

ZAKŁAD CHEMII MEDYCZNEJ
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY
LABORATORYJNEJ
UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

dr Iwona Radziejewska

**Dokumentacja o wszczęcie postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk
medycznych, dyscyplina – biologia medyczna**

AUTOREFERAT

Białystok 2013

1. Imię i nazwisko: Iwona Radziejewska (Minkiewicz do roku 1999)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- a) Magister analityki medycznej – Akademia Medyczna w Białymstoku, 1988
- b) Doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej – Akademia Medyczna w Białymstoku, 1996; tytuł rozprawy doktorskiej: „Badania produktów redukcji i alkilacji mucyny żołądkowej izolowanej w obecności inhibitorów proteolizy” (promotor – prof. dr hab. Andrzej Gindzieński)

3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych:

- a) 1989 – 1992 – technik w Zakładzie Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Białymstoku
- b) 1992 – 2008 – asystent w Zakładzie Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Białymstoku (obecnie Zakład Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego)
- c) od 2008 – adiunkt w Zakładzie Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

4. Znaczące osiągnięcia naukowe:

- a) Tytuł osiągnięcia naukowego: **Udział struktur cukrowych żołądkowej mucyny błonowej MUC1 w oddziaływaniach z *Helicobacter pylori***
- b) Uzyskane znaczące osiągnięcie naukowe zostało przedstawione w cyklu 8 prac, wymienionych poniżej, opublikowanych w latach 2001 –

2012. Sumaryczny Impact factor wymienionych prac – 7,125; pkt MNiSW – 124.

- [H1] **Minkiewicz-Radziejewska I**, Gindzieński A, Namiot Z. Isolation of MUC1 antigen from human gastric juice. *Rocz Akad Med* 2001, 46, 69-76 (MNiSW – 4)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń, interpretacji wyników badań, wykonaniu rycin i zdjęć oraz na napisaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

- [H2] **Radziejewska I**, Gindzieński A, Wosek J, Kozuszyńska-Topór M, Namiot Z. The influence of omeprazole treatment on MUC1 mucin contents in gastric juice of *Helicobacter pylori* infected patients. *Gastroenterol Pol* 2004, 11, 435-438 (MNiSW – 5).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu większości doświadczeń, interpretacji wyników badań, wykonaniu rycin i zdjęć oraz na napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- [H3] **Radziejewska I**, Kisiel DG, Borzym-Kluczyk M, Kluz A, Namiot Z, Gindzieński A. MUC1 mucin content in gastric juice of duodenal ulcer patients: effect of *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Clin Exp Med* 2007, 7, 72-76 (IF – 1,531; MNiSW – 20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń, interpretacji wyników badań, wykonaniu ryciny 1 oraz na napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

- [H4] **Radziejewska I**, Borzym-Kluczyk M, Kisiel DG, Namiot Z, Wosek J, Gindzieński A. The effect of *Helicobacter pylori* eradication treatment on the MUC1 and Lewis antigens level in human gastric juice: a preliminary study. Dig Dis Sci 2008, 53, 2641-2645 (IF – 1,583; MNiSW – 20).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń, interpretacji wyników badań, wykonaniu większości rycin i zdjęć oraz na napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

- [H5] **Radziejewska I**, Borzym-Kluczyk M, Kisiel D, Namiot Z, Gindzieński A. The influence of *Helicobacter pylori* patients' treatment on MUC 1 content in gastric juice. Hepato-Gastroenterology 2008, 55, 1887-1889 (IF – 0,68; MNiSW – 20).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń, interpretacji wyników badań, wykonaniu ryciny 1 i na napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- [H6] **Radziejewska I**, Leszczyńska K, Borzym-Kluczyk M, Namiot Z. Assessment of interactions between mucins of gastric juice and

Helicobacter pylori - preliminary study. Hepato-Gastroenterology 2010, 57, 367-371 (IF – 0,677; MNiSW – 20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń, interpretacji wyników badań, wykonaniu rycin i na napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- [H7] **Radziejewska I**, Borzym-Kluczyk M, Namiot Z, Stefańska E. Glycosylation of mucins present in gastric juice: the effect of *Helicobacter pylori* eradication treatment. Clin Exp Med 2011, 11, 81-88 (IF – 2,0; MNiSW – 20).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich doświadczeń, interpretacji wyników badań, wykonaniu rycin i na napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

- [H8] **Radziejewska I**. Rola mucyn żołądkowych w oddziaływaniach z *Helicobacter pylori*. Post Hig Med Dośw 2012, 66, 60-66 (IF – 0,654; MNiSW – 15)

Praca poglądowa. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

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

Wprowadzenie

Mucyny żołądkowe są glikoproteinami syntetyzowanymi przez komórki nabłonkowe. Są one głównym składnikiem śluzu pokrywającego nabłonek. W śluzie można wyodrębnić dwie zasadnicze warstwy: wewnętrzną, przylegającą do komórek nabłonka oraz zewnętrzną, luźno przylegającą, stale usuwaną i odnawianą, grubsza część od strony światła żołądka. pH warstwy śluzowej zawiera się między kwaśnym w świetle żołądka i obojętnym na powierzchni komórek nabłonka. Zasadniczą funkcją śluzu jest szeroko pojęta ochrona komórek nabłonka przed dostępem różnych szkodliwych czynników, w tym chemicznych, enzymatycznych, mikrobiologicznych i mechanicznych. Te ochronne właściwości śluzu przypisuje się głównie mucynom.

Mucyny to wielkocząsteczkowe glikoproteiny o masach cząsteczkowych wahających się w szerokich granicach pomiędzy 250 a 2000 kDa. W ich cząsteczkach obecne są liczne wiązania O-glikozydowe, utworzone przez połączenie łańcuchów oligosacharydowych z seryną i treoniną rdzenia białkowego. Węglowodany skupione są głównie w tzw. obszarach zmiennej liczby powtórzeń (VNTR) w obrębie łańcucha białkowego. Rozmiar i liczba tych powtórzeń uzależnione są w dużym stopniu od typu mucyny. W przypadku wielu genów mucynowych występuje polimorfizm liczby powtórzeń. Cukry stanowią najczęściej ponad 50% masy cząsteczki mucyny, często nawet 70 – 80%. Każda mucyna może zawierać do 100 różnych struktur

oligosacharydowych. Do typowych terminalnych modyfikacji łańcuchów cukrowych należą antygeny Lewis.

W zdrowym żołądku ludzkim produkowane są przede wszystkim dwie mucyny wydzielnicze MUC5AC i MUC6 oraz mucyna związana z błoną komórkową MUC1. Mucyna MUC5AC jest wytwarzana przez komórki nabłonkowe powierzchniowe, podczas gdy mucyna MUC6 przez komórki nabłonkowe gruczołów żołądkowych. Mucyny wydzielnicze są głównymi składnikami śluzu żołądkowego. Występują one w postaci oligomerycznych podjednostek, połączonych ze sobą za pośrednictwem mostków disiarczkowych, tworząc w ten sposób wielkocząsteczkowe struktury. Mucyna błonowa MUC1 obecna jest na powierzchni szczytowej komórek nabłonkowych. Jej struktura różni się od wspomnianych mucyn wydzielniczych. Mucyna MUC1 składa się z trzech domen: cytoplazmatycznej, transbłonowej i pozakomórkowej. Ostatnia z wymienionych domen występuje w postaci długiej, sztywnej, nitkowatej struktury wystającej 200 – 500 nm ponad powierzchnię nabłonka. W czasie biosyntezy, domena ta jest „rozcięta” na dwie podjednostki, połączone następnie ze sobą wiązaniem niekowalencyjnym. Ze względu na możliwość proteolitycznego odłączenia, domena ta jest składnikiem śluzu żołądkowego, miesza się z mucynami wydzielniczymi, które jak wspomniałam wyżej są mucynami ilościowo dominującymi w śluzie. Ponadto w śluzie żołądkowym może być obecna także mucyna ślinowa MUC5B, a także, szczególnie w przypadku nowotworów, mucyna jelitowa MUC2.

Mucyny śluzu żołądkowego odgrywają istotną rolę w ograniczeniu zakażenia *Helicobacter pylori*. Ta Gram-ujemna, mikroaerofilna bakteria została wyizolowana po raz pierwszy ze śluzu żołądkowego pacjentów z przewlekłym

stanem zapalnym przez Marshall'a i Warren'a w 1983 roku. *H. pylori* odpowiedzialna jest za stany zapalne, wrzody, a także nowotwory żołądka. W 1994 roku, w oparciu o badania epidemiologiczne, Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem uznała *H. pylori* za czynnik rakotwórczy I klasy. Uważa się, że zainfekowana jest ponad połowa populacji ludzkiej, przy czym objawy kliniczne wykazuje tylko niewielka część, a nowotwór rozwija się zaledwie u 1% zakażonych. Rozwój choroby zależy przede wszystkim od bakteryjnych czynników wirulencji, indywidualnych cech gospodarza uczestniczących w bezpośrednich oddziaływaniach z bakterią, a także w pewnym stopniu od innych czynników środowiskowych np. palenia papierosów, diety. Przyleganie komórek bakterii do nabłonka żołądkowego wydaje się głównym etapem podczas rozwoju zakażenia. Uważa się, że w bezpośrednich interakcjach z *H. pylori*, chroniących w rezultacie przed dotarciem patogenu do nabłonka, uczestniczy przede wszystkim żołądkowa mucyna wydzielnicza MUC5AC. Najlepiej poznanymi strukturami cukrowymi tej mucyny, oddziałującymi z adhezynami bakteryjnymi są antygeny cukrowe Lewis b. Jednakże należy wziąć także pod uwagę udział mucyny błonowej MUC1 w ograniczaniu rozwoju zakażenia. Rola tej mucyny wydaje się niezwykle istotna z kilku względów. Z uwagi na jej specyficzną strukturę mucyna ta może stanowić fizyczną przeszkodę ograniczającą penetrację bakterii w kierunku błony śluzowej żołądka. Ponadto, ponieważ jest to mucyna związana z błoną, może ona brać udział w indukowaniu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w odpowiedzi na zakażenie.

Założenia i cel naukowy

Moje zainteresowania naukowe od początku kariery zawodowej dotyczyły glikoprotein żołądkowych. W prezentowanym cyklu prac moja uwaga skupiła się przede wszystkim na mucynie błonowej MUC1. Jak wspomniano powyżej mucyna ta składa się z domeny cytoplazmatycznej, transbłonowej i pozakomórkowej. Ostatnia z tych domen może być proteolitycznie odłączana i jest obecna w soku żołądkowym. W związku z nawiązaniem współpracy z prof. Zbigniewem Namiotem, będącym ówczesnie pracownikiem Oddziału Gastroenterologii Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego, zaistniała możliwość pracy z materiałem klinicznym jakim był sok żołądkowy pobierany od pacjentów tego oddziału, zakażonych *Helicobacter pylori*.

W pierwszej z wymienionych prac [praca H1; komunikat zjazdowy 5] podjęłam próbę opracowania metody izolacji mucyny MUC1 z soku żołądkowego pobranego od pacjentów z chorobą wrzodową. Po wstępnym przygotowaniu soków (zagęszczanie, odwirowanie, sączenie molekularne na Sepharose 4B), materiał zawierający mucynę MUC1 (obecność tej mucyny w eluacie z kolumny sprawdzałam stosując technikę dot blot; do detekcji MUC1 użyłam przeciwciała monoklonalne anty-MUC1) poddałam chromatografii powinowactwa na kolumnie z Sepharose 4B, aktywowanej CNBr, sprzężonej z przeciwciałem monoklonalnym HMFG-1 (anty-MUC1). Po elucji, zagęszczony materiał wykazujący aktywność z przeciwciałem anty-MUC1, poddany został elektroforezie i Western blottingowi. W rezultacie otrzymałam jeden rozdyfundowany prążek o średniej masie cząsteczkowej około 400 kDa, zidentyfikowany za pomocą przeciwciała monoklonalnego anty-MUC1. Wykazałam, że zastosowana przeze mnie metoda chromatografii

powinowactwa umożliwia wyizolowanie badanej mucyny z materiału biologicznego. Potwierdziłam także obecność mucyny błonowej MUC1 w soku żołądkowym.

Materiał kliniczny którym dysponowałam pochodził od dwóch grup pacjentów zakażonych *Helicobacter pylori*. Pierwszą z nich stanowili badani od których pobierano soki żołądkowe przed i po leczeniu omeprazolem, z kolei od pacjentów z drugiej grupy soki pobierano przed i po leczeniu omeprazolem wraz z zestawem eradykacyjnym (antybiotyki).

W związku ze wspomnianą wyżej we wstępie możliwością udziału mucyny MUC1 w oddziaływaniach z *H. pylori* postanowiłam sprawdzić jaki jest wpływ leczenia stanu zapalnego omeprazolem na poziom MUC1 w soku żołądkowym [prace H2, H5; komunikat 12]. Omeprazol jest lekiem z grupy inhibitorów pompy protonowej. Działanie tego leku w leczeniu zakażenia polega przede wszystkim na hamowaniu wydzielania kwasu solnego i obniżeniu kwaśności soku żołądkowego. Uważa się, że omeprazol może do pewnego stopnia „tłumić” patogenne działanie bakterii na przykład poprzez wpływ na hamowanie ich namnażania. Po wstępnym oczyszczeniu soków żołądkowych przeprowadziłam elektroforezę, a następnie Western blotting wielkocząsteczkowego materiału zawierającego MUC1, otrzymanego po sączeniu molekularnym na Sepharose 4B. W zdecydowanej większości badanych próbek zaobserwowałam wzrost poziomu mucyny MUC1 w materiale po leczeniu omeprazolem. Te same tendencje zaobserwowałam także w stosunku do poziomu cukrów obojętnych. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że zmiana warunków w obszarze błony śluzowej żołądka, indukowana działaniem omeprazolu ogranicza sugerowany przez niektórych autorów hamujący wpływ bakterii na ekspresję MUC1.

Leczenie omeprazolem nie doprowadza do eradykacji bakterii. *H. pylori* jest wciąż obecna w badanym materiale. Mimo to, jak opisałam wyżej, zaobserwowałam zmiany w poziomie antygenu MUC1 w sokach żołądkowych przed i po leczeniu. Kolejnym krokiem moich badań było określenie wpływu leczenia zakażenia *H. pylori* omeprazolem oraz zestawem eradykacyjnym (amoksylicyna i tynidazol) na poziom mucyny MUC1, a także DNA w soku żołądkowym pacjentów przed i po leczeniu [praca H3]. Wyższy poziom DNA przed leczeniem w przypadku surowego soku jak i w materiale rozpuszczalnym (supernatant po odwirowaniu) wskazuje na prawdopodobny destrukcyjny wpływ infekcji na komórki nabłonka żołądkowego (więcej uwolnionego DNA), a także na wzrost apoptozy komórek zainfekowanego nabłonka. Wielkocząsteczkowy materiał zawierający MUC1, otrzymany po sączeniu molekularnym poddałam elektroforezie i Western blottingowi. U 86% badanych pacjentów stwierdziłam wzrost poziomu MUC1 po leczeniu eradykacyjnym. Otrzymane wyniki potwierdziły sugerowany przez niektórych autorów hamujący wpływ *H. pylori* na ekspresję mucyny błonowej MUC1. Zmniejszony poziom tej mucyny może ułatwiać dotarcie bakterii do powierzchni nabłonka i ułatwiać indukowanie zmian zapalnych.

Jednym z najlepiej poznanych antygenów cukrowych funkcjonujących jako receptor dla adhezyn bakteryjnych jest struktura Lewis b (Fuc(α 1-2)Gal(β 1-3)[Fuc(α 1-4)]GlcNAc). Genom *H. pylori* zawiera ponad 30 genów determinujących ekspresję zewnętrznych białek błonowych, do których należą między innymi adhezyny odpowiedzialne za oddziaływania z antygenami cukrowymi mucyn, a także z innymi strukturami powierzchni nabłonka żołądkowego. Za wiązanie antygenu Lewis b odpowiada adhezyna BabA –

adhezyna wiążąca struktury cukrowe determinujące grupy krwi, kodowana przez gen *babA2*. Uważa się, że głównym nośnikiem struktury Lewis b w śluzie żołądkowym jest mucyna wydzielnicza MUC5AC. Rola mucyny błonowej MUC1 w oddziaływaniach z bakterią oraz rodzaj struktur cukrowych, uczestniczących w tych oddziaływaniach, nie są wyczerpująco wyjaśnione. Celem kolejnych moich doświadczeń było zbadanie wpływu eradykacji na poziom mucyny MUC1 i antygenów Lewis b oraz Lewis a (antygen pokrewny antygenowi Lewis b, pozbawiony jednej reszty fukozy połączonej wiązaniem α 1-2 z galaktozą) w sokach żołądkowych oraz ocena ewentualnych korelacji ekspresji wymienionych struktur z poziomem MUC1 [prace H4, H5]. W wyniku rozdziatu elektroforetycznego i Western blottingu materiału wielkocząsteczkowego, zawierającego MUC1 zaobserwowałam znamienne statystycznie wzrost zawartości wspomnianych wcześniej struktur po leczeniu eradykacyjnym. Nie zaobserwowałam jednak dodatniej korelacji między poziomem struktur Lewis a MUC1 [praca H4]. Tak więc na tym etapie moich badań nie uzyskałam potwierdzenia, iż antygen Lewis b mógł być obecny na MUC1. Potwierdziłam jednak hamujący wpływ infekcji na ekspresję MUC1 oraz wspomnianych antygenów cukrowych, które są prawdopodobnie obecne także na innych (poza MUC1) cząsteczkach w soku żołądkowym, w tym także na MUC5AC.

Jak wspomniałam wcześniej, dwie mucyny żołądkowe uczestniczą prawdopodobnie w oddziaływaniach z *H. pylori* w przebiegu infekcji. Jest to przede wszystkim mucyna wydzielnicza MUC5AC, a także, zgodnie z ostatnimi doniesieniami mucyna błonowa MUC1, której rozpuszczalna domena pozakomórkowa obecna jest w soku żołądkowym. Uważa się, że druga żołądkowa mucyna wydzielnicza, MUC6, nie uczestniczy w bezpośrednim

wiązaniu z bakterią, może jednak wykazywać działanie antybakteryjne przez hamowanie biosyntezy ważnego błonowego lipidu bakteryjnego, cholesterolo- α -D-glukopiranozydu. W kolejnych moich badaniach postanowiłam ocenić wiązanie *H. pylori* z MUC1 i MUC5AC obecnymi w sokach żołądkowych otrzymanych od pacjentów po eradykacji bakterii [praca H6]. W tym celu zastosowałam test ELISA, do detekcji mucyn i bakterii stosując przeciwciała monoklonalne. W całej badanej grupie pacjentów zaobserwowałam wiązanie poszczególnych mucyn z *H. pylori* oraz wysokie, dodatnie korelacje między poziomami obu mucyn w sokach i mucynami związanymi z adhezynami bakteryjnymi. Wyniki te potwierdzają udział mucyny MUC5AC oraz MUC1 w oddziaływaniach z *H. pylori*. Jednak w doświadczeniu oceniającym wiązanie bakterii ze składnikami soku żołądkowego, bez zróżnicowania na poszczególne mucyny, nie wykazałam dodatnich korelacji między poziomem wspomnianych mucyn a poziomem *H. pylori* związanym ze składnikami soku. Wynik ten wskazuje na oddziaływanie bakterii z receptorami obecnymi także na innych, poza mucynami, strukturach obecnych w soku.

W kolejnej mojej pracy postanowiłam ocenić wpływ eradykacji bakterii na poziom także innych niż badanych wcześniej struktur cukrowych, mogących potencjalnie uczestniczyć w oddziaływaniach z *H. pylori* [praca H7; komunikat 14]. Do struktur tych zalicza się między innymi, oprócz wspomnianej wcześniej struktury Lewis b także antygen H typ 1 rozpoznawany przez adhezynę BabA, jak również antygen sjalo Lewis x (adhezyna bakteryjna odpowiedzialna za potencjalne wiązanie tego antygenu to SabA – adhezyna wiążąca kwas sjalowy, kodowana przez gen *sabA*). Podwyższone stężenie sjalo Lewis x jest typowe dla stanów zapalnych błony śluzowej żołądka. W celu oceny glikozylacji

glikoprotein soków żołądkowych zastosowałam test ELISA z użyciem przeciwciał monoklonalnych anty-MUC1, anty-MUC5AC, anty-Lewis b, anty-sjalo-Lewis x, anty-H typ 1 oraz biotynylowanych lektyn o wysokiej specyficzności do określonych struktur cukrowych. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazałam w materiale po eradykacji zwiększony poziom tych antygenów cukrowych, które mogłyby potencjalnie uczestniczyć w oddziaływaniach z *H. pylori*. Należą do nich przede wszystkim Lewis b, H typ 1, sjalo Lewis x oraz inne fukozylowane i sjalowane antygeny cukrowe. Zaskakujący okazał się wyższy poziom struktur sjalowanych po eradykacji, jako że są one specyficzne szczególnie dla stanów zapalnych. Wydaje się, że bogato sjalowana mucyna ślinowa MUC5B, która może być obecna w soku żołądkowym, może być nośnikiem tych struktur. Ponadto wykazałam dodatnie korelacje między innymi pomiędzy poziomem MUC1 i antygenem H typ1 oraz pomiędzy MUC5AC i strukturą Lewis b (w materiale przed i po leczeniu eradykacyjnym). Może to sugerować obecność tych specyficznych antygenów cukrowych na wymienionych mucynach a także wskazywać na ich udział w oddziaływaniach z *H. pylori*.

W cyklu zaprezentowanych prac zajmowałam się badaniem udziału rozpuszczalnej formy mucyny błonowej MUC1 obecnej w soku żołądkowym w oddziaływaniach z *H. pylori*. Pragnę podkreślić, że moje wszystkie doświadczenia prezentowanego tematu prowadzone były na materiale klinicznym, podczas gdy zdecydowana większość prac dotyczących podobnych aspektów wykonywana jest na nowotworowych liniach komórkowych. Do izolacji MUC1 z soku żołądkowego zaproponowałam stosunkowo prostą metodę chromatografii powinowactwa, która może być stosowana także do

oczyszczania mucyny z innego materiału biologicznego. Wykazałam hamowanie ekspresji tej mucyny przez bakterię oraz wiązanie jej receptorów cukrowych z adhezynami *H. pylori*.

Kontynuacja moich badań będzie polegała na badaniu oddziaływań zachodzących między strukturami cukrowymi mucyny MUC1 komórek raka żołądka linii AGS a adhezynami *H. pylori*. Jak wspominałam wcześniej, mucyna ta, ze względu na powiązanie z błoną komórkową i w związku z możliwością inicjacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej wydaje się odgrywać ważną rolę w przebiegu zakażenia, a także w rozwoju ewentualnego procesu nowotworowego indukowanego obecnością *H. pylori*. Z tego względu moje przyszłe badania planuję zogniskować nad potencjalnym udziałem sygnalizacji wewnątrzkomórkowej indukowanej oddziaływaniem między MUC1 i *H. pylori* w rozwoju zakażenia, a być może w konsekwencji w tworzeniu zmian nowotworowych.

Aktualną wiedzę obejmującą udział mucyn żołądkowych w oddziaływaniach z *Helicobacter pylori* przedstawiłam w mojej pracy poglądowej [praca H8].

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo badawczych

Od początku mojej pracy zawodowej jestem aktywnie zaangażowana w prowadzenie badań naukowych. Wyniki moich badań zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych oraz prezentowane były w formie plakatów i wystąpienia ustnego na konferencjach naukowych. Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 45 doniesień naukowych:

- 26 prac oryginalnych (w tym 1 praca przyjęta do druku, potwierdzenie w załączeniu); w 14 pracach jestem pierwszym autorem, w 8 drugim;
- 1 pracę poglądową (pierwszy autor);
- 1 ustny referat zjazdowy (pierwszy autor);
- 17 doniesień zjazdowych prezentowanych w formie plakatów; w 8 jestem pierwszym autorem, w 6 drugim.

Sumaryczny Impact factor moich publikacji wynosi 22,130 (+ 0,176 za pracę przyjętą do druku). Za wszystkie osiągnięcia naukowe otrzymałam 357 (+ 15 za pracę przyjętą do druku) punktów MNiSW.

Po raz pierwszy z badaniami naukowymi spotkałam się w Zakładzie Chemii Fizycznej Akademii Medycznej w Białymstoku w trakcie wykonywania swojej pracy magisterskiej, prowadzonej pod kierownictwem pani profesor dr hab. Leokadii Jaroszewicz. Opracowane wyniki badań przedstawiłam w pracy zatytułowanej: „Specyficzność substratowa 5'nukleotydazy”. Pracę obroniłam w czerwcu 1988 roku.

Kolejnym etapem w prowadzeniu badań naukowych było podjęcie pracy zawodowej. Od początku mojej zawodowej kariery naukowej do chwili obecnej jestem związana z Zakładem Chemii Ogólnej i Organicznej Akademii Medycznej w Białymstoku (obecna nazwa - Zakład Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku).

Do cyklu prac przedstawionych w pkt. 4 należy także praca [A10 - praca przyjęta do druku; referat ustny K1] dotycząca oddziaływań mogących

zachodzić między strukturami cukrowymi zarówno mucyny MUC1 jak i *H. pylori*. Ciekawym przystosowaniem *H. pylori* do środowiska, w którym bytuje jest występowanie na powierzchni zewnętrznej ściany komórkowej lipopolisacharydów (LPS) ze zmiennym fragmentem łańcucha cukrowego (tzw. antygen O). Antygen ten wykazuje strukturalną homologię z antygenami Lewis występującymi zarówno w śluzie żołądkowym jak i na powierzchni nabłonka. Dane literaturowe donoszą, że niektóre z tych struktur LPS (np. Lewis x) mogą brać udział w adhezji bakterii do komórek nabłonka. Jednak znaczenie tych interakcji (opartych na wiązaniach niekowalencyjnych) i rodzaj odpowiednich receptorów nie są dostatecznie poznane. Przypuszcza się, że występowanie LPS ze strukturami cukrowymi homologicznymi do struktur nabłonka żołądkowego może być rodzajem mimikry antygenowej pomiędzy bakterią a gospodarzem. Dzięki temu może dochodzić do tolerancji immunologicznej antygenów bakteryjnych lub do wytwarzania autoprzeciwciał skierowanych przeciwko komórkom nabłonka gospodarza, co obserwowane jest u pacjentów z przewlekłymi stanami zapalnymi żołądka. W mojej kolejnej pracy postanowiłam zbadać czy antygeny bakteryjne Lewis b i H typ 1 mogą uczestniczyć w oddziaływaniach ze strukturami cukrowymi MUC1. Stosując technikę ELISA wykazałam w badanych szczepach obecność zarówno antygenów Lewis b i H typ 1, jak również adhezyn odpowiedzialnych za wiązanie tych receptorów. Za pomocą testu sandwich ELISA, w którym mucyna MUC1 została selektywnie związana z płytką (za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-MUC1), wykazałam wzrost wiązania *H. pylori* do MUC1 w przypadku tych szczepów, do których dodawano H typ 1 – HSA (human serum albumin). Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują udział bakteryjnych struktur H

typ 1 w oddziaływaniach z mucyną MUC1. Są to pionierskie badania, wskazujące na możliwość istnienia interakcji typu cukier – cukier między antygenami bakteryjnymi a receptorami cukrowymi MUC1. Uzyskane przeze mnie wyniki wymagają potwierdzenia w kolejnych doświadczeniach. W przypadku oddziaływań z antygenem Lewis b rezultaty okazały się niejednoznaczne.

Ponadto, poza pracami zaprezentowanymi powyżej w mojej dotychczasowej działalności naukowej mogę wyróżnić następujące kierunki badań:

A. Badania nad izolacją i charakterystyką mucyn żołądkowych:

- prace oryginalne: A1, A2, A4, B1
- komunikaty zjazdowe: 1, 2, 4, 10

B. Badania nad izolacją i charakterystyką mucyny MUC1 płynów puchlinowych:

- prace oryginalne: A6, B3, B5
- komunikaty zjazdowe: 9, 13

C. Inne:

C1. Badania nad izoenzymami N-acetylo- β -heksozoaminidazy ludzkich ślinianek i nerek:

- prace oryginalne: A3, A5, A7
- komunikaty zjazdowe: 6, 7

C2. Badania glikozylacji białek zdrowych i nowotworowych tkanek ślinianek i nerek ludzkich:

- prace oryginalne: A8, A9
- komunikaty zjazdowe: 16

C3. Pozostałe:

- prace oryginalne: B2, B4, B6, B7, B8, B9
- komunikaty zjazdowe: 3, 8, 11, 15, 17

Ad. A

Od początku pracy zawodowej głównym obiektem moich zainteresowań były mucyny żołądkowe. Pierwsze prace prowadzone pod kierunkiem profesora Andrzeja Gindzieńskiego dotyczyły badań nad warunkami stosowanymi podczas oczyszczania mucyn. Początkowo zajmowałam się oceną aktywności proteolitycznej jaka zachodzi podczas preparatyki glikoprotein ze śluzu żołądków wieprzowych [komunikat zjazdowy 1]. Następnie podjęłam próbę oczyszczania i charakterystyki mucyn, a szczególnie drobnocząsteczkowych produktów jej depolimeryzacji. Izolację glikoprotein prowadziłam w obecności inhibitorów proteolizy metodą sączenia molekularnego na żelach Sepharose CL 2B i Sephacryl S-500. Wielkocząsteczkowy materiał poddawałam następnie redukcji i alkilacji jodo[¹⁴C]acetamidem. Wykazałam uwalnianie białek, o masie 75 kDa [praca B1, komunikat 2], a także białek związanych z podjednostkami mucynowymi za pomocą wiązań disiarczkowych o masach cząsteczkowych 100 i 140 kDa [prace A1, A2; komunikat 4].

W kolejnych pracach nad izolacją i charakterystyką mucyn uczestniczyłam, jako współwykonawca, w doświadczeniach nad zastosowaniem 50% roztworu hydrazyny do uwalniania O-glikanów, znakowanych następnie estrem etylowym kwasu p-aminobenzoesowego (ABBE) i poddawanych analizie HPLC [praca A4, komunikat 10]. Zastosowana metoda okazała się być alternatywą dla klasycznej β -eliminacji. Dodatkowo umożliwia ona znakowanie redukującego końca łańcucha oligosacharydowego za pomocą różnych znaczników.

Ad. B

W kilku kolejnych doświadczeniach podjęłam próbę izolacji i charakterystyki mucyny MUC1 z płynów puchlinowych. Mucyna ta jest glikoproteiną, której poziom często wzrasta w stanach nowotworowych, poza tym może dochodzić do zmian w jej glikozylacji. Jej domena pozakomórkowa jest uznanym markerem w wielu nowotworach. Badane przeze mnie płyny puchlinowe pochodziły z Kliniki Gastroenterologii Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego. Były one pobierane od pacjentów w różnych jednostkach chorobowych (nowotworowych i nienowotworowych) w celu odbarczenia. Do izolacji MUC1 z płynu pochodzącego od pacjentki z nowotworem jajnika zastosowałam metodę chromatografii powinowactwa na Sepharose 4B aktywowanej CNBr, sprzężonej z przeciwciałem monoklonalnym HMFG-1 (anty-MUC1). Metodę tę wykorzystałam także do izolacji MUC1 z soku żołądkowego [praca H1]. W wyniku rozdziału elektroforetycznego i Western blottingu oczyszczonego materiału uzyskałam pojedynczy, rozdyfundowany prążek o m. cz. 400 – 450 kDa. Analiza chromatograficzna (GC) wykazała skład cukrowy, z którego można wywnioskować obecność krótkich struktur typu antygen T i Tn, typowych

dla mucyn nowotworowych [praca B3; komunikat 9]. W kolejnej pracy przeprowadziłam charakterystykę porównawczą składu cukrowego MUC1 wyizolowanej powyższą metodą z płynów puchlinowych kilku pacjentów nowotworowych i nienowotworowych. Analizę węglowodanów wykonałam metodą chromatografii gazowej na podstawie której można wnioskować o dominacji krótkich, nierozgałęzionych struktur cukrowych we wszystkich badanych płynach. Nie zaobserwowałam jednak znaczących różnic w glikozylacji mucyny MUC1 pacjentów nowotworowych i nienowotworowych, wskazujących na proces nowotworowy [praca B5]. W ostatniej z prac tego cyklu ponownie zbadałam glikoformy obecne w płynach pochodzących od dwóch grup pacjentów, nowotworowych i nienowotworowych. Tym razem analizą objęłam większe grupy badanych. W celu oceny glikozylacji zastosowałam test typu ELISA z wykorzystaniem biotynylowanych lektyn. Wykazałam, iż kwas sialowy oraz antygen T (różnica znamienna statystycznie) występują w grupie nowotworowej na wyższym poziomie i mogą być w związku z tym traktowane jako rodzaj markera zmian nowotworowych [praca A6; komunikat 13].

Ad. C

Pozostałe prace, w których jestem współautorem powstały w większości w ramach współpracy naukowej prowadzonej z innymi jednostkami naukowymi.

Ad. C1

W cyklu prac A3, A5, A7; komunikaty zjazdowe 6, 7 uczestniczyłam w doświadczeniach dotyczących enzymu N-acetylo- β -heksozoaminidazy (HEX).

Izoelektrofokuszowanie, ocena densytometryczna oraz statystyczna izoform izoenzymów A i B wspomnianego enzymu pochodzącego ze zdrowej i nowotworowej tkanki nerkowej wykazała podobny profil i brak istotnych różnic w aktywności enzymu. Zastosowana metoda oceny statystycznej może być z powodzeniem stosowana w badaniu izoform innych enzymów [praca A3]. Istnienie kilku izoform izoenzymów A i B N-acetylo- β -heksozaminidazy wykazano także w zdrowej i nowotworowej tkance wątrobowej [komunikat 7].

W kolejnych doświadczeniach współuczestniczyłam w badaniu aktywności izoenzymów A i B N-acetylo- β -heksozaminidazy pochodzących ze zdrowej i nowotworowej tkanki ślinianek. Wykazano wyższy poziom aktywności całkowitej enzymu, jak również jego izoform w tkance nowotworowej. W związku z tym badanie aktywności N-acetylo- β -heksozaminidazy może być rodzajem markera podczas pojawiania się i ocenie rozwoju stanu nowotworowego ślinianek [praca A5; komunikat 6].

W następnej pracy współuczestniczyłam w ocenie wpływu palenia papierosów na aktywność N-acetylo- β -hexoaminidazy we krwi i moczu pacjentów zdrowych i pacjentów z rakiem nerki. Wykazaliśmy hamujący efekt palenia papierosów na aktywność enzymu w obu badanych tkankach, co może wskazywać na ograniczanie katabolizmu łańcuchów oligosacharydowych w raku nerki. Ponadto zaobserwowaliśmy, podobnie jak w materiale pochodzącym z ludzkich ślinianek, wyższą aktywność enzymu w grupie pacjentów nowotworowych w porównaniu ze stanem fizjologicznym [praca A7].

Ad. C2

W kolejnych pracach prowadzonych w ramach współpracy z Zakładem Biochemii Farmaceutycznej brałam udział w ocenie różnic glikozylacji białek pochodzących ze zdrowych i nowotworowych ślinianek ludzkich [praca A8] i tkanki nerkowej [praca A9; komunikat 16]. We wszystkich badanych tkankach zaobserwowano wpływ procesu nowotworowego na glikozylację białek. Uzyskane wyniki mogą sugerować wykorzystanie niektórych ocenianych struktur jako markerów procesu nowotworowego.

Ad. C3

Pozostałe prace prowadzone w ramach współprac z innymi jednostkami naukowymi dotyczą następujących tematów:

- badanie obecności białek, wybranych związków chemicznych i jonów w ultra filtratach pochodzących z dializatorów o wysokim i niskim przepływie [praca B2; komunikat 3];

- badania zależności pomiędzy cukrzycą ciężarnych a przebiegiem ciąży [prace B4, B6]. Wykazano ważność właściwej opieki położniczo-ginekologicznej kobiet ciężarnych w zapobieganiu ewentualnym powikłaniom w zdrowiu zarówno matki jak i noworodka. Uczestniczyłam także w badaniach dotyczących oceny wpływu niedotlenienia okołoporodowego na zgony, chorobowość i defekty neurologiczne płodów i noworodków [praca B7; komunikat 11];

- badanie wpływu sytuacji ekonomiczno-społecznej na zwyczaje żywieniowe studentów [prace B8, B9; komunikat 15];

- ocena wpływu zastosowania *Saccharomyces boulardii* w leczeniu zapalenia jelita grubego na strukturę mucyny [komunikat 8]. Wykazano pozytywny wpływ drożdży na odbudowę śluzówki zmienionej w przebiegu procesu chorobowego, w związku z tym stosowanie *S. boulardii* mogłoby okazać się pomocne w leczeniu stanu zapalnego jelita grubego;

- ocena galaktozylacji IgG w reumatoidalnym zapaleniu stawów u pacjentów leczonych metotrexatem [doniesienie 17]. Wykazano, iż reumatoidalne zapalenie stawów powoduje zmniejszenie galaktozylacji IgG w surowicy (ze wzrostem poziomu po leczeniu metotrexatem). Stwierdzono także dodatnie korelacje między poziomem galaktozylacji a ciężkością stanu chorobowego. W związku z powyższym ocena glikozylacji IgG może być przydatnym markerem w monitorowaniu przebiegu choroby i leczenia.

W czasie mojej pracy zawodowej byłam recenzentem manuskryptów proponowanych do publikacji w następujących czasopismach:

- Acta Biochimica Polonica
- Evidence Based Complementary and Alternative Medicine (2 manuskrypty)
- Journal of Pediatric Biochemistry

W trakcie pracy na Uniwersytecie Medycznym wielokrotnie otrzymywałam nagrody JM Rektora UM za działalność naukową:

- nagroda zespołowa I stopnia za osiągnięcia naukowe w latach:
1999/2000, 2000/2001, 2003/2004, 2007/2008, 2010/2011, 2011/2012
- nagroda zespołowa II stopnia za osiągnięcia naukowe w latach:
1997/1998, 2004/2005, 2009/2010
- nagroda zespołowa III stopnia za osiągnięcia naukowe w latach:
2008/2009

Kaducejewska