

AUTOREFERAT

dr Agnieszka Zabłocka

Zakład Immunochemii

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

Wrocław, styczeń 2016r.

1. Agnieszka Zabłocka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 1995 Licencjat, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, kierunek: Biotechnologia, rozprawa pt. „Lizozym – struktura, właściwości, funkcja”. opiekun: prof. dr hab. Antoni Polanowski
- 1997 Magister Biotechnologii, specjalność: Biotechnologia peptydów i białek; Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, praca magisterska pt. Oczyszczanie inhibitorów tripsyny z nasion *Cyclanthera pedata* na immobilizowanej chymotrypsynie. promotor: prof. dr hab. Tadeusz Wilusz
- 2006 Doktor Nauk Biologicznych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu; rozprawa doktorska pt. Badanie mechanizmu działania kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę (PRP). promotor: prof. dr hab. Maria Janusz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 11.2015 – obecnie asystent, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
- 11.2006 – 10.2015 adiunkt, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
- 09.1997 – 10.2006 asystent, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

4. Opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik 4, objęty tytułem:

” IMMUNOMODULATORY POCHODZENIA NATURALNEGO I ICH ROLA W PROCESACH NEURODEGENERACJI”.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Zabłocka A.**, Mitkiewicz M., Macała J., Janusz M.: Neurotrophic activity of cultured cell line U87 is up-regulated by proline-rich polypeptide complex and its constituent nonapeptide. *Cellular Molecular Neurobiology* 2015, 35, 977-986.
IF¹: 2,506 MNiSW²: 20 liczba cytowań³: 0

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 80%: autor korespondencyjny, pomysłodawca przeprowadzonych badań, samodzielne planowanie doświadczeń, prowadzenie hodowli komórkowej, oznaczanie żywotności testem MTT, wykonywanie oznaczeń testem ELISA, izolacja RNA, Western blotting (1/3 udziału), analiza densytometryczna wyników uzyskanych techniką Western blotting, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu, przygotowanie i ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

2. **Zabłocka A.**, Urbaniak A., Kuropatwa M., Zyzak J., Rossowska J., Janusz M.: Can proline-rich polypeptide complex mimic the effect of nerve growth factor? *BioFactors*, 2014, 40, 501-512.
IF¹: 4,592 MNiSW²: 25 liczba cytowań³: 2

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 65%: autor korespondencyjny, pomysłodawca przeprowadzonych badań, wiodący udział w planowaniu eksperymentów, przygotowanie materiału do badań, oznaczanie toksyczności testem MTT, oznaczanie poziomu NO metodą Griessa, badania z użyciem mikroskopii świetlnej, współudział w oznaczaniu poziomu cGMP (1/3 udziału), współudział w badaniach z użyciem mikroskopii konfokalnej (1/3 udziału); interpretacja uzyskanych wyników, napisanie i ostateczne zredagowanie manuskryptu po recenzjach.

3. **Zabłocka A.**, Sosnowska A., Urbaniak A., Janusz M., Polanowski A.: Peptides accompanying chicken egg yolk IgY – alternative methods of isolation and immunoregulatory activity. *Food & Function*, 2014, 5, 724-733.
IF¹: 2,791 MNiSW²: 30 liczba cytowań³: 0

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 65%: autor korespondencyjny pomysłodawca części przeprowadzonych badań, udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, oznaczanie poziomu cytokin metodą ELISA, badanie poziomu TAC, fagocytozy, wolnych rodników tlenowych, tlenku azotu, poziomu produktów utleniania białek i lipidów. Udział w pisaniu manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku.

4. Polanowski A., Sosnowska A., **Zabłocka A.**, Janusz M., Trziszka T.: Immunologically active peptides that accompany hen egg yolk immunoglobulin Y: separation and identification. *Biological Chemistry*, 2013, 394, 879-887.
IF¹: 2,689 MNiSW²: 25 liczba cytowań³: 2

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 20%: współudział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, oznaczanie poziomu cytokin testem ELISA; udział w pisaniu manuskryptu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

5. **Zabłocka A.**, Janusz M.: Effect of proline – rich polypeptide complex/ColostrininTM on the enzymatic antioxidant system. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2012, 60, 383-390.
IF¹: 2,378 MNiSW²: 20 liczba cytowań³: 3

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 90%: autor korespondencyjny, pomysłodawca przeprowadzonych badań, samodzielne planowanie doświadczeń, interpretacja uzyskanych wyników, hodowla komórek pełnej krwi ludzkiej, izolacja PBMC, przygotowanie prób do badań, oznaczanie poziomu nadtlenu wodoru, glutationu, produktów utleniania białek i lipidów, oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych; napisanie manuskryptu, przygotowanie pracy do druku i ostateczne zredagowanie manuskryptu po recenzjach;

6. Polanowski A., **Zabłocka A.**, Sosnowska A., Janusz M., Trziszka T.: Immunomodulatory activity accompanying chicken egg yolk immunoglobulin Y. Poultry Science, 2012, 91, 3091-3096.

IF¹: 1,516 MNiSW²: 40 liczba cytowań³: 5

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 60%: autor korespondencyjny oraz autor równorzędny z pierwszym autorem, współpomysłodawca części przeprowadzonych badań, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, hodowla komórek pełnej krwi ludzkiej, przygotowanie prób do badań, oznaczanie poziomu cytokin testem ELISA oraz oznaczanie poziomu tlenu azotu metodą Griessa. Udział w przygotowaniu pracy do druku i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach,

7. **Zabłocka A.**, Siednienko J., Mitkiewicz M., Gorczyca W.A., Lisowski J., Janusz M.: Proline-rich polypeptide complex (PRP) regulates secretion of inflammatory mediators by its effect on NF-κB activity. Biomedicine & Pharmacotherapy 2010, 64, 16-20

IF¹: 2.208 MNiSW²: 27 liczba cytowań³: 6

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 50%: udział w koncepcji pracy, współudział w interpretacji wyników, izolacja PBMC, przygotowanie prób do badań, oznaczanie I-κB techniką Western blotting; napisanie części manuskryptu, ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach;

8. Janusz M., **Zabłocka A.**: Colostral proline-rich polypeptides – immunoregulatory properties and prospects of therapeutic use in Alzheimer's disease. Current Alzheimer Research, 2010, 7, 323-333.

IF¹: 4,953 MNiSW²: 32 liczba cytowań³: 13

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 50%: udział w wyborze tematu, pisaniu manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku;

9. **Zabłocka A.**, Janusz M.: Hipoteza stresu oksydacyjnego w chorobie Alzheimera. W : „Choroby Otepienne. Teoria i Praktyka”. Wyd. Continuo, 2011, 255-268.

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 70%; rozdział do książki przygotowany na zaproszenie, wybór tematu, analiza literatury, napisanie rozdziału.

¹Wartość współczynnika wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania.

²Liczba punktów według polskiego systemu punktacji czasopism, zgodnie z rokiem opublikowania.

³Liczba cytowań (z uwzględnieniem autocytowań), według bazy Web of Science, stan z dnia 25.11.2015r.

b) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Prezentowane osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl dziewięciu prac: siedmiu prac oryginalnych, jednej anglojęzycznej pracy przeglądowej oraz rozdziału do książki (Załącznik 4). Przedstawiony cykl publikacji przygotowany został w ramach mojej pracy realizowanej w Laboratorium Immunochemii Ogólnej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

WPROWADZENIE

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera, Parkinsona, czy Huntingtona, są skutkiem postępującego obumierania komórek nerwowych w niektórych strukturach układu nerwowego. Zapobieganie uszkodzeniom neuronów w tych schorzeniach stanowi niezwykle ważny i wciąż nierozwiązany problem współczesnej medycyny. Obecnie prowadzone są liczne badania, których celem jest poznanie przyczyn śmierci neuronów oraz wprowadzenie skutecznych metod wczesnej diagnozy i leczenia chorób neurodegeneracyjnych. Szacuje się, że obecnie na chorobę Alzheimera cierpi ponad 30 milionów osób na całym świecie. Biorąc pod uwagę problem „starzenia się” społeczeństwa w wielu krajach, Międzynarodowe Stowarzyszenie Alzheimerowskie przewiduje, że liczba ta może się potroić do 2050 roku.

Proces starzenia się ośrodkowego układu nerwowego związany jest ze zmianami morfologicznymi i czynnościowymi zachodzącymi w tkance mózgowej. Po 65 roku życia obserwuje się istotne zmniejszenie masy mózgu w porównaniu z osobami młodymi. Dochodzi do znacznego zaniku substancji białej, obserwuje się także obecność patologicznych form białek zdolnych do agregacji. Pociąga to za sobą postępujące upośledzenie przewodnictwa cholinergicznego, dopaminergicznego czy serotoninergicznego skutkujące m.in. zaburzeniami pamięci oraz funkcji poznawczych.

Komórki centralnego układu nerwowego (CNS) wykazują silne powiązanie funkcjonalne. Przeżywalność neuronów, ich wzrost oraz zdolność do przekazywania sygnału warunkowana jest występowaniem w ich bliskim sąsiedztwie astrocytów i mikrogleju. Astrocyty charakteryzują się dużą odpornością na czynniki stresowe i zapalne, co czyni z nich doskonałych obrońców dla słabych i wrażliwych neuronów. Dynamiczny przepływ informacji zachodzący podczas kooperacji neuron - astrocyt wiąże się z uwalnianiem całego spektrum cząsteczek przekaźnikowych. Należą do nich czynniki kontrolujące przeżywalność oraz pobudzające wzrost i różnicowanie komórek nerwowych takie, jak nerwowy czynnik wzrostu (NGF), neurotrofowy czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), czy neurotransmitery regulujące funkcjonalnie dojrzały układ nerwowy. Neurotrofiny odgrywają szczególną rolę w różnicowaniu, przeżywalności oraz regeneracji neuronów. Warunkują one prawidłowe funkcjonowanie hipokampa i kory nowej, regulują funkcje neuronów siatkówki, neuronów cholinergicznym i dopaminergicznym. Ponadto odgrywają one kluczową rolę w regulacji plastyczności synaptycznej oraz kontroli procesu syntezy neurotransmiterów, w tym również acetylocholino. Spadek poziomu neurotrofin w mózgu prowadzi do pogorszenia zdolności pamięciowych i poznawczych. Śledząc sekwencje zjawisk prowadzących do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych możliwości terapeutyczne można wiązać z bezpośrednim wpływem na ochronę komórek nerwowych przed destruktywnym działaniem patologicznych form białek. Można to osiągnąć, m.in. poprzez regulację wydzielania czynników troficznych.

Komórki glejowe w mózgu wykazują zdolność do wydzielania cytokin, w tym interleukiny 6 (IL-6), czynnika martwicy nowotworu typu alfa (TNF- α) oraz beta (TNF- β), czynnika stymulującego kolonie typu 1 (CSF1) czy interleukiny 1(IL-1). IL-1 wydzielana przez mikroglej w warunkach fizjologicznych pobudza astrocyty do syntezy czynników wzrostowych m.in. NGF. IL-6 uwalniana jest konstytutywnie przez komórki CNS w czasie jego rozwoju. Doświadczenia *in vitro* wykazały, iż odgrywa ona istotną rolę w kontroli przeżywalności i funkcji neuronów oraz w procesie różnicowania neuronów i astrocytów do komórek funkcjonalnie dojrzałych. Myszy z nokautem dla IL-6 wykazywały osłabioną wrażliwość reagowania na bodźce oraz brak zdolności do regeneracji aksonów. Ponadto, działając synergistycznie z IL-1, IL-6 pobudza astrocyty do produkcji czynników wzrostu tj. NGF oraz wspomaga neurotroficzne działanie NGF na neurony. TNF- α , obok szkodliwego wpływu na neurony w procesie zapalnym, uwalniany w niskich stężeniach, może działać jako czynnik troficzny dla komórek nerwowych. Wykazano, iż działa on również ochronnie w warunkach stresu oksydacyjnego oraz w obecności peptydów amyloidu beta (A β). Ponadto, TNF- α chroni komórki przed toksycznym działaniem glutaminianu. Jest on również potencjalnym aktywatorem czynnika transkrypcyjnego NF- κ B odpowiedzialnego za transkrypcję genów nie tylko dla czynników prozapalnych, ale również dla czynników przeżycia.

Neurodegeneracja jest postępującym procesem zwyrodnienia komórek nerwowych prowadzącym do ich obumierania, co pociąga za sobą m.in. zaburzenia szlaków przekazywania sygnałów. Głównym czynnikiem ryzyka w rozwoju chorób o podłożu neurodegeneracyjnym jest starzenie się organizmu, które w połączeniu z czynnikami genetycznymi oraz czynnikami środowiskowymi prowadzi do ujawnienia stanu chorobowego. Na poziomie komórkowym procesom neurodegeneracyjnym sprzyja stres oksydacyjny, dysfunkcja mitochondriów, niedobory czynników troficznych oraz nadmierne wydzielanie cytokin prozapalnych. Istotnym czynnikiem działającym destrukcyjnie na komórki nerwowe są powstające agregaty białek przybierających konformację tzw. beta-harmonijki, odporne na działanie enzymów proteolitycznych i wykazujące efekty toksyczne. Białka te działając toksycznie na komórki powodują ich obumieranie na drodze nekrozy lub apoptozy. W mózgu chorych na chorobę Alzheimera ma miejsce permanentna aktywacja komórek mikrogleju i astrocytów. Prowadzi to do uwalniania patologicznych ilości mediatorów zapalnych – cytokin, NO i ROS, które powodują uszkodzenie komórek nerwowych. Ponadto, ze względu na uszkodzenie bariery krew-mózg napływające do mózgu komórki krwi obwodowej, limfocyty T i B oraz makrofagi ulegają wtórnemu pobudzeniu, co powoduje zmiany w profilu wydzielanych efektorów biologicznych. Stąd, zmiany morfologiczne i wydzielnicze w mózgu znajdują swoje odzwierciedlenie na obwodzie. Można zatem sądzić, iż możliwość regulacji statusu wydzielniczego komórek krwi obwodowej może znaleźć odzwierciedlenie w regulacji aktywności komórek nerwowych. W świetle badań ostatnich kilkunastu lat stało się oczywiste, że mózg nie jest organem „immunologicznie izolowanym”. Zwrócono uwagę na rolę układu odpornościowego w etiopatogenezie wciąż nieuleczalnej, a dotykającej coraz większej liczby osób, szczególnie w starszym wieku, choroby Alzheimera. Związane z wiekiem zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego są powszechnie znane. Dotyczą one między innymi spadku aktywności funkcjonalnej monocytów i makrofagów, obniżenia ekspresji Toll - podobnych receptorów, wzmożonej sekrecji rodników tlenowych, NO, chemokin i cytokin, a więc reakcji nieswoistego systemu odporności wrodzonej. W przypadku choroby Alzheimera markery reakcji zapalnej lub zaburzenia procesów odpowiedzi immunologicznej mogą być wykorzystane do monitorowania przebiegu choroby.

Wpływ stresu oksydacyjnego na poszczególne etapy rozwoju chorób neurodegeneracyjnych nadal pozostaje wśród naukowców kwestią sporną. Nie mniej jednak jego patologiczna rola pozostaje niepodważalna. Stężenie wolnych rodników tlenowych

(ROS) oraz szybkość ich reagowania zależne są od występowania równowagi pomiędzy szybkością ich wytwarzania, a stężeniem niskocząsteczkowych antyoksydantów i enzymów odpowiedzialnych za ich rozkład. ROS są cząsteczkami posiadającymi niesparowany elektron. Powstają w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu, która prowadzi kolejno do wytworzenia anionorodnika nadadtlenowego (O_2^-), nadttlenku wodoru (H_2O_2) oraz rodnika hydroksylowego ($OH^\cdot$). Reakcje wolnorodnikowe zachodzące w układzie *in vivo* katalizowane są głównie przez jony metali przejściowych. W warunkach fizjologicznych w komórce utrzymywany jest bardzo niski poziom wolnych rodników. Odgrywają one istotną rolę m.in. jako wtórne przekaźniki uczestniczące w kontroli ekspresji genów. Ponadto stanowią podstawowe narzędzie walki komórek fagocytarnych, które wykorzystują ROS do zabijania organizmów patogennych. Jednakże uwalnianie zbyt dużych ilości ROS pociąga za sobą ryzyko wystąpienia stresu oksydacyjnego - stanu, w którym narastający poziom wolnych rodników i produktów ich reakcji przeważa nad możliwością ich rozkładu. Stres wywołany przez wolne rodniki tlenowe prowadzi nie tylko do wystąpienia reakcji zapalnej, ale również uruchamia zależną od NF- κ B transkrypcję genów dla różnych czynników zapalnych. Negatywne działanie ROS prowadzi do inaktywacji białek zawierających grupy tiolowe, zahamowania glikolizy czy do uszkodzeń DNA. Zachodzące pod wpływem działania ROS zmiany prowadzą do zaburzenia potencjału jonowego błony komórkowej i w konsekwencji do jej uszkodzenia.

Komórki wyposażone są w endogenne systemy mające na celu ochronę przed toksycznym działaniem ROS. W utrzymywanie tej równowagi zaangażowane są enzymy o właściwościach antyoksydacyjnych. Należą do nich: peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationu, dysmutazy nadadtlenkowe umiejscowione w cytoplazmie (FeSOD oraz Cu/Zn SOD) oraz w macierzy mitochondrialnej (MnSOD), katalaza, mieloperoksydaza oraz bardzo istotny kompleks oksydazy NADPH. Mózg jest szczególnie podatny na uszkodzenia oksydacyjne. Wynika to z obecności dużej ilości lipidów, w tym znacznego odsetka nienasyconych kwasów tłuszczowych. Ponadto pewne rejony mózgu człowieka zawierają znaczne ilości jonów metali, a zwłaszcza żelaza, miedzi i cynku, co sprzyja reakcjom tworzenia ROS. Badania wykazały, że gromadzące się peptydy amyloidu β pobudzają wydzielanie nadmiernych ilości nadttlenku wodoru i peroksydację lipidów błony komórkowej. Ponadto aktywują kompleks oksydazy NADPH-zależnej mikrogłeju oraz SOD. Z kolei tworzeniu splątków neurofibrylarnych towarzyszy obecność podwyższonego poziomu adduktów 4-hydroksynonenalu - produktów powstałych w wyniku peroksydacji lipidów błony komórkowej. Obserwuje się również obniżoną aktywność SOD i transferazy glutationowej uczestniczącej, między innymi, w neutralizacji 4-hydroksynonenalu wykazującego silnie toksyczne działanie poprzez hamowanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich, jak peroksydaza glutationowa czy katalaza. Usuwanie wolnych rodników tlenowych związane jest również z obecnością w komórce bądź w przestrzeni zewnątrzkomórkowej substancji o niskiej masie cząsteczkowej określanych mianem oksydantów niskocząsteczkowych. Zalicza się do nich: zredukowany glutation, kwas moczowy czy pochodne estradiolu. Reakcje antyoksydantów niskocząsteczkowych z ROS są mniej specyficzne niż działanie enzymów antyoksydacyjnych co sprawia, iż związki te stają się bardziej uniwersalnymi obrońcami i mogą pełnić kilka funkcji. Działają one jak druga linia obrony degradując ROS, które umknęły enzymom antyoksydacyjnym.

Tlenek azotu w organizmie człowieka i zwierząt jest mediatorem procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Tlenek azotu powstaje z L - argininy podczas jej przemiany w L - cytrulinę w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu (NOS). Dwie formy enzymu występują konstytutywnie w neuronach (nNOS) oraz komórkach śródbłonna (eNOS). Forma indukcyjna (iNOS), niezależna od jonów wapnia i kalmoduliny występuje między innymi w makrofagach oraz neutrofilach. Obecność tej formy stwierdzono również w mikrogłeju i astrocytach. Ponieważ NO jest związkiem silnie toksycznym, jego ilości w

organizmie muszą pozostawać pod bardzo ścisłą kontrolą. W ilościach fizjologicznych działa on jako neuronalna cząsteczka sygnalizacyjna. Mechanizm działania tlenu azotu na poziomie komórkowym nie jest do końca poznany. W jednym ze szlaków przekazywania sygnału aktywowanym przez NO bierze udział cyklaza guanylanowa zdolna do katalizowania wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału - cGMP regulującego wiele procesów komórkowych. W ośrodkowym układzie nerwowym tlenek azotu uczestniczy w dojrzewaniu komórek nerwowych oraz pełni funkcję neuroprekaźnika uczestniczącego w kontroli procesów pamięci i uczenia się zachodzących w hipokampie. W przypadku wystąpienia stanu zapalnego w organizmie dochodzi do aktywacji mechanizmów prowadzących do jego eliminacji. Pobudzone komórki fagocytyczne, obok cytokin prozapalnych takich, jak IFN- γ , TNF- α czy IL-1, uwalniają zwiększone ilości NO oraz wolnych rodników tlenowych. Doświadczenia wykonane na myszach transgenicznych wykazały, iż w mózgu zwierząt z amyloidozą i patologiczną formą preseniliny 1 obserwuje się 4-krotnie wyższą aktywność iNOS. Ponadto wykazano, że patogenne działanie A β przejawia się jego zdolnością do aktywowania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B kontrolującego ekspresję iNOS i produkcję NO. W wyniku reakcji NO z jonem nadadtlenowym O $_2^-$ powstaje nadtlenoazotan uczestniczący w procesie nitrowania reszt tyrozyny w białkach. Szczególnie podatne na proces nitrowania jest białko obecne w synapsach - synaptofizyna, która w postaci zmienionej wraz z peptydami A β indukuje proces dysfunkcji cholinergiczej. W warunkach fizjologicznych reakcja ta pozostaje pod kontrolą SOD, stąd istotne jest sprawowanie kontroli nad prawidłowym działaniem tego enzymu. Aktywacja NF- κ B zachodząca w odpowiedzi na stres oksydacyjny, zarówno w komórkach limfoidalnych jak i neuronach lub gleju, prowadzi do ekspresji wielu genów istotnych dla obrony przed patogenem. Należą do nich geny dla TNF, IL-6, IL-8 oraz SOD i iNOS. Zaburzenie gospodarki oksydacyjnej w mózgu powoduje nadmierną aktywację NF- κ B, a tym samym nieregulowaną produkcję czynników zapalenia. Nadmierną aktywację NF- κ B obserwuje się w miejscach syntezy i gromadzenia się patologicznych form A β , głównie w synapsach neuronów.

Mimo wzrastającej liczby osób dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi, nadal nie jest dostępny lek skutecznie niwelujący skutki lub hamujący postęp choroby. Identyfikowane są czynniki protekcyjne, które mają zmniejszać ryzyko wystąpienia choroby neurodegeneracyjnej bądź łagodzić jej skutki. Korzystnymi wydają się być aktywność fizyczna i intelektualna oraz dieta bogata w witaminy oraz w substancje o właściwościach antyoksydacyjnych. W ostatnich latach duże nadzieje wiązano z aktywną immunizacją pacjentów za pomocą A β 42. Niestety, ze względu na występujące skutki uboczne badania zakończyły się niepowodzeniem. Obecnie stosowanymi lekami w terapii choroby Alzheimera są inhibitory acetylocholinesterazy wpływające na polepszenie funkcji poznawczych oraz behawioralnych. Jest to leczenie objawowe, skupiające się na zwiększeniu neurotransmisji cholinergiczej. Niestety, niekorzystną cechą tej terapii jest jej krótkotrwała efektywność. Rekomendowanymi lekami prewencyjnymi stosowanymi jako elementy uzupełniające terapię standardową są ekstrakty z *Ginkgo Biloba*, estrogen, statyny czy niesteroidowe leki przeciwzapalne.

W ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na istotną rolę układu immunologicznego w regulacji procesów neurodegeneracyjnych. Powstawanie oraz gromadzenie się złogów amyloidu beta powoduje permanentną aktywację mikrogleju prowadzącą do zaburzenia fagocytozy oraz nadmiernego wytwarzania cytokin, wolnych rodników tlenowych i tlenu azotu które nasilają procesy neurodegeneracji. Zatem kontrolowana ingerencja w odpowiedź immunologiczną stanowi ogromny potencjał leczniczy w przypadku schorzeń neurodegeneracyjnych. Szczególne zainteresowanie budzą substancje pochodzenia naturalnego, bezpieczne dla organizmu, nie wywołujące skutków ubocznych, wykazujące

charakter endogennych regulatorów odpowiedzi zapalnej oraz działające neuroprotekcynie. Przykładem takiej substancji może być kompleks polipeptydowy bogaty w prolinę – PRP wykryty w siarze owczej jako frakcja towarzysząca immunoglobulinie IgG₂.

Kompleks polipeptydowy bogaty w prolinę (PRP) został wykryty w siarze owiec przez Janusz i współpr. Obecne w mieszaninie peptydy charakteryzują się wysoką zawartością reszt proliny (22%) i aminokwasów hydrofobowych (40%). Wśród określonych do tej pory 56 peptydów 1/3 nie znajduje swoich odpowiedników w bazie danych GenBank. Ciężar cząsteczkowy peptydów kompleksu PRP zawarty jest w granicach 500 – 3000 Da. PRP wykazuje właściwości immunoregulatorowe indukując dojrzewanie i różnicowanie się mysich tymocytów do immunologicznie kompetentnych komórek T (*in vivo* oraz *in vitro*), przywraca równowagę w immunologicznych funkcjach limfocytów. Wpływa zarówno na odpowiedź humoralną, jak i komórkową nie wykazując przy tym właściwości cytotoksycznych. PRP nie wykazuje swoistości gatunkowej, jest aktywny zarówno u myszy, szczurów i ludzi. PRP wpływa na rozwój odpowiedzi immunologicznej poprzez indukcję cytokin, w tym IFN- γ i TNF- α , w hodowlach komórek pełnej krwi ludzkiej oraz limfocytów krwi obwodowej. Efekt ten, w świetle doniesień o zdolności hamowania przez te cytokiny powstawania złogów białka amyloidu β , wskazał na potencjalne zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera. Dalsze badania wykazały zdolność PRP do hamowania agregacji białka amyloidu β , wydzielania wolnych rodników tlenowych (ROS) oraz tlenu azotu (NO), co pozytywnie korelowało ze zmianą aktywności dysmutazy ponadtlenowej oraz iNOS. Preparat poprawiał również zdolność uczenia się i zapamiętywania u starych szczurów.

Jednoczesne wykazywanie przez PRP immunotropowych i prokognitywnych właściwości stało się podstawą do przeprowadzenia badań nad jego wpływem na rozwój choroby Alzheimera (AD). PRP podawany pacjentom chorym na AD w formie tabletek Colostrininy® zawierających 100 μ g kompleksu, powodował polepszenie samopoczucia, pamięci i zdolności poznawczych. Przeprowadzone próby w 7 ośrodkach klinicznych w Polsce wykazały, że u pacjentów przyjmujących tabletki Colostrininy® następuje stabilizacja lub poprawa stanu chorobowego. Bardzo istotną zaletą PRP/Colostrininy® jest fakt, że nie powoduje on żadnych negatywnych skutków ubocznych, nawet przy długotrwałym podawaniu.

Wydzielony z produktów chymotryptycznego trawienia PRP **nonapeptyd (NP)**: Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro we wstępnych badaniach wykazywał właściwości immunoregulatorowe podobne do nietrawionego PRP. Szereg kolejnych badań porównawczych przeprowadzono z zastosowaniem nonapeptydu otrzymanego na drodze syntezy chemicznej. Peptyd ten wpływał na regulację wydzielania cytokin w hodowlach komórek pełnej krwi ludzkiej oraz limfocytów krwi obwodowej. W odniesieniu do hamowania wydzielania tlenu azotu uprzednio indukowanego przez LPS (w układzie *in vitro* i *in vivo*) oraz w odniesieniu do hamowania aktywności dysmutazy ponadtlenowej i wydzielania nadtlenu wodoru wykazywał efekty porównywalne z PRP. Podobnie jak w przypadku kompleksu PRP, nonapeptyd wpływał na poprawę zdolności uczenia się i zapamiętywania u starych szczurów. Istotna jest również jego zdolność do hamowania agregacji białka amyloidu beta.

Wyniki badań nad mechanizmem działania kompleksu polipeptydowego PRP zostały zebrane w monografii opublikowanej w *Current Alzheimer Research* (Załącznik 4, cykl prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe).

Efekty terapeutyczne potencjalnych leków mogą dotyczyć mechanizmów regulacji odporności wrodzonej oraz neuroprotekcji. Zatem kontrolowana ingerencja w nieswoistą odpowiedź immunologiczną stanowi ogromny potencjał leczniczy w przypadku schorzeń neurodegeneracyjnych. Jednak, aby w pełni wykorzystać taki potencjał potrzebne jest szerokie zrozumienie mechanizmów zaangażowanych w jego regulację zarówno w stanach

prawidłowych, jak i chorobowych. Stąd, mechanizm działania kompleksu PRP jest nadal przedmiotem intensywnych badań.

Biorąc pod uwagę powyższe aspekty zasadnym wydało się szersze zbadanie mechanizmu działania kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę PRP wykazującego pozytywne efekty u chorych na chorobę Alzheimera oraz podjęcie próby pozyskania i identyfikacji nowych substancji pochodzenia naturalnego. Pozwoli to na opracowanie w przyszłości alternatywnych strategii terapeutycznych.

Uważam, że w tym kontekście do najważniejszych i najbardziej interesujących rezultatów zawartych w przedstawionym przeze mnie do oceny cyklu prac należą:

- zaproponowanie mechanizmu działania PRP w modulacji odpowiedzi zapalnej poprzez zdolność kompleksu PRP do regulacji procesów transkrypcji białek pozostających pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego NF- κ B; uzyskane wyniki pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmu działania PRP/NP w odniesieniu do obserwowanego efektu hamowania aktywności SOD hamownia wydzielania wolnych rodników tlenowych oraz cytokin prozapalnych;
- wykazanie, że kompleks PRP oraz nonapeptyd NP są zdolne do regulacji wewnątrzkomórkowego systemu obrony przed wolnymi rodnikami tlenowymi; regulacja procesów oksydacyjnych przez PRP może minimalizować toksyczne działanie wolnych rodników uwalnianych w nadmiarze podczas długotrwałego procesu zapalnego;
- wyjaśnienie po raz pierwszy roli kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę (PRP) oraz nonapeptydu (NP) w regulacji szlaku sygnałowego NO/cGMP/ERK 1/2 zaangażowanego w proces różnicowania się komórek nerwowych oraz wykazanie ich potencjalnej zdolności do regulacji procesów warunkujących przeżycie oraz prawidłowe funkcjonowanie komórek nerwowych w warunkach dla nich niekorzystnych; obserwowane podobieństwo sygnałowe w porównaniu do NGF wskazuje na prawdopodobieństwo potencjalnego wzmacniania sygnału przez PRP/NP, szczególnie w warunkach niedoborów NGF obserwowanych w czasie starzenia się oraz w chorobach neurodegeneracyjnych;
- wykazanie po raz pierwszy, że kompleks PRP oraz nonapeptyd NP regulują aktywność wydzielniczą astrocytów ludzkiej linii U87 pobudzając je do ekspresji i wydzielania nerwowego czynnika wzrostu NGF. Ponadto, wykazana zdolność nonapeptydu NP do regulacji wydzielania IL-6 jako cytokiny potencjalnie zaangażowanej we wzmacnianie działania NGF, wskazuje na możliwość zastosowania go jako czynnika terapeutycznego w wybranych jednostkach chorobowych;
- wykazanie po raz pierwszy obecności kompleksu polipeptydowego towarzyszącego frakcji immunoglobulin Y w żółtku jaja kurzego, analogicznie do kompleksu PRP, nazwanego Yolkiną;
- opracowanie alternatywnych metod izolacji i oczyszczania kompleksu Yolkiny z żółtka jaja kurzego oraz wykazanie jego właściwości immunoregulatorowych w odniesieniu do sekrecji cytokin, tlenku azotu oraz utleniania lipidów komórkowych;
- możliwość pozyskania potencjalnego środka terapeutycznego z łatwo dostępnego źródła;

Uzyskane wyniki mogą mieć istotne znaczenie dla rozwoju badań aplikacyjnych związanych z leczeniem chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, takich jak choroba Alzheimera, jak też chorób wieku podeszłego. Wskazują również na możliwość zastąpienia preparatu PRP jego 9-aminokwasowym fragmentem – NP, otrzymywanym

na drodze prostej syntezy chemicznej. Odkrycie kompleksu polipeptydowego, Yolkiny wykazującego właściwości immunoregulatorowe wskazuje na nowe cele badawcze oraz otwiera nowe możliwości regulacji odpowiedzi immunologicznej.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW OPISANYCH W PUBLIKACJACH WYBRANYCH DO OCENY.

KOMPLEKS POLIPEPTYDOWY BOGATY W PROLINĘ (PRP)

- **Zabłocka A.**, Siednienko J., Mitkiewicz M., Gorczyca W.A., Lisowski J., Janusz M: *Proline-rich polypeptide complex (PRP) regulates secretion of inflammatory mediators by its effect on NF- κ B activity*. Biomedicine & Pharmacotherapy 2010, 64: 16-20

Szereg procesów zachodzących w komórce, w tym wydzielanie cytokin czy aktywacja enzymów antyoksydacyjnych znajduje się pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. We wcześniejszych badaniach (ujętych w mojej pracy doktorskiej) wykazałam zdolność kompleksu PRP do obniżania aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B aktywowanego LPS o około 40%. Wyniki prezentowane w obecnej pracy stanowią kontynuację badań rozpoczętych w ramach mojego doktoratu. Celem badań było wykazanie zależności pomiędzy stopniem aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B a poziomem podjednostki hamującej I κ B oraz określenie związku pomiędzy aktywacją NF- κ B a ekspresją cytokin: IL-6 i TNF- α . Wykazano, że 30 minutowa pre-inkubacja komórek jednojądrzastych krwi ludzkiej z PRP, a następnie poddanie ich działaniu LPS skutkuje hamowaniem ekspresji genów dla IL-6 i TNF α . Zaobserwowano również wzrost poziomu podjednostki inhibitorowej I κ B w komórkach w odpowiedzi na sam PRP oraz obniżanie jej poziomu w przypadku potraktowania komórek PRP i LPS.

Podsumowując, uzyskane wyniki pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu działania PRP w modulacji odpowiedzi zapalnej poprzez zdolność kompleksu PRP do regulacji transkrypcji białek pozostających pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Uzyskane wyniki wyjaśniają ponadto mechanizm działania kompleksu PRP prowadzący do wykazanego wcześniej obniżania aktywności dysmutazy ponadtlenowej i hamowania produkcji nadtlenu wodoru. Wolne rodniki tlenowe są potencjalnymi aktywatorami NF- κ B, a obniżanie poziomu H₂O₂ we wnętrzu komórki może osłabiać sygnał potrzebny do aktywacji tego czynnika.

- **Zabłocka A.**, Janusz M: *Effect of proline – rich polypeptide complex/ColostrininTM on the enzymatic antioxidant system*. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 2012, 60, 383-390

W pracy tej podjęto próbę głębszego wyjaśnienia wpływu kompleksu PRP na status oksydacyjny komórki. Analizie poddano układ antyoksydacyjny kontrolujący poziom nadtlenu wodoru w komórce, obejmujący: glutation zredukowany (GSH) i utleniony (GSSG), peroksydazę i reduktazę glutationu oraz katalazę. Badania przeprowadzono na modelu komórek pełnej krwi ludzkiej oraz komórek jednojądrzastych krwi ludzkiej (PBMC). Badano wpływ kompleksu PRP oraz jego dziewięcio-aminokwasowego fragmentu NP na status antyoksydacyjny komórek krwi. Wykazano, że komórki PBMC potraktowane kompleksem PRP lub NP hamują wydzielanie nadtlenu wodoru indukowane LPS. Ponadto, pod wpływem PRP/NP wzrasta aktywność peroksydazy glutationowej (GSHPx) przeprowadzającej reakcję rozkładu nadtlenu wodoru z wykorzystaniem glutationu

zredukowanego GSH. Jednocześnie obserwowana zdolność PRP/NP do aktywacji reduktazy glutationu umożliwia odtwarzanie puli zredukowanego glutationu, tym samym usprawnia działanie systemu ochrony przed toksycznym działaniem wolnych rodników tlenowych. Ochronny wpływ kompleksu PRP oraz nonapeptydu NP na komórki skutkuje wzrostem ochrony białek komórkowych przed ich utlenianiem w warunkach zapalnych indukowanych działaniem toksyny bakteryjnej LPS. Nie wykazano wpływu PRP/NP na aktywność katalazy.

Uzyskane wyniki dowodzą, że kompleks PRP oraz jego fragment NP są zdolne do usprawniania wewnątrzkomórkowego systemu obrony przed wolnymi rodnikami tlenowymi.

- **Zabłocka A.**, Urbaniak A., Kuropatwa M., Zyzak J., Rossowska J., Janusz M. *Can proline-rich polypeptide complex mimic the effect of nerve growth factor?* BioFactors, 2014, 40, 501-512

W chorobach neurodegeneracyjnych obserwuje się znaczny spadek poziomu neurotrofin w mózgu oraz nasilone zjawisko degeneracji komórek nerwowych indukowane obecnością patologicznych form białek. Celem pracy było zbadanie czy korzystny efekt kompleksu polipeptydowego PRP w terapii choroby Alzheimera może wynikać z jego neuroprotektoryjnego działania. Badania przeprowadzono na modelu szczurzej linii komórkowej PC12 wyprowadzonej z guza chromochłonnego nadnerczy szczura. Ze względu na ekspresję receptorowej kinazy tyrozynowej TrkA oraz receptora $p75^{\text{NTR}}$ wykorzystuje się ją jako model do badania szlaków sygnałowych aktywowanych za ich pośrednictwem. Kontrolę odnośnikową stanowił nerwowy czynnik wzrostu (NGF). Wykazano, że kompleks PRP oraz jego nonapeptydowy fragment NP nie wykazują toksycznego wpływu na komórki nerwowe. Inkubacja komórek PC12 z agregatami białka amyloidu β_{1-42} powodowała istotny spadek przeżywalności komórek nawet do 25%. Z kolei potraktowanie komórek PC12 PRP/NP, które podano jednocześnie z białkiem amyloidu β_{1-42} , wywierało działanie ochronne podnosząc ich przeżywalność do poziomu komórek kontrolnych (test MTT). Następnie wykazano zdolność kompleksu PRP do inicjacji zjawiska neurytogenezy komórek PC12, przy czym zdolność do tworzenia krótkich wypustek o długości nie przekraczającej średnicy ciała komórki zaobserwowano u 20% komórek traktowanych PRP w dawce 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (mikroskop świetlny). NP pozostawał bez wpływu na proces neurytogenezy. Kolejny etap badań pozwolił na wyjaśnienie roli PRP oraz NP w regulacji mechanizmów molekularnych zaangażowanych w kontrolę przeżywalności oraz inicjację procesu różnicowania się komórek nerwowych. Wykazano że zarówno PRP, jak i NP pozostają bez istotnego wpływu na ekspresję (RT PCR) oraz poziom neuronalnej NOS (Western blotting), są natomiast zdolne do regulacji aktywności neuronalnej syntazy tlenku azotu (nNOS), co skutkowało wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu tlenku azotu (NO) (zmodyfikowana metoda Griessa). Prowadziło to w efekcie do aktywacji rozpuszczalnej cyklicznej guanylanowej oraz do wzrostu stężenia przekaźnika komórkowego – cyklicznego GMP (ELISA). W świetle doniesień naukowych wskazujących na neuroprzekaźnikowy charakter NO uwalnianego przez neurony oraz przyżyciowe działanie cGMP na komórki nerwowe szczególnie w warunkach niedoborów NGF, wykazana zdolność PRP/NP do indukowania syntezy NO i cGMP wskazuje na ich neuroprotektoryjne właściwości. Wykazano następnie, że wzrost poziomu cyklicznego GMP w odpowiedzi na PRP oraz NP prowadzi do aktywacji kinaz ERK1/2, porównywalnie z sygnałem obserwowanym dla próby odnośnikowej - NGF (Western blotting). Kinazy ERK1/2 zaangażowane są w regulację aktywności czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ekspresję genów dla białek pełniących ważną rolę m.in. w kontroli przeżywalności neuronów oraz w neurytogenezie. Otrzymane wyniki weryfikowano w stosunku do komórek traktowanych swoistym inhibitorem kinazy MEK1/2 odpowiedzialnej za aktywację kinaz białkowych ERK1/2 - U0126. W celu weryfikacji

zależności aktywacji kinaz ERK1/2 od szlaku nNOS-NO-cGMP, zastosowano inhibitor neuronalnej NOS –L-NAME.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wyjaśnienie roli kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę (PRP) oraz nonapeptydu (NP) w regulacji mechanizmów molekularnych zaangażowanych w inicjację procesu różnicowania się komórek nerwowych oraz wskazują na ich potencjalną zdolność do regulacji procesów warunkujących przeżycie oraz prawidłowe funkcjonowanie komórek nerwowych w warunkach dla nich niekorzystnych. Obserwowana analogia sygnałowa w odniesieniu do NGF wskazuje na możliwość potencjalnego wzmacniania sygnału, szczególnie w warunkach niedoborów NGF obserwowanych w czasie starzenia się oraz w chorobach neurodegeneracyjnych.

- **Zabłocka A.**, Mitkiewicz M., Macała J., Janusz M. *Neurotrophic activity of cultured cell line U87 is up-regulated by proline-rich polypeptide complex and its constituent nonapeptide*. Cellular & Molecular Neurobiology 2015, 35, 977-986

Przepływ informacji zachodzący podczas kooperacji neuron-astrocyt, zachodzi za pośrednictwem cząsteczek przekąźnikowych, do których należą czynniki wzrostu i różnicowania neuronów (NGF, BDNF), cytokiny czy neuroprzekąźniki. Czynniki wzrostowe wydzielane przez astrocyty odgrywają ważną rolę w kontroli przeżywalności, różnicowania oraz ochronie komórek nerwowych w warunkach stresowych. Ponadto, ważne wydają się najnowsze doniesienia o wpływie IL-6 na wydzielanie czynników wzrostu oraz na wzmacnianie ich neurotroficznego działania na neurony. Stąd, za cel obrano zbadanie, czy wykazane wcześniej neuroprotektoryjne działanie kompleksu PRP oraz NP może wiązać się z jego wpływem na regulację funkcji wydzielniczych astrocytów.

W badaniach wstępnych wykazano, że kompleks PRP oraz nonapeptyd NP nie działają toksycznie na komórki astrocytarne linii U87 oraz nie pobudzają ich proliferacji. Za pomocą techniki real-time PCR wykazano wpływ nonapeptydu NP na wzrost ekspresji genu dla NGF oraz wpływ PRP/NP na wzrost poziomu NGF wydzielanego zewnątrzkomórkowo. Za pomocą techniki Western blotting wykazano, że wydzielany na zewnątrz komórki NGF zawiera zarówno formę dojrzałą NGF jak i propeptyd. Nie wykazano wpływu PRP/NP na wydzielanie BDNF. W kolejnym etapie badań wykazano, że inkubacja komórek ludzkiej linii astrocytarnej U87 z nonapeptydem NP prowadzi do wzrostu sekrecji interleukiny 6. Wydzielane ilości IL-6 nie działały toksycznie na komórki nerwowe linii PC12 (dane niepublikowane). Efektu tego nie obserwowano dla kompleksu PRP.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na zdolność kompleksu PRP oraz jego nonapeptydowego fragmentu NP do regulacji ekspresji i wydzielania nerwowego czynnika wzrostu oraz interleukiny 6. Można zatem wnioskować, że wykazane wcześniej neuroprotektoryjne działanie kompleksu PRP oraz NP może wiązać się z jego wpływem na regulację funkcji wydzielniczych astrocytów.

- Janusz M., **Zabłocka A.** *Colostrin® proline-rich polypeptides – immunoregulatory properties and prospects of therapeutic use in Alzheimer's disease*"; Current Alzheimer Research, 2010, 7, 323-333

Praca stanowi podsumowanie stanu wiedzy na temat kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę PRP/ Colostrin®. W pracy opisano występowanie oraz znaczenie terapeutyczne peptydów bogatych w prolinę szeroko rozpowszechnionych w mikroorganizmach, roślinach i zwierzętach, ze szczególnym uwzględnieniem peptydów obecnych w podwzgórzu, przysadce oraz płynach biologicznych takich jak, siara czy mleko.

Praca zawiera informacje na temat historii odkrycia kompleksu polipeptydowego PRP, jego charakterystykę oraz zastosowanie w terapii choroby Alzheimera.

- **Zabłocka A.**, Janusz M. *Hipoteza stresu oksydacyjnego w chorobie Alzheimera*. W : „Choroby Otepienne”. Wyd. Continuo, 2011, 255-268

Praca stanowi podsumowanie stanu wiedzy na temat roli stresu oksydacyjnego skutkującego zaburzeniem równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w komórce w patogenezie choroby Alzheimera.

YOLKINA

- Polanowski A, **Zabłocka A.**, Sosnowska A., Janusz M., Trziszka T. *Immunomodulatory activity accompanying chicken egg yolk immunoglobulin Y*. Poultry Science, 2012 91, 3091-3096

Podstawową rolę immunoglobulin transportowanych z surowicy do żółtka jaja jest wywołanie biernej odpowiedzi immunologicznej u zarodka i utrzymanie jej do momentu nabycia zdolności do wytwarzania przeciwciał. Jedną z głównych grup immunoglobulin ptaków są immunoglobuliny Y (IgY) uważane za ewolucyjnego prekursora immunoglobulin G i E swoistych dla układu immunologicznego ssaków.

We wcześniejszych badaniach wykazano obecność kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę – PRP, występującego jako frakcja towarzysząca immunoglobulinom IgG₂ w siarce owczej. Obecność PRP wykazano również w siarce ludzkiej i krowiej. Szeroka analiza aktywności biologicznej kompleksu PRP potwierdziła jego właściwości immunoregulatorowe poprzez wpływ m.in. na regulację odpowiedzi humoralnej oraz komórkowej. Stąd, celem badań było sprawdzenie, czy immunoglobulinom typu Y towarzyszy również frakcja peptydowa o właściwościach immunoregulatorowych.

Podczas oczyszczania IgY otrzymano, po raz pierwszy frakcję wykazującą obecność peptydów niskocząsteczkowych o masie cząsteczkowej rzędu 20-37 kDa. Wykorzystując model komórek pełnej krwi ludzkiej pochodzącej od zdrowych dawców przeprowadzono badania porównawcze mające na celu zbadanie aktywności biologicznej „surowej” frakcji IgY wyizolowanej z żółtka jaja kurzego (IgY+) oraz frakcji IgY oczyszczonej techniką chromatografii żelowej pozbawionej frakcji peptydowej (IgY-). Równolegle poddano analizie „surową” frakcję IgG z siary owiec (IgG+), frakcję oczyszczonych IgG (IgG-) oraz kompleks polipeptydowy bogaty w prolinę (PRP) oddzielony od IgG. Zaobserwowano, że w odpowiedzi na IgG+ oraz oczyszczony kompleks polipeptydowy PRP poziom cytokin wydzielanych przez komórki pełnej krwi ludzkiej: TNF- α i IL-1 β jest znacznie wyższy niż w przypadku IgG pozbawionych kompleksu peptydowego PRP. Podobną zależność zaobserwowano dla IgY. IgY+ charakteryzowała się większą aktywnością indukcyjną niż oczyszczone IgY. Kolejne badania wykazały, że otrzymana w wyniku oczyszczania IgY frakcja peptydów niskocząsteczkowych nazwana **Yolkina** również wykazuje aktywność immunoregulatorową, pobudzając komórki pełnej krwi ludzkiej do wydzielania cytokin: TNF- α i IL-1 β oraz aktywując komórki makrofagowe linii J774 do wydzielania tlenu azotu.

Przeprowadzone badania wykazały po raz pierwszy obecność kompleksu peptydowego o właściwościach immunoregulatorowych - Yolkiny w żółtku jaja kurzego jako frakcji towarzyszącej immunoglobulinom Y, analogicznie do immunoglobulin IgG w siarce. Obserwacje te mogą wskazywać na nową fizjologiczną rolę immunoglobulin jako nośników

substancji o działaniu immunomodulatorowym odgrywającymi ważną rolę w kontroli rozwoju zarodka.

- Polanowski A., Sosnowska A., **Zabłocka A.**, Janusz M., Trziszka T. *Immunologically active peptides that accompany hen egg yolk immunoglobulin Y: separation and identification*. Biological Chemistry, 2013, 394, 879-887

Praca stanowi kontynuację podjętych wcześniej badań. Celem badań było opracowanie metody izolacji i oczyszczania wykrytej frakcji peptydowej towarzyszącej immunoglobulinom Y w żółtku jaja kurzego oraz jej charakterystyka. Profil elucyjny frakcji IgY uzyskany po chromatografii żelowej przedstawiał obecność dwóch frakcji białkowych. Główna frakcja zawierała czyste immunoglobuliny Y, natomiast druga, mniejsza stanowiła frakcję białek niskocząsteczkowych, które nazwano Yolkina. Analiza składu aminokwasowego Yolkiny wykazała wysoką zawartość reszt Asp/Asn i Glu/Gln oraz niską, 6% zawartość reszt proliny. Analiza elektroforetyczna Yolkiny wykazała obecność peptydów o masie cząsteczkowej rzędu 1-37 kDa, z czego peptydy o masie 16, 19, 23, 29, 32 i 37 kDa posiadają reszty cukrowe. Analiza sekwencji aminokwasowej N-końca Yolkiny wykazała dużą homologię do C-końcowego fragmentu witelogeniny II. Profil elucyjny uzyskany po rozdziale Yolkiny techniką HPLC wskazał na obecność czterech głównych frakcji białkowych, z przewagą białek o masie cząsteczkowej 20 i 23 kDa.

Potwierdzono, że Yolkina otrzymana techniką chromatografii żelowej wykazuje zdolność do pobudzania komórek pełnej krwi ludzkiej do wydzielania IL-1 β i IL-6, podobnie do kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę PRP/Colostrin towarzyszącego frakcji IgG w siarze. Wykazano ponadto, że poszczególne składowe peptydowe Yolkiny uzyskane po rozdziale techniką HPLC wykazują, zależną od dawki, zdolność do indukcji cytokin.

- **Zabłocka A.**, Sosnowska A., Urbaniak A., Janusz M., Polanowski A. *Peptides accompanying chicken egg yolk IgY – alternative methods of isolation and immunoregulatory activity*. Food & Function, 2014, 5, 724-733

Celem prezentowanej pracy była szersza analiza właściwości biologicznych Yolkiny. Ponadto, ze względu na możliwość potencjalnego zastosowania Yolkiny w leczeniu chorób o podłożu immunologicznym podjęto próbę modyfikacji pierwotnej metody jej izolacji i oczyszczania. Miało to na celu usprawnienie procesu otrzymywania Yolkiny na większą skalę. Ponadto praca wprowadza nowe rozwiązania technologiczne umożliwiające wydajną izolację i oczyszczanie Yolkiny.

Materiał wyjściowy stanowiła frakcja immunoglobulin Y zawierająca peptydy Yolkiny. Pierwotna metoda izolacji i oczyszczania Yolkiny wykorzystuje technikę chromatografii żelowej (SEC) na złożu Sephacryl S-100. Wprowadzone modyfikacje zastępowały etap rozdziału frakcji peptydowej od IgY techniką SEC na:

- a) technikę ultrafiltracji z użyciem membrany z punktem odcięcia 50 kDa (Yolkina 2)
- b) technikę wytrącania z użyciem kwasu nadchlorowego (Yolkina 3).
- c) technikę wytrącania z użyciem kwasu nadchlorowego oraz wysalania siarczanem amonu (Yolkina 4)

Uzyskano wydajność preparatywną porównywalną z metodą wyjściową, natomiast preparaty Yolkiny uzyskane metodami alternatywnymi cechowały różnice w składzie peptydowym. Podjęto badania mające na celu szerszą analizę aktywności biologicznej otrzymanych preparatów. Wykazano, że Yolkina podnosi status immunologiczny komórek pełnej krwi ludzkiej zwiększając produkcję cytokin pro, i antyzapalnych, pozostając bez wpływu na poziom cytokin uwalnianych w odpowiedzi na LPS, co wskazuje bardziej na jej

działanie regulatorowe. Największą efektywnością cechowały się preparaty Yolkina 3 i Yolkina 4.

Fizjologiczne ilości tlenku azotu (NO) uwalniane przez komórki odgrywają ważną rolę w regulacji szeregu procesów immunologicznych oraz w kontroli neuroprzekaźnictwa nerwowego. Z kolei nadprodukcja tlenku azotu może prowadzić do rozwoju permanentnej reakcji zapalnej i inicjacji odpowiedzi autoimmunologicznej. Stąd możliwość modulowania syntezy NO stanowi istotny cel terapeutyczny. Wykazano, że Yolkina pobudza wydzielanie niewielkich ilości tlenku azotu, jednocześnie Yolkina 4 w sposób istotny obniża poziom NO uwalnianego w odpowiedzi na LPS. Skutkiem nasilonego stresu oksydacyjnego jest wzrost poziomu produktów utleniania lipidów błonowych, co skutkować może zaburzeniem płynności błony prowadzącej do generacji procesów patologicznych i śmierci komórki. Wykazano zdolność Yolkiny do hamowania procesu utleniania lipidów indukowanego czynnikiem zapalnym LPS, nie zaobserwowano natomiast jej wpływu na hamowanie wydzielania nadtlenu wodoru czy poziom antyoksydantów niskocząsteczkowych. Porównując aktywność biologiczną Yolkiny otrzymanej jedną z czterech zaproponowanych metod można wnioskować, że zmiany w poszczególnych metodach preparacji pozwalają na uzyskanie preparatu o selektywnej aktywności biologicznej. Zastosowanie metody z użyciem kwasu nadchlorowego pozwoliło na otrzymanie frakcji peptydowej zdolnej do regulacji odpowiedzi zapalnej.

Uzyskane wyniki badań wskazały, że żółtko jaja kurzego stanowi bogate źródło peptydów o działaniu immunoregulatorowym z możliwością ich potencjalnego zastosowania w leczeniu chorób o podłożu immunologicznym.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).

Podsumowanie.

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w 24 pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), w tym w 12 pracach oryginalnych opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (pierwszy autor - 7 prac, w tym w jednej pracy równorzędnie z pierwszym autorem, autor korespondencyjny – 6 prac), współautorstwo w 5 pracach przeglądowych oraz w jednym rozdziale do książki. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych byłam współautorem w 7 pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, z czego w 4 byłam pierwszym autorem. Ponadto mój dorobek naukowy obejmuje 2 prace opublikowane w czasopismach spoza bazy JRC, 16 komunikatów zjazdowych, 3 referaty wygłoszone na konferencjach naukowych. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) prac oryginalnych wynosi 43,721 (punkty MNiSW: 462). Do dnia 25 listopada 2015 r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane 165 razy, w tym 126 razy wyłączając autocytowania. Łączny IF dziewięciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi 23,633, przy ilości cytowań 31. Ponadto, w ramach działalności naukowej uczestniczyłam w realizacji 7 projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki Szkolnictwa Wyższego (w tym w 2 byłam kierownikiem), oraz uczestniczyłam w realizacji jednego projektu finansowanego ze środków UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Obecnie uczestniczę w realizacji 3 projektów badawczych realizowanych w ramach działalności naukowej Uniwersytetu Medycznego oraz w ramach KNOW.

	prace opublikowane przed doktoratem	prace opublikowane po doktoracie	łącznie
Liczba publikacji naukowych	7	19	26
Liczba publikacji w czasopismach znajdujących się w bazie JRC	7	17	24
łączna liczba punktów wg listy czasopism MNiSW*	79	383	462
Sumaryczny Impact Factor	5,674	38,047	43,721

*obejmuje punkty za publikacje w czasopismach naukowych bez uwzględnienia rozdziałów w monografiach oraz publikacji w materiałach konferencyjnych.

a) Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę licencjacką zatytułowaną „Lizozym – struktura, właściwości, funkcja” wykonałam pod opieką prof. dr hab. Antoniego Polanowskiego w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego. Po ukończeniu studiów licencjackich rozpoczęłam studia magisterskie na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego, kierunek Biotechnologia, specjalność: Biotechnologia peptydów i białek. W 1996 roku odbyłam 5-miesięczny staż naukowy w ramach programu TEMPUS w Instytucie Biologii Molekularnej w Aalborg (Dania), gdzie realizowałam projekt badawczy pt. „Izolacja i charakterystyka inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) i jego mutantów”. Udział w realizacji tego projektu pozwolił mi na poznanie podstawowych technik biologii molekularnej.

Pracę dyplomową realizowałam pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Wilusza w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego. Wyniki badań otrzymanych przeze mnie w czasie realizacji pracy magisterskiej pt. „Oczyszczanie inhibitorów trypsyny z nasion *Cyclanthera pedata* na immobilizowanej chymotrypsynie” opublikowano w czasopiśmie naukowym *Biochimica Biophysica Acta* (Zał. 3 pt. I.2.1., 3). Po ukończeniu studiów, w 1997 r. rozpoczęłam pracę w Laboratorium Immunochemii Ogólnej IITD PAN we Wrocławiu na stanowisku asystenta. Głównym tematem podjętych i kontynuowanych badań podczas realizacji pracy doktorskiej był mechanizm działania kompleksu polipeptydowego bogatego w prolinę (PRP/Colostrinin®) z siary owczej oraz jego składowych peptydów. Podjęcie tej tematyki badawczej było szczególnie istotne ze względu na ważną rolę procesów zapalnych w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Alzheimer. Badania prowadziłam na modelu komórek pełnej krwi ludzkiej *ex vivo*, na modelu komórek jednojądrzastych krwi ludzkiej (PBMC) *in vitro* oraz na modelu mysim *in vivo*. Przeprowadzone analizy pozwoliły mi na wykazanie, że korzystne efekty terapeutyczne kompleksu polipeptydowego PRP/Colostrinin® obserwowane u osób na chorobę Alzheimer można wiązać z jego zdolnością do modulowania odpowiedzi zapalnej, szczególnie w odniesieniu do regulacji wydzielania cytokin, tlenku azotu (NO) oraz wolnych rodników tlenowych (ROS). Hamowanie wydzielania NO oraz ROS przez PRP pozytywnie korelowało z jego wpływem na hamowanie aktywności iNOS oraz SOD oraz na aktywność

czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Ponadto wykazałam, że otrzymane na drodze syntezy chemicznej nona i heksapeptydowe fragmenty kompleksu i ich oligomeryczne pochodne mogą znaleźć zastosowanie jako selektywne regulatory odpowiedzi immunologicznej. Badania realizowane były w ramach grantów KBN nr 6 PO4B 013 11, Grantu Młodego Pracownika nr 4 PO5A 015 18 oraz Grantu Promotorskiego P05A 046 27 (Załącznik 3 pkt. VII, 1-3). Wyniki badań prezentowano w postaci publikacji (Załącznik 3 pkt. I.1.1., 2-5,7) oraz doniesień konferencyjnych (Załącznik 3 pkt. IX.1., 1-7). Podczas wykonywania mojej pracy doktorskiej opanowałam technikę hodowli komórek pełnej krwi ludzkiej oraz hodowli linii komórkowych, opanowałam izolację subpopulacji komórkowych z pełnej krwi ludzkiej oraz wykonywanie eksperymentów na zwierzętach zgodnie z obowiązującymi zasadami etyki. Ten okres w rozwoju zawodowym pozwolił mi także na opanowanie spektrofotometrycznych metod oznaczania aktywności enzymów, techniki ELISA oraz immunohistochemicznych/immunocytochemicznych technik obrazowania.

Równolegle do badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej uczestniczyłam w badaniach realizowanych w ramach grantu Grant KBN nr 3 P05A 075 25 (Załącznik 3 pkt. VII, 4) działalności statutowej Instytutu oraz w badaniach prowadzonych we współpracy z Uniwersytetem Wrocławskim i Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu. Badania te dotyczyły m.in. wpływu kompleksu PRP na regulację wydzielania serotoniny, na właściwości adhezyjne komórek makrofagowych oraz obejmowały badania nad właściwościami immunomodulatorowymi peptydów owadzych (wyniki nieopublikowane).

b) Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii uzyskałam w 2006 roku. Podjęty jeszcze podczas realizacji pracy doktorskiej kierunek badawczy, jakim było badanie mechanizmu działania kompleksu polipeptydowego PRP oraz jego nonapeptydowego fragmentu NP kontynuuję i rozwijam do chwili obecnej. Ponadto zaangażowałam się w badania nad właściwościami immunoregulatorowymi innych białek pochodzenia naturalnego, w tym kompleksu peptydowego Yolquina wyizolowanego z żółtka jaja kurzego oraz kompleksu peptydowego Coloco wyizolowanego z siary krowiej pod kątem ich potencjalnego zastosowania w terapii chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Badania te prowadzone były (i są obecnie kontynuowane) we współpracy z Zakładem Biotechnologii Białek Uniwersytetu Wrocławskiego, Katedrą i Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Katedrą Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego oraz z firmą Geo-Poland z Poznania.

Najważniejsze, uzyskane przeze mnie wyniki zostały zawarte w cyklu publikacji naukowych przedstawionych jako osiągnięcie naukowe, szczegółowo opisanych w punkcie 4b niniejszego autoreferatu. Poniżej przedstawione zostały najważniejsze zagadnienia wykraczające poza ten cykl, w tym częściowo nieopublikowane.

- Wykazany wpływ kompleksu polipeptydowego PRP oraz jego nonapeptydowego fragmentu NP na hamowanie aktywności iNOS oraz wydzielanie NO w odpowiedzi na czynnik zapalny LPS rozszerzono o badania immunohistochemiczne obejmujące organy: serce, nerki, śledzionę oraz wątrobę. Wykazano, że w odpowiedzi na PRP podany myszom dootrzewnowo 6 godzin po indukcji reakcji zapalnej przez LPS obserwuje się spadek ilości komórek iNOS-pozytywnych w wątrobie (Załącznik 3 pkt. I.2.1, 8).
- Potwierdzeniem wyników uzyskanych *in vivo* na modelu zwierzęcym (Załącznik 3 pkt. I.1.1, 7) było przeprowadzenie badań nad wpływem kompleksu PRP oraz NP na regulację wydzielania tlenu azotu w układzie *in vitro* z wykorzystaniem mysiej linii

monocytno-makrofagowej J774 (praca wykonana pod moją opieką w ramach pracy magisterskiej Pani Klaudii Piegdoń). W kolejnych badaniach podjęto próbę wyjaśnienia wpływu PRP/NP na regulację ekspresji iNOS i jej aktywność (praca wykonana pod moją opieką w ramach pracy magisterskiej Pani Magdaleny Orsicz) oraz na regulację aktywności kinaz ERK 1/2 zaangażowanych w proces wydzielania NO w odpowiedzi na LPS (praca wykonana pod moją opieką w ramach pracy magisterskiej Pani Marii Michór) (wyniki nieopublikowane).

- W ramach projektu badawczego pt.: „Badania nad mechanizmem działania PRP/Colostriny – preparatu wykazującego terapeutyczne efekty w chorobie Alzheimera” (Załącznik 3 pkt. VII, 4) badałam wpływ kompleksu PRP oraz NP na właściwości adhezyjne komórek monocytno-makrofagowych linii komórkowych THP-1 i HL-60 nieróżnicowanych oraz różnicowanych różnymi czynnikami. Otrzymane wyniki nie wykazały wpływu PRP/NP na właściwości adhezyjne monocytów i makrofagów (wyniki nieopublikowane).
- Swoje zainteresowania rozszerzyłam o badania nad wpływem kompleksu PRP i NP na regulację aktywności wydzielniczej komórek ludzkich linii astrocytarnych (U373, U87, N1231), co zaowocowało pracą magisterską wykonaną pod moim kierownictwem przez Panią Monikę Kraśnicką (wyniki nieopublikowane) oraz publikacją (Załącznik 3 pkt. I.2.1, 12)
- Badania wykonane w ramach projektu „Ovocura” (Załącznik 3 pkt. VII, 7) zaowocowały odkryciem Yolliny – kompleksu peptydowego towarzyszącego immunoglobulinie Y w żółtku jaja kurzego (Załącznik 3 pkt. I.2.1, 10) oraz wykazaniem jej właściwości immunoregulatorowych (Załącznik 3 pkt. I.2.1, 13,15). Uzyskane wyniki badań są przedmiotem trzech publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe. Badania nad właściwościami Yolliny są przeze mnie kontynuowane. Obecnie trwające badania realizowane w ramach działalności statutowej IITD PAN oraz w ramach projektu KNOW realizowanego we współpracy z Katedrą Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wskazują na neuroprotektoryjne działanie Yolliny i potwierdzają możliwość jej zastosowania jako potencjalnego czynnika terapeutycznego w terapii schorzeń o podłożu neurodegeneracyjnym (Załącznik 3 pkt. VII, 10). Ponadto, brałam udział w badaniach nad właściwościami biologicznymi peptydów otrzymywanych z białka jaja oznaczając ich zdolność do indukcji cytokin na modelu komórek pełnej krwi ludzkiej.
- Moje zainteresowania oraz warsztat badawczy pozwoliły mi na udział w realizacji dwóch projektów badawczych we współpracy z Katedrą Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Realizowane przeze mnie zadania badawcze mają na celu określenie wpływu krioterapii ogólnoustrojowej na status immunologiczny komórek krwi ludzkiej w wybranych jednostkach chorobowych (Załącznik 3 pkt. VII 8-9). W chorobach neurodegeneracyjnych patologiczne formy białek przedostające się na obwód m.in. przez uszkodzoną barierę krew-mózg mogą stanowić istotny sygnał prozapalny dla komórek pełnej krwi ludzkiej obwodowej: limfocytów oraz monocytów/makrofagów. Badania ostatnich lat wskazują również na znaczący wzrost poziomu cytokin prozapalnych na obwodzie u osób z depresją, łagodnymi zaburzeniami funkcji poznawczych (MCI) oraz z chorobą Alzheimera.
- Choroba Parkinsona, obok choroby Alzheimera, jest postępującym schorzeniem neurodegeneracyjnym prowadzącym do zwyrodnienia neuronów dopaminergicznych szlaku nigro-striatalnego oraz w mniejszym stopniu neuronów adrenergicznych i serotonergicznych. Częstość jej występowania wynosi 0,15% w całej populacji, u ludzi powyżej 70 roku życia wzrasta dziesięciokrotnie. Niestety, stosowane obecnie leki w terapii choroby Parkinsona działają tylko objawowo i nie wykazują pełnej

skuteczności. Stąd, swoją aktywność naukową rozszerzyłam o badania nad właściwościami biologicznymi nonapeptydu NP-POL (możliwego do otrzymania na drodze syntezy chemicznej), o sekwencji RPKHPIKHQ, wydzielonego z Colostriny techniką filtracji żelowej w kontekście jego zastosowania w terapii choroby Parkinsona.

- Modyfikacja metody izolacji aktywnych biologicznie peptydów obecnych w sianie krowiej pozwoliła na wyizolowanie kompleksu polipeptydowego Coloco. W 2008 roku rozpoczęłam współpracę z firmą Geo-Poland z Poznania. Realizowany projekt badawczy ma na celu zbadanie aktywności biologicznej kompleksu Coloco oraz przeprowadzenie analizy porównawczej pomiędzy Coloco a badanym w naszym laboratorium kompleksem PRP.
- Preparaty pochodzenia roślinnego stanowią potencjalne źródło substancji o działaniu neuroochronnym. Jednym z nich jest ekstrakt z korzenia *Anemarrhena asphodeloides*. W ramach współpracy z Zakładem Toksykologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu uczestniczę w realizacji projektu mającego na celu zbadanie właściwości neuroprotektoryjnych ekstraktu na modelu linii komórkowej PC12.

18.01.2016r.

Agnieszka Zdobych