

*Załącznik nr 2
do wniosku o przeprowadzenie
postępowania habilitacyjnego*

A U T O R E F E R A T

Katarzyna Winsz-Szczotka

Załącznik nr 2
do wniosku o przeprowadzenie
postępowania habilitacyjnego

A U T O R E F E R A T

1. IMIĘ I NAZWISKO: **Katarzyna Winsz-Szczotka**

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE:

- ❖ 1994 r. tytuł magistra analityki medycznej (dyplom z wyróżnieniem, Promotor pracy magisterskiej – Prof. dr hab. n med. Jeremi Czaplicki)
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej,
Śląska Akademia Medyczna w Katowicach
- ❖ 2003 r. stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: *"Glikoaminoglikany surowicy krwi osób z chorobą Gravesa i Basedowa"* (z wyróżnieniem, Promotor – Prof. dr hab. n med. Krystyna Olczyk)
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej,
Śląska Akademia Medyczna w Katowicach

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

Od ukończenia studiów do chwili obecnej jestem pracownikiem Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (do 2007 roku: Śląska Akademia Medyczna):

- ❖ 1.10.1994 r. do 30.09.1995 r.
 - ✓ Asystent stażysta w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej
- ❖ 1.10.1995 r. do 30.09.2006 r.
 - ✓ Asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej
- ❖ 1.10.2006 r. do nadal
 - ✓ Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej

- ❖ 01.03.2009 r. do nadal
 - ✓ Pełnomocnik Rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach ds. specjalizacji dla diagnostów laboratoryjnych
- ❖ 01.02.2015 r. do nadal
 - ✓ Kierownik Kolegium Kształcenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

4. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE, WYNIKAJĄCE 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. Cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

**„OCENA BIOMARKERÓW PRZEMIAN SKŁADNIKÓW MACIERZY
POZAKOMÓRKOWEJ W PRZEBIEGU
MŁODZIEŃCZEGO IDIOPATYCZNEGO ZAPALENIA STAWÓW”**

(łącznie IF: **9.414**; łącznie punktacja KBN/MNiSW: **125**)

- ❖ **K. Winsz-Szczotka**, K. Komosińska-Vassev, K. Kuźnik-Trocha, A. Gruenpeter, I. Lachór-Motyka, K. Olczyk: Influence of proteolytic-antiproteolytic enzymes and prooxidative-antioxidative factors on proteoglycan alterations in children with juvenile idiopathic arthritis. Clin Biochem, 2014, 47 (9): 829-834.
IF= 2.275; MNiSW = 30
Wkład habilitanta: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, zebranie materiału do badań, udział w wykonaniu analiz ilościowych glikozoaminoglikanów, metaloproteinaz macierzowych i ich tkankowych inhibitorów, całkowitego potencjału anty- i prooksydacyjnego osocza, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 75%.*
[pozycja **I.1.** w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].
- ❖ **K. Winsz-Szczotka**, K. Komosińska-Vassev, K. Kuźnik-Trocha, A. Siwiec, B. Żegleń, K. Olczyk: Circulating keratan sulfate as a marker of metabolic changes of cartilage proteoglycan in juvenile idiopathic arthritis; influence of growth factors as well as proteolytic and prooxidative agents on aggrecan alterations. Clin Chem Lab Med, 2015, 53 (2): 291-297.
IF= 2.707; MNiSW = 35
Wkład habilitanta: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, zebranie materiału do badań, udział w wykonaniu analiz ilościowych siarczanów keratanu, TGF-β1, PDGF-BB,*

ADAMTS-4, ADAMTS-5 i grup tiolowych we krwi, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

[pozycja **I.2.** w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- ❖ **K. Winsz-Szczotka, K. Kuźnik-Trocha, K. Komosińska-Vassev, G. Wisowski, A. Gruenpeter, I. Lachór-Motyka, B. Żegleń, W. Lemski, K. Olczyk:** Plasma and urinary glycosaminoglycans in the course of juvenile idiopathic arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458 (3): 639-643.

IF= 2.297; MNiSW = 20

Wkład habilitanta: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, zebranie materiału do badań, udział w wykonaniu izolacji oraz ocenie ilościowej siarczanowanych i niesiarczanowanego typu glikozoaminoglikanów osocza oraz moczu, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

[pozycja **I.3.** w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- ❖ **K. Winsz-Szczotka, K. Kuźnik-Trocha, K. Komosińska-Vassev, A. Jura-Półtorak, K. Olczyk:** Laboratory indicators of aggrecan turnover in juvenile idiopathic arthritis, *Dis Markers*, 2016, Vol. 2016, ID 7157169, p. 1-7, doi.org/10.1155/2016/7157169.

IF= 1.562; MNiSW = 25

Wkład habilitanta: koncepcja pracy, projekt eksperymentu, zebranie materiału do badań, udział w wykonaniu oceny stężenia CS, CS846 oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych we krwi, analiza i interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 75%.*

[pozycja **I.4.** w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- ❖ **K. Winsz-Szczotka, Ł. Mencner, K. Olczyk:** The metabolism of glycosaminoglycans in the course of juvenile idiopathic arthritis. *Postepy Hig Med Dosw*, 2016, 70: 135-142, doi:10.5604/17322693.1196355.

IF= 0.573; MNiSW = 15

Wkład habilitanta: koncepcja pracy, napisanie manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

[pozycja **I.5.** w wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik nr 3].

- *do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów prac, określające indywidualny wkład każdego z Nich w ich powstanie – załącznik nr 6.

- b. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Cel naukowy:

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) to najczęściej występująca postać zapalnych układowych chorób tkanki łącznej wieku rozwojowego. Artropatia rozwija się u dzieci z genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej, ujawnieniu których sprzyjają niekorzystne wpływy zewnątrzpochodnych czynników. Do tych ostatnich należą infekcje, stres czy niekorzystne warunki psychospołeczne, które bezpośrednio przyczyniają się do przełamania autotolerancji i rozwoju zaburzeń immunologiczno-zapalnych, leżących u podstaw MIZS [1-3]. Wyrazem tych ostatnich zaburzeń jest hipersekrecja cytokin prozapalnych, w tym – czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α), interleukiny 1 (IL-1) czy interleukiny 6, przez makrofagi, komórki dendrytyczne czy limfocyty T, których przedłużona i niekontrolowana aktywacja prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego, toczącego się pierwotnie w obrębie błony maziowej stawów, po czym często rozszerzającego się na tkanki okołostawowe, przyczepy ścięgien i mięśni oraz pochewki ścięgna [4]. Postępujące zużycie chrząstki stawowej w przebiegu MIZS skutkuje zachwianiem równowagi pomiędzy biologiczną odpornością chrząstki, jej funkcją i działającymi siłami nacisku. Zaburzenia te przypisywane są w szczególności zmianom homeostazy komponentów macierzy pozakomórkowej (ECM) tkanki łącznej, współtworzącej chrząstkę [4-6]. Spośród tych ostatnich związków szczególną rolę w utrzymaniu mechaniczno-immunologicznych właściwości chrząstki pełnią proteoglikany (PGs), w tym – agrekan, dekoryna czy biglikan. Cząsteczki wymienionych proteoglikanów współtworzone są przez białko rdzeniowe, do którego przyłączone są heteropolisacharydowe łańcuchy glikozoaminoglikanów (GAGs), tj. siarczanów chondroityny (CS), siarczanów keratanu (KS), siarczanów dermatanu (DS), siarczanów heparanu (HS) i heparyn (H). Zapewnienie chrząstce przez omawiane PGs wytrzymałości i odporności na obciążenie wynika w szczególności z zdolności agrekanu do agregacji z łańcuchem kolejnego GAG, tj. kwasu hialuronowego (HA) [7]. Glikozoaminoglikany są nierozgałęzionymi heteropolisacharydowymi składnikami tkanki łącznej, zbudowanymi z powtarzających się jednostek dwucukrowych. Sekwencje te, w zależności od typu GAGs, składają się z reszty heksozoaminy tj. N-acetylo-D-galaktozoaminy (GalNAc) lub N-acetylo-D-glukozaaminy (GlcNAc) oraz reszty kwasu heksuronowego, tj. D-glukuronowego (GlcA) lub L-iduronowego (IdoA) albo D-galaktozy (Gal) [7-10]. Znaczne rozpowszechnienie omawianych glikanowych makrocząsteczek w tkankach, jak też i duża gęstość – warunkowanego obecnością reszt karboksylowych i siarczanowych – ujemnego ładunku elektrycznego tych makrocząsteczek decydują, że GAGs, obok pełnienia roli międzykomórkowego spoiwa, uczestniczą w regulacji procesów adhezji, migracji, proliferacji czy różnicowania komórek. Te ostatnie funkcje zachodzą poprzez interakcje GAGs z wieloma rodzajami cząsteczek, w tym – enzymami czy ich efektorami, czynnikami wzrostu i ich receptorami, czynnikami transkrypcyjnymi, jak też z strukturalnymi macierzowymi białkami [5-10]. Stąd też, każda zmiana metabolizmu omawianych komponentów ECM, związana

ze zmianą szybkości zarówno ich biosyntezy jak i degradacji, może mieć konsekwencje patologiczne i prowadzić do ujawnienia się MIZS. Jednakże, towarzyszące artropatii przemiany PGs/GAGs, wiążące się zarówno z modyfikacją, stymulowaną czynnikami wzrostowymi, biosyntezy wspomnianych komponentów [11-13], jak również – z postsyntetyczną ich przebudową, związaną z reakcjami proteolitycznej [14, 15] jak i oksydacyjnej degradacji [16-18], pozostają nie w pełni poznane.

Z uwagi na fakt, że profil glikozoaminoglikanów w płynach ustrojowych w dużej mierze odzwierciedla metabolizm wymienionych makrocząsteczek na poziomie tkankowym, z drugiej zaś strony – możliwy do oceny w stosunkowo łatwo dostępnym materiale biologicznym takim jak krew, reprezentować może wartościowy biomarker przemian składników ECM tkanki łącznej w przebiegu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów. Szczególnie ważne są próby znalezienia wczesnych biomarkerów przebudowy komponentów łącznotkankowych współtworzących struktury kostno-stawowe, których pomiar pozwoliłby na określenie stopnia nasilenia i/lub postępu uszkodzenia chrząstki stawowej u dzieci z MIZS. Zbyt późno lub błędnie rozpoznana artropatia może bowiem skutkować niepełnosprawnością pacjentów. Takimi biomarkerami mogą być fragmenty agrekanu, które są uwalniane do płynów biologicznych w przebiegu metabolicznych przemian tego proteoglikanu chrząstkowego.

Zważywszy ponadto, że zmiany składu i struktury komponentów macierzy pozakomórkowej mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie MIZS oraz, że stężenie omawianych makrocząsteczek w płynach ustrojowych, w tym – i we krwi, znajduje coraz szersze zastosowanie w praktyce klinicznej, stanowiąc niejednokrotnie – dobrze korelujący z ciężkością procesu chorobowego – marker aktywności schorzeń, zasadniczym celem cyklu prac, pod wspólnym tytułem „**Ocena biomarkerów przemian składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów**”, była, przeprowadzona w materiale biologicznym pozyskanym od dzieci z MIZS w momencie klinicznej manifestacji choroby jeszcze przed wprowadzeniem leczenia, jak również u tych samych pacjentów po zastosowaniu terapii modyfikującej przebieg procesu zapalnego i przyczyniającej się do uzyskania klinicznej poprawy, ocena:

- ❖ stężenia i strukturalnej przebudowy glikozoaminoglikanów osocza, oparta o analizę ilościową zarówno całkowitej puli GAGs jak również – o jakościową i ilościową charakterystykę poszczególnych klas tych związków, w zależności od ich wrażliwości na depolimeryzację wysoce swoistymi bakteryjnymi liazami, z następowym elektroforetycznym rozdziałem opornych na trawienie glikanów. Z uwagi na związek osoczowego profilu GAGs z wielkością przesączania kłębuszkowego, celem pracy było przeprowadzenie ilościowej i jakościowej charakterystyki wydalanych z moczem glikanowych makrocząsteczek;
- ❖ mechanizmów, regulujących procesy przebudowy heteropolisacharydowych składników macierzy pozakomórkowej w oparciu o:
 - ✓ ocenę równowagi proteolityczno-antyproteolitycznej osocza na podstawie analizy stężenia proteinaz z grupy ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs), w tym – ADAMTS-4 i ADAMTS-5, jak również

- metaloproteinaz macierzowych (MMP), w tym – MMP-3 i MMP-10 oraz ich fizjologicznych tkankowych inhibitorów (TIMP) w tym – TIMP-1, TIMP-2, jako czynników regulujących procesy pozakomórkowej degradacji składników ECM;
- ✓ ocenę stanu prooksydacyjno-antyoksydacyjnego ustroju jako czynnika o istotnym znaczeniu w postsyntetycznej modyfikacji składników macierzy pozakomórkowej, poprzez biochemiczną analizę całkowitego statusu oksydacyjnego (TOS) oraz parametrów odzwierciedlających wolnorodnikową modyfikację białek, w tym białek rdzeniowych PGs, tj. grup tiolowych (TG) w osoczu, a ponadto, ocenę zakresu zaburzeń potencjału antyoksydacyjnego komórek i płynu pozakomórkowego, poprzez pomiar całkowitego statusu przeciwutleniaczy (TAS) jak też analizę aktywności enzymatycznego statusu antyutleniaczy – aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CT) i peroksydazy glutationowej (GPx);
 - ✓ ocenę osoczowego stężenia czynników mających znaczący wpływ na wielkość biosyntezy komponentów macierzowych, w tym – transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β 1) oraz czynnika wzrostowego pochodzenia płytkowego BB (PDGF-BB);
 - ❖ ocena we krwi stężenia siarczanów keratanu oraz siarczanów chondroityny – jako wczesnych markerów destrukcji agrekanu, jak również ocena epitopu 846 łańcucha siarczanu chondroityny (CS846) – pełniącego rolę wskaźnika syntezy wspomnianego PGs, jako próba znalezienia odpowiedzi na pytanie czy stosowana u dzieci z MIZS terapia, mająca na celu zmniejszenie aktywności zapalnej choroby, równocześnie przyczynia się do regeneracji przemian agrekanu i poprzez to hamuje dysfunkcję chrząstki stawowej.

Material i metody:

Materiał biologiczny do badań stanowiły próbki krwi pozyskane od dzieci obojga płci, w wieku od 2 do 16 roku życia, ze świeżo rozpoznanym młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, leczonych w Poradni Reumatologicznej Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej Centrum Pediatrii im. Jana Pawła II w Sosnowcu lub hospitalizowanych na Oddziale Reumatologii wyżej wspomnianego szpitala.

Rozpoznanie MIZS u dzieci ustalono, zgodnie z kryteriami Międzynarodowej Ligi Stowarzyszeń Reumatologicznych (ILAR) w oparciu o czas trwania choroby, objawy kliniczne – obejmujące ból i obrzęk stawów, ograniczenia ruchomości stawów oraz zaburzenia wzrostu. W zakwalifikowaniu osób do badań posłużono się obowiązującą listą wykluczeń. Ponadto, trafność diagnozy potwierdzono wynikami laboratoryjnych badań diagnostycznych, w tym – wskaźników procesu zapalnego tj. białka C reaktywnego (CRP) i wskaźnika opadania krwinek czerwonych (ESR), oznaczenia czynnika reumatoidalnego (RF) oraz miana przeciwciał przeciwjądrowych oraz przeciwko cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi. Do badań zakwalifikowano osoby z umiarkowaną aktywnością nielicznostawowej lub wielostawowej postaci MIZS.

U wszystkich chorych badania przeprowadzone zostały przed rozpoczęciem leczenia modyfikującego stan zapalny, a także – u tych samych osób, po uzyskaniu u nich stanu klinicznej poprawy, tj. po co najmniej jedenastomiesięcznym okresie leczenia. Kliniczną poprawę u pacjentów określono w oparciu o kryteria ACR Pediatric 30. W leczeniu pacjentów z MIZS stosowano sulfasalazynę (Sulfasalazin EN), prednison (Encorton) oraz metotreksat (Methotrexat).

Materiał referencyjny do badań stanowiły próbki krwi, pobrane od zdrowych dzieci, w odpowiednio dobranych grupach wiekowych, u których wykonywano badania profilaktyczne w pracowni Diagnostyki Laboratoryjnej Niepublicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej F-MED w Czeladzi.

Ponadto, jeszcze przed pozyskaniem materiału biologicznego, prawni opiekunowie zarówno dzieci chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów jak i dzieci zdrowych wyrazili zgodę na udostępnienie i wykorzystanie pobranego materiału biologicznego, pozostającego po wykonaniu zleconych badań diagnostycznych. Na przeprowadzenie niniejszych badań wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (nr KNW/0022/KBI/142/I/09).

Uzyskany materiał biologiczny poddany został procedurze badawczej, obejmującej izolację i oczyszczanie glikozoaminoglikanów z następową ich analizą ilościową i jakościową. Pułę glikozoaminoglikanów krwi stanowią łańcuchy GAGs natywnych proteoglikanów osocza, GAGs wywodzące się z rozpadu zarówno PGs tkankowych jak i krwi, jak również wolne łańcuchy GAGs różnej długości, związane z białkami niekowalencyjnie, tj. za pośrednictwem wiązań jonowych, mostków wodorowych lub innych typów oddziaływań. GAGs wyizolowano z próbek krwi metodą Volpiego i wsp. [19] w modyfikacji Olczyk i wsp. [20]. W celu całkowitego usunięcia pozostałości białek, związanych z łańcuchami GAGs, próbki krwi poddano niespecyficzej hydrolizie enzymatycznej papainą oraz procesowi tzw. β -eliminacji w obecności wodorotlenku sodu. Z uzyskanych hydrolizatów wytracono glikany, a następnie, w celu ich oczyszczenia zastosowano reakcję specyficznego kompleksowania glikozoaminoglikanów z chlorkiem cetylpirydyniowym. Ilościowej analizy wyizolowanych i oczyszczonych osoczowych GAGs dokonano metodą Blumenkrantz i Asboe-Hansen [21], w oparciu o ocenę stężenia kwasów heksuronowych, współtworzących łańcuchy tych związków. Następnie, celem jakościowej i ilościowej analizy poszczególnych glikanowych frakcji osocza, próbki GAGs zostały poddane elektroforezie na octanie celulozy, zarówno przed jak i po zastosowaniu enzymów swoście eliminujących poszczególne typy tych związków. Zastosowano procedury depolimeryzacji GAGs z wykorzystaniem chondroitynazy ABC, chondroitynazy B oraz heparanazy I w kombinacji z heparanazą III. Natomiast, do oceny surowiczego stężenia CS wykorzystano pomiar kwasów heksuronowych w próbkach GAGs, zarówno przed jak i po zastosowaniu chondroitynazy B z heparanazami, tj. czynników degradujących inne niż CS typy glikanów.

Ilościowej oceny – niezawierających w budowie reszt heksuronowych – siarczanów keratanu oraz niesiarczanowanego i nietworzącego kowalencyjnych połączeń z białkami glikozoaminoglikanu – kwasu hialuronowego w osoczu, dokonano metodą immunoenzymatyczną. Natomiast, procedurę kompleksowania siarczanowanych GAGs z błękitem dimetylenowym,

zarówno przed jak i po usunięciu z próbek, działaniem kwasu azotowego (III), siarczanów heparanu i heparyn, wykorzystano do ilościowej i jakościowej charakterystyki GAGs moczu

Z kolei, analizę ilościową TGF- β 1, PDGF-BB, proteinaz i ich inhibitorów – przeprowadzono z wykorzystaniem metod immunochemicznych. Pozostałe oznaczenia wykonano z użyciem testów diagnostycznych, zgodnie z procedurami podanymi przez producenta.

Piśmiennictwo:

1. V. Kalinina Ayuso, N. Makhotkina, M. van Tent-Hoeve, et al.: Pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis associated uveitis: the known and unknown. *Surv Ophthalmol*, 2014 59: 517-31.
2. P. Kahn: Juvenile idiopathic arthritis: an update for the clinician. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2012, 70: 152-66.
3. D. Kaminiarczyk, K. Adamczyk, M. Niedziela: Proinflammatory factors in children with juvenile idiopathic arthritis. *Reumatologia*, 2010, 48: 62-65.
4. A. Ravelli: The time has come to include assessment of radiographic progression in juvenile idiopathic arthritis clinical trials. *J Rheumatol*, 2008, 35: 553-7.
5. M. Maldonado, J. Nam: The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res Int*, 2013, doi: 10.1155/2013/284873.
6. S. Kamphuis, K. Hrafnkelsdóttir, M.R. Klein, et al.: Novel self-epitopes derived from aggrecan, fibrillin, and matrix metalloproteinase-3 drive distinct autoreactive T-cell responses in juvenile idiopathic arthritis and in health. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8: R178.
7. A. Aspberg: The different roles of aggrecan interaction domains. *J Histochem Cytochem*, 2012, 60: 987-96.
8. D.H. Vynios: Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease. *Biomed Res Int*, 2014, doi: 10.1155/2014/452315.
9. K.R. Taylor, R.L. Gallo: Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation, *FASEBJ*, 2006, 20: 9-22.
10. A. Jura-Póltorak, K. Komosinska-Vassev, A. Kotulska et al.: Alterations of plasma glycosaminoglycan profile in patients with rheumatoid arthritis in relation to disease activity. *Clin Chim Acta*, 2014, 433: 20-27.
11. D. Nikitovic, A. Zafiroopoulos, P. Katonis, et al.: Transforming growth factor-beta as a key molecule triggering the expression of versican isoforms v0 and v1, hyaluronan synthase-2 and synthesis of hyaluronan in malignant osteosarcoma cells. *IUBMB Life*, 2006, 58: 47-53.
12. S. Rosengren, M. Corr, D.L. Boyle: Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12: R65.
13. S. Rosengren, M. Corr, D.L. Boyle: Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12: R65.
14. P. Verma, K. Dalal: ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 3507-14.
15. T. Klein, R. Bischoff: Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases, *Amino Acids*, 2011, 41: 271-290.
16. Y. Henrotin, B. Kurz, T. Aigner: Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13: 643-654.
17. R. Brik, I. Rosen, D. Savulescu, et al.: Salivary antioxidants and metalloproteinases in juvenile idiopathic arthritis. *Mol Med*, 2010, 16: 122-8.
18. M.D. Rees, E.C Kennett, J.M. Whitelock, et al.: Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44: 1973-2001.

19. N. Volpi, M. Cusmano, T. Venturelli: Qualitative and quantitative studies of heparin and chondroitin sulfates in normal human plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 18: 49-58.
20. K. Olczyk, A. Głowacki, E. Koźma: Non-insulin-dependent diabetes mellitus-associated changes in serum glycosaminoglycans. *Pathophysiol*, 1997, 4: 121-129.
21. N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen: New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem*, 1973, 54: 484-489.

Wyniki i wnioski:

❖ **W przebiegu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów dochodzi do zaburzeń metabolizmu proteoglikanowych komponentów macierzy pozakomórkowej, znajdujących odzwierciedlenie w ilościowych oraz jakościowych zmianach glikozoaminoglikanów krwi oraz moczu**

Glikozoaminoglikany współtworzą dynamiczną strukturę ECM, która ulega ciągłej przebudowie, a zaburzenia procesów syntezy, modyfikacji czy degradacji tych heteropolisacharydów, stanowiące jedno z ogniw łańcucha patogenetycznych zmian prowadzących do rozwoju młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów, znajdują wyraz w zmianach stężenia GAGs we krwi i moczu dzieci chorych [I.1., I.3.; numeracja zgodna z wykazem prac naukowych, załącznik 3]. W osoczu dzieci z świeżo rozpoznaną, dotychczas nieleczoną artropatią wykazano bowiem obniżenie całkowitego stężenia GAGs [I.1.]. Uzyskane wyniki stanowią prawdopodobnie wyraz znacznie nasilonej degradacji PGs tkankowych, zachodzącej na wczesnych, jeszcze przedklinicznych stadiach choroby. W chwili pojawienia się klinicznych objawów schorzenia pula tkankowych GAGs jest znacznie zredukowana, a procesy syntezy komponentów ECM nie kompensują wielkości degradacji tych związków. Dlatego we krwi dzieci ze świeżo rozpoznany MIZS osoczowe stężenie GAGs jest znacznie niższe w stosunku do ich stężenia we krwi dzieci zdrowych [I.1.,I.5.].

Poddanie wyizolowanych z osocza cząstek glikanowych dalszym badaniom biochemicznym, z zastosowaniem czynników swoiście depolimeryzujących łańcuchy GAGs, tj. chondroitynazy ABC, chondroitynazy B oraz heparanazy I i III, a następnie rozdzielenie – metodą elektroforezy, opornych na działanie wymienionych liaz – glikanów, pozwoliło na stwierdzenie, że dominującymi we krwi zarówno dzieci zdrowych jak i dzieci z MIZS są siarczany chondroityny, zaś występującymi w mniejszych ilościach są siarczany dermatanu, siarczany heparanu i heparyny. Jednakże u pacjentów z MIZS stwierdzono ilościowe odmienności w osoczym stężeniu poszczególnych typów GAGs, sprowadzające się do obniżenia stężenia CS zaś wzrostu DS. Osoczowe stężenie HS/H nie zmieniało się w przebiegu omawianej artropatii. Ponadto, zastosowanie swoistych przeciwciał, celem ilościowej oceny HA, pozwoliło na stwierdzenie we krwi nieleczonych dzieci z MIZS także znamiennego wzrostu stężenia tego niesiarczanowanego i nietworzącego kowalencyjnych połączeń z białkami, glikanu w porównaniu do jego stężenia we krwi dzieci zdrowych [I.3.]. Obserwowany u młodych pacjentów osoczowy profil GAGs wydaje się odzwierciedlać odmienną wrażliwość poszczególnych glikanowych frakcji na wpływy czynników

prowadzących do rozwoju MIZS. Do tych ostatnich czynników należą prozapalne cytokiny i czynniki wzrostu, w tym – TNF- α , IL-1, IL-6 czy TGF- β , które będąc równocześnie czynnikami stymulującymi biosyntezę GAGs, wydają się regulować w szczególności metabolizm DS i HA. Wysokie stężenia wymienionych typów GAGs były znamienne związane z wykazanymi u nieleczonych pacjentów wartościami wskaźnika procesu zapalnego – CRP. Natomiast przemiany CS, zdają się być bardziej związane z procesami tkankowej degradacji ich proteoglikanowych połączeń, zachodzącymi pod wpływem swoistych proteinaz jak również RFT [I.3.,I.5.].

Zmieniające się w przebiegu MIZS stężenia poszczególnych frakcji GAGs we krwi, odzwierciedlając zaburzenia struktury ECM, mogą skutkować, ze względu na wielofunkcyjność glikanów, wystąpieniem zmian, które mogą sprzyjać bądź przeciwdziałać rozwojowi artropatii. I tak np. ujawnieniu się MIZS wydają się sprzyjać uwalniane w nadmiarze łańcuchy DS oraz łańcuchy HA o mniejszej masie cząsteczkowej. Wymienione GAGs, poprzez modyfikowanie odpowiedzi organizmu na czynniki infekcyjne, w tym – *streptococcus*, *mycoplasma pneumonia* czy *parvovirus B19*, jak i stymulowanie procesów syntezy prozapalnych czynników, w tym – IL-1, TNF- α czy cyklooksygenazy-2, prowadzić mogą do ujawnienia się predyspozycji genetycznych, leżących u podstaw rozwoju omawianego schorzenia. Przeciwnie, wykazane znamienne niższe osoczowe stężenie CS u dzieci z artropatią, ujemnie korelujące z wartością CRP, stanowi prawdopodobnie odzwierciedlenie „wyczerpania” się tkankowej puli tych GAGs, wynikającego z pełnienia przez te związki przeciwzapalnych oraz antyoksydacyjnych funkcji. Stąd też, wydaje się, że CS stanowią czynniki opóźniające rozwój omawianej jednostki chorobowej [I.1.,I.3.,I.5.].

Drogi przemian składników ECM w przebiegu MIZS są złożone. Zastosowanie leczenia modyfikującego stan zapalny i przyczyniającego się do uzyskania klinicznej poprawy u dzieci chorych, nie doprowadziło do normalizacji ani całkowitego stężenia GAGs jak i dominujących we krwi CS [I.1.,I.3.]. Pomimo wykazanego u leczonych pacjentów wzrostu stężenia tych związków we krwi – mogącego wskazywać na toczące się w tkankach procesy regeneracyjne, związane z odbudową ECM, to stężenie omawianych glikanów nadal było znamienne niższe w stosunku do osoczowego stężenia omawianych makrocząsteczek u dzieci zdrowych [I.1.,I.3.]. Prawdopodobnie obserwowane zmiany metabolizmu PGs/GAGs u dzieci z MIZS wiążą się również z autoimmunologicznym tłem schorzenia. W układzie krążenia i w płynie maziowym pacjentów z artropatią stwierdza się bowiem obecność przeciwciał przeciw GAGs. Ponadto sugeruje się, że białko rdzeniowe agrekanu może być pierwotnym celem autoreaktywności u dzieci z MIZS [I.5.].

Mechanizm prowadzący do obniżenia stężenia GAGs we krwi pacjentów z MIZS mógłby wiązać się z nasilonym wydalaniem tych cząsteczek z moczem. Jednakże, u dzieci z nieleczonym MIZS nie wykazano upośledzonego wydalania wymienionych związków. Przeciwnie, całkowita ilość siarczanowanych glikanów w moczu u tych pacjentów była, podobnie do stężenia we krwi, znamienne niższa w porównaniu do stężenia stwierdzonego w moczu dzieci zdrowych [I.1.]. Głównymi glikozoaminoglikanami moczu dzieci z nieleczoną artropatią były glikany chondroityno-dermatanowe, zaś mniejszy udział przypadł na glikany heparanosiarczanowe oraz kwas hialuronowy [I.3.]. Podczas gdy stężenie dominujących CS/DS oraz stężenie HA w moczu

pacjentów z świeżo rozpoznany MIZS były znamienne niższe od stężenia tych związków w moczu dzieci zdrowych, to stężenie HS nie odbiegało od wartości referencyjnych. Co więcej, wykazano, że zastosowane leczenie modyfikujące przebieg choroby, równocześnie przyczynia się do normalizacji wydalania zarówno całkowitych GAGs jak i poszczególnych typów tych makrocząsteczek [I.3.].

Uzyskane wyniki wskazują, że w przebiegu MIZS, metabolizm poszczególnych typów GAGs jest regulowany przez różne mechanizmy, zależne zarówno od czynników prozapalnych jak i zaburzeń immunologicznych, leżących u podstaw rozwoju MIZS. Wydaje się, że ilościowe zmiany GAGs jak również jakościowa przebudowa ocenianych makrocząsteczek stanowią wyraz ogólnoustrojowych zaburzeń metabolizmu ECM, a nie tylko miejscowych zmian zachodzących w obrębie struktur stawowych. W efekcie powyższych dysfunkcji u dzieci z MIZS pojawiać się mogą zaburzenia wzrastania i dojrzewania [I.1.,I.3.,I.5.].

❖ Zmianom ilościowym i jakościowym GAGs osocza, związanym z procesami zapalno-immunologicznymi prowadzącymi do rozwoju MIZS, towarzyszą zaburzenia niespecyficznego degradacji składników łącznotkankowych, zachodzącej z udziałem agrekanaz oraz metaloproteinaz macierzowych, uczestniczących w trawieniu białek rdzeniowych PGs

Procesy katabolizmu PGs/GAGs odbywają się wewnątrzkomórkowo oraz w przestrzeni pozakomórkowej. Jednakże tylko pozakomórkowa degradacja omawianych związków – stymulowana enzymami proteolitycznymi czy reaktywnymi formami tlenu – stanowi źródło glikozoaminoglikanów krwi. Głównymi enzymami zaangażowanymi w procesy trawienia komponentów ECM są agrekanazy z rodziny ADAMTS oraz metaloproteiny macierzowe [I.1.,I.2.]. Chociaż wczesne etapy procesów degradacji komponentów ECM powinny odzwierciedlać się wzrostem stężenia GAGs we krwi, to wydaje się, że wzmożona depolimeryzacja, tocząca się przez dłuższy okres czasu u dzieci z rozwijającym się MIZS, może prowadzić, poprzez wyczerpywanie substratów, do stopniowego zmniejszenia osoczowej puli GAGs. Tezę o nasilonej degradacji PGs/GAGs potwierdzają, wykazane u dzieci chorych, zaburzenia równowagi proteolityczno-antyproteolitycznej ustroju, znajdujące wyraz w zmianach stężenia enzymów proteolitycznych i ich tkankowych inhibitorów. U dzieci ze świeżo rozpoznany, dotychczas nieleczony MIZS stwierdzono, że stężenia enzymów z grupy ADAMTS, tj. ADAMTS-4 i ADAMTS-5, uważanych za główne czynniki regulujące procesy degradacji komponentów ECM chrząstki stawowej, wykazują odmienne trendy zmian. Podczas gdy osoczowe stężenie ADAMTS-4 było znamienne wyższe to stężenie ADAMTS-5 było znamienne niższe we krwi nieleczonych pacjentów, w porównaniu do stężeń tych enzymów we krwi dzieci zdrowych. Zastosowana terapia, przyczyniająca się do uzyskania klinicznej poprawy, równocześnie doprowadziła do normalizacji stężenia jedynie ADAMTS-4 [I.2.]. Uzyskane wyniki zdają się potwierdzać tezę o wiodącej roli ADAMTS-4 w modelowaniu przemian komponentów ECM w stanach patologicznych, podczas gdy ADAMTS-5 wydaje się odgrywać ważną rolę w rozwoju

układu kostno-stawowego oraz przemianach agrekanu zachodzących w warunkach fizjologicznych [I.2.,I.5.].

Podobny, do opisanej wyżej ilościowej charakterystyki agrekanaz, charakter zmian stężeń wykazano analizując osoczowy poziom MMP, tj. MMP-3 i MMP-10. Stwierdzono, bowiem w osoczu pozyskanym od dzieci z klinicznie ujawnioną artropatią istotny wzrost stężenia jedynie MMP-3 tj. enzymu wykazującego specyficzność substratową w stosunku do większości składników macierzy i charakteryzującego się w stosunku do tych składników, większą od pozostałych MMP, efektywnością proteolityczną. Wykazane wysokie stężenie MMP-3, znamienne związane zarówno z osoczym stężeniem GAGs jak i wartością wskaźnika stanu zapalnego – CRP, u dzieci z MIZS, mógłby być wskaźnikiem aktywności choroby, a także mógłby pozwalać na przewidywanie progresji klinicznej schorzenia [I.1.]. Przeciwnego charakteru przebiegiem cechował się profil zmian MMP-10, wyrażający się istotnym obniżeniem jego stężenia we krwi nieleczonych dzieci chorych. Stwierdzono ponadto, że leczenie stanu zapalnego w przebiegu MIZS prowadzi do normalizacji stężenia MMP-10 oraz znamiennego obniżenia stężenia MMP-3 we krwi dzieci poddanych leczeniu, jednakże nie do jego normalizacji [I.1.].

Różnice w osoczymym profilu stężenia dwóch analizowanych metaloproteinaz w przebiegu MIZS, wynikają najprawdopodobniej z różnic w regulacji stopnia ekspresji i aktywności tych enzymów przez wiele cytokin i czynników wzrostowych, oraz – z odmiennej wrażliwości obu MMPs na zależną od stanu redox – ekspresję genów MMPs. Zważywszy, iż aktywne MMP obecne w przestrzeni pozakomórkowej mogą być hamowane przez ich naturalne inhibitory tkankowe (TIMPs), kolejne analizy dotyczyły oceny dynamiki zmian stężenia dwóch głównych inhibitorów proteaz – TIMP-1 oraz TIMP-2 w osoczu dzieci z MIZS. Stężenie TIMP-1 w osoczu nieleczonych dzieci z artropatią było znacząco wyższe w stosunku do stężeń stwierdzonych zarówno u tych samych dzieci po leczeniu i uzyskaniu klinicznej poprawy jak i u osób zdrowych. Odmiennym natomiast przebiegiem cechował się profil stężenia TIMP-2. W osoczu pacjentów z klinicznie jawnym schorzeniem wykazano bowiem istotne obniżenie stężenia wymienionego inhibitora [I.1.].

Kliniczne konsekwencje wysokich stężeń proteinaz we krwi dzieci z nieleczonym MIZS skutkują nie tylko remodelingiem struktury PGs\GAGs chrząstki stawowej, lecz prawdopodobnie, przez zróżnicowane mechanizmy, prowadzić mogą do ogólnoustrojowych zaburzeń ECM tkanki łącznej. Z jednej strony, obok depolimeryzacji białkowych komponentów ECM, MMP-3 zdolna jest bowiem do aktywowania innych proteolitycznych enzymów, w tym – pro-MMP-1, -3, -7, -8, -9 czy -13. Z drugiej zaś do – rozszczepiania komórkowych molekuł adhezyjnych, chemokin czy cytokin. W efekcie powyższych aktywności mogą pojawić się zaburzenia proliferacji i różnicowania komórek, którym sprzyja – stymulowany przez proteinazy – zaburzony metabolizm GAGs [I.1.,I.2., I.5.].

❖ **Zmiany postsyntetyczne, jakim podlegają składniki ECM w przebiegu MIZS zależą od stanu prooksydacyjno-antyoksydacyjnego ustroju**

Zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej stanowi, obok nadmiernej enzymatycznej proteolizy, kolejny czynnik patogenetyczny prowadzący do zaburzeń metabolizmu PGs/GAGs u dzieci z MIZS. Wiadomo, że reaktywne formy tlenu uczestniczą w pozakomórkowej degradacji komponentów ECM. Z drugiej zaś strony dowiedziono, że u dzieci z artropatią, występuje stres oksydacyjny, przejawiający się nasiloną aktywnością wolnorodnikową i osłabieniem układów antyoksydacyjnych. Wyrazem nadmiernej aktywności omawianych reaktywnych cząsteczek, był wykazany u dzieci z nieleczoną artropatią istotny wzrost całkowitego statusu oksydacyjnego [I.1.].

Istnienie ścisłego związku pomiędzy stężeniem TOS a całkowitym stężeniem GAGs w osoczu dzieci chorych wskazuje na istotny udział tej wolnorodnikowej formy postsynetycznej modyfikacji cząsteczek w mechanizmie zmiany struktury macierzy pozakomórkowej w przebiegu MIZS [I.1.].

Laboratoryjnym wykładnikiem aktywności RFT a zarazem oksydacyjnej modyfikacji cząsteczek białkowych, w tym białek rdzeniowych PGs, w przebiegu MIZS, było istotnie niższe stężenie grup tiolowych w osoczu [I.2.]. Należy przy tym podkreślić, że stężenie grup TG odzwierciedla nie tylko aktywność omawianych procesów degradacyjnych, lecz jest także wskaźnikiem zdolności przeciwutleniającej ustroju. Dowiedziono bowiem, że białka zawierające grupy tiolowe spełniają również funkcję antyoksydantów. Jednakże, zdolności antyoksydacyjne organizmu zależą przede wszystkim od zawartości i działania innych białek o właściwościach antyoksydacyjnych, a w szczególności katalazy, peroksydazy glutationowej oraz dysmutazy ponadtlenkowej [I.4.]. Obserwowany wzrost aktywności wymienionych enzymów we krwi dzieci chorych, wskazujący na pojawiające się w przebiegu MIZS zaburzenia aktywności enzymatycznego układu przeciwutleniający, wydaje się stanowić wyraz adaptacyjnej odpowiedzi komórek na nasilone tworzenie RFT. Odpowiedź ta sprowadzała się do wzmożenia syntezy białek enzymatycznych, chroniących komórkę przed nadreaktywnością wolnorodnikową. Z drugiej strony stwierdzano obniżenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza we krwi dzieci z nieleczonym MIZS [I.1.]. Uzyskane wyniki badań wskazały na odmienne mechanizmy odpowiedzi poszczególnych składników rezerwy antyoksydacyjnej ustroju na stan rozwijającego się, bądź utrwalonego stresu oksydacyjnego w przebiegu MIZS [I.4.].

Spośród ocenianych enzymów antyoksydacyjnych szczególny związek z przemianami agrekanu wydaje się mieć katalaza. Wykazana bowiem znaczna zależność pomiędzy aktywnością tego enzymu a stężeniem CS we krwi nieleczonych dzieci z MIZS zdają się potwierdzać udział tych związków w kształtowaniu odpowiedzi organizmu na stres oksydacyjny, sprzyjający ujawnieniu się MIZS [I.4.]. Wspólnym mianownikiem wymienionego działania wydają się być procesy przemian nadtlenu wodoru. Z jednej strony wiadomo bowiem, że katalaza zapobiega gromadzeniu się wspomnianej RFT, katalizując reakcję dysproporcjonowania tego związku do wody i tlenu cząsteczkowego. Wymieniony proces jest istotny ze względu na fakt, że nadtlenek wodoru stanowi substrat reakcji Fentona, która prowadzi do wytworzenia wysoce toksycznej formy tlenu – rodnika hydroksylowego. Z drugiej zaś strony znana jest zdolność siarczanów chondroityny do hamowania powyższej reakcji, poprzez chelatowanie jonów żelaza będących katalizatorami tej przemiany [I.5.]. Powyższa reaktywność CS ograniczająca patologiczne skutki stresu oksydacyjnego potwierdza

tezę, że hamowanie syntezy RFT jest bardziej efektywnym mechanizmem antyoksydacyjnym w porównaniu do działania „zmiatającego” omawiane reaktywne cząsteczki. Całościowa ocena antyoksydacyjnych możliwości obrony organizmu powinna zatem opierać się na analizie mechanizmów zaangażowanych we wszystkie aspekty ochrony, obejmujące zarówno reakcje enzymatyczne, jak i nieenzymatyczne. Różnorodność mechanizmów antyoksydacyjnych jest koniecznością sprawnego funkcjonowania komponentów ECM. Różnorodność ta zapewnia zarówno ograniczenie powstawania RFT i czynników prozapalnych, ich neutralizację, jak również ochronę przed uszkodzeniami powodowanymi przez przekroczenie ich fizjologicznego poziomu [I.4.].

Analiza parametrów równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej we krwi dzieci z MIZS po uzyskaniu u nich klinicznej poprawy wykazała, że zastosowane leczenie przyczynia się równocześnie do normalizacji parametrów odzwierciedlających aktywność prooksydacyjną, jednakże nie do wyrównania stężenia wskaźników aktywności antyoksydacyjnej. W przypadku tej ostatniej, wykazano bowiem znamienne różne wartości TAS oraz CT we krwi dzieci chorych z klinicznie wyrównanym schorzeniem w porównaniu do dzieci zdrowych, co może sugerować celowość wzbogacenia terapii pacjentów z artropatią o związki antyoksydacyjne [I.1.,I.4.]. Z uwagi na znaczny destrukcyjny potencjał ROS oraz wysoki poziom ich ekspresji w przebiegu MIZS, zmniejszenie nadprodukcji tych związków u chorych dzieci powinno przynieść znaczną korzyść kliniczną a związaną z normalizacją metabolizmu składników ECM [I.1.,I.4.,I.5.].

❖ **Przebudowa składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu MIZS, znajdująca wyraz w profilu GAGs osocza, pozostaje pod kontrolą czynników stymulujących procesy syntezy komponentów ECM, tj. TGF- β 1 oraz PDGF-BB**

Obok nadmiernej proteolizy, dysfunkcji komponentów macierzy pozakomórkowej w przebiegu MIZS mogą sprzyjać zaburzone procesy biosyntezy tych składników. Wiadomo, że czynnikami mającymi znaczący wpływ na wielkość syntezy składników ECM są TGF- β 1 oraz PDGF-BB [I.2.]. Te ostatnie są wielofunkcyjnymi związkami, które obok regulacji wspomnianych procesów biosyntezy, kontrolują także proliferację, różnicowanie, migrację czy apoptozę komórek [I.5.]. Jak wykazano, wymienione czynniki występują we krwi nieleczonych dzieci z MIZS w znamienne wyższych stężeniach [I.2.]. Złożone wpływy TGF- β 1 i PDGF-BB na przemiany komponentów ECM odzwierciedlane są istotnie wysokim osoczym stężeniu siarczanów keratanu u tych chorych [I.2.]. Z jednej strony oba czynniki indukują proliferację synowocytów o fenotypie fibroblastów (FLS), tj. komórek, które wydzielają wiele łącznotkankowych komponentów, w tym – fibronektynę, lamininę, kolageny jak i proteoglikany. Z drugiej strony, aktywowane FLS stają się także źródłem proteinaz degradujących proteoglikanowe komponenty stawu. Stąd też można uznać, że FLS, stymulowane przez PDGF i TGF- β , odgrywają ważną rolę w procesach zarówno syntezy jak i degradacji PGs/GAGs. Nie można pominąć roli omawianych czynników wzrostu w regulacji procesów zapalnych, leżących u podstaw rozwoju MIZS. PDGF i TGF- β silnie i selektywnie wzmagają syntezę cytokin prozapalnych, w tym – IL-6 czy IL-8, przez FLS [I.2.,I.5.]. Co należy

podkreślić, uzyskane u dzieci z klinicznie wyrównanym schorzeniem stężenia omawianych czynników wzrostu, były znamienne niższe od ich stężeń wykazanych we krwi dzieci zdrowych [I.2.]. Można więc przypuszczać, że prozapalne cytokiny, prowadzące do rozwoju artropatii u dzieci równocześnie indukują hipersekrecję PDGF-BB and TGF- β , które z kolei mogą nasilać kaskady przemian prowadzące do towarzyszących MIZS zmian w obrębie struktur stawowych [I.2.,I.5.].

❖ **Zaburzenia struktury chrząstkowego agrekanu, towarzyszące rozwojowi MIZS, znajdują wyraz zarówno w obniżeniu stężenia CS jak i we wzroście stężenia KS oraz CS846 we krwi chorych dzieci**

Postępujące zużycie chrząstki stawowej w przebiegu MIZS, skutkuje zachwianiem równowagi pomiędzy biologiczną odpornością chrząstki, jej funkcją i działającymi siłami nacisku. Zaburzenia te przypisywane są w szczególności zmianom homeostazy chrząstkowego agrekanu, którego degradacja zachodzi prawdopodobnie już na wczesnych etapach zapalenia stawów [I.2.,I.4.,I.5.]. Jak wykazano we krwi dzieci z świeżo zdiagnozowaną artropatią dochodzi do zmian ilościowych produktów trawienia agrekanu, sprowadzających się do istotnego wzrostu stężenia KS [I.2.], zaś obniżenia stężenia CS [I.4.]. Stężenie KS wydaje się lepiej niż stężenie CS, odzwierciedlać przemiany chrząstkowego PGs, bowiem KS obecne we krwi, w największej części pochodzą z struktur kostno-stawowych, a w niewielkiej tylko z rogówki czy układu nerwowego. Natomiast, CS występują obficie we wszystkich tkankach a ich obecność we krwi stanowi wyraz ogólnoustrojowych przemian ECM [I.2.,I.4.].

Wykazany wzrost stężenia KS we krwi nieleczonych dzieci z MIZS był silnie związany z destrukcyjnym wpływem czynników proteolitycznych, prooksydacyjnych oraz prozapalnych na komponenty ECM, o czym świadczą stwierdzone istotne zależności pomiędzy surowiczym stężeniem KS a stężeniem ADAMTS-4, stężeniem TG oraz wartościami CRP i ESR [I.2.].

Natomiast, stwierdzone u dzieci chorych przed wprowadzeniem leczenia modyfikującego przebieg MIZS, niskie stężenia CS były silnie ujemnie skorelowane ze wskaźnikami procesu zapalnego, a także z wysokimi osoczwymi stężeniami MMP-3 oraz ADAMTS-4 u tych pacjentów. Wykazana ponadto znaczna zależność pomiędzy stężeniem CS a aktywnością katalazy pozwoliła na potwierdzenie wcześniej wysuniętej tezy o roli omawianego GAGs w kształtowaniu odpowiedzi organizmu na rozwijający się stres oksydacyjny, sprzyjający ujawnieniu się MIZS [I.4.].

Uzyskane wyniki badań stanowią wyraz zaburzeń struktury komponentów ECM, w tym struktury agrekanu, która w momencie uzyskania klinicznej poprawy u chorych, nie ulega całkowitej odnowie a procesy regeneracyjne muszą być nadal pobudzane. Stwierdzono bowiem, że zastosowane u dzieci chorych leczenie modyfikujące stan zapalny i doprowadzające do uzyskania klinicznej poprawy nie przyczyniło się równocześnie do normalizacji stężenia zarówno KS jak i CS we krwi dzieci z artropatią [I.2.,I.4.].

W świetle uzyskanych wyników badań oraz analizy piśmiennictwa wydaje się, że pomiar stężenia KS we krwi dzieci z MIZS, mógłby stać się narzędziem diagnostycznym służącym do

monitorowania indywidualnych reakcji pacjenta na leczenie. Jest to związane zarówno ze stabilnością stężenia KS w krwi jak również istnieniem związku tego GAGs z masą chrząstki [I.2.].

Badając przemiany agrekanu u dzieci z MIZS, wykazano także znamienne wzrost surowiczego stężenia epitopu 846 łańcucha siarczanu chondroityny (CS846) – jako biomarkera syntezy omawianego chrząstkowego proteoglikanu [I.4.]. Obserwowane u nieleczonych pacjentów wysokie stężenie CS846, silnie związane ze stężeniem CS, zdaje się wskazywać na znaczne nasilenie procesów anabolicznych agrekanu, jednakże niewystarczające aby zrównoważyć wielkość degradacji tego PGs. Choć wykazano istotny wzrost stężenia we krwi czynników stymulujących syntezę komponentów ECM, tj. TGF- β 1 and PDGF-BB, to jedynie wysokie stężenie pierwszego z wymienionych wiązało się statystycznie ze stężeniem wskaźnika syntezy agrekanu (CS846). Związek ten potwierdza zależność szlaków sygnalizacyjnych związanych z TGF- β z elastycznością chrząstki, warunkowaną strukturą agrekanu. Nasilenie syntezy CS, odzwierciedlające się w wysokich stężeniach CS846, jest bardziej intensywne u dzieci z wyższą aktywnością enzymatycznych czynników antyoksydacyjnych, o czym zdają się świadczyć zależności ocenianego markera z aktywnością CT oraz GPx. Natomiast, stwierdzone ujemne związki CS846 z CRP oraz ESR wskazują, że odbudowa ta jest także większa u dzieci z mniej nasilonym stanem zapalnym [I.4.].

W przebiegu MIZS dochodzi do zaburzeń struktury chrząstkowego agrekanu, znajdujących wyraz zarówno w obniżeniu stężenia CS jak i we wzroście stężenia KS oraz CS846 we krwi chorych dzieci. Zastosowana terapia, łagodząca objawy MIZS nie doprowadza jednakże do całkowitej regeneracji uszkodzonych przez czynniki proteolityczno-oksydacyjne komponentów ECM chrząstki stawowej. Obserwowany u leczonych dzieci z MIZS, po ustąpieniu objawów zapalenia, obraz markerów przebudowy chrząstkowego agrekanu, wskazuje na dalszą potrzebę kontynuowania terapii mającej na celu zabezpieczenie chorego przed ewentualną niepełnosprawnością [I.2., I.4.].

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Poza cyklem publikacji, wybranych jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje:

- ❖ **34 publikacje** o łącznej wartości IF **30.264**, na które składa się 29 publikacji eksperymentalnych (2 opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz 5 publikacji poglądowych (2 opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora).
- ❖ **61 komunikatów**, na które składa się **21** komunikatów prezentowanych na zagranicznych konferencjach i zjazdach naukowych (przed uzyskaniem stopnia doktora – 5 komunikatów) oraz **40** komunikatów prezentowanych na konferencjach i zjazdach krajowych, w tym – 12 o zasięgu międzynarodowym (przed uzyskaniem stopnia doktora 13 komunikatów, w tym – 5 o zasięgu międzynarodowym).

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych wraz z analizą bibliometryczną dorobku naukowego, sporządzoną przez Bibliotekę Główną Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, zawarto w załączniku nr 3.

- ❖ Sumaryczny *impact factor* za całokształt dorobku naukowego wynosi – według listy Journal Citation Reports – **39.678** oraz **629** punktów według punktacji MNiSW
- ❖ Analiza publikacji w bazie:
 - ✓ **Web of Science – Science Citation Index-Expanded** wykazała **188 cytowań**,
 - Indeks Hirscha wynosi 7
 - ✓ **Scopus** wykazała **250 cytowań**,
 - Indeks Hirscha wynosi 7

Główne kierunki pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja działalność naukowo-badawcza, prowadzona w początkowym okresie po ukończeniu studiów i podjęciu pracy zawodowej w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, dotyczyła tematyki szeroko pojętej medycyny laboratoryjnej, obejmując badania metabolizmu składników macierzy pozakomórkowej, jak i ocenę aktywności procesów wolnorodnikowych i przeciwutleniających w przebiegu wybranych jednostek chorobowych, z określeniem możliwości zastosowania badanych parametrów biochemicznych w diagnostyce laboratoryjnej. Mój dorobek naukowy, powstały przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych obejmuje tematykę badawczą, dotyczącą:

- ❖ **oceny procesów wolnorodnikowych i antyoksydacyjnych w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa oraz twardziny układowej wraz z analizą przydatności wskaźników równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej ustroju w diagnostyce laboratoryjnej tych stanów.**

Powyższe zagadnienia stały się przedmiotem dwóch prac doświadczalnych oraz dwóch prac poglądowych, zamieszczonych na łamach *Clinica Chimica Acta* [II.A.1], *European Journal of Internal Medicine* [II.B.1] oraz *Postępów Higieny i Medycyny Doświadczalnej* [III.B.1; III.B.2].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: IF: **1.041**, KBN/MNiSW: **37**

Stres oksydacyjny jest stanem charakteryzującym się nadmierną wolnorodnikową aktywnością, rozwijającą się w wyniku zachwiania równowagi pomiędzy wzmożonym wytwarzaniem RFT a ich usuwaniem przez ustrojowe systemy antyoksydacyjne. Hipertyreoza towarzysząca chorobie Gravesa-Basedowa, powodująca przyspieszenie podstawowej przemiany materii oraz zwiększenie zużycia tlenu przez komórki, sprzyja ujawnieniu się wspomnianego stresu oksydacyjnego z jego patologicznymi konsekwencjami. Nasze badania dowiodły, że u pacjentów z nieleczoną chorobą Gravesa-Basedowa dochodzi do nasilenia, stymulowanych wolnorodnikową aktywnością, zarówno procesów peroksydacji lipidów jak i procesów oksydacyjnej modyfikacji białek. We krwi badanych osób z hipertyreozą stwierdziliśmy istotny wzrost stężenia skoniugowanych układów dienowych (CD) oraz substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), a ponadto obniżenie stężenia grup tiolowych we krwi. Z uwagi na fakt, że cząsteczki zawierające TG pełnią rolę antyoksydantów, przytoczone wyniki dowodzą osłabienia mechanizmów antyoksydacyjnych u pacjentów z nadczynnością tarczycy. Powyższą tezę potwierdziliśmy wykazując obniżenie zarówno TAS we krwi jak i aktywności GPx i reduktazy glutationowej (GR), nie kompensowane wzrostem aktywności CT i SOD we krwi osób chorych. Uzyskane wyniki wskazały ponadto, że zastosowany w leczeniu nadczynności tarczycy tiamazol, obok poprawy obrazu klinicznego choroby, wykazuje prawdopodobnie właściwości antyoksydacyjne, równocześnie przyczyniając się do normalizacji ocenianych parametrów.

Obecność stresu oksydacyjnego, jako jednego z ogniw patogenetycznego łańcucha zaburzeń prowadzących do ujawnienia się twardziny układowej (TU), potwierdziliśmy wynikami badań oceniających parametry równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej we krwi osób chorych. Stwierdziliśmy bowiem istotne, w stosunku do osób zdrowych, zmiany stężenia produktów peroksydacji lipidów tj. CD i TBARS, jak i wskaźnika oksydacyjnych uszkodzeń białek tj. TG. Ponadto, wykazaliśmy obniżenie aktywności SOD, CT, GPx, GR oraz stężenia TAS komórek i płynu pozakomórkowego u osób chorych.

Omawiane badania były jednymi z pierwszych, które wskazały na istotną rolę stresu oksydacyjnego i zaburzeń potencjału antyoksydacyjnego w patomechanizmie choroby Gravesa i Basedowa oraz TU, sugerując jednocześnie przydatność antyoksydantów w farmakoterapii wymienionych schorzeń.

Główne kierunki pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych konsekwentnie kontynuowałam badania nad problematyką, będącą przedmiotem moich wcześniejszych zainteresowań naukowych, koncentrując się głównie na zagadnieniach dotyczących stresu oksydacyjnego oraz biochemii

i patobiochemii tkanki łącznej. Cykle publikacji powstałe w tym czasie współtworzone są, poza osiągnięciem wskazanym jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, przez 27 prac doświadczalnych oraz 3 prace pogładowe, wśród których wyodrębnić można grupy tematyczne:

❖ **ocena układu antyoksydacyjnego oraz metabolizmu glikoaminoglikanów w przebiegu cukrzycy typu 2**

Powyższe zagadnienia stały się przedmiotem dwóch prac doświadczalnych, zamieszczonych na łamach *Diabetes Research and Clinical Practice* [II.A.3] oraz *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [II.A.4].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: IF: **3.154**, KBN/MNiSW: **47**

Cukrzyca jest zespołem przewlekłych chorób w przebiegu których długotrwałe zaburzenia metaboliczne prowadzą do zmian w mikro- i makrokrążeniu, przyczyniają się do nieodwracalnych uszkodzeń wielu narządów. Główną przyczyną rozwoju wymienionych powikłań cukrzycy jest przewlekła hiperglikemia, która indukuje szereg mechanizmów generujących nadmierne wytwarzanie toksycznych, reaktywnych form tlenu. Wyniki naszych badań, obejmujące wieloparametrową ocenę systemu antyoksydacyjnego u chorych z cukrzycą typu 2 w zależności od stanu wyrównania metabolicznego schorzenia jak i obecności powikłań naczyniowych o charakterze mikro i/lub makroangiopatii pozwoliły na stwierdzenie, że w przebiegu omawianej choroby dochodzi do zaburzeń aktywności endogennych antyoksydantów enzymatycznych oraz zmniejszenia stężeń drobnocząsteczkowych przeciwutleniaczy. Przeprowadzone badania obejmujące ocenę zdolności obronnych ustroju osób z cukrzycą typu 2 przed skutkami nasilenia reakcji wolnorodnikowych wykazały bowiem obniżenie aktywności CT, GPx i GR, nie kompensowane wzrostem aktywności SOD we krwi osób chorych. Potwierdzeniem tej ostatniej tezy zdaje się być stwierdzone we krwi chorych znacznego stopnia obniżenie całkowitego stężenia przeciwutleniaczy. Zmiany aktywności systemu antyoksydacyjnego korespondowały ponadto – w przypadku oznaczeń CT, SOD i TAS – zarówno ze stopniem metabolicznego wyrównania cukrzycy, jak i obecnością późnych powikłań naczyniowych. Obserwowane zaburzenia potencjału antyoksydacyjnego ustroju u chorych z cukrzycą typu 2, mogą stanowić jeden z mechanizmów prowadzących do obserwowanych w przebiegu omawianego schorzenia zaburzeń przemian proteoglikanów tkankowych. Należy zaznaczyć, że przemiany PGs na poziomie tkankowym znajdują odzwierciedlenie w stężeniu glikoaminoglikanów we krwi. Wykazano, że w przebiegu cukrzycy dochodzi do znamiennego wzrostu całkowitego stężenia GAGs we krwi, szczególnie zaś u pacjentów z niewyrównaną postacią schorzenia oraz u tych z obecnością powikłań naczyniowych. Ilościowe zmiany surowiczych GAGs istotnie korelowały z aktywnością lizosomalnych egzoglikozydaz, uczestniczących w wewnątrzkomórkowej degradacji omawianych glikanów. Wzrost aktywności badanych enzymów również wykazywał silny związek z nieprawidłową kontrolą metaboliczną pacjentów oraz obecnością późnych zmian naczyniowych. Uzyskane wyniki wskazują, iż cukrzyca związana jest z istotnymi zmianami metabolizmu glikoaminoglikanowych

komponentów macierzy pozakomórkowej, które to zmiany mogą mieć poważne konsekwencje metaboliczne leżące u podstaw obserwowanych w przebiegu choroby powikłań naczyniowych.

❖ **ocena metabolizmu glikozoaminoglikanów, z uwzględnieniem wpływu stresu oksydacyjnego na przemiany składników macierzy pozakomórkowej, w przebiegu leczonej tiamazolem choroby Gravesa-Basedowa**

Powyższe zagadnienia stały się przedmiotem publikacji obejmujących sześć prac doświadczalnych oraz jedną pracę pogładową, zamieszczonych na łamach *Clinica Chimica Acta* [II.A.2], *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [II.A.5], *Wiadomości Lekarskich* [II.B.3], *Farmacji Polskiej* [II.B.4], *Farmaceutycznego Przeglądu Naukowego* [II.B.9], *Clinical Biochemistry* [II.A.16] oraz *Postępów Higieny i Medycyny Doświadczalnej* [III.B.3].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: IF: **5.633**, KBN/MNiSW: **108**.

Gromadzenie się glikozoaminoglikanów w macierzy pozakomórkowej tkanek przyocnych i tkanek okolic przedgoleniowych, stanowi jedną z przyczyn rozwijania się pozatarczycowych objawów choroby Gravesa-Basedowa, tj. oftalmopatii i obrzęku przedgoleniowego. Jak wynika z naszych badań, do zmian tkankowego metabolizmu wspomnianych komponentów dochodzi również u tych osób z endokrynopatią, u których nie wystąpiły pozatarczycowe objawy tego schorzenia. W surowicy krwi wymienionych osób chorych niepoddanych leczeniu, wykazaliśmy bowiem istotny wzrost stężenia glikozoaminoglikanów, zarówno tych – występujących w postaci siarczanowanych pochodnych, jak i niesiarczanowanego GAG, tj. kwasu hialuronowego. Wzrost stężenia siarczanowanych GAGs w surowicy pacjentów z hipertyreozą, spowodowaną chorobą Gravesa-Basedowa, wiązał się ze wzrostem stężenia w szczególności galaktozoaminoglikanów, tj. grupy glikanów współtworzonych przez CS i DS. Znacznie mniejszy udział w omawianym wzroście stężenia GAGs przypadł HS/H. Wykazano także przesunięcia w procentowym rozkładzie zawartości poszczególnych frakcji GAGs surowicy, ze znacznym wzrostem udziału frakcji heparanosiarczanowej i dermatanosiarczanowej, kosztem malejącego udziału siarczanów chondroityny w całkowitej puli GAGs surowicy. Obserwowanym zmianom ilościowym towarzyszył wzrost heterogenności strukturalnej CS, manifestujący się zwiększonym zróżnicowaniem w zakresie ruchliwości elektroforetycznej tych glikanów. Zastosowanie metody HPLC, celem rozdzielania – współtworzących łańcuchy CS – disacharydów o różnym stopniu siarczanowania, pozwoliło potwierdzić tezę o znacznej heterogenności wspomnianych, dominujących we krwi nieleczonych osób z chorobą Gravesa-Basedowa, glikanowej frakcji. Wykazaliśmy bowiem, że stężenia zarówno disacharydów siarczanowanych przy 6 atomie węgla reszty GalNAc (Δ Di-6S) oraz tych – siarczanowanych przy 4 atomie węgla reszty GalNAc (Δ Di-4S) były znacząco wyższe u pacjentów z hipertyreozą. Z uwagi na antyoksydacyjne i przeciwzapalne właściwości CS siarczanowanych przy 4 lub 6 atomie węgla reszty GalNAc, możliwe jest, że obserwowany u nieleczonych pacjentów z hipertyreozą, podwyższony stopień siarczanowania disacharydowych jednostek CS stanowi alternatywną w stosunku do aktywności

typowych związków antyoksydacyjnych, formę obrony organizmu przed destrukcyjnymi wpływami RFT. Sugestię tę wydają się potwierdzać wykazane znaczne ujemne zależności pomiędzy stężeniami Δ Di-4S oraz Δ Di-6S a stężeniem TAS, wskazując jednocześnie na odmienne mechanizmy indukcji ich potencjału antyoksydacyjnego. Z drugiej strony, stwierdzone wysokie, ujemne współzależności pomiędzy stężeniem grup tiolowych, będących markerami oksydacyjnych modyfikacji białek rdzeniowych PGs, a całkowitą pulą GAGs oraz stężeniem CS pozwalają sądzić, iż kumulacja GAGs we krwi nie leczonych osób chorych, stanowi prawdopodobnie wyraz – stymulowanej RFT – pozakomórkowej degradacji PGs. Drogi przemian glikoproteinowych składników ECM zależą nie tylko od obecności stresu oksydacyjnego, lecz prawdopodobnie wiążą się z aktywnością czynników enzymatycznych, uczestniczących w tkankowym metabolizmie tych związków. Dowiedliśmy bowiem, że przebudowa profilu GAGs w surowicy chorych z nadczynnością tarczycy współistniała ze znamienym wzrostem aktywności – uczestniczących w degradacji analizowanych makrocząsteczek – lizosomalnych egzoglikozydaz, w tym – N-acetylo- β -D-glukozaminidazy, β -D-glukronidazy, β -D-galaktozydazy, α -D-mannozydazy, β -D-ksylozydazy i α -L-fukozydazy.

Mechanizmy regulujące przemiany komponentów ECM w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa są złożone, czego dowiodła ocena stężenia zarówno całkowitych GAGs jak i poszczególnych frakcji tych związków, jak również ocena stężenia TAS oraz TG w surowicy osób chorych z klinicznie przywróconym – w wyniku stosowania tiamazolu – stanem eutyreozy. Leczenie nadczynności tarczycy, przywracające równocześnie równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną ustroju, doprowadziło do wzrostu stężenia TAS i normalizacji stężenia grup tiolowych, oraz do obniżenia – jednakże nie do wartości występujących u osób zdrowych – stężenia GAGs, w tym galaktozoaminoglikanów w surowicy krwi osób chorych. Uzyskanie stanu klinicznie utrwalonej eutyreozy u pacjentów nie wywierało istotnego wpływu na frakcję CS, prowadząc jednocześnie do znamiennej redukcji stężenia DS – poniżej wartości obserwowanych u osób zdrowych oraz do normalizacji stężenia HS/H. Zastosowane leczenie prowadziło również do obniżenia stężenia kwasu hialuronowego w surowicy do wartości obserwowanych u osób zdrowych.

Uzyskane wyniki wykazały po raz pierwszy, iż drogi przemian glikanowych składników macierzy pozakomórkowej zależą z jednej strony od stanu czynnościowego tarczycy, z drugiej zaś wiążą się z autoimmunologicznym tłem choroby. Powodowana nadmiarem hormonów tarczycy nasiloną degradacją tkankowych proteoglikanów i kwasu hialuronowego wspólnie z nasiloną enzymatyczną i wolnorodnikową modyfikacją glikoproteinowych składników macierzy wydaje się zasadniczą przyczyną osoczowej kumulacji GAGs w przebiegu choroby Gravesa i Basedowa. Z kolei, związane z autoimmunologicznym tłem choroby, zaburzenia poziomu CS i częściowo DS w surowicy, są prawdopodobnie odbiciem nasilonej biosyntezy proteoglikanów, spowodowanej lokalnym zwiększeniem aktywności czynników wzrostowych i cytokin. Mechanizmy te, zachodzące prawdopodobnie równocześnie i będące od siebie zależne, mogą przyczyniać się do ogólnoustrojowych zmian właściwości ECM tkanki łącznej. Uzyskane wyniki wskazują ponadto na

zasadność stosowanej – w leczeniu nadczynności tarczycy – terapii tiamazolem, która przywracając stan równowagi oksydacyjnej ustroju zmniejsza jednocześnie wolnorodnikową modyfikację glikoproteinowych składników macierzy. Wydaje się także, że zastosowanie CS jako leków uzupełniających u osób ze świeżo rozpoznaną hipertyreozą, może mieć korzystny efekt terapeutyczny. Każde działanie prowadzące do hamowania nadprodukcji RFT i prozapalnych cytokin u chorych jest korzystne i prowadzić może do normalizacji przemian komponentów ECM i tym samym do opóźnienia ujawnienia się pozataarczycowych objawów choroby Gravesa i Basedowa.

❖ **Ocena wpływu procesów proteolityczno-antyproteolitycznych, prooksydacyjno-antyoksydacyjnych oraz procesów glikacji na ilościowe zmiany i jakościową przebudowę glikozoaminoglikanów w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju**

Powyższe zagadnienia stały się przedmiotem publikacji, obejmujących dziesięć prac doświadczalnych, zamieszczonych na łamach *Diagnostyki Laboratoryjnej* [II.B.2], *Farmaceutycznego Przeglądu Naukowego* [II.B.6, II.B.8, II.B.10], *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [II.A.6, II.A.9, II.A.11], *Gerontology* [II.A.8], *Mechanisms of Ageing and Development* [II.A.12] oraz *Clinical Biochemistry* [II.A.15].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: IF: **15.363**, KBN/MNiSW: **197**.

Nieodłącznym elementem starzenia się organizmu, jako naturalnego, złożonego i nieodwracalnego procesu, są strukturalno-czynnościowe zmiany komponentów macierzy pozakomórkowej, w tym – glikozoaminoglikanów. Jak wynika z naszych badań, w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju dochodzi do zmian ilościowych i jakościowych glikozoaminoglikanów osocza. Wyrazem zmian ilościowych było obserwowane w przebiegu omawianego procesu, sukcesywne wraz z wiekiem obniżanie osoczonego stężenia glikanów chondroityno-dermatanowych, reprezentujących dominujące typy siarczanowanych GAGs osocza, jednakowo silnie zaznaczone w grupie kobiet i mężczyzn. Ocena równoczesnego wpływu płci i wieku na średnie stężenie tych makrocząsteczek, przeprowadzona w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji, wykazała obecność efektu interakcji powyższych czynników we wspólnym oddziaływaniu na stężenie glikanów chondroityno-dermatanowych osocza w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju. Natomiast, obniżenie stężenia HS/H, reprezentujących najmniej liczną frakcję GAGs osocza, dotyczyło jedynie grupy kobiet. Obecne we krwi CS oraz DS charakteryzowała ponadto znaczna strukturalna heterogenność wyrażająca się występowaniem tych GAGs w obrębie kilku glikanowych frakcji, różniących się ruchliwością elektroforetyczną i powinowactwem do barwnika. Cechy te wskazywały na różny ładunek wędrujących w obrębie – zidentyfikowanych jako CS oraz DS – cząsteczek, będący pochodną różnego stopnia siarczanowania ich łańcuchów, a także różnej ich wielkości.

Kolejną, zidentyfikowaną osoczną glikanową frakcją był HA, którego stężenie ulegało zmianom na przestrzeni kolejnych lat życia, osiągając najwyższą wartość u osób z pierwszej dekady życia, by następnie, wraz z wiekiem przyjąć tendencję spadkową. Dowiedziono ponadto, że wraz z wiekiem

zmieniały się proporcje poszczególnych typów GAGs, sprowadzając się do sukcesywnego wzrastania na przestrzeni lat wkładu ilościowego CS, kosztem malejącego wraz z wiekiem udziału DS w całkowitej puli GAGs osocza.

Powyższe wyniki badań osoczowych frakcji GAGs, uzyskane w wyniku wieloetapowej ekstrakcji i oczyszczania tych związków, korespondowały z rezultatami ilościowych analiz GAGs uzyskanych za pomocą specyficznej interakcji siarczanowanych heteropolisacharydów obecnych we krwi z barwnikiem kationowym. Odmiennego charakteru zależność, sprowadzającą się do istotnego wzrostu stężenia GAGs w osoczu krwi, wykazano jedynie w grupie kobiet powyżej 50 roku życia.

Zmianom ilościowym i jakościowym GAGs we krwi towarzyszyły zmiany w wydalaniu tych związków z moczem, sprowadzające się do – niezależnego od płci – obniżania w funkcji czasu zarówno całkowitego stężenia ocenianych związków jak również puli CS/DS, HS oraz HA w moczu dzieci od 1 do 18 roku życia.

Przebudowa składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju, znajdująca wyraz w profilu GAGs osocza, pozostaje pod kontrolą TNF- α , tj. cytokiny o działaniu prozapalnym, a ponadto stymulującej wydzielanie MMP. Jak wykazano stężenie wymienionego czynnika zmienia się we krwi wraz z wiekiem i płcią osoby badanej. Zmiany te w grupie mężczyzn przejawiały się sukcesywnie obniżającym się na przestrzeni lat stężeniem TNF- α w surowicy, podczas gdy u kobiet zależność stężenia tej cytokiny od wieku pozostawała nieistotna statystycznie. Przeprowadzona w toku dalszych badań analiza korelacji w całej grupie badanej, wskazała na istnienie ścisłego związku pomiędzy stężeniem TNF- α , a wartościami stężeń receptora dla tej cytokiny (sTNF-RI, soluble TNF receptors). Stwierdzone zmiany ilościowe i jakościowe GAGs osocza, towarzyszące procesowi starzenia, wiążą się z zaburzeniami niespecyficznej, zachodzącej z udziałem metaloproteinaz macierzowych, degradacji proteoglikanowych składników ECM. Wykazaliśmy, że w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju dochodzi do sukcesywnego na przestrzeni lat wzrastania stężenia stromielizyny-1 (MMP-3), szczególnie u kobiet. Podobnej tendencji zmian nie stwierdziliśmy w przypadku stromielizyny-2 (MMP-10). Ponadto, dowiedliśmy obecność w surowicy krwi osób najmłodszych i osób najstarszych grup wiekowych, zarówno proenzymów (57 kDa i 56kDa) jak i aktywnych form (45 kDa i 46kDa) obydwu metaloproteinaz. Zważywszy, iż aktywne MMP obecne w przestrzeni pozakomórkowej mogą być hamowane przez ich naturalne inhibitory tkankowe, kolejne analizy pozwoliły na stwierdzenie, że stężenie TIMP-1 w surowicy znacząco wzrasta w miarę starzenia się mężczyzn, pozostając na stosunkowo stałym poziomie u kobiet. Odmiennym natomiast przebiegiem cechował się profil stężenia TIMP-2, wykazując u mężczyzn wyjątkowo silny charakter spadkowy wraz z wiekiem, zaś lekką tendencją spadkową u kobiet.

Pozakomórkowej degradacji komponentów ECM, towarzyszącej procesowi starzenia sprzyjają, obok zaburzeń proteolityczno-antyproteolitycznych, także zmiany równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej. Te ostatnie zmiany potwierdziliśmy wykazując zarówno wzrastające wraz z wiekiem powstawanie końcowych produktów utleniania cząsteczek białkowych jak i silny wzrost stężenia grup karbonylowych osocza u badanych osób na przestrzeni kolejnych

dekad życia. Odmiennego charakteru tendencję zmian, choć również wskazującą na nasilającą się w przebiegu procesu starzenia – wolnorodnikową modyfikację cząsteczek białkowych – stwierdzono analizując związany z wiekiem profil grup tiolowych. Postępujące stopniowo na przestrzeni lat obniżenie rezerwy tiolowej płynu pozakomórkowego, dotyczyło w jednakowym stopniu grupy kobiet i mężczyzn i było szczególnie silnie zaznaczone u osób po 60 roku życia. W korelacji z wiekiem pozostawały także zmiany potencjału antyoksydacyjnego ustroju, przejawiające się sukcesywnie obniżającym się na przestrzeni lat spadkiem potencjału antyoksydacyjnego nieenzymatycznych przeciwutleniaczy. Obserwowane z kolei – w toku dalszych badań – obniżanie się wraz z wiekiem aktywności enzymów usuwających nadtlenek wodoru – katalazy i peroksydazy glutationowej, wskazało na pojawiające się w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju, zaburzenia aktywności enzymatycznego układu przeciwutleniaczy. Wzrastająca natomiast w przebiegu starzenia się ustroju – aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wydaje się stanowić wyraz adaptacyjnej odpowiedzi komórki na nasilone tworzenie RFT.

Wykazana ścisła korelacja pomiędzy wskaźnikami oksydacyjnej modyfikacji cząsteczek białkowych a siarczanowanymi oraz niesiarczanowanymi GAGs krwi osób w różnym wieku, potwierdziła udział stresu oksydacyjnego w modelowaniu przemian proteoglikanów tkankowych, co znajduje swoje odzwierciedlenie w profilu GAGs osocza. Kolejne badania wskazały przy tym, iż niezawierający grup siarczanowych – hialuronian, w odróżnieniu od siarczanowanych GAGs, przejawia większą wrażliwość na działanie RFT.

Wydaje się, że proces glikacji, którego nasilenie oceniono w oparciu o analizę ilościową N^c karboksymetylolizyny – głównej struktury antygenowej końcowych produktów glikacji, stanowi kolejny mechanizm, prowadzący do zmian struktury i składu ECM w przebiegu procesu starzenia. Wykazaliśmy bowiem, narastającą wraz z wiekiem, szybkość przebiegu omawianego procesu, przejawiającą się wzrostem stężenia ocenianego związku w osoczu zarówno w grupie kobiet jak i mężczyzn. Najwyższe wartości N^c karboksymetylolizyny wykazano w osoczu osób najstarszych, około ósmej dekady życia, i różniły się one istotnie z wartościami stwierdzonymi u osób z pozostałych grupach wiekowych. Istotny i narastający w przebiegu procesu starzenia – wkład reakcji glikacji w postsyntetyczną modyfikację składników macierzy potwierdziły badania, dotyczące dynamiki zmian endogennego sekrecyjnego wariantu receptora dla późnych produktów glikacji. Postępujące wraz z wiekiem obniżenie stężenia wspomnianego markera było szczególnie silnie zaznaczone u osób powyżej 60 roku życia i intensywniej przebiegało u kobiet niż u mężczyzn. Obserwowane w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju zwiększone powstawanie późnych produktów glikacji wraz z obniżoną ekspresją receptora wyraźnie korelowało ponadto z dynamiką zmian zawartości wszystkich typów siarczanowanych glikozoaminoglikanów.

Konsekwencją związanych z aktywnością procesów proteolitycznych, oksydacyjnych czy glikacji, ilościowych zmian i jakościowej przebudowy składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju mogą być postępujące z wiekiem zaburzenia w oddziaływaniach GAGs z enzymami, czynnikami wzrostowymi i transkrypcyjnymi, czy też – z białkami strukturalnymi macierzy pozakomórkowej.

Kolejne badania omawianego cyklu pozwoliły na stwierdzenie zachodzących wraz z wiekiem, zmian strukturalno-czynnościowych także i w obrębie tkanki tłuszczowej, odzwierciedlających się w zmianach stężenia leptyny we krwi. Na powyższe wskazały stwierdzone na przestrzeni lat dwa trendy wzrostowe o różnej intensywności przebiegu. Zachodzące wraz z wiekiem zmiany leptynemii korespondowały przy tym z wartością współczynnika BMI oraz wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, nie wykazując związku z cholesterolemią. Uzyskane wyniki sugerują, iż dynamiczna ocena stężenia leptyny – istotnego modulatora procesu zapalnego, może być pomocnym czynnikiem prognostycznym rozwoju chorób zapalnych, towarzyszących starzeniu.

❖ **Ocena czynników sprzyjających tkankowej kumulacji komponentów ECM, która leży u podstaw twardzinowego włóknienia wraz z analizą ich przydatności w diagnostyce laboratoryjnej tego stanu**

Powyższe zagadnienia stały się przedmiotem publikacji, obejmujących trzy prace doświadczalne oraz jedną pracę pogładową, zamieszczonych na łamach *Farmaceutycznego Przeglądu Naukowego* [II.B.7], *Annales Academiae Medicae Silesiensis* [II.B.11], *Diagnostyki Laboratoryjnej* [III.B.5] oraz *International Journal of Rheumatic Diseases* [II.A.14] Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: IF: **1.469**, KBN/MNiSW: **27**.

Twardzina układowa jest chorobą tkanki łącznej, charakteryzującą się zaburzeniami immunologicznymi, uszkodzeniem naczyń krwionośnych oraz nadmiernym odkładaniem się w tkankach komponentów ECM, w tym – kolagenu czy glikozoaminoglikanów. Twardzinowe włóknienie, wiążące się ze złożonymi interakcjami między komórkami śródbłonna, limfocytami czy fibroblastami, zależy od współdziałania szeregu mediatorów, w tym – uwalnianych z tkanki tłuszczowej – adiponektyny i leptyny. Dowiedliśmy, że w przebiegu TU dochodzi do obniżenia osoczonego stężenia wymienionych adipokin, szczególnie nasilonego w grupie pacjentów dłużej chorujących. Niskie stężenia adiponektyny wykazywały równocześnie związek z wysokim stężeniem wskaźnika całkowitej peroksydacji lipidów (TLP), laboratoryjnymi markerami procesu zapalnego (CRP, ESR) oraz czasem trwania choroby. Natomiast leptynemia osób chorych korelowała z wysokimi stężeniami IGF-1, CRP, TLP oraz wskaźnikiem masy ciała. Ponadto, wykazana wysoka współzależność pomiędzy stężeniem leptyny a wartością indeksu Rodnana, będącego miarą zasięgu twardzinowego stwardnienia skóry, zdaje się wskazywać, że leptynemia, podobnie do postępujących, rozległych zmian skórnych, korelujących z wystąpieniem powikłań ze strony płuc, serca i nerek, stanowić może wyraz aktywności procesu chorobowego. W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że tkanka tłuszczowa może odgrywać złożoną rolę w patogenezie twardziny układowej, wpływając zarówno na stan energetyczny organizmu, jak i na modelowanie wolnorodnikowej degradacji komponentów ECM tkanki łącznej. Pomimo, że leptyna wydaje się wywierać efekt prooksydacyjny, natomiast zarówno adiponektyna jak i IGF-1 wydają się przeciwdziałać stresowi oksydacyjnemu, to potwierdzenie powyższych wniosków wymaga dalszych badań.

W wyniku przeprowadzonych prac stwierdziliśmy ponadto, że leżąca u podstaw twardzinowego włóknienia, kumulacja PGs/GAGs w tkankach, stanowi przejaw nie tylko nadmiernej biosyntezy tych makrocząsteczek, lecz także wiąże się ze zmianami ich degradacji. Powyższą tezę potwierdzają wykazane zmiany surowiczej aktywności glikozydaz lizosomalnych, uczestniczących w rozpadzie glikozoaminoglikanów, w tym – N-acetylo- β -D-glukozaminidazy, β -D-glukozydazy i α -D-mannozydazy, co wskazuje na udział tych enzymów w kształtowaniu metabolizmu składników ECM, w przebiegu TU. Stwierdzenie to może stanowić przesłankę do rozważań, czy różnice w aktywności badanych glikozydaz lizosomalnych, a zwłaszcza N-acetylo- β -D-glukozaminidazy, jako czułych wskaźników uszkodzenia tkanek, mogą być wykorzystane w monitorowaniu przebiegu twardziny układowej.

❖ **Ocena oddziaływania propolisu na przebudowę macierzy pozakomórkowej w procesach gojenia się doświadczalnych ran pooparzeniowych skóry**

Powyższe zagadnienia stały się przedmiotem publikacji, obejmujących sześć prac doświadczalnych oraz jedną pracę pogładową, zamieszczonych na łamach *Farmaceutycznego Przeglądu Naukowego* [II.B.5], *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [II.A.13], *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* [II.A.7], *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* [II.A.10], *Farmacji Polskiej* [II.B.12], *Leczenia Ran* [II.B.13] oraz na łamach *Postępów Higieny i Medycyny Doświadczalnej* [III.B.4].

Całkowita punktacja dla prac tworzących cykl wynosi: IF: **3.604**, KBN/MNiSW: **88**.

Naprawa uszkodzeń tkankowych, warunkująca zastąpienie uszkodzonych struktur żywą tkanką, a tym samym przywrócenie integralności skóry, stanowi wysoce skoordynowaną reakcję wielu typów komórek, odpowiedzialnych za syntezę szeregu cytokin, czynników wzrostowych, jak również składników ECM, w tym – GAGs, czy niekolagenowych glikoprotein, w tym – lamininy (LN) i witronektyny (VN). Znaczącą rolę w modelowaniu przemian powyższych związków uczestniczących w procesach regeneracji termicznych uszkodzeń skóry wieprzowej odgrywa maść propolisowa, oparta na naturalnym produkcie pszczelim, cechującym się aktywnością immunomodulującą, przeciwzapalną, antyoksydacyjną jak i przeciwdrobnoustrojową. Przeprowadzona ocena kliniczna oraz mikrobiologiczna gojenia się ran oparzeniowych, zaopatrywanych maścią propolisową dowiodła, iż apiterapeutyk – w porównaniu z powszechnie stosowaną solą srebrną sulfadiazyny (SSD) – istotnie przyspiesza procesy regeneracyjno-reparacyjne uszkodzeń tkankowych oraz sprzyja uzyskaniu korzystnych warunków mikrobiologicznych w miejscu uszkodzenia, manifestujących się większym stopniem redukcją liczby drobnoustrojów i wyższą skutecznością bakteriobójczą. Wykazaliśmy ponadto, że w obrębie macierzy wypełniającej pole ran zaopatrywanych propolisem, dochodzi do ilościowych i jakościowych zmian glikozoaminoglikanów, które przejawiały się wzmożoną kumulacją tych makrocząsteczek, zaś w szczególności glikanów chondroityny-dermatanowych oraz kwasu hialuronowego. W przypadku natomiast glikanów heparanosiarczanowych, krótkotrwały wzrost zawartości tych GAGs w ranach oparzeniowych zaobserwowano jedynie w przypadku uszkodzeń

termicznych leczonych propolisem. Kumulacji heteropolisacharydowych komponentów ECM sprzyjają, stymulowane procesami naprawczymi, zmiany aktywności MMP. Wpływ propolisu na dominujące w macierzy wypełniającej pole rany glikany chondroitynowo-dermatanowe, przejawiał się modelowaniem procesów siarczanowania ich łańcuchów. W efekcie tej regulacji stwierdziliśmy istotny wzrost zawartości 4-O-siarczanowanych disacharydów współtworzących łańcuchy wymienionych GAGs oraz nieznaczną ekspresję 6-O-siarczanowanych disacharydów. Ponadto, propolis przyczyniał się do występowania zwiększonej zawartości w strukturze CS/DS podwójnie siarczanowanych disacharydów, szczególnie 2,4-O-siarczanowanych. Uzyskane wyniki badań zdają się wskazywać, że apiterapeutyk poprzez zarówno wzmożenie gromadzenia GAGs w łożysku uszkodzeń jak i poprzez stymulację procesów siarczanowania łańcuchów CS/DS, warunkującego właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne tych związków, stymuluje gojenie ran oparzeniowych.

Działanie maści propolisowej, w odróżnieniu od rutynowo stosowanej soli srebrowej sulfadiazyny, przejawiało się również w jej korzystnym modelowaniu procesów modyfikacji siarczanów dermatanu. Łańcuchy tych ostatnich GAGs cechowały się bowiem zawartością reszt iduronianowych zbliżoną do tej, która charakteryzowała DS obecne w skórze zdrowej. Z uwagi na fakt, że modyfikacja DS wywiera istotny wpływ na oddziaływania tych glikanów z wieloma bioligandami, to przywrócenie „prawidłowego” modelu epimeryzacji DS sugerować może przynajmniej częściowe odzyskanie przez łańcuchy tego glikanu funkcji biologicznych, charakterystycznych dla nieuszkodzonej tkanki.

Analiza eksperymentalna pozwoliła ponadto na identyfikację w macierzy wypełniającej pole ran oparzeniowych glikoprotein – witronektyny i lamininy. Czynniki apiterapeutyczne, modulując przemiany wymienionych niekolagenowych związków, szczególnie zaś poprzez stymulację wzrostu zawartości VN, przyczynia się do skuteczniejszej kontroli procesu gojenia na poziomie komórkowym – włączając migrację i proliferację komórek epidermalnych i keratynocytów oraz aktywację fibroblastów, warunkujących reepitelializację oraz wygojenie rany.

Uzupełnieniem prac oryginalnych jest praca pogładowa, po raz pierwszy przybliżająca polskiemu czytelnikowi w szerokim zakresie wiedzę, dotyczącą metabolizmu i roli biologicznej kwasu hialuronowego w przebiegu naprawy uszkodzeń tkankowych.

Udział, jako główny wykonawca, w realizacji projektów badawczych:

- ❖ Grant promotorski Komitetu Badań Naukowych w latach **2002-2004 r.** pt.: Glikozoaminoglikany surowicy krwi osób z chorobą Gravesa i Basedowa. Uwieńczeniem projektu była moja rozprawa doktorska o tym samym tytule.
- ❖ Badanie struktury i interakcji glikozoaminoglikanów z komponentami substancji podstawowej u chorych na cukrzycę, **1994 r.** (NN-4-015/44), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Aktywność enzymatyczna krwi chorych na twardzinę uogólnioną, **1995 r.** (NN-2-020/95), Śląska Akademia Medyczna

- ❖ Aktywność enzymatyczna krwi chorych z nadczynnością tarczycy, **1997 r.** (NN-2-084/97), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Aktywność enzymatyczna krwi osób z cukrzycą insulinoniezależną, **1998 r.** (NN-5-032/98), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Ocena zawartości kwasu hialuronowego w surowicy krwi pacjentów z nadczynnością tarczycy, **2000 r.** (NN-5-028/00), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Ocena metabolizmu glikozoaminoglikanów u chorych z ostrym zapaleniem trzustki, **2001 r.** (NN-560-15/01), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Ocena zawartości kwasu hialuronowego w osoczu krwi osób z ostrym zapaleniem trzustki **2002 r.** (NN-5-051/02), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Metabolizm glikozoaminoglikanów w przebiegu gojenia się ran oparzeniowych, **2003 r.** (NN-2-346/03), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Glikozoaminoglikany osocza krwi chorych z ostrym zapaleniem trzustki, **2004 r.** (NN-5-205/04), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Ocena wydalania glikozoaminoglikanów w przebiegu procesów starzenia, **2005 r.** (NN-2-174/05), **2006 r.** (NN-2-023/06), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Metabolizm glikozoaminoglikanów w przebiegu gojenia się ran oparzeniowych, **2006 r.** (NN-2-020/06), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Ocena stopnia i sposobu siarczanowania glikozoaminoglikanów w przebiegu gojenia się ran oparzeniowych, **2006 r.** (NN-2-093/07), Śląska Akademia Medyczna
- ❖ Ocena zakresu epimeryzacji glukuronozylowej siarczanów dermatanu w przebiegu gojenia się ran pooparzeniowych, **2008 r.** (KNW-2-097/08), Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
- ❖ Dynamika zmian zawartości lamininy oraz witronektyny w przebiegu gojenia się doświadczalnych ran oparzeniowych, **2009 r.** (KNW-2-138/09), Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
- ❖ Ocena zmian aktywności metaloproteaz macierzy w przebiegu gojenia się ran pooparzeniowych, **2010 r.** (KNW-2-043/10), Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
- ❖ Strukturalne modyfikacje osoczowych siarczanów chondroityny w przebiegu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów, **2015 r.** (KNW-1-150/N/5/0), Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Nagrody za działalność naukowo-badawczą

Zostałam wyróżniona nagrodami JM Rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (do 1997 roku – Śląskiej Akademii Medycznej) za działalność naukową:

- ❖ **I stopnia zespołowa** za badania zmian biochemicznych w przebiegu procesów naprawczych wybranych patologii ustroju ludzkiego, **2001 r.**

- ❖ **I stopnia zespołowa** za publikacje dotyczące wskazania zmian składu i struktury proteoglikanów macierzy pozakomórkowej w procesach naprawczych oraz procesach włóknienia powięzi; poznania metabolizmu składników macierzy pozakomórkowej; poznania roli zaburzeń równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w patogenezie cukrzycy typu 2 oraz oceny wpływu tych zaburzeń na metabolizm proteoglikanów, **2006 r.**
- ❖ **II stopnia zespołowa** za publikacje dotyczące poznania metabolizmu składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu Gravesa i Basedowa, **2007 r.**
- ❖ **II stopnia zespołowa** za poznanie metabolizmu składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu fizjologicznego starzenia się ustroju, **2009 r.**
- ❖ **I stopnia zespołowa** za publikacje dotyczące oceny mechanizmów, regulujących proces jakościowej przebudowy składników macierzy pozakomórkowej w przebiegu procesu fizjologicznego starzenia się ustroju, **2012 r.**
- ❖ **I stopnia zespołowa** za osiągnięcia naukowe w zakresie oceny udziału oksydacji i glikacji w mechanizmach zmian struktury i składu komponentów macierzy pozakomórkowej w przebiegu procesu starzenia się ustroju, **2013 r.**
- ❖ **I stopnia zespołowa** za osiągnięcia naukowe w zakresie oceny oddziaływań propolisu na przebudowę tkanki łącznej w trakcie regeneracji termicznych uszkodzeń skóry, **2014 r.**
- ❖ **I stopnia zespołowa** za osiągnięcia naukowe w zakresie oceny oddziaływań procesów zapalnych oraz wolnorodnikowych na przebudowę tkanki łącznej w przebiegu wybranych chorób autoimmunologicznych, **2015 r.**

Janina Wójcik-Sereth