG, w szczególności sjalizacji i fukozytacji, wpływają na powinowactwo wiązania z antygenem i FcR oraz uwalnianie mediatorów prozapalnych, jak również mają wpływ na cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał, aktywność przeciwnowotworową w warunkach in vitro oraz funkcje efektorowe, w których pośredniczy przeciwciało, takie jak fagocytoza i degranulacja.^{18,19} W pracy „***Degree of sialylation and fucosylation of plasma and amniotic immunoglobulin G changes progressively during normal pregnancy***” (2012) [publikacja nr 4.3] wykazałam, że pomimo prawie niezmiennego stężenia IgG w płynie owodniowym (dużo niższe niż w osoczu kobiet ciężarnych, odpowiednio 92,7±46 mg/l i 10,7±5,1 g/l) podczas analizowanego okresu ciąży, tj. II, III trymestr, okres okołoporodowy, ciąża przenoszona oraz poród, poziom sjalizacji i fukozytacji IgG ulegał dynamicznym zmianom związanym ze stopniem zaawansowania ciąży. W II trymestrze profil sjalizacji i fukozytacji owodniowej IgG jest jakościowo zbliżony do IgG

¹⁵ Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003;21:3365-69

¹⁶ Quan CP, Watanabe S, Forestier F, Bouvet JP. Human amniotic IgA inhibits natural IgG autoantibodies of maternal or unrelated origin. *Eur J Immunol* 1998;28:4001-9

¹⁷ Goldblum RM, Hilton S. Amniotic fluid and the fetal mucosal immune system. In *Mucosal Immunology*, 2nd edn, P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J. R. McGhee (eds). Academic Press: London 1999;1555-64

¹⁸ Anthony RM, Ravetch JV. A novel role for the IgG Fc glycan: the antiinflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 2010;30:S9-S14

¹⁹ Anthony RM, Nimmerjahn F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcRs in vivo. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2011;16:7-14

osocza matki, natomiast ilościowo ich poziom jest wyższy i charakteryzuje się obecnością $\alpha 2,3$ -sialowanych glikotopów, które nie występują na IgG pochodzenia matczynego. Obecność $\alpha 2,3$ -sialowanego glikotopu, rozpoznawanego w reakcji z lektyną MAA, glikoproteinach jest związane z etapami rozwoju, tj. okresem płodowym i jest określane, jako płodowy typ glikozylacji.²⁰ W porównaniu do II trymestru, na IgG płynu owodniowego z III trymestru profil sjalizacji i fukozytacji wykazywał zmiany jakościowe jak i ilościowe, związane z pojawieniem się $\alpha 1,2$ - i $\alpha 1,3$ -fukozylowanych glikotopów na owodniowej IgG oraz istotny wzrost ekspresji zarówno $\alpha 2,3$ - jak i $\alpha 2,6$ -sialowanych glikotopów. W kolejnych etapach ciąży fizjologicznej, tj. w okresie okołoporodowym oraz podczas porodu profil sjalizacji i fukozytacji utrzymywał się na względnie stałym poziomie. Natomiast w płynie owodniowym pochodzącym z ciąży po 41 tygodniu (przenoszonych) zaobserwowaliśmy, istotny wzrost ekspresji wysoko fukozylowanych i sialowanych glikowariantów IgG (pochodzenia płodowego i/lub łożyskowego) w porównaniu do glikowariantów IgG obecnych w płynie owodniowym pochodzącym z porodu.

Immunoglobuliny A, oprócz wysokiej heterogeniczności molekularnej związane z faktem, że występują, jako monomery, dimery i oligomery, oraz dodatkowo w podklasach IgA1 i IgA2, a także jako S-IgA, występują w różnych glikoformach z przyłączonymi N- i O-glikanami. Część cukrowa IgA zależy od pochodzenia i stanowi od 6% dla IgA obecnej w surowicy do 25% dla składnika wydzielniczego (SC). IgA1, IgA2 i S-IgA mogą posiadać różne struktury N- i/lub O-glikanów, które przynajmniej częściowo są wynikiem miejscowo zależnych różnic w mechanizmie glikozylacji w komórkach nabłonkowych²¹. Badania Royle i wsp. [2003]²² wykazały, że cząstka wydzielnicza S-IgA z siary, dzięki obecności $\alpha 2,3$ -sialowanych i $\alpha 1,4$ -, $\alpha 1,3$ - i $\alpha 1,2$ - fukozylowanych glikotopów, które służą jako wabiki dla patogenów wiążących się z powierzchnią błon śluzowych, stanowi element odporności wrodzonej. W płynie owodniowym podczas ciąży stężenie IgA, podobnie jak IgG, utrzymuje się na relatywnie stałym poziomie, natomiast jest znacznie niższe ($7,7 \pm 4,4$ mg/l) niż stężenie IgG ($92,7 \pm 46$ mg/l). W pracy „*Lectin-based analysis of fucose and sialic acid expressions on human amniotic IgA during normal pregnancy*” (2013) [publikacja nr 4.4] wykazałam, że podobnie do IgG, IgA płynu owodniowego z II trymestru wykazywała wyższy poziom sjalizacji i fukozytacji niż IgA osocza matki oraz obecność $\alpha 2,3$ -sialowanych i $\alpha 1,2$ - i $\alpha 1,3$ -fukozylowanych glikotopów, które nie występują na osoczowej IgA. Ponadto, profil sjalizacji i fukozytacji był ściśle powiązany z etapami ciąży. Główne trendy obserwowane dla sjalizacji i fukozytacji IgG i IgA płynu owodniowego na przełomie II i III trymestru ciąży są podobne, tj. wzrost ekspresji $\alpha 2,3$ - i $\alpha 2,6$ -sialoglikotopów oraz $\alpha 1,2$ -, $\alpha 1,3$ - i $\alpha 1,6$ -fukozyloglikotopów i są odzwierciedleniem intensywnego rozwoju i dojrzewania płodu w III trymestrze ciąży. Ponadto, w wyniku zwiększonej syntezy/transportu Ig, poziom Ig pochodzenia płodowego

²⁰ Hampel DJ, Köttgen B, Dudenhausen JW, Köttgen E. Fetal fibronectin as a marker for an imminent preterm delivery. A new technique using the glycoprotein lectin immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 1999;224:31-42

²¹ Arnold JN, Royle L, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB. Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. John S. Axford (ed), *Glycobiology and Medicine*, 2005; pp 27-43. Springer, Printed in the Netherlands

²² Royle L, Roos A, Harvey DJ, Wormald MR, van Gijlswijk- Janssen D, Redwan el-RM, Wilson IA, Daha MR, Dwek RA, Rudd PM. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J. Biol. Chem.* 2003;278:20140-20153

jest wyższy i przeważa nad udziałem IgA i IgG pochodzenia matczynego, co ma bezpośredni wpływ na wzór glikozylacji owodniowego IgA i IgG podczas III trymestru ciąży. Taki sam charakterystyczny przebieg ilościowego udziału płodowych i matczyńskich glikoform obserwowano wcześniej dla glikokoniugatów płynu owodniowego²³, AGP²⁴ i FN²⁵.

Glikoproteiny płynu owodniowego, do których należy także glikowarianty IgG i IgA zawierające α 2,3-kwas sialowy i α 1,3-fukozę, które tworzą glikotop sialo-Lewis^x, obecne w III trymestrze ciąży mogą stanowić ligand dla selektyn owodni, a tym samym, mogą one działać, jako biocząsteczki przeciwzapalne, przez hamowanie oddziaływań między leukocytami i selektynami. Odmienne role jest sugerowane dla glikowariantów zawierających α 1,2-fukozę, która wchodzi w skład glikotopu Lewis^y, i stanowi ligand dla receptorów lektynowych niektórych bakterii, np. *Pseudomonas aeruginosa*²⁶ i *Campylobacter jejuni*.²⁷ Zgodnie z teorią Royle'a i wsp. [2003], α 1,2-fukozylowane glikotopy obecne na owodniowych IgA i IgG mogą działać, jako inhibitory adhezji i kolonizacji bakterii i w ten sposób uczestniczyć we wrodzonej odporności. Obecne w płynie owodniowym IgA może funkcjonować, jako "powłoka antyseptyczna" na powierzchni błon śluzowych płodu i zapobiegać adhezji i inwazji bakterii.²⁸

Z immunologicznego punktu widzenia, podczas porodu obserwuje się napływ komórek układu odpornościowego do macicy, w celu promowania procesu zapalnego. Prozapalne środowisko, które promuje skurcze macicy, urodzenie dziecka i wydalenie łożyska^{29,30}, nie wywiera istotnego wpływu na stopień usjalowania i ufukozylowania owodniowego IgG i IgA podczas porodu. Zmiany wykazane dla glikowariantów owodniowego IgG w grupie ciąż przenoszonych tj. wzrost sjalizacji i fukozytacji, pokrywają się ze zmianami wykazanymi dla owodniowego IgA (z wyjątkiem dla MAA; wzrost bez istotności statystycznej). Występowanie podobnych trendów w ekspresji sjalowanych i fukozylowanych glikotopów może skłaniać do postawienia hipotezy, że dla immunoglobulin płynu owodniowego mogą istnieć wspólne mechanizmy regulacji glikozylacji, zależne od wieku ciąży i prawdopodobnie związane z syntezą miejscową i/lub związaną z ciążą modulacją glikozylacji.

²³ Orczyk-Pawiłowicz M, Florjański J, Zalewski J, Kątnik-Prastowska I. Relative amounts of sialic acid and fucose of amniotic fluid glycoconjugates in relation to pregnancy age. *Glycoconj. J.* 2005;22:433-442

²⁴ Orczyk-Pawiłowicz M, Hirnle L, Kątnik-Prastowska, I. The expression of fucose isoforms of amniotic and plasma alpha-1-acid glycoprotein derived from 2nd and 3rd trimester normal pregnancies. *Clin. Biochem.* 2009;42:1517-1523

²⁵ Hirnle L. Analysis of fibronectin molecular forms in amniotic fluid and plasma of pregnant women during normal and complicated by intrauterine infection pregnancies. Habilitation Thesis, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland; 2006

²⁶ Lerrer B, Lesman-Movshovich E, Gilboa-Garber N. Comparison of the antimicrobial adhesion potential of human body fluid glycoconjugates using fucose-binding lectin (PA-III) of *Pseudomonas aeruginosa* and *Ulex europaeus* lectin (UEA-I). *Curr Microbiol* 2005;51:202-6

²⁷ Wada J, Honda Y, Nagae M, et al. 1,2- α -L-Fucosyltransferase: a glycosyltransferase derived from an inverting α -glycosidase with an unusual reaction mechanism. *FEBS Lett* 2008;582:3739-43

²⁸ Monteiro RC. Role of IgA and IgA Fc receptors in inflammation. *J. Clin. Immunol.* 2010;30:1-9

²⁹ Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2006;11:317-326

³⁰ Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011;1221:80-87

Podsumowując, ciąża jest okresem zdarzeń molekularnych, w którym rozwój, dojrzewanie płodu i adaptacja ustroju matki jest zasocjowana z modulacją układu immunologicznego, hormonalnego i nerwowego, w których istotną rolę w komunikacji między komórkami i biocząsteczkami odgrywają oddziaływania między ligandami cukrowymi (glikotopami) a receptorami lektynowymi. Podczas kolejnych etapów ciąży, tego typu oddziaływania mogą mieć znaczenie dla kontrolowania/regulacji zarówno pro- jak i przeciwzapalnych procesów towarzyszących ciąży. W tym aspekcie, I i III trymestr ciąży jest definiowany, jako faza prozapalna (Th1), która towarzyszy odpowiednio implantacji oraz skurczom macicy podczas porodu. Przeciwnie, II trymestr ciąży reprezentuje fazę przeciwzapalną, określaną także, jako środowisko Th2, w którym matka, łożysko i płód są symbiotyczne.³¹ Zmiany w ekspresji reaktywnych z lektynami sjałowanych i fukozylowanych glikotopów IgG i IgA na przełomie II i III trymestru pokrywają się z immunologicznymi fazami ciąży. W mojej opinii, związana z ciążą unikalna ekspresja sjałowanych i fukozylowanych glikoform IgG i IgA płynu owodniowego odzwierciedla ogólne znaczenie oddziaływań cukier-lektyna i/lub cukier-cukier w kontroli i modulacji pro- i przeciwzapalnych wydarzeń, które są odpowiedzialne za zapewnienie dobrostanu płodu.

Otrzymane wyniki sugerują, że wysoko usjałowane i ufukozylowane glikowarianty owodniowych IgA i IgG nie wydają się być biernymi cząsteczkami, ale mogą być zaangażowane w kontrolę i modulowanie, zależnych od ekspresji swoistych glikotopów, procesów pro- i przeciwzapalnych, które uczestniczą w zapewnianiu homeostazy podczas ciąży oraz ochronę płodu. Na podstawie uzyskanych profili sjałowacji i fukozytacji w czasie ciąży, można wyróżnić przełomowe okresy w ekspresji fukozylowane i sjałowanych glikowariantów owodniowych IgG i IgA związane z progresją/rozwojem ciąży. Wydają się być wskaźniki molekularnymi odzwierciedlającymi zaawansowanie przemian molekularnych związanych z rozwojem ciąży, jednakże takie markery nie mogą być rutynowo stosowane w klinicznym laboratorium z powodu inwazyjnej procedury amniopunkcji.

Odmienne tendencje od innych badanych w okresie okołoporodowym glikoprotein płynu owodniowego wykazywał profil glikozylacji AGP^{32,33} - białka ostrej fazy. Fakt ten skłonił nas do analizy poziomu sjałowacji i fukozytacji AGP w ciążach powikłanych urodzeniem noworodka z cechami „zespołu przenoszenia”. Ciąża przenoszona/po terminie porodu może zakończyć się urodzeniem noworodka z cechami „zespołu przenoszenia” (ang. post-maturity syndrome), ok. 10% wszystkich ciąż, natomiast w 43 tygodniu ciąży ryzyko wzrasta aż do 33%. Termin „zespół przenoszenia” nie zawsze jest równoznaczny z dłuższym czasem trwania ciąży³⁴, natomiast jest związany z występowaniem zaburzeń w rozwoju płodu, które są ujawnione po urodzeniu i obejmują: zaniki tkanki podskórnej, łuszczenie skóry, zabarwienie

³¹ Mor, G., Cardenas, I.: The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010;63:425-433

³² Orczyk-Pawiłowicz M, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I.: Alterations of N-glycan branching and expression of sialic acid on amniotic fluid alpha-1-acid glycoprotein derived from second and third trimesters of normal and prolonged pregnancies. *Clin.Chim.Acta* 2006;367:86-92

³³ Orczyk-Pawiłowicz M, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I.: The expression of fucose isoforms of amniotic and plasma alpha-1-acid glycoprotein derived from 2nd and 3rd trimester normal pregnancies. *Clin.Biochem.* 2009;42:1517-1523

³⁴ Suresh, V.; Stanley, K. P. Prolonged Pregnancy. *Curr. Obstet. Gyn.* 2002;12:59-64

smółką skóry płodu.³⁵ Z klinicznego punktu widzenia, „zespół przenoszenia”, jest konsekwencją obniżenia wydolności funkcji łożyska, które zaczyna się starzeć i ostatecznie nie jest w stanie wydajnie pełnić swoich funkcji, tj. dostarczać tlen i substancje odżywcze od matki.^{36,37}

W badaniach przedstawionych w pracy **„High expression of α 1,2- and α 1,6-linked fucoses on amniotic AGP as a biomarker of fetal postmaturity risk” (2011) [publikacja nr 4.2]** po raz pierwszy wykazałam, że w płynie owodniowym ciąż zakończonych urodzeniem noworodka z cechami „zespołu przenoszenia” profil fukozytacji AGP, białka ostrej fazy, był zmieniony. Zaobserwowałam istotnie wyższą ekspresję α 1,6- i α 1,2-fukozylowanych glikotopów owodniowego AGP z równoczesnym brakiem zmian w profilu fukozytacji AGP osocza matek, które są skorelowane z występowaniem „zespołu przenoszenia” u noworodków. Interesujące, że sposób zakończenia ciąży (poród/cięcie cesarskie) nie miał wpływu na profil sjalizacji i fukozytacji owodniowego AGP. W większości przypadków, „zespół przenoszenia” wiąże się ze zwapnieniem i pogorszeniem wydajności łożyska. Ponadto, choroby naczyń łożyska, mogą wywoływać odpowiedź cytokin zapalnych płodu. W konsekwencji, uszkodzone komórki łożyska są eliminowane w wyniku apoptozy. Obu procesom, tj., stanom zapalnym i apoptozie, towarzyszy zwiększona ekspresja fukozy na glikokoniugatach komórkowych i osoczowych.^{38,39} Zakładając, że AGP w płynie owodniowym po terminie porodu jest głównie pochodzenia łożyskowego/płodowego, wyższa ekspresja α 1,2- i α 1,6-fukozylowanych glikoform AGP może być związana z modulacją (miejscową) ścieżki glikozylacji towarzyszącej stanom zapalnym i/lub nawet procesom apoptotycznym. Potencjalne implikacje kliniczne należy jednak traktować, jako uzupełnienie wielu technik obrazowania ciąży pozwalających na obserwację in situ dobrostanu płodu i łożyska. Zwiększona fukozytacji AGP towarzysząca ciążom z „zespołem przenoszenia”, może być rozważana w kontekście dodatkowego glikobiomarkera do monitorowania ciąży, które przekroczyły 40-ty tydzień, ponieważ noworodki, urodzone z „zespołem przenoszenia”, które w ostatnim okresie ciąży znajdowały się w środowisku prozapalnym, stanowią grupę zwiększonego ryzyka rozwoju zaburzeń neurologicznych i chorób autoimmunologicznych. Glikowarianty glikoprotein obecnych w płynie owodniowym wydają się być wskaźnikami molekularnymi odzwierciedlającymi nie tylko wiek ciąży i stopień dojrzałości płodu, ale mogą być również rozpatrywane, jako efekt fizjologicznych zdarzeń, które towarzyszą zarówno ciąży normalnej jak i przenoszonej. Ponadto, ekspresja α 1,2-fukozylowanych glikotopów, które znajdują się w glikodeterminantach rodziny Lewis⁴⁰ i są cząsteczkami uczestniczącymi w odporności wrodzonej⁴¹ może się różnić między matkami, co jest związane z statusem

³⁵ Siozos C, Stanley KP. Prolonged Pregnancy. *Curr. Obst. Gynaecol.* 2005;15:73-79

³⁶ McKenna D, Tharmaratnam S, Mahsud S, Dornan J. Ultrasonic Evidence of Placental Calcification at 36 Weeks' Gestation: Maternal and Fetal Outcomes. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2005;84:7-10

³⁷ Abramowicz JS, Sheiner E. In Utero Imaging of the Placenta: Importance for Diseases of Pregnancy. *Placenta* 2007;28:S14-S22

³⁸ Hocheppied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. α 1-Acid Glycoprotein: An Acute Phase Protein with Inflammatory and Immunomodulating Properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:25-34

³⁹ Franz S, Frey B, Sheriff A, Gaip US, Beer A, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. Lectins Detect Changes of the Glycosylation Status of Plasma Membrane Constituents During Late Apoptosis. *Cytometry* 2006;69A:230-239

⁴⁰ Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 2003;13:41-53

⁴¹ Royle L, Roos A, Harvey DJ, Wormald MR, van Gijlswijk- Janssen D, Redwan el-RM, Wilson IA, Daha MR, Dwek RA, Rudd PM. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J. Biol. Chem.* 2003;278:20140-20153

wydzielacza/niewydzielacza i ma wpływ na wrażliwość na bodźce/czynniki zewnętrzne oraz wydajność układu immunologicznego.

Z immunologicznego punktu widzenia płyn owodniowy może być uważany za prekursora karmienia mlekiem ludzkim. Według teorii Goldblum i Hilton [1999]⁴² ludzkie mleko ze względu na ochronną rolę związaną z układem immunologicznym błon śluzowych oraz jako egzogenne źródło czynników immunologicznych, chronią noworodka w sposób bezpośredni i modulują niedojrzały układ odpornościowy niemowlęcia. Mleko kobiece zawiera cząsteczki dostarczające noworodkom i niemowlętom podstawowych składników budulcowych/odżywczych, takich jak białka, węglowodany, lipidy, związki nieorganiczne, których stężenie zmienia się wraz z etapami dojrzewania mleka. Mleko ludzkie, oprócz składników odżywczych, jest bogatym źródłem biologicznie aktywnych cząsteczek, w tym białek, które w sposób bezpośredni i pośredni biorą udział w procesach odpornościowych. Bioaktywne cząsteczki zaangażowane w procesy immunologiczne obecne w mleku matki, stanowią egzogenne źródło czynników immunologicznych, które nie tylko wspomagają i modulują działanie niedojrzałego układu odpornościowego noworodka, ale także chronią go przed rozwojem infekcji.

Aktualny stan wiedzy dotyczący składu białkowego mleka kobiecego, ze szczególnym uwzględnieniem cząsteczek zaangażowanych w procesy immunologiczne przedstawiono w pracy przeglądowej **„Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne” (2013) [publikacja nr 4.5]**. Dokonano przeglądu piśmiennictwa i charakterystyki białek mleka uczestniczących w odporności nieswoistej (lizozy, laktoferyna, laktoperoksydaza oraz białka układu dopełniacza oraz jego inhibitory) i swoistej (immunoglobuliny), białka uczestniczące w komunikacji międzykomórkowej (cytokiny), niektóre czynniki wzrostu, białka uczestniczące w regulacji równowagi energetycznej oraz peptydy o właściwościach bifidogennych. Ponadto, scharakteryzowano białka uczestniczące w immunomodulacji oraz zaangażowane w proces zapalny, tj. białek ostrej fazy, w tym białka C-reaktywnego, α 1-antytrypsyny, α 1- antychymotrypsyny, α 1-kwaśnej glikoproteiny, haptoglobiny, ceruloplazminy, fibrynogenu, prokalcytoniny oraz składników dopełniacza C3 i C4. Obecność w mleku ludzkim cząsteczek zaangażowane w procesy immunologiczne warunkuje prawidłowy rozwój niemowląt, a w razie zachorowania szybszy powrót do zdrowia. Z ewolucyjnego, żywieniowego i ekonomicznego punktu widzenia, mleko ludzkie jest idealnym naturalnym pokarmem zalecanym przez Amerykańską Akademię Pediatrii, Europejskie Stowarzyszenie Neonatologii i Perinatologii oraz Światową Organizację Zdrowia, a także pierwszym naturalnym lekiem wykorzystywanym w opiece postnatalnej. Skład mleka kobiecego, szczególnie matek, które urodziły przedwcześnie, nie jest do końca dobrze zdefiniowany, co jest związane z dużą zmiennością w zależności od okresu laktacji, jak również z występowaniem różnic indywidualnych między matkami. Pełna charakterystyka oraz docenienie wartości zarówno odżywczych jak i immunologicznych cząsteczek obecnych

⁴² Goldblum RM, Hilton S. Amniotic fluid and the fetal mucosal immune system. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, et al., eds. *Mucosal Immunology*, 2nd ed. London, Academic Press, 1999:1555-1564

w mleku mogłyby wpłynąć na inicjację, czas trwania i wyłączność karmienia piersią, a także przyczynić się do rozwoju projektu substytutów mleka ludzkiego.⁴³

Białka mleka badano przez dziesięciolecia, jednak zaskakująco mało wysiłku włożono w określenie, jak modyfikacje potranslacyjne, szczególnie glikozylacja białek, mogą się zmieniać w czasie trwania laktacji. Badania Froehlich i wsp. [2010]⁴⁴ wykazały, że laktoferyna, jedna z najpowszechniejszych glikoprotein w mleku ludzkim ulega dynamicznej glikozylacji podczas laktacji. Należy podkreślić, że najbardziej dynamiczne zmiany w ekspresji zarówno białek jak i glikoprotein występują w pierwszym miesiącu laktacji, w czasie dojrzewania mleka, tj. przemiany siary przez mleko przejściowe do mleka dojrzalego. Do tej pory scharakteryzowano w szczególności zaledwie kilka glikoprotein mleka ludzkiego, które występują w mleku w wysokich stężeniach, tj. laktoferyna i S-IgA.

Wraz z mlekiem matki, noworodkom dostarczane są składniki odżywcze, a także glikokoniugaty, które zapewniają swoistą, a także nieswoistą, ochronę przed czynnikami infekcyjnymi i są uważane za część wrodzonego układu odpornościowego.⁴⁵ W szczególności, sialowane i fukozylowane glikotopy, uczestniczące w wielu procesach rozpoznawania biologicznych i przekazywania sygnałów w oparciu o zależne od selektywności oddziaływanie komórka-komórka, są zdolne do modulowania reakcji w układzie odpornościowym, manifestując swoje właściwości przeciwzapalne. Określenie profilu sjalizacji i fukozylacji glikoprotein mleka ludzkiego jest istotne w świetle doniesień o kluczowej roli wolnych oligosacharydów zawierających kwas sialowy i/lub fukozę w hamowaniu adhezji patogennych mikroorganizmów do tkanek niemowląt karmionych mlekiem matki. Ponadto, na glikoproteinach występują częściowo inne glikotopy lub całe struktury oligosacharydowe niż na HMO, które mogą stanowić dodatkowe ligandy rozpoznawane przez patogeny, i w ten sposób stanowić dodatkową ochronę przed infekcją.

AGP, dodatnie białko „ostrej fazy”, które zawiera od 40 do 45% cukrów w cząsteczce, może występować w 15-20 glikoformach, których wzajemna proporcja zmienia się w stanach patologicznych i pozwala rozróżnić ostre stany zapalne od chronicznych. Ponadto, część cukrowa AGP moduluje funkcjonowanie układu immunologicznego oraz poprzez kompetycyjne wiązanie jej sjalowanych glikanów, uczestniczy w hamowaniu adhezji niektórych patogenów, a mianowicie *Plasmodium falciparum* i *Mycoplasma pneumoniae* do komórek gospodarza.⁴⁶ AGP obecne w mleku kobiecym jest wypadkową pochodzenia wątrobowego i syntezy miejscowej przez komórki nabłonkowe gruczołu sutkowego. W modelu bydłęcym AGP mleka, jako cząsteczka immunomodulująca, indukuje monocyty do syntezy niektórych pro- i przeciwzapalnych cytokin podczas stanu zapalnego gruczołu sutkowego.⁴⁷ W pracy „**Lactation stage-related expression of sialylated and fucosylated**

⁴³ Neville MC, Anderson SM, McManaman JL, Badger TM, Bunik M, Contractor N, et al. Lactation and neonatal nutrition: defining and refining the critical questions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012;17:167-88

⁴⁴ Froehlich JW, Dodds ED, Barboza M, et al. Glycoprotein expression in human milk during lactation. *J Agric Food Chem* 2010;58:6440-6448

⁴⁵ Newburg DS. Glycobiology of human milk. *Biochemistry (Moscow)* 2013;78:771-785

⁴⁶ Ceciliani F, Pocacqua V. The acute phase protein α 1-acid glycoprotein: A model for altered glycosylation during diseases. *Curr Prot Pept Sci* 2007;8:91-108.

⁴⁷ Ceciliani F, Pocacqua V, Provasi E, et al. Identification of the bovine α 1-acid glycoprotein in colostrum and milk. *Vet Res* 2005;36:735-746

glycotopes of human milk α -1-acid glycoprotein” (2014) [publikacja nr 4.6] wykazano, że AGP mleka ludzkiego wynosi około 0,1% całkowitego białka mleka, a jego stężenie jest około 30 razy niższe niż w osoczu matek karmiących i osób zdrowych. Ponadto, wykazano spadek stężenia AGP w mleku ludzkim podczas procesu dojrzewania mleka, który koreluje ze spadkiem stężenia białka całkowitego. Analiza względnej ilości kwasu sjałowego i fukozy z zastosowaniem specyficznych lektyn (Lektyno-ELISA) wykazała, że poziom usjałowania i ufukozylowania AGP obecnego w mleku ludzkim różni się w sposób ilościowy, jak i jakościowy od profilu AGP osocza matek karmiących. Ekspresja α 2,3- i α 2,6-sjałowanych glikotopów była istotnie wyższa dla AGP mleka ludzkiego. Ponadto, wykazano wysoką ekspresję α 1,2-, α 1,3- i α 1,6-fukozylowanych glikotopów, które są obecne w niewielkich ilościach lub których obecność nie została potwierdzona dla AGP osocza matek karmiących i zdrowych osób. Zwiększony stopień fukozytacji jest ogólnym trendem obserwowanym dla glikoprotein mleka ludzkiego.⁴⁸ Pomimo spadku poziomu sjałizacji i fukozytacji AGP mleka podczas laktacji, ich poziom nadal był istotnie wyższy niż poziom sjałizacji i fukozytacji obserwowany dla AGP osocza.

Profil sjałizacji wykazany dla AGP mleka, tj. względnie stały poziom α 2,3-sjałizacji (reaktywność z MAA) z jednoczesnym obniżeniem α 2,6-sjałizacji (reaktywność z SNA), pokrywa się z trendami dla poziomu wolnych oligosacharydów mleka (HMO) i względnie stabilnym poziomie 3-sjałolaktazy podczas laktacji opisanymi przez Wang i Brand-Miller.⁴⁹ W moich badaniach wykazałam, że względna zawartość α 1,2- (reaktywność z UEA) i α 1,6- (reaktywność z LCA) fukozylowanych glikotopów również ulegała obniżeniu wraz ze stopniem dojrzewaniem mleka. Niemniej jednak, ekspresja UEA-reaktywnych glikotopów różniła się w zależności od statusu wydzielacza/niewydzielacza matki. W naszych badaniach 19% próbek mleka pochodziło od matek ze statusem niewydzielacza (nie wykazywało reaktywności z UEA). Próbkę mlek pochodzące od matek ze statusem niewydzielacza zostały wykluczone z analizy statystycznej. Interesujące, że dla pozostałych analizowanych glikotopów status wydzielacza nie miał wpływu na reaktywność z zastosowanymi lektynami. W przeciwieństwie, ekspresja α 1,3-fukozylowanych glikotopów (reaktywność z LTA) wykazywała odmienny trend, była niska na początku laktacji, w siarze, i znacznie wyższa w mleku przejściowym i dojrzałym. Glikotopy zawierające α 1,3- fukozę, jako część antygenów Lewis^x i sjał-Lewis^x, prawie nie są wykrywane lub występują w niewielkich ilościach w prawidłowych niezapalnych tkankach, natomiast podczas reakcji ostrej fazy, ich ekspresja wzrasta i działają, jako modulatory zależnej od selektyn adhezji komórkowej. We wczesnej siarze zdrowych matek, ekspresja α 1,3-fukozylowanych glikotopów w większości przypadków była niska, jednak wysoka wartość odchylenia standardowego od wartości średniej oraz zwiększenie poziomu w czasie pierwszego tygodnia laktacji wskazuje na indywidualne różnice w ekspresji α 1,3-fukozy. Zachwiania równowagi hormonalnej związane

⁴⁸ Nwosu CC, Aldredge DL, Lee H, et al. Comparison of the human and bovine milk N-glycome via high-performance microfluidic chip liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2012;11:2912-2924

⁴⁹ Wang B, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:1351-1369

z ciążą, porodem i połogiem mogą prowadzić do indywidualnej reakcji organizmu i modulacji syntezy antygeny Lewis^x.

Moje badania glikoprotein mleka ludzkiego dotyczyły również analizy ekspresji glikotopów na O-glikanach, ze szczególnym uwzględnieniem sjalowanej i asjalowanej formy antygeny T oraz Tn. O-glikany uczestniczą w komunikacji komórkowej i adhezji, oddziaływaniach typu receptor-ligand i gospodarz-patogen, jak również zapewniają ochronę białek przed działaniem enzymów proteolitycznych. Ponadto, miejsca O-glikozylacji oraz struktury O-glikanów są tkankowo-specyficzne i ulegają istotnym zmianom w zapaleniu i nowotworach. Glikoproteiny obecne w płynach ustrojowych rzadko zawierają O-glikany, wyjątek stanowią S-IgA i FN. Szerokie spektrum O-glikanów wydzielniczej immunoglobuliny A siary, które mogą oddziaływać z adhezynami bakteryjnymi, skutkuje zablokowaniem ich adhezji do komórek gospodarza i jest uważane za część odporności wrodzonej.

W przeciwieństwie do N-glikomu, O-glikom mleka ludzkiego nie został dobrze scharakteryzowany. Wyniki uzyskane w pracy „**O-glycosylation of α -1-acid glycoprotein of human milk is lactation stage related**” (2015) [publikacja nr 4.7] z zastosowaniem lektyn z: *Artocarpus integrifolia* (Jacalin, specyficzna do sjało antygeny T, sjało-Gal β 1,3GalNAc-), *Arachis hypogaea* (PNA, specyficzna do asjało antygeny T, Gal β 1,3GalNAc-) i *Vicia villosa* (VVA, specyficzna do Tn, GalNAc-) wykazały, że AGP mleka, w przeciwieństwie do AGP osocza matek, zawiera oprócz N-glikanów, sjalowane i asjalowane formy antygeny T oraz Tn, które stanowią struktury rdzeniowe O-glikanów. Jak dotąd, różnice ilościowe i jakościowe w O-glikozylacji między surowicą i mlekiem wykazano tylko dla S-IgA. Podczas laktacji zaobserwowano obniżenie poziomu względnej zawartości sjalowanych glikoform antygenów T, zwiększonej ilości asjalowanych glikoform antygeny T oraz względnie stabilny poziom antygeny Tn. Spadek ekspresji usjalowanej formy glikotopu T wraz z dojrzewaniem mleka i obserwowana zwiększona reaktywność z PNA, są ściśle związane z obniżeniem sjalizacji wraz z laktacją i sugerują, że poziom antygeny T *per se* jest względnie stały. O-glikany są charakterystyczne dla glikoprotein wydzielniczych oraz mucyn wyścielających nabłonek górnych dróg oddechowych, gdzie są zaangażowane we wrodzone mechanizmy obronnych, oparte na oddziaływaniach glikan-receptor lektynowy. Obecność, O-glikanów, które mają wpływ na funkcje i stabilność cząsteczki AGP, ma potencjalnie biologicznie ważną rolę, ponieważ mogą one stanowić dodatkowe źródło kwasu sjalowego do syntezy sjaloglikokoniugatów w mózgu oraz stanowić nośnik kwasu sjalowego, który jest istotnym elementem uczestniczącym w blokowaniu adhezji sjało-zależnych patogenów.⁵⁰ Obecność O-związanych glikotopów T i Tn na AGP ludzkiego mleka, które nie są obecne na AGP osocza oraz na wolnych oligosacharydach mleka, zwiększa różnorodność glikotopów, które mogą funkcjonować jako rozpuszczalne „wabiki” wiązanych przez adhezyny bakterii i rotawirusy i w ten sposób uczestniczyć w zapobieganiu ich adhezji do komórek gospodarza.

⁵⁰ Yu Y, Lasanajak Y, Song X, Hu L, Ramani S, Mickum ML, Ashline DJ, Prasad BV, Estes MK, Reinhold VN, Cummings RD, Smith DF. Human milk contains novel glycans that are potential decoy receptors for neonatal rotaviruses. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13:2944-60

Ponadto, obecność O-glikanów na AGP mleka może być rozpatrywane w odniesieniu do przystosowań ewolucyjnych bioaktywnych składników mleka ludzkiego do działania, jako element odporności wrodzonej, przekazywany przez matkę do noworodka karmionego piersią. W ten sposób sjalowane i asjalowane O-glikany mleka, jak również fukozylowane i sjalowane glikotopy działające, jako inhibitory oddziaływań gospodarz-patogen wpływają na skuteczność mechanizmów obronnych odporności wrodzonej noworodka karmionego mlekiem matki. Jestem podobnego zdania jak Gao i wsp. [2012]⁵¹, którzy sugerują, że zmiana w strukturach glikanów podczas laktacji idzie w parze z przemianami w mechanizmach obronnych, które mają miejsce od momentu narodzin noworodków do małych niemowląt.

Interesująca w kontekście doniesień uczestnictwa w oddziaływaniach z bakteriami, które mogą być rozpatrywane, jako jeden z elementów odporności wrodzonej, jest również FN, wielodomenowa glikoproteina która zawiera od 5 do 9% cukrów, głównie w formie N-glikanów oraz w mniejszym stopniu jako O-glikany. Fizjologiczna funkcja glikanów FN nie została do końca zbadana, jednak wiadomo, że uczestniczą w utrzymaniu topologii i funkcji domen FN oraz chronią przed hydrolizą. Forma molekularna i profil glikozylacji FN zależy od jej pochodzenia (osoczowa i komórkowa) i stanu patofizjologicznego i jest ściśle powiązany z pełnionymi funkcjami biologicznymi m.in. uczestnictwo w procesach angiogenezy, embriogenezy, gojeniu ran, wzroście, różnicowaniu, migracji, adhezji oraz komunikacji komórka-komórka i komórka-macierz zewnątrzkomórkowa.^{52,53} FN ma potencjalną zdolność wiązania niektórych patogenów dzięki oddziaływaniom typu lektyna-cukier, a nawet cukier-cukier. Glikany FN są ważne podczas kolonizacji gospodarza przez *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter fetus* i *Campylobacter jejuni* (wywołujące bakteryjne choroby układu pokarmowego i biegunki) oraz *Streptococcus pneumoniae* (zapalenie płuc). Rozpuszczalne α 1,2-fukozylowane glikowarianty FN płynu owodniowego mogą odgrywać kluczową rolę w ochronie płodu oraz żeńskich dróg rodnych przed kolonizacją patogenami działając, jako inhibitory wiązania receptorów lektynowych patogenów do tkanek gospodarza.⁵⁴ Brak doniesień dotyczących profilu glikozylacji FN oraz potencjalnych funkcji w mleku ludzkim skłoniły do podjęcia badań pozwalających na określenie ogólnego wzoru sjalizacji i fukozytacji oraz ekspresji O-glikanów FN mleka w odniesieniu do FN matki oraz etapów dojrzewania mleka. Pochodzenie FN w mleku ludzkim, jak dotąd nie jest jednoznacznie określone, przypuszczalnie jest syntezowana lokalnie w komórkach nabłonkowych gruczołu sutkowego lub przez obecne w gruczole makrofagi oraz może pochodzić z przesączu osocza. Wyniki moich badań przedstawione w pracy **„Terminal glycotope expression on milk fibronectin differs from plasma fibronectin and changes over lactation” (2015) [publikacja nr 4.8]** wykazały, że FN w ludzkim mleku stanowi około 0,01% wszystkich białek mleka, a

⁵¹ Gao X, McMahon RJ, Woo JG, et al. Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions. *J Proteome Res* 2012;11:3897-3907

⁵² Tajiri M, Yoshida S, Wada Y. Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. *Glycobiology* 2005;15:1332-40

⁵³ Jankovič MM, Kosanovič MM. Fibronectin pattern in benign hyperplasia and cancer of the prostate. *Dis Markers* 2008;25:49-58

⁵⁴ Kątnik-Prastowska I, Orczyk-Pawiłowicz M. Expression and potential biological role of α (1,2)fucosylated glycotopes on amniotic and seminal fibronectins. *Biochem Soc Trans* 2011;39:355-9

średnia wartość stężenia dla 132 próbek mleka ($1,52 \pm 0,9$ mg/l) była znacznie niższa niż w osoczu matek karmiących (234 ± 63 mg/l) oraz zdrowych osób (214 ± 34 mg/l). Stężenie FN w mleku ludzkim podczas laktacji utrzymuje się na prawie niezmiennym poziomie, w przeciwieństwie do spadku stężenia białka całkowitego, co może sugerować istotną rolę FN w mleku. Zbadany po raz pierwszy profil sjalizacji i fukozytacji oraz ekspresji antygenów T i Tn FN mleka jest zupełnie odmienny od matczynego profilu FN osocza. Zaobserwowane różnice, tj. wyższy poziom usjalowania, fukozytacji oraz ekspresji antygenów T i Tn są związane z lokalną syntezą FN w gruczole sutkowym, w przeciwieństwie do FN osocza pochodzenia wątrobowego. Po raz pierwszy wykazałam dla FN mleka ludzkiego zmiany w profilu sjalizacji i fukozytacji oraz antygeny T związane z etapami laktacji. Podczas procesu dojrzewania mleka, tj. transformacji siary przez mleko przejściowe do mleka dojrzalego, względna zawartość $\alpha 2,6$ -syalowanych i $\alpha 1,6$ -fukozylowanych glikowariantów FN mleka oraz ekspresja usjalowanej formy antygeny T na FN ulegały obniżeniu, podczas gdy stopień $\alpha 2,3$ -syalizacji, $\alpha 1,3$ - i $\alpha 1,2$ - fukozytacji FN mleka nie zmieniał się wraz z laktacją. W przeciwieństwie, ekspresja asjalowanej formy antygen T na FN mleka wzrasta.

Obserwowane dla FN trendy w poziomie sjalizacji pokrywają się z trendami obserwowanymi uprzednio dla poziomu sjalizacji glikowariantów AGP podczas dojrzewania mleka. Natomiast dla fukozytacji, tylko trend dla $\alpha 1,6$ -fukozylowanych glikotopów jest taki sam jak obserwowany wcześniej dla AGP. Wyniki naszych badań dotyczące sjalizacji pozwalają na weryfikację hipotezy Froehlich i wsp. [2010]⁵⁵, którzy sugerują, że nie istnieje wspólny schemat dla zmian wzoru glikozylacji poszczególnych glikoprotein mleka podczas laktacji. W mojej opinii, dynamika zmian wykazanych w poziomie sjalizacji AGP i FN mleka, pokrywa się z ogólnymi trendami obserwowanymi dla innych glikoprotein mleka, wolnych oligosacharydów ludzkiego mleka (HMO) oraz całkowitego N-glikomu białek serwatkowych mleka ludzkiego.^{56,57} Obserwowane zmiany są zasocjowane z miejscową syntezą glikoprotein i HMO w gruczole sutkowym podczas laktacji na drodze hormono-zależnej. Laktacja, jako unikatowy stan neuroendokryny, związana jest ze zwiększeniem wydzielaniem prolaktyny i zmniejszeniem wydzielania estrogenu, które mogą regulować ekspresję glikozylotransferaz zaangażowanych w syntezę N- i O-glikanów.⁵⁸

Z immunologicznego punktu widzenia, fukozylowane i sjalowane glikotopy FN mleka, dostarczane noworodkom podczas karmienia, mogą działać, jako cukrowe rozpuszczalne „wabiki” dla lektyn bakteryjnych (adhezyn) i obniżać adhezję patogenu do mucyn i białek macierzy noworodka, w ten sposób mogą uczestniczyć w ochronie noworodków przeciwko infekcjom. Dlatego też mleko matki o statusie wydzielacza ma przewagę nad mlekiem matki o statusie niewydzielacza w ochronie noworodka/niemowlęcia przed biegunką, ponieważ $\alpha 1,2$ -fukozylowane glikotopy mogą działać, jako inhibitory adhezji *Campylobacter* i

⁵⁵ Froehlich JW, Dodds ED, Barboza M, et al. Glycoprotein expression in human milk during lactation. *J Agric Food Chem* 2010;58:6440-6448

⁵⁶ Bode L. Humanmilk oligosaccharides: every baby needs a sugarmama. *Glycobiology* 2012;22:1147-62

⁵⁷ Nwosu CC, Aldredge DL, Lee H, Lerno LA, Zivkovic AM, German JB, et al. Comparison of the human and bovine milk N-glycome via high-performance microfluidic chip liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2012;11:2912-24

⁵⁸ Groër M, Davis M, Casey K, Short B, Smith K, Groër S. Neuroendocrine and immune relationships in postpartum fatigue. *MCN Am J Matern Child Nurs* 2005;30:133-8

kolonizacji kaliciwirusa. Ponadto, FN może również uczestniczyć w opsonizacji i usuwaniu bakterii, a tym samym zwiększa aktywność przeciwbakteryjną makrofagów.^{59,60}

Podsumowując wyniki przedstawione w powyższych pracach, mleko matki jest bogate w bioaktywne glikoproteiny, do których zaliczamy nie tylko laktoferynę i S-IgA, ale również AGP i FN, które mogą odgrywać rolę w zapewnieniu noworodkom odporności na infekcje. Znaczące zmiany obserwowane w ekspresji sjalowanych i fukozylowanych glikotopów analizowanych glikoprotein mleka w stosunku do odpowiedników w osoczach matek karmiących, z ewolucyjnego punktu widzenia, mogą sugerować ich uczestnictwo we wspieraniu odpornościowych potrzeb noworodków do momentu, aż ich własny układ odpornościowy dojrzeje. Niemniej jednak, szczegółowe badania strukturalne i funkcjonalne glikoprotein mleka ludzkiego powinny być kontynuowane, w celu uzyskania danych o ekspresji glikotopów na oligosacharydach glikoprotein w próbkach mleka pochodzącym od matek chorych. Szczególnie ważne wydaje się odpowiedzenie na pytanie czy mleko pochodzące od matek z zespołem metabolicznym, cukrzycą, nadciśnieniem jest równocennym pokarmem dla niemowląt w porównaniu z mlekiem matek zdrowych. Jest to szczególnie istotne z klinicznego punktu widzenia, ponieważ uzyskane wyniki mogą wspomóc nowoczesną opiekę poporodową noworodków, poprzez ich wykorzystanie do kontroli jakości biochemicznej mleka deponowanego w bankach mleka, ze szczególnym uwzględnieniem noworodków urodzonych przedwcześnie, z niską masą urodzeniową, dla których mleko matki jest nie tylko pokarmem, ale również lekiem. Wykazane różnice zarówno w stężeniu jak i w poziomie sjalizacji i fukozytacji glikoprotein w procesie dojrzewania mleka mogą stanowić dodatkowy glikomarker pomocny w charakteryzowaniu mleka od potencjalnych dawczyń. Ponadto, analiza taka pozwoli na wyłączenie matek ze statusem niewydzielacza, których mleko w porównaniu do matek o statusie wydzielacza ma obniżone właściwości ochronne w stosunku do fukozo-zależnych patogenów.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Sumaryczny IF prac, które nie wchodzą do cyklu wynosi **22,674 (239 punktów MNiSW)**

Moje główne zainteresowania badawcze są związane z glikobiologią, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania lektyn w badaniach ekspresji glikotopów, ważnych w procesach rozpoznania biologicznego. Pracę naukową, jako studentka biotechnologii, rozpoczęłam od izolacji lektyny z liści kosaćca ogrodowego (Praca dyplomowa), a następnie w kolejnym etapie scharakteryzowałam wyizolowaną lektynę, określając swoistość i potencjalne zastosowanie w analizie glikokoniugatów. W publikacji **„*The N-acetylgalactosamine and lactosamine specific lectin from *Iris hybrida* leaves*”, (1997) [praca nr IA1] wykazano, że lektyna jest glikoproteina, zbudowaną z dwóch identycznych**

⁵⁹ Goldman AS. The immune system in human milk and the developing infant. *Breastfeed Med* 2007;2:195-204

⁶⁰ Abdulla EM, Zaidi FE, Zaidi A. Immune factors in breast milk: a study and review. *Pak J Med Sci* 2005;21:178-86

podjednostek połączonych mostkami disiarczkowymi i zawiera 12% cukrów. Lektyna rozpoznaje i wiąże asjaloglikoproteiny, które zawierają N-glikany typu złożonego, i jest specyficzna względem N-acetylogalaktozaminy i laktozy. Ponadto, testy hamowania wykazały, że typ wiązania galaktozy nie ma wpływu na wiązanie z lektyną, wskazując na dość szeroki zakres specyficzności tej lektyny.

Moje zainteresowania badawcze w początkowym okresie pracy naukowej dotyczyły analizy glikokoniugatów (glikoproteiny+glikolipidy+oligosacharydy) płynu owodniowego w patofizjologii ciąży. Uzyskane dane doświadczalne zawarte w **Rozprawie doktorskiej (2003)** i pracach oryginalnych opublikowanych na jej podstawie (**„Zawartość kwasu sjałowego glikokoniugatów płynu owodniowego ciężarnych kobiet”, (2001) [praca nr IB1]**, **„Zmiany w sjałizacji i fukozytacji glikokoniugatów w ciążach powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego”, (2005) [praca nr IB2]** oraz **„Relative amounts of sialic acid and fucose of amniotic fluid glycoconjugates in relation to pregnancy age”, (2005) [praca nr IA2]**) charakteryzują względną zawartość reszt kwasu sjałowego oraz fukozy glikokoniugatów płynu owodniowego w zależności od czasu trwania oraz powikłań ciąży. Przeprowadzone analizy półilościowe metodą lektyno-dotingu wykazały różnice w obecności przyłączonego kwasu sjałowego oraz fukozy z uwzględnieniem typu wiązania glikozydowego zależną od wieku ciąży oraz stanu patofizjologicznego. Ekspresja kwasu sjałowego zarówno α 2,3- jak i α 2,6- oraz fukozy α 1,2- i α 1,6- wykazywała dodatnią korelację z wiekiem ciąży, natomiast poziom ekspresji fukozy α 1,3-, co prawda nie korelował z progresją ciąży, ale był istotnie wyższy w II trymestrze oraz w ciąży przenoszonej. Ponadto, wyniki analiz pozwoliły na wskazanie w ciąży fizjologicznej dwóch okresów, podczas których obserwuje się największe zmiany w profilu sjałizacji i fukozytacji, a mianowicie między II i III trymestrem oraz okresem okołoporodowym i ciążą po terminie. Cięży powikłanej przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego w porównaniu do ciąży fizjologicznej z zachowanymi błonami płodowymi towarzyszy wzrost ekspresji kwasu sjałowego przyłączonego do glikanów zarówno wiązaniem glikozydowym α 2,3 jak i α 2,6 oraz wzrost ekspresji fukozy α 1,3. Ponadto, wykazano różnice w ekspresji kwasu sjałowego między ciążami powikłanymi wielowodziem, małowodziem idiopatycznym oraz ze zrealizowanym konfliktem Rh.

Odmienny trend zaobserwowany dla α 1,3-fukozylowanych glikowariantów, obecnych w glikotopach Lewis^x i sjało-Lewis^x, których ekspresja wzrasta podczas procesu zapalnego oraz towarzyszy procesom nowotworowym, skłoniły nas do podjęcia dalszych badań. Na podstawie wykonanych analiz profilu białkowego glikoprotein płynu owodniowego metodą blotingu oraz lektyno-blotingu [**rozprawa doktorska, 2003**] do dalszych analiz wytypowano jedno z białek ostrej fazy - AGP, którego stężenie jak również poziom sjałizacji i fukozytacji wzrasta podczas stanu zapalnego. Stopień rozgałęzienia N-glikanów, tj. zawartość dwu-, trój- i czteroantennowych N-glikanów AGP, również ulega zmianom podczas procesu zapalnego i umożliwia rozróżnienie ostrych stanów zapalnych od przewlekłych. Do badań zawartości dwu- trój- i czteroantennowych N-glikanów AGP zastosowano dwuwymiarową immunoelektroforezę z użyciem lektyny (Con A), natomiast do określenia względnej zawartości fukozy i kwasu sjałowego - technikę immunoenzymatycznej detekcji typu

„sandwich”, w których przeciwciała detekcyjne zastąpiono specyficznymi lektynami znakowanymi biotyną (Lektyno-ELISA). Przeprowadzone przez nas analizy, których wyniki opublikowano w pracach *„Alterations of N-glycan branching and expression of sialic acid on amniotic fluid alpha-1-acid glycoprotein derived from second and third trimesters of normal and prolonged pregnancies”*, (2006) [praca nr IA3] oraz *„The expression of fucose isoforms of amniotic and plasma alpha-1-acid glycoprotein derived from 2nd and 3rd trimester normal pregnancies”*, (2009) [praca nr IA4] wykazały, że stężenie AGP w płynie owodniowym nie koreluje z progresją ciąży, pomimo, że na przełomie II i III trymestru ciąży obserwuje się zmianę z fazy anty-zapalnej na pro-zapalną. Wykazano natomiast istotny wzrost w ekspresji α 1,2-, α 1,3- i α 1,6 fukozylowanych glikowariantów oraz wzrost trój- i czteroantennowych N-glikanów. Ponadto, podczas porodu, któremu towarzyszy napływ komórek immunologicznych oraz środowisko prozapalne, zaobserwowano spadek poziomu fukozytacji, który jest charakterystyczny dla wczesnej fazy procesu zapalnego (do 24 godzin).

Moje zainteresowanie udziałem fukozy w oddziaływaniach między komórkami na kolejnych etapach rozwoju oraz dojrzewania organizmu zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych znalazło wyraz w monografii *„Znaczenie fukozytacji glikokoniugatów w zdrowiu i chorobie”*, (2007) [praca nr IIIB1]. Ponadto, fukozylowane glikowarianty glikokoniugatów, w tym syntetyzowane miejscowo α 1,2-fukozylowane glikotopy (które nie są wykrywane na osoczowych glikoproteinach) FN pochodzącej z płynu owodniowego i plazmy nasienia ludzkiego, mogą aktywnie uczestniczyć w ograniczaniu kolonizacji gospodarza przez fukozo-zależne receptory lektynowe patogenów. Potencjalny udział α 1,2 fukozylowanych glikowariantów FN w ochronie matki i płodu w czasie ciąży jak również żeńskich narządów rozrodczych przed kolonizacją przez chorobotwórcze bakterie omówiono w pracy *„Expression and potential biological role of α (1,2)fucosylated glycotopes on amniotic and seminal fibronectin”*, (2011) [praca nr IIIA1]. Rozpuszczalne fukozylowane cząsteczki FN, jako wabiki, stanowią glikotopy/ligandy dla receptorów lektynowych patogenów, hamując w ten sposób wiązanie do komórek gospodarzem. W związku z tym α 1,2 fukozylowane glikowarianty FN mogą stanowić jeden z elementów wrodzonego układu odpornościowego płynu owodniowego i plazmy nasienia.

Aktualny stan wiedzy dotyczący udziału fukozylowanych glikokoniugatów, do których zaliczamy wolne oligosacharydy mleka oraz glikoproteiny, obecnych w mleku kobiecym w zapewnieniu prawidłowego rozwoju i ochrony niemowląt przedstawiono w pracy przeglądowej *„Znaczenie fukozylowanych glikokoniugatów mleka ludzkiego w żywieniu noworodków i niemowląt”*, (2015) [praca nr IIIA2]. Szczególny nacisk położono na wyjaśnienie mechanizmów za pomocą, których fukozylowane glikany uczestniczą w hamowaniu adhezji patogenów do komórek nabłonkowych gospodarza. W większości chorób o podłożu wirusowym i/lub bakteryjnym pierwszym etapem w kolonizacji patogenów są reakcje rozpoznania, a kolejnym przyleganie komórek patogenów do nabłonka gospodarza. W procesach rozpoznania biologicznego kluczową rolę odgrywają powierzchniowe adhezyny i/lub lektyny drobnoustrojów, które rozpoznając i wiążąc wybrane glikotopy komórek gospodarza, umożliwiają ich kolonizację. Proces adhezji patogenów do komórek nabłonkowych noworodka i niemowlęcia może być jednak utrudniony dzięki

obecności w mleku kobiecym bioaktywnych cząsteczek, do których zalicza się również glikokoniugaty. Rozpuszczalne glikokoniugaty mleka „opłukujące” komórki nabłonkowe gardzieli, przełyku, żołądka oraz jelit noworodka mogą być rozpoznawane i wiązane przez receptory lektynowe bakterii i/lub przez receptory lektynowe komórek gospodarza. W obu przypadkach dochodzi do zablokowania przez glikokoniugaty mleka receptorów lektynowych, co nie pozwala na kolonizację komórek gospodarza przez patogeny. Sugeruje się, że z tego powodu częstość występowania u niemowląt karmionych mlekiem matki infekcji, biegunek, ostrego zapalenia żołądka i jelit oraz innych chorób o podłożu bakteryjnym i/lub wirusowym jest znacznie mniejsza w porównaniu z niemowlętami, które są karmione sztucznymi mieszankami mlecznymi.

Zmiany profilu fukozytacji niektórych glikoprotein mleka ludzkiego, a mianowicie AGP i FN [prace stanowiące część osiągnięcia, 4.6-4.8], obserwowane podczas procesu dojrzewania mleka skłoniły nas do pogłębienia analizy całkowitego profilu fukozytacji glikoprotein, z uwzględnieniem typu wiązania α 1,2-, α 1,3- i α 1,6-fukozy z zastosowaniem lektyno-blotingu. W pracy eksperymentalnej „*Lectin-based analysis of fucosylated glycoproteins of human skim milk during 47 days of lactation*”, (2015) [praca nr IA7] (stanowi część otwartego przewodu doktorskiego mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka, w którym pełnię funkcję promotora pomocniczego) scharakteryzowano trendy we względnym poziomie α 1,2-, α 1,3- i α 1,6-fukozytacji głównych glikoprotein mleka pochodzącego od matek ze statusem wydzielacza podczas dojrzewania mleka, tj. od niedojrzałej siary, przez mleko przejściowe do mleka dojrzałego. Osiemdziesiąt procent α 1,2- i/lub α 1,6-fukozylowanych glikoprotein mleka wykazywało wysoką ujemną korelację między poziomem fukozytacji a dniem laktacji. W przeciwieństwie, ekspresja α 1,3-fukozylowanych glikotopów na większość analizowanych glikoprotein mleka była relatywnie niska i utrzymywała się na prawie niezmiennym poziomie podczas analizowanego okresu siedmiu tygodni laktacji, z wyjątkiem glikoproteiny o masie 30kDa, która wykazywała ujemną korelację z etapami dojrzewania mleka. Zaobserwowane zmiany w α 1,6- i α 1,2-fukozytacji glikoprotein mleka w ciągu siedmiu tygodni fizjologicznej laktacji pokrywają się z tymi, które obserwowano uprzednio dla całkowitego poziomu fukozytacji HMO oraz poziomu 2' i 3-fukozyloolaktazy i odzwierciedlają etapy fizjologicznego dojrzewania mleka. W związku z tym, ludzkie mleko dawczyń deponowane w bankach mleka oraz mieszanki mleczne, zwłaszcza dla noworodków urodzonych przedwcześnie, powinny odpowiadać profilowi fukozytacji mleka zdrowych matek ze statusem wydzielacza.

Moje zainteresowania mlekiem kobiecym skupiają się nie tylko na sjalizacji i fukozytacji glikoprotein mleka, ale również dotyczą zmian składu mleka w zależności od tygodnia zakończenia ciąży oraz stanu patofizjologicznego. Dzięki nawiązaniu współpracy z Fundacją Bank Mleka Kobiecego w Warszawie oraz Zakładem Biochemii II Wydziału Lekarskiego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, powstały opracowania naukowe dotyczące różnic między mlekiem matki, która urodziła przedwcześnie w stosunku do mleka matek, które urodziły o czasie oraz ewentualnego wzmacniania mleka kobiecego, które jest traktowane nie tylko jako pokarm, ale również jako lek. Aktualny stan wiedzy w tym temacie, oraz towarzyszące wzmacnianiu pokarmu ograniczenia kliniczne przedstawiono w dwóch

pracach przeglądowych „*Różnice w biochemicznym składzie mleka matek wcześniaków i noworodków urodzonych o czasie - aspekt żywieniowy i terapeutyczny*” (2013) [praca nr III B2] oraz „*Wzmacnianie pokarmu kobiecego - potrzeby, możliwości i ograniczenia*”, (2014) [praca nr III B3].

Skład jakościowy głównych składników mleka kobiecego jest stały, natomiast różnice dotyczą składu ilościowego poszczególnych składników mleka w kolejnych etapach dojrzewania mleka, tj. białka, cukrów i tłuszczu oraz odpowiadającej im wartości kalorycznej. Mleko kobiece jest złotym standardem w żywieniu noworodków i niemowląt. Niemniej jednak żywienie noworodków, zwłaszcza z niską i ekstremalnie niską masą, wyłącznie w oparciu o mleko matki stanowi poważne wyzwanie. Najnowsze rekomendacje AAP (American Academy of Pediatrics) zalecają żywienie wcześniaków (z masą ciała poniżej 1500g) mlekiem matki, ale wskazują na konieczność wzbogacania. Postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie ratowania życia wcześniaków wymusza rozwój nowych strategii żywienia i leczenia, które przyczyniły się do powstania nowej dziedziny wiedzy, a mianowicie laktotechnologii. Laktotechnologia obejmuje działania mające na celu możliwie optymalne dopasowanie składu mleka ludzkiego do potrzeb wcześniaków oraz noworodków z niską masą urodzeniową, w tym optymalizację technik ściągania i przechowywania pokarmu, a także personalizację składu mleka dzięki zastosowaniu wzmacniaczy. W wyniku współpracy w ww. zakresie oraz mojego bezpośredniego zaangażowania, zawiązano ogólnopolskie, wielośrodkowe konsorcjum „Lacto-feed - rozwój technologii leczenia żywieniowego” w skład którego, oprócz Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wchodzi jednostki naukowe Instytut Wysokich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Politechnika Gdańska, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, Instytut Matki i Dziecka, Gdański Uniwersytet Medyczny oraz Fundacja Banku Mleka Kobiecego.

Dzięki nawiązanej współpracy z Zespołem Pana dr hab. Piotra Młynarza, prof. PWR z Zakładu Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej, poszerzyłam swoje zainteresowania o nową technikę badawczą – metabolomikę. Metabolomika (lub metabonomika) jest najmłodsza i prawdopodobnie najdynamiczniej rozwijającą się technologią należącą do grupy „omics”. Pozwala na holistyczne podejście do metabolitów, które są obecne w komórkach, tkankach lub całym organizmie, wykorzystuje pomiary charakteryzujące się dużą wydajnością, a następnie identyfikację, oznaczania ilościowe i charakterystykę metabolitów drobnocząsteczkowych (<1500 Da).^{61,62,63} Podejście metabolomiczne składa się z dwóch etapów. Pierwsza faza – analityczna służy do profilowania wszystkich niskocząsteczkowych metabolitów obecnych w danej próbce biologicznej i uzyskania widma zawierającego sygnały pochodzące od poszczególnych molekuł. Analizie mogą być poddane wszystkie płyny biologiczne pochodzące od matki i/lub płodu, tj. osocze, mocz, mleko, ślina, płyn owodniowy, krew pępowinowa, wydzielina z

⁶¹ Horgan RP, Clancy OH, Myers JE, Baker PN. An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research. *BJOG*, 2009; 116, 173-181

⁶² Fanos V, Barberini L, Antonucci R, Atzori L. Metabolomics in neonatology and pediatrics. *Clinical Biochemistry* 2011;44,452-454

⁶³ Fanos V, Atzori L, Makarenko K, Melis GB, Ferrazzi E. Metabolomics Application in Maternal-Fetal Medicine. *BioMed Research International*, Volume 2013, Article ID 720514

pochwy oraz homogenaty tkanek. Do analizy stosuje się różne technologie: magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), chromatografia gazowa połączone ze spektrometrią mas (GC-MS) oraz chromatografia cieczowa połączone ze spektrometrią mas (LC-MS). Druga faza - analizy danych i interpretacji wymaga programu eksploracji danych i dużych baz metabolitów, jak również analizy chemometrycznej w celu opisanie powiązań i sieci szlaków metabolicznych. Technikę metabolomiczną zastosowano do określenie profilu metabolomicznego w okresie pre-, peri- i postnatalnym. Wyniki uzyskanych badań są na etapie opracowywania i przygotowania do publikacji.

Ponadto, w ramach ww. współpracy, uczestniczyłam w realizacji wielośrodkowego projektu badawczego: „Przewlekła obturacyjna choroba płuc - zastosowanie metabolomiki, jako narzędzia wspomagającego diagnostykę kliniczną” oraz „Konstrukcja bibliotek peptydowych i badania metabolomiczne, jako narzędzia w diagnostyce nowotworów tarczycy”, finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Celem projektów było określenie profilu metabolomicznego w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (POChP) oraz w nowotworach gruczołu tarczowego, ze szczególnym uwzględnieniem zależności metabolomu od stopnia ciężkości choroby i określenie metabolomu, jako czynnika predykcyjnego rozwoju/przebiegu choroby. Wynikiem realizacji projektów są prace: *“Follicular adenomas exhibit a unique metabolic profile. 1H NMR studies of thyroid lesions”, PLoS One 2013 [praca nr IA5]* oraz *“Fusion of the 1H NMR data of serum, urine and exhaled breath condensate in order to discriminate chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea syndrome”, Metabolomics 2015 [praca nr IA6]*.

Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek obejmuje: **22** pełnych prac, w tym **15** pełnotekstowych prac oryginalnych: **13** z IF (w **10** jako pierwszy autor, w **1** jako ostatni autor) i **2** bez IF (pierwszy autor). Jestem również autorką **7** prac poglądowych (**4** z IF, **3** bez IF), **2** rozdziałów w książce i **5** rozdziałów w skryptach dla studentów (w tym dwóch w j. angielskim), **13** abstraktów konferencyjnych: **7** prezentowanych na konferencjach międzynarodowych, a **6** na konferencjach krajowych oraz jednego wykładu na zaproszenie „Terminal monosaccharide expressions on some amniotic glycoproteins as a biomarker of fetus maturity” wygłoszonego podczas „Glycomarkers for Disease” (14.09.2010) Euroglycoforum Research Network Program; The European Science Foundation.

Całkowita liczba punktów MNiSW/KBN mojego dorobku wynosi **462** (w tym **197** w cyklu stanowiącym osiągnięcie). Sumaryczny IF wg Journal Citation Reports (JCR): **37.109** (w tym **14,435** w cyklu stanowiącym osiągnięcie). Liczba cytowań wg bazy **Web of Science** (uwzględniono cytowania ze wszystkich baz, dane z 19.10.2015): **84** z autocytowaniami/**54** bez autocytowań. Średnia liczba cytowań na pracę: **4,94**. Indeks Hirscha: **6** (wyniki wyszukiwania z bazy Web of Science poniżej).

PEŁNY DOROBEK NAUKOWY OBEJMUJE

DOROBEK NAUKOWY SPRZED UZYSKANIA STOPNIA DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH	<i>n</i>	Współczynnik wpływu (IF)	Punktacja MNiSW
PUBLIKACJE NAUKOWE	2	0.522	13
Prace oryginalne (łącznie)			
• pierwszy autor i/lub autor korespondencyjny	1		5
• współautor	1	0,522	8
Prace poglądowe (łącznie)			
• pierwszy autor i/lub autor korespondencyjny			
• współautor			
DONIESIENIA KONFERENCYJNE			
• międzynarodowe			
• krajowe	2		
DOROBEK NAUKOWY PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH			
PUBLIKACJE NAUKOWE, które nie wchodzą do cyklu	12	22,152	226
Prace oryginalne (łącznie)	7	17,312	170
• pierwszy autor i/lub autor korespondencyjny	5		
• współautor	2		
Prace poglądowe (łącznie)	5	4,284	56
• pierwszy autor i/lub autor korespondencyjny	3		
• współautor	2		
Prace wskazane jako znaczące osiągnięcie (łącznie)	8	14,43	197
<i>Zgodnie z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.)</i>			
• pierwszy autor i/lub autor korespondencyjny	8	14,43	197
• współautor	---		
DONIESIENIA KONFERENCYJNE	11		
• międzynarodowe	7		
• krajowe	4		
Publikacje pełnotekstowe łącznie	22	37,109	436
ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH, PODRĘCZNIKACH I SKRYPTACH ORAZ PEŁNOTEKSTOWE REFERATY W MATERIAŁACH ZJAZDOWYCH	7		26
• w języku polskim	5		12
• w języku angielskim	2		14
RAPORT CYTOWAŃ WG DANYCH WEB OF SCIENCE			
uwzględniono cyt. ze wszystkich baz, dane z 19.10.2015	84		
Liczba cytowań	54		
Liczba cytowań bezautocytowań	6		
h-index	6		



Citation Report: 17

(from All Databases)

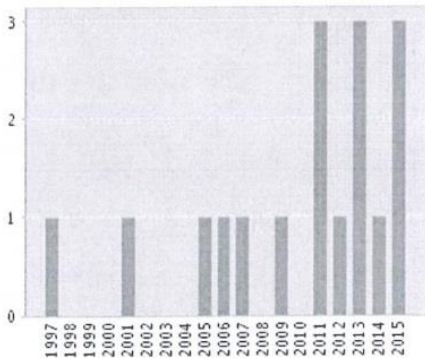
You searched for: **AUTHOR: (Orczyk-Pawłowicz M)** ...More

Timespan: All years.

...Less

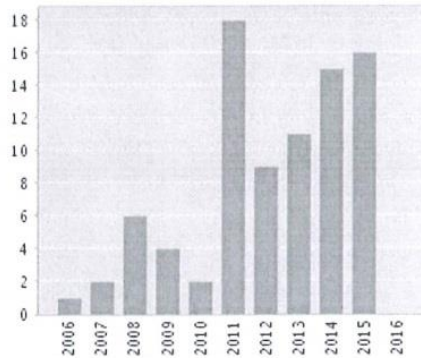
This report reflects citations to source items indexed within All Databases.

Published Items in Each Year



The latest 20 years are displayed.

Citations in Each Year



The latest 20 years are displayed.

Results found: 17
 Sum of the Times Cited [?]: 84
 Sum of Times Cited without self-citations [?]: 54
 Citing Articles [?]: 62
 Citing Articles without self-citations [?]: 53
 Average Citations per Item [?]: 4.94
 h-index [?]: 6

Magdalena
 Orczyk-Pawłowicz