



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Farmaceutyczny

ROZPRAWA DOKTORSKA

Katarzyna Wiesława Solkiewicz

**Analiza profilu i stopnia glikozylacji surowiczej immunoglobuliny G
u kobiet z zaawansowaną endometriozą**

The analysis of the profile and degree of serum immunoglobulin G
glycosylation in women with advanced endometriosis

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Promotor:

dr hab. n. med. Ewa Maria Kratz, prof. uczelni

Promotor:

prof. dr hab. Hubert Krotkiewski

Wrocław 2023 r.

STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM

Wprowadzenie: Endometrioza, to choroba, u podłoża której leży rozrost błony śluzowej macicy (endometrium) poza jamą macicy. Brak swoistych objawów powoduje, że endometrioza jest trudna do zdiagnozowania, a obecnie zalecane metody diagnostyki obrazowej (USG, MRI) mogą być niewystarczające do ustalenia właściwego rozpoznania, zwłaszcza w przypadku zmian zaotrzewnowych i głęboko naciekających. Obecnie brak jest czułych i swoistych markerów, które umożliwiłyby skuteczną diagnostykę endometriozy. Dlatego istnieje potrzeba poszukiwania nieinwazyjnych biomarkerów charakterystycznych dla tej choroby, które mogłyby być zastosowane w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej.

Cel badań: Głównym celem przeprowadzonych badań było określenie profilu i stopnia glikozylacji surowiczej immunoglobuliny G (IgG) u kobiet z zaawansowaną endometriozą oraz sprawdzenie czy występują różnice w ekspresji glikanów IgG między grupą pacjentek z zaawansowaną endometriozą a grupą kobiet z innymi niż endometrioza, łagodnymi chorobami ginekologicznymi oraz kobietami zdrowymi, co pozwoliłoby na ich różnicowanie oraz na określenie ewentualnych cech charakterystycznych dla zaawansowanej endometriozy w profilu glikanowym IgG obecnej w surowicy. Dodatkowym aspektem przeprowadzonych badań było również porównanie czułości oznaczeń profilu i stopnia glikozylacji IgG między oznaczeniami wykonanymi dla IgG obecnej w surowicy i w wyizolowanych preparatach IgG, w kontekście wykorzystania łatwo dostępnego materiału biologicznego jakim jest surowica krwi do rutynowych oznaczeń gliko-markerów w procesie diagnostycznym endometriozy, z pominięciem pracochłonnego i czasochłonnego procesu izolacji IgG.

Materiał i metody: Surowice badane pochodziły od pacjentek z zaawansowaną endometriozą (E; n=40) oraz od pacjentek bez endometriozy, z łagodnymi schorzeniami ginekologicznymi (NE; n=36). Grupa kontrolna to kobiety zdrowe (C; n=19), bez jakichkolwiek zdiagnozowanych chorób ginekologicznych. Izolację IgG z surowic przeprowadzono z użyciem kolumny powinowactwa ze złożem Protein A/G-Sepharose. Oznaczenie stężenia IgG przeprowadzono z wykorzystaniem następujących metod: 1) dla wyizolowanych preparatów IgG metodą bicynchoninową, 2) dla surowiczej IgG metodą turbidymetryczną. Analizę profilu i stopnia glikozylacji IgG przeprowadzono

z wykorzystaniem testu lektyno-ELISA z zastosowaniem lektyn specyficznych wobec wybranych N- i O-glikanów. Do analizy statystycznej uzyskanych wyników zastosowano program Statistica 13.3 PL, a za istotne uznano wyniki, dla których współczynnik istotności $p < 0,05$.

Wyniki: Ekspresja końcowego kwasu sjałowego na glikanach IgG w surowicy, jak i w wyizolowanych preparatach IgG, była istotnie wyższa w grupie kobiet zdrowych w porównaniu z pacjentkami z grup E i NE. Zaobserwowano także obniżoną ekspresję galaktozy na N-glikanach IgG (surowica i wyizolowane preparaty) w grupach E i NE w odniesieniu do grupy C, a wartość współczynnika agalaktozylacji (GSL-II/RCA-I), była istotnie wyższa w grupach E i NE w porównaniu do grupy C. Wartość współczynnika sjałilacji (MAA/SNA) była istotnie niższa w grupie E w porównaniu do C. Ekspresja fukozy rdzeniowej była istotnie wyższa w grupie C w porównaniu do grupy E i NE, zarówno dla IgG w surowicy jak i dla IgG w wyizolowanych preparatach. Natomiast w przypadku fukozy antenowej LTA- i UEA-reaktywnej zależności te były odwrotne. Względne reaktywności O-glikanów w wyizolowanych preparatach IgG ze specyficznymi lektynami oraz wartości współczynnika O-glikozylacji MPL/VVL były istotnie wyższe u pacjentek z grup E i NE w porównaniu z grupą kontrolną kobiet zdrowych. Ponadto dla wyizolowanej IgG w grupach E i NE wykazano również istotnie wyższą ekspresję wielorozgałęzionych N-glikanów. Wyniki analiz krzywych ROC i analizy skupień pozwoliły na wytypowanie panelu gliko-markerów (względna reaktywność glikanów IgG z MPL, VVL, Jacaliną oraz współczynnik MPL/VVL), które mogą stanowić pomocne narzędzie diagnostyczne w różnicowaniu kobiet z zaawansowaną endometriozą od kobiet zdrowych.

Wnioski: Wartości względnej reaktywności glikanów IgG w surowicy i w wyizolowanych preparatach IgG, ze sjało-specyficzną lektyną MAA, wykrywającą kwas sjałowy przyłączony wiązaniem $\alpha 2,3$, oraz wartości współczynników sjałilacji i agalaktozylacji pozwoliły na różnicowanie kobiet z zaawansowaną endometriozą od kobiet zdrowych. Reaktywność glikanów IgG w surowicy z panelem fukozospecyficznych lektyn AAL, LCA i LTA może być brana pod uwagę jako przydatne narzędzie diagnostyczne i kliniczne do różnicowania pacjentek z zaawansowaną endometriozą od grupy zdrowych kobiet. Ponadto wykazano, że analiza fukozylacji surowiczej IgG, bez uprzedniej czasochłonnej, pracochłonnej i kosztownej izolacji IgG, jest wystarczająca do różnicowania zaawansowanych stadiów endometriozy od grupy

kontrolnej zdrowych kobiet. Zmiany profilu i stopnia O-glikozylacji IgG pozwalają na różnicowanie kobiet z zaawansowaną endometriozą od kobiet zdrowych. Analiza ekspresji O-glikanów specyficycznie wiążących się z Jacaliną, najprawdopodobniej typu 'core 3', obecnych w wyizolowanych preparatach IgG, może być pomocna w różnicowaniu kobiet z zaawansowaną endometriozą od pacjentek z innymi chorobami ginekologicznymi o podłożu zapalnym, co ma szczególną wartość diagnostyczną. Wykazana istotnie wyższa ekspresja wieloantennowych N-glikanów w surowiczej IgG u kobiet z grupy E i NE w porównaniu z kobietami zdrowymi wskazuje, że obecność wielorozgałęzionych N-glikanów w IgG towarzyszy stanom zapalnym występującym w wielu różnych chorobach ginekologicznych.

STRESZCZENIE PRACY W JEZYKU ANGIELSKIM

Introduction: Endometriosis is a disease caused by the growth of the lining of the uterus (endometrium) outside the uterus. The lack of specific symptoms makes endometriosis difficult to diagnose, and currently recommended diagnostic imaging methods (USG, MRI) may be insufficient to establish the correct diagnosis, especially in the case of retroperitoneal and deep infiltrating lesions. Currently, there are no sensitive and specific markers that would enable an effective diagnosis of endometriosis. Therefore, there is a need to search for non-invasive biomarkers characteristic of this disease, which could be used in routine laboratory diagnostics.

Aim of the study: The main objective of the study was to determine the profile and degree of glycosylation of serum immunoglobulin G (IgG) in women with advanced endometriosis and to check whether there are differences in the expression of IgG glycans between the group of patients with advanced endometriosis and the group of women with other than endometriosis, mild gynecological diseases and healthy women, which would allow for their differentiation, and to determine possible features characteristic of advanced endometriosis in the IgG glycan profile present in the serum. An additional aspect of the conducted research was also the comparison of the sensitivity of the determination of the profile and degree of glycosylation of IgG between the determinations made in serum and in isolated IgG preparations, in the context of the use of readily available biological material, i.e. blood serum, for routine determinations of glycomarkers in the diagnostic process of endometriosis, omitting the laborious and time-consuming process of IgG isolation.

Materials and methods: The tested sera came from patients with advanced endometriosis (E; n=40) and from patients without endometriosis with mild gynecological diseases (NE; n=36). The control group consisted of healthy women (C; n=19), without any diagnosed gynecological diseases. IgG isolation from the sera was performed using an affinity column with Protein A/G-Sepharose. IgG concentration was determined respectively: 1) for isolated IgG preparations by bicinchoninic method, 2) for serum IgG by turbidimetric method. The analysis of the profile and degree of glycosylation of IgG was carried out using the lectin-ELISA test with the use of lectins specific for selected N- and O-glycans. The Statistica 13.3 PL program was used

for the statistical analysis of the obtained results, and the results for which the significance coefficient $p < 0.05$ were considered significant.

Results: Expression of terminal sialic acid on serum IgG glycans and in isolated IgG preparations were significantly higher in the group of healthy women compared to patients from groups E and NE. There was also a reduced expression of galactose on IgG glycans in groups E and NE in relation to group C, and the value of the agalactosylation coefficient (GSL-II/RCA-I) was significantly higher in groups E and NE compared to group C. The value of the sialylation coefficient (MAA/SNA) was significantly lower in group E compared to C. Expression of core fucose was significantly higher in group C compared to groups E and NE for both serum IgG and IgG in isolated preparations. However, these relationships were reversed in the case of LTA- and UEA-reactive antennary fucose. The relative reactivities of O-glycans in isolated IgG preparations with specific lectins and the values of the MPL/VVL O-glycosylation coefficient were significantly higher in patients from groups E and NE compared to the control group of healthy women. In addition, a significantly higher expression of multibranched N-glycans was also demonstrated for the isolated IgG in groups E and NE. The results of the analysis of ROC curves and cluster analysis allowed to select of a panel of glycomarkers (MPL, VVL, MPL/VVL, Jacalina), which can be a helpful diagnostic tool in differentiating women with advanced endometriosis from healthy women.

Conclusions: The values of the relative reactivity of IgG glycans in the serum and in the isolated IgG preparations with the sialyl-specific MAA lectin as well as the values of the sialylation and agalactosylation coefficients allowed for the differentiation of women with advanced endometriosis from healthy women. The reactivity of serum IgG glycans with a panel of fucose-specific AAL, LCA and LTA lectins can be considered a useful diagnostic and clinical tool to differentiate patients with advanced endometriosis from healthy patients women. In addition, it has been shown that the analysis of serum IgG fucosylation, without prior time-consuming, laborious and costly isolation of IgG, is sufficient to differentiate advanced stages of endometriosis from a control group of healthy women. Changes in the profile and degree of IgG O-glycosylation allow differentiating women with advanced endometriosis from healthy women. Analysis of the expression of O-glycans specifically binding to Jacalin, most likely of the 'core 3' type, present in isolated IgG preparations, may help differentiate

women with advanced endometriosis from patients with other inflammatory gynecological diseases. The significantly higher expression of multi-antennary N-glycans in serum IgG in women from groups E and NE compared to healthy women indicates that the presence of multi-branched N-glycans in IgG accompanies inflammation in various gynecological diseases.