

MAGDALENA ORCZYK-PAWIŁOWICZ¹, LIDIA HIRNLE², JERZY FLORJAŃSKI³

Zmiany w sjalizacji i fukozylacji glikokoniugatów w ciążach powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego

Alterations in Sialylation and Fucosylation of Glycoconjugates in Pregnancy Complicated by Premature Ruptures of the Membrane

¹ Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii AM we Wrocławiu

² Katedra i Klinika Rozrodczości i Położnictwa AM we Wrocławiu

³ Klinika Zaburzeń Rozwojowych Płodu AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Przedwczesne odpływanie płynu owodniowego jest jednym z ważniejszych powodów wcześniejszego ukończenia ciąży. Uwaga położników skupia się na znalezieniu biochemicznych wskaźników pozwalających na wczesne rozpoznanie tej patologii.

Cel pracy. Określenie profilu glikozylacji glikokoniugatów płynów owodniowych, uwzględniając ekspresję i sposób przyłączenia kwasu sjałowego i fukozy, obecność antygenu T oraz stopień rozgałęzienia N-glikanów w ciążach powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego, w porównaniu do ciąż z zachowanymi błonami płodowymi.

Materiał i metody. Profil glikozylacji glikokoniugatów płynów owodniowych scharakteryzowano stosując technikę dotingu, przez pomiar reaktywności 10 µg białek płynu owodniowego z zestawem lektyn o znanej swoistości. Powstałe obrazy barwnych pasm reprezentujących kompleksy lektyna–glikokoniugaty płynu owodniowego poddano analizie komputerowej, a intensywność zabarwienia wyrażono w umownych jednostkach – pikselach.

Wyniki. W ciąży powikłanej przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego w porównaniu do ciąży fizjologicznej z zachowanymi błonami płodowymi towarzyszą następujące zmiany w profilu glikozylacji: 1) wzrost ekspresji kwasu sjałowego przyłączonego do glikanów zarówno wiązaniem glikozydowym α2,3, jak i α2,6 oraz wzrost wartości współczynnika sjalizacji, wyrażającego wzajemną proporcję zawartości kwasu sjałowego przyłączonego do glikanów wiązaniem α2,3 w stosunku do α2,6 wiązań; 2) wzrost ekspresji fukozy przyłączonej wiązaniem α1,3; 3) większa liczba dwuantenowych glikanów; 4) brak zmian w ekspresji antygenu T.

Wnioski. Przedwczesne odpływanie płynu owodniowego jest związane z subtelnymi zmianami w glikozylacji glikokoniugatów obecnych w płynie owodniowym. Wyniki wskazują na dynamiczne zmiany ilościowe i jakościowe, obecności mikroheterogennych usjałowanych, ufukozylowanych oraz dwuantenowych glikoform glikokoniugatów w czasie trwania ciąży (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 1, 51–57).

Słowa kluczowe: płyn owodniowy, przedwczesne odpływanie płynu owodniowego, glikozylacja, glikokoniugaty.

Abstract

Background. Premature ruptures of the membranes (PROM) constitute one of the important causes of early cessation of labour. Obstetricians focus their attention on looking for the biochemical parameters, which would allow them to diagnose this pathology at its early stage.

Objectives. The goal of this work was to determine the profile of glycosylation of the glycoconjugates in the amniotic fluid, taking into account the expression and the type of sialic acid and fucose linkages, the presence of T-antigen, as well as the degree of N-glycan branching in labours complicated by PROM in comparison to labours, in which the membranes are left intact.

Material and Methods. The glycosylation profiles of the amniotic fluid glycoconjugates were characterized by the use of dotting method by measuring the reaction of 10 µg of amniotic fluid protein reaction with set of lectins of known specificity. The formed bands, representing the complexes of lectin-amniotic fluid glycoconjugates, were analyzed by computer and the colour intensity of bands were expressed in arbitrary units – pixels.

Results. In labour complicated by PROM, compared to labour in which membranes are left intact, the following alterations in the profile of glycosylation were observed: 1) An increase of the expression of sialic acid attached to glycans by $\alpha 2,3$ as well as $\alpha 2,6$ bonds and an increase of the sialization ratio, which expresses the proportion of the sialic acid $\alpha 2,3$ versus $\alpha 2,6$; 2) An increased expression of fucose attached by $\alpha 1,3$ bond; 3) The higher amount of diantennary glycans; 4) No differences in T-antigen expression.

Conclusions. Premature ruptures of the membranes is accompanied by subtle alterations in the glycosylation of glycoconjugates present in the amniotic fluid. Results of this work point out the dynamic quantitative and qualitative changes in the presence of microheterogeneous sialo-, fucosyl- and branched glycoforms of amniotic fluid glycoconjugates appearing during the labour (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 1, 51–57).

Key words: amniotic fluid, premature rupture of the membranes, glycosylation, glycoconjugates.

Płyn owodniowy jest naturalnym środowiskiem wewnątrzmacicznym, w którym rozwija się płód. Odpowiednia objętość, skład, właściwości fizykochemiczne i biochemiczne płynu owodniowego są bardzo istotne dla prawidłowego rozwoju płodu. Analiza płynu owodniowego jest stosowana między innymi do oceny stopnia dojrzałości płodu oraz w diagnostyce prenatalnej [1, 2].

W płynie owodniowym znajdują się zarówno N-, jak i O-glikokoniugaty, głównie glikoproteiny, których funkcje i struktury glikanów nie są w pełni poznane. Do glikoprotein występujących w płynie owodniowym należą między innymi: α -fetoproteina, immunoglobuliny, transferyna, haptoglobina, fibronektyna, gonadotropina kosmówkowa [3]. Glikoproteiny płynu owodniowego zawierają przede wszystkim łańcuchy cukrowe związane N-glikozydowo oraz mniejszą ilość O-glikanów, które mogą zawierać struktury dwuantenowe z przedzielającą GlcNAc lub bez, fukozę, kwas sjałowy, galaktozę i GalNAc. W płynie owodniowym mogą być obecne krótkie struktury cukrowe, takie jak: antygen T, Tn oraz determinanty grup krwi typu Lewis^{x, y, a, b}, których obecność stwierdza się w niektórych nowotworach i określa się je jako antygeny towarzyszące nowotworom, ale z powodu ekspresji w tkankach płodu także jako antygeny nowotworo-płodowe [4]. Oznaczenia zawartości glikoform niektórych glikoprotein okazały się pomocne w diagnostyce prenatalnej i perinatalnej. Wrodzonym defektem cewy nerwowej towarzyszy nietypowy obraz mikroheterogennych frakcji α -fetoproteiny [5]. Wzrost sjałoglikotopów hCG oraz obniżenie ilości glikoform dwuantenowych AFP wykorzystywano w diagnostyce zespołu Downa [6, 7]. Hampel [8] proponuje zastosowanie oznaczenia sjałoform fibronektyny zawierającej kwas sjałowy przyłączony wiązaniem $\alpha 2,3$ w przewidywaniu przedwczesnego porodu.

Przedwczesne odpływanie płynu owodniowego jest powikłaniem ciąży, w której dochodzi do samoistnego pęknięcia błon płodowych przed rozpoczęciem akcji porodowej. Około 32–38% porodów przedwczesnych jest poprzedzonych odpływaniem płynu owodniowego. Etiologia przed-

wczesnego odpływania płynu owodniowego nie jest w pełni poznana i uważa się, że ważną rolę, szczególnie we wczesnym okresie trwania ciąży, odgrywa zakażenie błon płodowych i toczący się proces zapalny [9].

Celem pracy była obserwacja zmian profilu glikozylacji N- i O-glikokoniugatów płynów owodniowych w ciążach powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego. Autorzy badali, czy profil glikozylacji glikokoniugatów płynu owodniowego pochodzących z ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego jest zbliżony do profilu glikozylacji obserwowanego w okresie okołoporodowym w ciążach bez czynności skurczowej macicy, czy też do profilu występującego u kobiet rodzących. Analizy dokonano na podstawie interakcji glikokoniugatów płynu owodniowego ze swoistymi lektynami pozwalającymi na ocenę ekspresji i sposobu przyłączenia kwasu sjałowego i fukozy, obecności antygeny T oraz stopnia rozgałęzienia N-glikanów. Praca ta stanowi wycinek zaplanowanych badań dążących do wyjaśnienia roli glikoprotein w fizjopatologii ciąży oraz poszukiwanie nowych markerów, które w przyszłości mogłyby się okazać pomocne w diagnostyce porodu przedwczesnego lub ciąży przenoszonej.

Materiał i metody

Materiał stanowiło 26 płynów owodniowych pobranych od ciężarnych kobiet hospitalizowanych w Klinice Rozrodczości i Położnictwa Akademii Medycznej we Wrocławiu w latach 1997–2000. Płyny owodniowe wirowano przez 20 minut przy obrotach $3000 \times g$ w temperaturze $+4^{\circ}C$, a następnie przechowywano w temperaturze $-76^{\circ}C$.

Na podstawie badań klinicznych kobiet ciężarnych i badań laboratoryjnych uzyskane płyny owodniowe podzielono na 3 grupy.

1. Ciąża fizjologiczna – płyny pobrano za pomocą amniopunkcji od 10 kobiet w wieku 22–39 lat, w 35–40 tygodniu ciąży. Wskazaniem do amniopunkcji była ocena dojrzałości płodu. Badania nie

wykazały nieprawidłowości w rozwoju płodu i przebiegu ciąży. Ciężarne urodziły zdrowe dzieci. Badane płyny owodniowe były pozostałością po uprzednio wykonanych zasadniczych badaniach diagnostycznych.

2. Ciąża powikłana przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego – płyny owodniowe uzyskano podczas pierwszego badania we wziernikach od 10 kobiet w wieku 20–38 lat, w 35–39 tygodniu ciąży.

3. Okres porodowy – płyny owodniowe pobrano podczas porodu fizjologicznego z pęcherza płodowego będącego „na pęknięciu” od 6 kobiet w wieku 25–33 lat, w 39–41 tygodniu ciąży.

Lektynodotting

Badanie profilu glikozylacji glikokoniugatów płynu owodniowego wykonano techniką lektynodotingu. Metoda ta umożliwia wykrycie obecności

glikokoniugatów na podstawie interakcji odpowiednich glikanów z lektyną. Kolejne etapy dotingu wykonano zmodyfikowaną procedurą polecaną przez firmę Boehringer Mannheim zawartą w ulotce dołączonej do zestawu Glycan Differentiation Kit.

W tabeli 1 podano krótką charakterystykę zastosowanych w dotingu lektyn, ich preferencyjną swoistość, użyte stężenie oraz wymieniono glikoproteiny zastosowane jako preparaty kontrolne w testach lektynodotingu.

Wykonanie

Na papier nitrocelulozowy umieszczony w aparacie Bio-Dot SF Microfiltration (BIORAD) nanoszono po 100 µl odpowiednio rozcieńczonych TBS-em (0,05M bufor Tris/HCl pH 7,5 z 0,15M NaCl) prób zawierających 10 µg białek płynu owodniowego. Następnie inkubowano nitrocelulo-

Tabela 1. Stężenia lektyn oraz preparaty kontrolne stosowane w testach lektynodotingu

Table 1. Concentration of lectins and control samples used in lectin dotting

Lektyna; preferencyjna swoistość; piśmiennictwo (Lectin; The major binding specificities; references)	Stężenie lektyny (Concentration of lectin) µg/ml	Preparaty kontrolne, zastosowane w µg w teście z odpowiednią lektyną (Control samples)	
<i>Aleuria aurantia</i> (AAA) Proksymalna Fucα1,6GlcNAc [10]	5	asjalo-haptoglobina nowotworowa*	10 i 20
<i>Canavalia ensiformis</i> (ConA) Dwuantenowe łańcuchy cukrowe; [11]	2	haptoglobina fizjologiczna	1 i 5
<i>Tetragonolobus purpureus</i> (LTA) Fucα1,3GlcNAc (Lewis ^x); [12]	10	asjalo-haptoglobina nowotworowa*	10 i 20
<i>Maackia amurensis</i> (MAA) Kwas sjalowy α2,3 [13]	5	glikoforyna mysia**	1 i 5
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA) Antygen T (Galβ1,3GalNAcO-Ser/Thr) [14]	10	asjalo-glikoforyna ludzka**	0,5 i 0,1
<i>Sambucus nigra</i> (SNA) Kwas sjalowy α2,6, [15]	1	transferyna	1 i 5
<i>Ulex europaeus</i> (UEA) Fucα1,2Gal (w Lewis ^y) [16]	10	asjalo-haptoglobina nowotworowa*	10 i 20

* Preparat haptoglobiny otrzymany z płynów wysiękowych pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika [17].

** Preparaty glikoforyny mysiej i glikoforyny ludzkiej otrzymano dzięki uprzejmości dr. hab. H. Krotkiewskiego z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

* The haptoglobin samples were obtained from ascitic fluids of patients with advanced ovarian cancer.

** The murine and human glycophorin samples were the gift from dr. hab. H. Krotkiewski from Institute of Immunology and Experimental Therapy (Wrocław, Poland).

zę w 2% (v/v) Tween 20 w TBS przez godzinę w temperaturze pokojowej, i przez noc w temperaturze +4°C w celu zablokowania wolnych miejsc. Po odpłukaniu czynnika blokującego TBS-T (TBS z 0,1% Tween 20) nitrocelulozę inkubowano z roztworem odpowiedniej lektyny znakowanej biotyną w TBS-T lub TBS-T zawierającym 1 mM CaCl₂, MgCl₂ i MnCl₂ przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie odpłukiwano nadmiar lektyny tym samym buforem i nitrocelulozę inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej z roztworem ExtrAvidyny znakowanej alkaliczną fosfatazą w TBS-T (1 : 200 000). Po odpłukaniu nadmiaru ExtrAvidyny-AP TBS-T wywoływano

reakcję enzymatyczną, zanurzając papier nitrocelulozowy w 20 ml 0,1M buforu Tris-HCl z 0,1M NaCl i 0,05M MgCl₂ o pH 9,5 zawierającym 100 µl 7,7% roztworu chlorku błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) w mieszaninie dimetyloformamidu (DMF) i wody – 7 : 3 (v/v) i 75 µl 5% roztworu fosforanu 5-bromo-4-chloro-3-indolu (X-phosphate) w DMF. Reakcję przerywano, płuczac nitrocelulozę wodą, gdy pojawiała się pasmo dodatniej próby kontrolnej. Równolegle z próbami badanych płynów owodniowych наносono dodatnie (dla AAA, LTA i UEA asjalo-haptoglobinę nowotworową; dla ConA haptoglobinę fizjologiczną; dla MAA glikoforynę mysia; dla PNA asjalo-gli-

Tabela 2. Ekspresja kwasu sjałowego, fukozy, antygeny T oraz glikanów dwuantenowych na glikokoniugatach płynu owodniowego

Table 2. The expression of sialic acid, fucose, antigen T and diantennary glycans on amniotic fluid glycoconjugates

Analizowany cukier/glikan przez swoistą lektynę (Analyzed sugar/glycan by specific lectin)	Względna ekspresja glikotopu na glikokoniugatach płynu owodniowego analizowana w grupach: (The expression of glycotop on glycoconjugates from by specific amniotic fluid analyzed in groups:)		
	ciąża fizjologiczna (physiological pregnancy) n = 10 35–40 tydz. (35–40 week)	przedwczesne odpływanie płynu owodniowego (premature rupture of membrane) n = 10 35–39 tydz. (35–39 week)	poród (delivery) n = 8 39–41 tydz. (39–41 week)
Fucα1,6GlcNAc (AAA)	927 ± 327*	779 ± 238	596 ± 194
Fucα1,2Gal: Lewis ^y (UEA)	579 ± 351	628 ± 189	560 ± 318
Fucα1,3GlcNAc: Lewis ^x (LTA)	279 ± 160	421 ± 127**	453 ± 263
Dwuantenowe glikany (ConA)	783 ± 204	1025 ± 159**	801 ± 285
Antygen T (PNA)	989 ± 223	948 ± 184	940 ± 315
Kwas sjałowy α2,3 (MAA)	835 ± 297	1127 ± 287**	967 ± 327
Kwas sjałowy α2,6 (SNA)	1723 ± 328	1807 ± 323*	1493 ± 221
Współczynnik MAA : SNA (Coefficient MAA : SNA)	0,47 ± 0,13***	0,62 ± 0,08	0,65 ± 0,14

Reaktywność 10 µg białek płynu owodniowego z lektynami analizowano metodą lektynodotingu i wyrażono w jednostkach umownych – pikselach. Wartości podane jako wartość średnia ± odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie obliczono testem U Manna-Whitneya

* Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy „poród”.

** Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy „ciąża fizjologiczna”.

*** Różnica istotna statystycznie w stosunku do grup „poród” oraz „odpływanie płynu owodniowego”.

The reactivity of 10 µg of amniotic fluid protein with respective lectins was studied based on lectin dotting and expressed in arbitrary units, pixels. The values are given as mean ± standard deviation (mean ± SD). The U Mann-Whitney test was used for the statistical calculations.

* Significantly different from Delivery.

** Significantly different from Physiological pregnancy.

*** Significantly different from Delivery and Premature rupture of membrane.

koforynę ludzką; dla SNA transferynę) i ujemne próby kontrolne (roztwór 100 µg/ml albuminy ludzkiej zamiast płynu owodniowego) dla odpowiednich lektyn oraz ślepą próbę odczynnikową. W użytym przedziale stężeń natężenie barwy powstającej w wyniku reakcji enzymatycznej było wprost proporcjonalne do ekspresji glikotopów rozpoznanych przez lektyny.

Analiza komputerowa obrazu

Po wykonaniu lektynodotingu intensywność powstałego zabarwienia pasma określano ilościowo przez skanowanie, a następnie analizę komputerową obrazu za pomocą programu SigmaGel Spots Mode Measurements (Gel Analysis Software, Version 1.0, Jandel Scientific GmbH). Natężenie barwy odpowiadające reaktywności glikokoniugatów płynu owodniowego z lektynami wyrażano w pikselach. Liczba pikseli jest wprost proporcjonalna do względnej zawartości sacharydu lub glikotopu związanego z glikokoniugatami.

Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzano testem U Manna-Whitneya z użyciem programu komputerowego STATISTICA 5.1 (StatSoft, Polska). Jako wartości istotne statystycznie przy porównywaniu grup przyjmowano różnice dla $p < 0,05$.

Wyniki

W tabeli 2 przedstawiono wyniki charakteryzujące ekspresję kwasu sjałowego, fukozy, antygeny T oraz struktur dwuantenowych przyłączonych do glikanów glikokoniugatów obecnych w płynie owodniowym uzyskanym z ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego oraz w grupach ciąż fizjologicznych i porodu.

Ekspresja kwasu sjałowego

W ciąży powikłanej przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego ekspresja kwasu sjałowego rozpoznawanego przez MAA (wiązanie $\alpha 2,3$) okazała się wyższa niż w przypadku ciąży fizjologicznej ($p < 0,05$) i porodu. Ekspresja kwasu sjałowego rozpoznawanego przez SNA (wiązanie $\alpha 2,6$) w ciąży powikłanej przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego nie różniła się od

ekspresji obserwowanej dla ciąży fizjologicznej, ale okazała się wyższa niż w grupie porodu ($p < 0,05$).

Współczynnik MAA : SNA przyjmował wartość najniższą w ciążach fizjologicznych, wartość współczynnika natomiast była porównywalna dla ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego i dla grupy porodu fizjologicznego (tab. 2).

Stopień fukozylacji

W ciąży powikłanej przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego ekspresja fukozy proksymalnej rozpoznawanej przez AAA (wiązanie $\alpha 1,6$) była wyższa niż w przypadku porodu i niższa w stosunku do ciąży fizjologicznej, niemniej nie są to różnice istotne statystycznie.

Ekspresja fukozy dystalnej rozpoznawanej przez LTA (wiązanie $\alpha 1,3$) była istotnie statystycznie wyższa w ciąży powikłanej przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego ($p < 0,05$) w stosunku do ciąży fizjologicznej. Ekspresja fukozy dystalnej rozpoznawanej przez UEA (wiązanie $\alpha 1,2$) nie wykazywała natomiast różnic istotnych statystycznie w badanych grupach ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego, ciążach fizjologicznych i porodzie.

Ekspresja antygeny T

Reaktywność glikokoniugatów płynów owodniowych z lektyną PNA utrzymywała się na porównywalnym poziomie w badanych grupach.

Obecność dwuantenowych łańcuchów cukrowych

Reaktywność glikokoniugatów z lektyną ConA w grupie ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego okazała się statystycznie istotna wyłącznie w stosunku do podobnej reaktywności w grupie ciąży fizjologicznej ($p < 0,05$).

Omówienie

Wyniki niniejszej pracy wskazują na różnice istotne statystycznie w glikozylacji glikokoniugatów obecnych w płynie owodniowym, pochodzącym od kobiet w III tryestrze ciąży powikłanej przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego, w porównaniu do ciąż z zachowanymi błona-

mi płodowymi. Analizowane różnice dotyczyły stopnia i typu sjałizacji oraz fukozyłacji, a także obecności dwuantenowych glikoform, nie wykazano natomiast różnic w ekspresji antygenu T między analizowanymi grupami. Wstępna analiza nie wykazała różnic w profilu glikozylacji glikokoniugatów płynów owodniowych w ciążach powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego w zależności od tygodnia trwania ciąży w III trymestrze. W związku z tym otrzymane wyniki analizowano wyłącznie w grupie ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego w stosunku do ciąży fizjologicznej niepowikłanej przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego oraz do grupy poród, w której płyn owodniowy pobrano w czasie porodu.

W fizjologicznie pojawiających się glikoproteinach kwas sjałowy jest przyłączony do końcowej galaktozy wiązaniem glikozydowym $\alpha 2,6$ i/lub $\alpha 2,3$ oraz do N-acetylgalaktozaminy wiązaniem $\alpha 2,6$. Wiązanie typu $\alpha 2,6$ dominuje w złożonych glikanach dwuantenowych, natomiast $\alpha 2,3$ spotyka się w glikanach trójjantenowych, głównie w jednej, wewnętrznej antenie [18].

Hampel [8] z zastosowaniem sjałoswoistych lektyn z *Sambucus nigra* (SNA) i *Maackia amurensis* (MAA) wykazał wzrost ekspresji kwasu sjałowego przyłączonego wiązaniem $\alpha 2,3$ na fibronektynie z płynu owodniowego i z wydzieliny pochowej ciąż zagrożonych przedwczesnym porodem. Również przeprowadzone badania sjałizacji glikokoniugatów płynu owodniowego w ciążach powikłanych przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego wskazują na zwiększoną ekspresję kwasu sjałowego $\alpha 2,3$, co może wskazywać na zagrożenie porodem przedwczesnym.

Ekspresja kwasu sjałowego na glikokoniugatach zależy od stadium rozwoju komórki i tkanki. Vallejo [19] wykazał, że podczas dojrzewania tkanek u świń pojawiają się zmiany w typie wiązania kwasu sjałowego $\alpha 2,6$ lub/i $\alpha 2,3$ do galaktozy. Glikokoniugaty komórek ośrodkowego układu nerwowego noworodków w większości mają kwas sjałowy $\alpha 2,3$, kwas sjałowy $\alpha 2,6$ natomiast występuje w znikomych ilościach lub nie ma go w ogóle. W trakcie dojrzewania, w tych samych komórkach osobników dorosłych dominuje kwas sjałowy $\alpha 2,6$, ale równolegle obserwuje się obniżenie lub całkowitą utratę kwasu sjałowego przyłączonego $\alpha 2,3$ do galaktozy. Ekspresja kwasu sjałowego związanego $\alpha 2,3$ wydaje się więc charakterystyczna dla okresu płodowego i noworodkowego, co wykazano również dla transferyny i fibronektyny [20].

W okresie implantacji na powierzchni blastocysty i w doczesnej macicy obserwuje się ekspresję kwasu sjałowego $\alpha 2,3$ oraz poli- $\alpha 2,8$ i obniżenie lub brak ekspresji kwasu sjałowego związanego $\alpha 2,6$. Sugeruje się, że kwas sjałowy związany $\alpha 2,6$ może być istotny do przygotowania błony śluzowej macicy na przyjęcie trofoblastu i jego brak ma wpływ na rozwój kontaktu międzykomórkowego, który ułatwia implantację. Sądzi się, że reszty powierzchniowego kwasu sjałowego uczestniczą w regulacji adhezji komórek [21].

Uwzględniając, że glikoproteiny obecne w płynie owodniowym pochodzą zarówno od płodu, jak i od matki nie można wykluczyć, że obserwowane zmiany w glikozylacji glikoprotein mogą być odzwierciedleniem toczących się procesów metabolicznych zabezpieczających dobrostan płodu i przygotowanie ciężarnej i płodu do porodu.

Piśmiennictwo

- [1] **Brace RA:** Physiology of amniotic fluid volume regulation. Clin Obstet Gynecol 1997, 40, 280–289.
- [2] **Błońska-Fajfrowska B, Chabińska I, Chabiński S:** Przegląd metod diagnostycznych stosowanych w medycynie perinatalnej. Red. Błońska-Fajfrowska B, Zakład Poligrafii Śl. AM, Katowice 1999, 36–39, 77–90.
- [3] **Herrler A, von Rango U, Beier HM:** Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation (Review). Reprod Biomed Online 2003, 6, 244–256.
- [4] **Ohyama K, Suzuki R, Watanabe H, Hirikawa S, Yamakawa T:** Presence of *Vicia graminea* lectin- and *Vicia unijuga* lectin-binding (Vgu) glycoprotein in human amniotic fluid and some of its chemical and serological properties. J Biochem Cell Biol 1997, 29, 455–464.
- [5] **Toftager-Larsen K:** Carbohydrate heterogeneity of human alpha-fetoprotein in pregnancy. Dan Med Bull 1989, 37, 7–23.
- [6] **Abushoufa RA, Talbot JA, Brownbill K, Rafferty B, Kane JW, Robertson WR:** The development of a sialic acid specific lectin-immunoassay for the measurement of human chorionic gonadotropin glycoforms in serum and its application in normal and Down's syndrome pregnancies. Clin Endocrinol 2000, 52, 499–508.
- [7] **Yamamoto R, Azuma M, Wakui Y, Kishida T, Yamada H, Okuyama K, Sagawa T, Shimizu K, Satomura S, Fujimoto S:** Alpha-fetoprotein microheterogeneity: a potential biochemical marker for Down's syndrome. Clin Chim Acta 2001, 304, 137–141.
- [8] **Hampel DJ, Köttgen B, Dudenhausen JW, Köttgen E:** Fetal fibronectin as a marker for an imminent (preterm) delivery. A new technique using the glycoprotein lectin immunosorbent assay. J Immunol Methods 1999, 224, 31–42.

- [9] **Mercer BM:** Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003, 101, 178–193.
- [10] **Yamashita K, Kochibe N, Ohkura T, Ueda I, Kobata A:** Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized *Aleuria aurantia* lectin. *J Biol Chem* 1985, 260, 4688–4693.
- [11] **Goldstein IJ, Poretz RD:** Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Eds.: Liener IE, Sharon N, and Goldstein IJ, Academic Press, Orlando, FL 1986, 33–247.
- [12] **Yan L, Wilkins PP, Alvarez-Manilla G, Do SI, Smith DF, Cummings RD:** Immobilized *Lotus tetragonolobus* agglutinin binds oligosaccharides containing the Le x determinant. *Glycoconjugate J* 1997, 14, 45–55.
- [13] **Knibbs R, Goldstein IJ, Ratcliff RM, Shibuya N:** Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins. *J Biol Chem* 1991, 266, 83–88.
- [14] **Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N:** The purification, composition, and specificity of the Anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 1975, 250, 8518–8523.
- [15] **Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ:** The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2,6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 1987, 262, 1596–1601.
- [16] **Audette GF, Vondonselaar M, Delbaere LTJ:** The 2.2 Å resolution structure of the O(H) blood-group-specific Lectin I from *Ulex europaeus*. *J Mol Biol* 2000, 304, 423–433.
- [17] **Katnik I, Jadach J, Krotkiewski H, Gerber J:** Investigating the glycosylation of normal and ovarian cancer hapto-globins using digoxigenin-labeled lectins. *Glycosyl Dis* 1994, 1, 97–104.
- [18] **Kelm S, Schauer R:** Sialic acids in molecular and cellular interactions *Int Rev Cytol* 1997, 175, 137–240.
- [19] **Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernandez J, Ramirez H, Delannoy P, Zenteno E:** Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol B* 2000, 126, 415–424.
- [20] **Van Rooijen JJ, Jeschke U, Kamerling JP, Vliegthart JF:** Expression of N-linked sialyl Le (x) determinants and O-glycans in the carbohydrate moiety of human amniotic fluid transferrin during pregnancy. *Glycobiology* 1998, 8, 1053–1064.
- [21] **Jones CJP, Kimber SJ, Illingworth I, Aplin JD:** Decidual sialylation shows species-specific differences in the pregnant mouse and rat. *J Reprod Fertil* 1996, 106, 241–250.

Adres do korespondencji:

Magdalena Orczyk-Pawłowicz
Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii AM
ul. Bujwida 44a
50-345 Wrocław
e-mail: iwona@immchem.am.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 15.04.2004 r.

Po recenzji: 7.05.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 3.06.2004 r.

Received: 15.04.2004

Revised: 7.05.2004

Accepted: 3.06.2004