PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 47, ISSUE 2/2020
(99–222)

www.pbkom.pl

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Redaguje Kolegium – Editors:

Barbara CHWIROT – *biologia komórki, biologia nowotworów botanika bchwirot@umk.pl*

Agata FILIP – *genetyka medyczna, onkologia a.filip@umlub.pl*

Grażyna HOSER – *cytometria, komórki macierzyste graho@cmpk.edu.pl*

Lilla HRYNIEWIECKA – *energetyka komórki, mitochondria lillah@amu.edu.pl*

Bożena KAMIŃSKA-KACZMAREK – *neurobiologia, biologia molekularna bozenakk@nencki.gov.pl*

Jerzy KAWIAK – *immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów jkawiak@cmkp.edu.pl*

Wincenty KILARSKI – *mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek wincenty.kilarski@uj.edu.pl*

Andrzej K. KONONOWICZ – *komórki roślinne, regulacja ekspresji genów u Pro- i Eukaryota, inżynieria genetyczna akononow@biol.uni.lodz.pl*
Krzysztof LEWANDOWSKI – *hematologia, onkologia, komórki macierzyste krzysztof.lewandowski@sk1.am.poznan.pl*

Marek MALESZEWSKI – *biologia komórki, embriologia zwierząt maleszewski@biol.uw.edu.pl*

Janusz MASZEWSKI – *komórki roślinne, regulacja cyklu komórkowego, organizacja jądra komórkowego i struktura chromatyny jmasz@biol.uni.lodz.pl*

Michał NOWICKI – *hemopoeza, nefrologia, organizacja i rozwój naczyń krwiononośnych mnowicki@ump.edu.pl*

Barbara PŁYTYCZ – *immunologia barbara.plytycz@uj.edu.pl*

Zdzisław SMORĄG – *klonowanie zwierząt, zwierzęta transgeniczne, regulacja płci, hodowla gamet i zarodków in vitro, sterowan rozród zwierząt zdzislaw.smorag@izoo.krakow.pl*

Maciej ZABEL – *histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek mazab@amp.edu.pl*

Jan ŻEROMSKI – *patologia, immunologia, cytometria jzeromski@amp.edu.pl*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:
Andrzej ŁUKASZYK – przewodniczący, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORĄŻY, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office:
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, tel. 61 854 64 53, fax 61 854 64 40 *mnowicki@ump.edu.pl*
Redaktor techniczny – Zuzanna Podemska-Jedrzejczak *zpodemsk@ump.edu.pl*
@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – *Foundation for Cell Biology and Molecular Biology*
Indexed in: Biological Abstracts, Science Citation Index Expanded (SciSearch), Journal Citation Reports/Science Edition, BIOSIS Previews, Ulrich`s International Periodicals Directory, New Jersey, AGROS.

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Poznań, 2020-07-30

ROLA CZYNNIKA Nrf2 I JEGO AKTYWATORÓW W PATOGENEZIE WYBRANYCH CHORÓB ZWIĄZANYCH Z DYSFUNKCJĄ UKŁADU NERWOWEGO

THE ROLE OF Nrf2 FACTOR AND ITS ACTIVATORS IN THE PATHOGENESIS OF SELECTED NERVOUS SYSTEM DISEASES

Patrycja PAŃCZYSZYN-TRZEWIK[1], Agata SUROWIEC[2], Jeremi WNOROWSKI[2], Ruslan ZAVATSKYI[1], Magdalena SOWA-KUĆMA[1]

[1]Zakład Fizjologii Człowieka, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski
[2]Studenckie Koło Naukowe Fizjologii „Neuron" Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

Streszczenie: Jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 – Nrf2 stanowi jeden z kluczowych elementów odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny. Nrf2 reguluje ekspresję szeregu genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (tj. S-transferaza glutationowa; oksygenaza hemowa 1 czy katalaza). Co więcej, doniesienia naukowe sugerują że modulacja wewnątrzkomórkowej ścieżki Keap1-Nrf2 jak i aktywatory Nrf2 mogą stanowić nowy cel terapii chorób w patogenezie których wskazuję się na istotność współwystępowania zaburzonej homeostazy oksydacyjnej z nadmierną aktywacją układu immunologicznego. Aktywatory Nrf2 (tj. sulforafan, TBE-31, fumaran dimetylu) wykazują działanie antyoksydacyjne, neuroprotekcyjne, przeciwdepresyjne oraz przeciwzapalne. Aktywacja czynnika Nrf2, stanowi więc obiecujący kierunek poszukiwania skuteczniejszych form leczenia licznych schorzeń w tym chorób neurodegeneracyjnych czy zaburzeń depresyjnych.

Słowa kluczowe: Nrf2, stres oksydacyjny, aktywatory Nrf2, układ nerwowy

Summary: The nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) is a key regulator of antioxidant defenses, control genes encoding antioxidant enzyme (such as: glutathione-S-transferases, heme oxygenase-1 or catalase) in response to oxidative stress. Moreover scientific data, suggest that

modulation of intracellular Keap1-Nrf2 pathway as well as Nrf2 activators may be a novel pharmacological target for pathologies related with disturbance of oxidative stress and inflammatory. Nrf2 activators (e.g. sulforaphane,, TBE-31, dimethyl fumarate) have antioxidative, neuroprotective, antidepressant and anti-inflammatory activity. Nrf2 factor (especially its activation) seems to be a promising direction for defining more effective treatments of numerous diseases, including neurodegenerative diseases and depressive disorders.

Keywords: Nrf2, oxidative stress, Nrf2 activators, nervous system

WPROWADZENIE

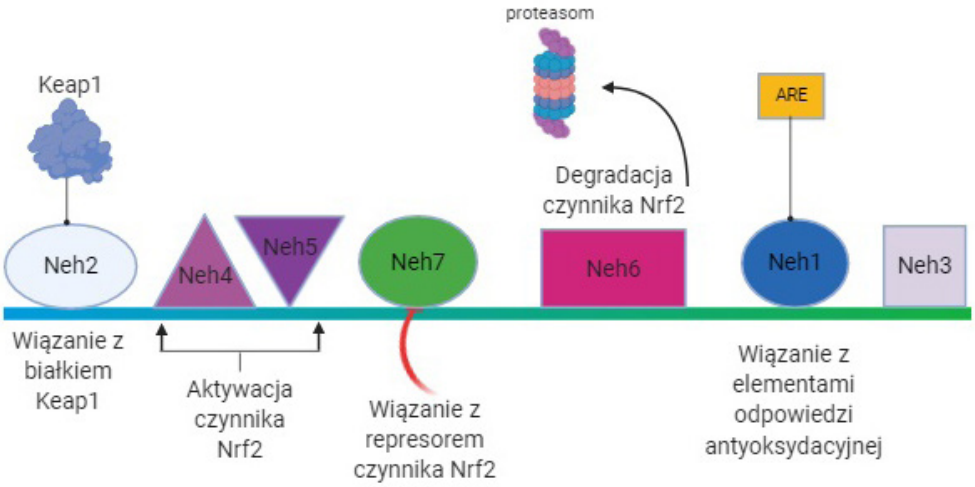
Zaburzenie równowagi pro- i antyoksydacyjnej określa się terminem stres oksydacyjny a jej konsekwencją jest nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species,* ROS). Stres, zanieczyszczenia, czy nieprawidłowa dieta to tylko niektóre z czynników, które mogą przyczynić się do powstawania ROS. Stres oksydacyjny prowadzi do szeregu uszkodzeń komórki, w tym struktury białek, lipidów, czy DNA. Coraz więcej doniesień naukowych wskazuje, że reakcjom stresu oksydacyjnego nierozerwalnie towarzyszą procesy zapalne. Co istotne, leżą one u podstaw rozwoju wielu chorób człowieka, w tym również chorób związanych z układem nerwowym [16]. Pierwszą linią obrony organizmu przed nadmierną produkcją ROS jest jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2,* Nrf2) [25]. Jako „molekularny strażnik" komórki chroni ją przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Stąd zaburzenia funkcji Nrf2 i możliwości modyfikacji jego aktywności wydają się być obiecującym kierunkiem w poszukiwaniu patomechanizmu i potencjalnej terapii wielu chorób, szczególnie tych, w przebiegu których obserwuje się zaburzenie równowagi oksydacyjno-zapalnej. Interesującym przykładem są schorzenia związane z dysfunkcją układu nerwowego, które stanowią główny przedmiot niniejszego artykułu.

CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY Nrf2 – OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Struktura ludzkiego czynnika Nrf2 została określona w 1993 r., a rok później białko to po raz pierwszy wyizolowano z ludzkiej linii komórek przewlekłej białaczki szpikowej (linia K562) [23]. Czynnik Nrf2 kodowany jest przez gen NFE2L2 zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 2 (2q 31.2). Ulega on ekspresji w większości tkanek, lecz największe stężenie osiąga w nerkach, tkance mięśniowej, płucach, sercu, wątrobie oraz mózgu [30]. Nrf2 zaliczany jest do podrodziny białek Cap'n'collor (CNC), które w swojej strukturze zawierają cha-

rakterystyczny element molekularny (tzw. motyw zamka lecynowego, ang. *basic leucine zipper,* bZip) umożliwiający wiązanie z jądrowym DNA. W strukturze białka Nrf2 można wyróżnić siedem homologicznych, funkcjonalnych domen (Neh1-Neh7) [24]. Neh1 zawiera region CNC-bZip umożliwiający przyłączenie czynnika Nrf2 do jądrowego DNA oraz wiązanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. W domenie 2 (Neh2) w regionie N-końcowym wyróżnia się dwa motywy DLG (sekwencja aminokwasowa leucyna 23 do arginina 43; niskie powinowactwo wiązania) oraz ETGE (sekwencja aminokwasowa glutamina 73 do izoleucyna 86; wysokie powinowactwo wiązania), które zapewniają stabilizację oddziaływania białka Keap1 z Nrf2 w cytoplazmatycznym kompleksie. Neh3 wykazuje zdolność wiązania z chromo-ATP-azą. Z kolei domeny Neh4 i Neh5 zaangażowane są w regulację funkcjonalnej aktywności transkrypcyjnej czynnika Nrf2. Domena Neh6 zawiera dwa motywy DSGIS (sekwencja aminokwasowa asparagina 329 do seryna 342) i DSAPGS (sekwencja aminokwasowa seryna 363 do kw. glutaminowy 379). Funkcja konserwatywnej domeny Neh6 związana jest z regulacją m.in. procesu protesomalnej degradacji czynnika Nrf2. Neh7 stanowi najnowszą zdefiniowaną i opisaną domenę struktury Nrf2. Domena wiąże się z receptorem kwasu retinowego alfa warunkując zahamowanie aktywności transkrypcyjnej Nrf2 jak i zależnych od niego genów [15] (Ryc. 1).

Główną funkcją białka Nrf2 w komórce jest aktywacja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (tzw. enzymy II fazy). W grupie tej wyróżnia się m.in. S-transferazę glutationową (ang. *glutathione-S-transferase,* GST), oksygenazę hemową 1 (ang. *heme oxygenase-1,* HO-1) czy katalazę [1]. Najogólniej mówiąc,



RYCINA 1. Struktura białka Nrf2. Opracowano na podstawie [24, 13]
FIGURE 1. Structure of Nrf2 protein. Based on [24, 13]

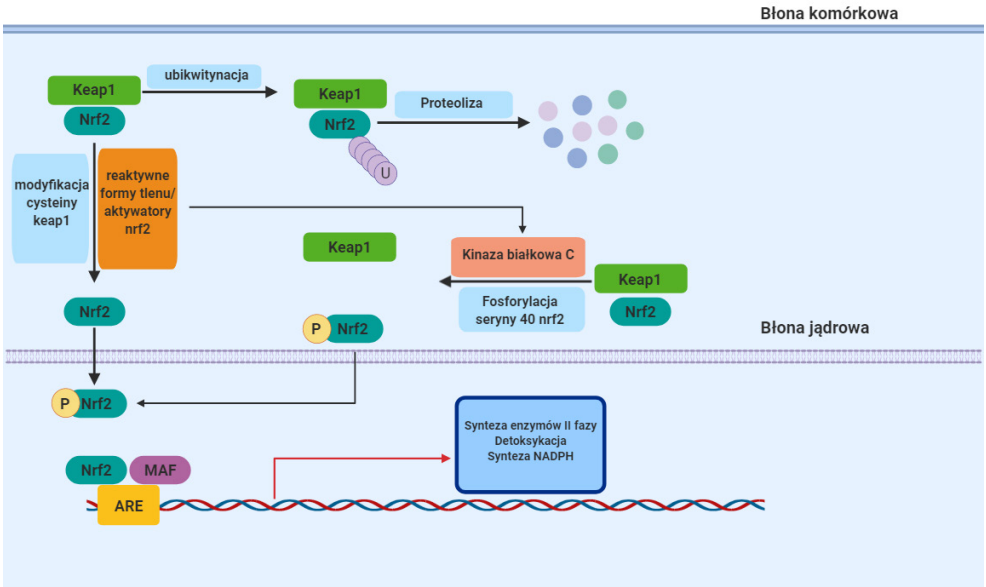
mechanizm ich działania polega na neutralizacji ROS powstających w przebiegu stresu oksydacyjnego w komórce, co pozwala zachować homeostazę oksydacyjną. Można zatem wysnuć stwierdzenie, że czynnik transkrypcyjny Nrf2 stanowi kluczowy element maszynerii molekularnej zaangażowanej w odpowiedź komórki na stres oksydacyjny. Coraz więcej doniesień naukowych wskazuje na rolę Nrf2 w regulacji ekspresji genów kodujących: neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor,* BDNF) czy białko p62 (białko związane z procesem autofagii komórkowej) [36]. Ponadto, oprócz wskazanej głównej funkcji antyoksydacyjnej, Nrf2 zaangażowany jest w regulację procesów przeciwzapalnych komórki, głównie poprzez hamowanie czynnika transkrypcyjnego kappaB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells,* NF-κB*).* Regulacja procesów przeciwzapalnych łączona jest również z aktywnością wewnątrzkomórkowego szlaku Nrf2-HO-1. Wykazano bowiem, że zarówno poziom mRNA jak i białka HO-1 w komórce podlega ścisłej regulacji Nrf2-zależnej [41]. Komórkowa aktywność HO-1 związana jest z enzymatyczną degradacją hemu do tlenku węgla i wolnych jonów żelaza oraz biliwerdyny do bilirubiny. Tlenek węgla wykazuje działanie hamujące na szlak zależny od czynnika NF-κB, prowadząc do obniżenia poziomu ekspresji cytokin prozapalnych [1]. Sugeruje się, że funkcje antyoksydacyjne i przeciwzapalne czynnika Nrf2 w ośrodkowym układzie nerwowym są wynikiem oddziaływania i wzajemnej regulacji z NF-κB. Dynamika zmian interakcji tych dwóch czynników transkrypcyjnych nie została w pełni poznana, stwarza jednak interesujący cel naukowy mogący wyjaśnić szereg regulacji komórkowych zaangażowanych w funkcje biologiczne Nrf2 [3].

MECHANIZMY REGULACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ ŚCIEŻKI Nrf2-ZALEŻNEJ

Regulacja aktywności Nrf2 jest procesem złożonym z kaskady kilku reakcji, w którą zaangażowanych jest wiele czynników komórkowych. Wskazana modulacja aktywności czynnika Nrf2 jest zależna od stanu fizjologicznego komórki.

W warunkach prawidłowych (niestresowych) czynnik Nrf2 jest związany z białkiem Keap1 (ang. *kelch-like ECH-associated protein 1*), stanowiącym formę białka represorowego, zlokalizowanego w cytoplazmie. W strukturze ludzkiego białka Keap1 wyróżnia się 5 domen: domenę N-końcową (ang. *N-terminal region*, NTR), domenę BTB (ang. *bric a brac domen*), domenę stanowiącą region powtórzeń glicyny (ang. *double glycine region,* DGR), region pośredni szczególnie bogaty w cysteinę (ang. *intervening region,* IVR) oraz domenę C-końcową (ang. *C-terminal region,* CTR*)*. DGR oraz CTR wiążą się do drugiej domeny białka

Nrf2 (Neh2) regulując tym samym interakcje Keap1-Nrf2 w kompleksie cytoplazmatycznym [24]. W warunkach prawidłowych utworzony kompleks uniemożliwia transport Nrf2 do jądra komórkowego, przez co czynnik ten pozostaje w formie nieaktywnej biologicznie. Wykazano również, że istotnym elementem regulacji poziomu Nrf2 w komórce jest proces ubikwitynacji polegający na dołączaniu specyficznych reszt ubikwityny predysponujących białko do rozkładu enzymatycznego w proteasomach (układ ubikwityna/proteasom 26S) [2]. W regulacji procesu degradacji proteosomalnej najistotniejszą rolę odgrywa aktywność ligazy ubikwityny E3 związanej z kuliną, która hamuje aktywność transkrypcyjną czynnika Nrf2 [1].



RYCINA 2. Mechanizmy regulacji wewnątrzkomórkowej ścieżki Nrf2-zależnej.
W warunkach prawidłowych cytoplazmatyczny kompleks Keap1-Nrf2 podlega degradacji proteolitycznej (układ ubikwityna/proteasom). Wzrost reaktywnych form tlenu lub aktywatory Nrf2 warunkują rozpad kompleksu Keap1-Nrf2 (zmiana konformacji białka Keap1, fosforylacja czynnika Nrf2). Uwolniony Nrf2 migruje do jądra komórkowego łączy się z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej ARE indukując transkrypcje enzymów antyoksydacyjnych (m.in. enzymów II fazy). Opracowano na podstawie [9]
FIGURE 2. Mechanisms of Nrf2-dependent intracellular signaling pathway.
Under normal (unstressed) conditions Nrf2 is subject to proteolytic degradation (ubiquitin / proteasome pathway mediated by Keap1 protein). During increase the reactive oxygen species or Nrf2 activators, Nrf2 is derepressed via modification of Keap1protein or phosphorylation of a serine residue (Ser40) in the Neh2 domain of Nrf2. Next Nrf2 translocates into nucleus and activates selected target genes through antioxidant response elements, exerting antioxidant effects. Based on [9]

Wzrost poziomu ROS, bądź ekspozycja na specyficzne aktywatory Nrf2 (np. sulforafan, TBE-31, fumaran dimetylu, kurkumina, resweratrol, kwercetyna) zapoczątkowują zmiany, w efekcie których kompleks Keap1-Nrf2 ulega rozpadowi. Badania naukowe wskazują, że mechanizm tej reakcji związany jest z utlenieniem reszt cysteinowych (szczególnie cysteiny w pozycji 151) obecnych na powierzchni białka Keap1, warunkujących zmiany organizacji przestrzennej białka Keap1 i ostatecznie oddysocjowanie Nrf2 z kompleksu. Następnie, czynnik ten na drodze transportu aktywnego przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie heterodimeryzuje z małymi białkami Maf (ang. *small Maf proteins,* sMaf). Umożliwia to rozpoznanie i oddziaływanie z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. *antioxidant response element,* ARE). Proces ten jest niezbędny do indukcji ekspresji genów i w następstwie syntezy enzymów antyoksydacyjnych [25] (Ryc. 2).

Zaprezentowany mechanizm aktywacji Nrf2 jest jak dotąd najlepiej opisanym, jednak jak się okazuje, w świetle najnowszych danych literaturowych, nie jedyny. Wskazuje się między innymi na istotną rolę modyfikacji potranslacyjnych czynnika Nrf2 (np. fosforylacja przez kinazę białkową C, szczególnie na serynie 40), czy mechanizmów epigenetycznych (np. metylacja promotorów genów; acetylacja/fosforylacja białek histonowych; regulacja przez małe niekodujące cząsteczki RNA – mikroRNA – miR153, miR27a; miR144) zaangażowanych w kontrolę ekspresji genów KEAP1 i NFE2L2 [18].

ZNACZENIE AKTYWNOŚCI KOMÓRKOWEJ CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO Nrf2 W PATOGENEZIE WYBRANYCH CHORÓB ZWIĄZANYCH Z UKŁADEM NERWOWYM

Aktualnie w bazie PubMed znajduje się ponad 14 tys. prac opisujących funkcje Nrf2 oraz jego potencjalne korelacje z różnymi chorobami, w tym nowotworami (ponad 5 tys. prac), chorobami sercowo-naczyniowymi (ponad 1,3 tys. prac), chorobami układu oddechowego (ponad 800 prac), chorobami neurodegeneracyjnymi (757 prac), udarem niedokrwiennym mózgu (227 prac), czy zaburzeniami depresyjnymi (133 prac).

Ze względu na fakt, iż rola czynnika Nrf2 w patogenezie i chemioterapii chorób nowotworowych jest najobszerniej dyskutowana, w niniejszej pracy autorzy skupili się przede wszystkim na wybranych schorzeniach związanych z dysfunkcją układu nerwowego.

CHOROBY NEURODEGENERACYJNE

Wraz z postępującym starzeniem się społeczeństwa, odnotowuje się stały trend wzrostu liczby osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne. Prognozy statystyczne wskazują, że już w 2030 r. liczba pacjentów ze zdiagnozowanymi

schorzeniami neurodegeneracyjnymi w samej tylko Polsce przekroczy 9 milionów [17]. Choroby te stanowią zależny od wieku, nieuleczalny zespół heterogennych zaburzeń, których cechą wspólną jest postępujący proces neurodegeneracji komórek mózgowych. Wśród najczęściej występujących wyróżnia się: chorobę Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, stwardnienie rozsiane, czy ataksję rdzeniowo – móżdżkową. Pomimo intensywnych badań, patogeneza zaburzeń neurodegeneracyjnych w dalszym ciągu jest niewystarczająco poznana, co znajduje odzwierciedlenie w braku skutecznych ich terapii [16].

W etiopatogenezie chorób neurodegeneracyjnych (szczególnie w chorobie Alzheimera i Parkinsona) u pacjentów obserwuje się zaburzenie potencjału redukcyjno-oksydacyjnego [14]. Co więcej w przebiegu choroby Alzheimera wskazuje się, że wzrost poziomu ROS jest skorelowany ze stopień toksyczności złogów amyloidu-beta [40]. Dysfunkcja głównych komórkowych układów antyoksydacyjnych w rozwoju powyższych chorób została powiązana z rolą zmian aktywności czynnika Nrf2 [12].

Choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer's disease,* AD)

W badaniach mających na celu poszukiwanie mechanizmów chorób neurodegeneracyjnych lub możliwości ich terapii najczęściej wykorzystuje się zwierzęce modele. W przypadku AD, do najważniejszych zalicza się modele transgeniczne oparte na mutacji genu APP (gen białka prekursorowego β-amyloidu), MAPT (gen kodujący białko tau), apoE (gen kodujący apolipoproteinę E) oraz genów presenilin [42].

W zakresie badań przedklinicznych Mota i wsp., podjęli próbę oceny roli czynnika Nrf2 w transgenicznym zwierzęcym modelu AD tj. mysim modelu 3xTg-AD [31]. Model ten został opisany w 2003r., i oparty jest na mutacji genu APP, preseniliny 1 oraz białka tau. Należy zaznaczyć, że model ten prezentuje u zwierząt najpełniejszy obraz patologii występujący w przebiegu klinicznym choroby Alzheimera [42]. W przeprowadzonym badaniu naukowcy zaobserwowali wzrost poziomu formy fosforylowanej czynnika Nrf2 na serynie 40 (p-S40-Nrf2) w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. *peripheral blond mononuclear cell,* PBMC) pozyskanych od 3-miesięcznych myszy 3xTg-AD. Co więcej, ocena poziomu białka Nrf2 została również przeprowadzona we frakcji jądrowej wyizolowanej z próbek kory mózgowej 3-miesięcznych myszy 3xTg-AD (samce, samice). Wyniki analiz biochemicznych u samców wykazały wzrost poziomu białka Nrf2 w korze mózgowej który był odwrotnie skorelowany z poziomem mRNA oraz białka dysmutazy ponadtlenkowej 1. Poziom ligazy glutaminianowo-cysteinowej (ang. *glutamate-cysteine ligase catalytic,* GCL) nie uległ zmianie. Interesującym jest również brak zmian w poziomie czynnika Nrf2 w korze mózgowej samic. Wyniki przedstawionego badania sugerują, że w przebiegu AD dochodzi do zaburzenia antyoksydacyjnej regulacji Nrf2-zależnej, ponieważ pomimo obserwowanej migracji czynnika Nrf2 do jądra komórkowego, synteza enzymów antyoksydacyjnych nie jest w nim zapoczątkowywana. Co więcej, wskazuje się,

że regulacja wewnątrzkomórkowych reakcji zintegrowanych z czynnikiem Nrf2, może być zależna od płci jak i odmienna dla danych grup wiekowych [31]. Potwierdzeniem roli Nrf2 w patogenezie AD są również wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem myszy Nrf2-KO (z delecją genu kodującego czynnik Nrf2; ang. *Nrf2 knockout mice;* Nrf2 $^{(-)/(-)}$). U zwierząt Nrf2$^{(-)/(-)}$, wykazano obniżony poziom ekspresji genu GSTM1 (gen zaangażowany w regulację aktywności antyoksydacyjnej S-transferazy glutationowej zależny od NFE2L2) oraz genów KRAS i WDFY1 zaangażowanych w regulacje sygnalizacji komórkowej i procesów zapalanych. Co więcej Rojo i wsp., wykazali u tych zwierząt gromadzenie się białka amyloidu-beta oraz zwiększoną fosforylację białka tau. Są to typowe cechy patologiczne, które obserwuje się w AD.W hipokampie myszy Nrf2-KO (w odniesieniu do szczepu dzikiego) wykazano również podwyższony poziom markerów stresu oksydacyjnego i parametrów prozapalnych. Obserwowanym zmianom towarzyszyły nieprawidłowości w procesie uczenia się przestrzennego oraz procesach pamięciowych, co jest również charakterystycznym objawem choroby [35].

W badaniach *post mortem* (pośmiertne), z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej podjęto próbę oceny lokalizacji komórkowej czynnika Nrf2 determinującej endogenną aktywację kaskad antyoksydacyjnych w hipokampie pacjentów z AD (dokładniej neurony pola CA1). Wyniki badań wykazały istotne statystycznie spadki poziomu czynnika Nrf2 w jądrze komórkowym neuronów hipokampa AD. Wyniki te zostały również potwierdzone w obserwacji preparatów z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego. Z kolei analiza molekularna przeprowadzona techniką Western Blot wykazała spadki poziomu białka Nrf2 we frakcji jądrowej kory mózgu pacjentów z AD, co jest zgodne ze zmiany w strukturze hipokampa chorych przedstawionymi powyżej [34].

Zaprezentowane wyniki badań, sugerują na silną korelację czynnika Nrf2 z etiopatogenezą choroby Alzheimera. Należy pamiętać, że w patogenezie AD istotna jest zarówno aktywacja jak i supresja czynnika Nrf2. Jest to bardzo złożona zależność wieloukładowa, która nie jest w pełni opisana w literaturze naukowej. Wskazuje się, że ścieżka regulacji czynnika Nrf2 w chorobach neurodegeneracyjnych (również w AD), jest zależna od badanej struktury mózgowej; typu komórek jak również stadium choroby [13]. Co więcej istotnym jest również fakt, że obecne wyniki badań wskazują rolę czynnika Nrf2 w indywidualnej regulacji procesów amyloidopatii i taupatii. Brak jest ujęcia roli tego czynnika we wzajemnych regulacjach tych procesów patologicznych, które w przebiegu klinicznym AD często współwystępują u pacjentów. Ważnym jest również, brak uniwersalnego wzoru zmian ekspresji Nrf2, w przeprowadzanych badaniach o charakterze przedklinicznym i *post-mortem*. To dodatkowo wskazuje, że ścieżka regulacji czynnika Nrf2 jest układem bardzo złożonym.

Choroba Parkinsona (ang. *Parkinson's disease*, PD)

Wyniki badań przedklinicznych przeprowadzonych z wykorzystaniem myszy Nrf2-KO wykazały, że niedobór czynnika Nrf2 wzmacniał efekt indukowany podaniem toksyny – MPTP (1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) [10]. MPTP jest najlepiej poznaną substancją neurotoksyczną, która wykorzystywana jest do indukcji objawów choroby Parkinsona. U zwierząt jej podanie prowadzi do neurodegeneracji (m.in. uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w obrębie szlaku nigrostriatalnego prążkowia) zbliżonych do obrazu klinicznego PD [10]. Z kolei Williamson i wsp., w ocenie roli wewnątrzkomórkowej ścieżki Keap1-Nrf2 w przebiegu PD wykorzystali mechanizm wyciszania genu w procesie interferencji RNA (siRNA skierowane „przeciwko" KEAP1; siKeap1). Naukowcy zaobserwowali że dostrukturalne podanie siKeap1 w okolicy prążkowia myszy, indukowało efekt protekcyjny względem neuronów dopaminergicznych po podaniu MPTP [43]. Ponadto w zwierzęcym modelu PD, opartym na dostrukturalnym podaniu 6-hydroksydopaminy (6-OHDA, neurotoksyna indukująca procesy neurodegeneracyjne ścieżki nigrostriatalnej) wykazano zaburzenie równowagi antyoksydacyjnej związanej z gromadzeniem się ROS oraz nasiloną odpowiedź zapalną skorelowaną z aktywacją mikrogleju [4]. Przedstawione wyniki wskazują na potencjalną rolę aktywacji czynnika Nrf2 w regulacji systemów antyoksydacyjnych i zapalnych, których dysfunkcje obserwuje się w przebiegu PD.

Analiza wybranych biomarkerów stresu oksydacyjnego regulowanych przez czynnik Nrf2 przeprowadzona we krwi obwodowej pacjentów z PD (mutacja w genie kodującym białko parkinę – PARK2) wykazała u chorych podwyższone poziomy malonodialdehydu (produkt peroksydacji lipidów) i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [38].

W badaniach *post mortem* wykazano wzrost poziomu czynnika Nrf2 w istocie czarnej chorych. Zmiany lokalizacji czynnika Nrf2 (dokładniej jego translokacja z cytoplazmy i akumulacja w jądrze komórkowym) w neuronach istoty czarnej były pozytywnie skorelowane z aktywacją odpowiedzi antyoksydacyjnej zależnej od Nrf2 [34]. Co więcej Fao i wsp., w swojej pracy przeglądowej wskazują na fakt, że w przebiegu PD obserwowane zmiany aktywności czynnika Nrf2 są związane z wewnątrzkomórkową kaskadą reakcji PI3K/Akt/GSK-3β oraz regulacją czynnika NF-κB [15].

UDAR NIEDOKRWIENNY MÓZGU

Udary mózgu (krwotoczny lub niedokrwienny) stanowią trzecią, co do częstości przyczynę zgonów na świecie. Według statystyk udar niedokrwienny mózgu stanowi najczęstszą postać udarów (w populacji europejskiej około 80% wszystkich przypadków) [21]

W zakresie badań naukowych, podstawowym dyskutowanym zagadaniem jest rola regulacji i zmian dynamiki sygnalizacji zależnej od czynnika Nrf2 w prewencji jak i ukierunkowanej interwencji w stanach udaru niedokrwiennego.

Zwierzęce modele doświadczalne udaru niedokrwiennego polegają na ograniczeniu dostępu tlenu i glukozy do określonych rejonów tkanki nerwowej (struktur mózgu). Wśród wykorzystywanych w badaniach wyróżnia się modele odtwarzające warunki całkowitego (globalnego) lub częściowego (tzw. ogniskowego) oraz czasowego lub permanentnego (stałego) niedokrwienia [22].

W modelu częściowego trwałego niedokrwienia wywołanego zamknięciem tętnicy środkowej mózgu (ang. *permanent middle cerebral artery occlusion model,* pMCAO), wykazano wzrost poziomu białka Nrf2 oraz aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i oksygenazy hemowej-1 w strukturach mózgowych objętych niedokrwieniem [7]. Podobne wyniki opublikował Zhao i wsp. Zastosowany model pMCAO indukował u myszy wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i tendencję wzrostową poziomu malonodialdehydu. Obserwowane zmiany w aktywności wybranych parametrów stresu oksydacyjnego były pozytywnie skorelowane ze wzrostem poziomu białka Nrf2 i HO-1 w korze mózgowej objętej niedokrwieniem [48]. Co więcej, Zhao i wsp., wykazali że podanie paeonolu (20-hydroksy-40-metyloksyacetofenon, naturalny związek pozyskiwany z piwonii krzewiastej mający działanie antyoksydacyjne) warunkowało efekt neuroprotekcyjny, biochemicznie związany ze zwiększeniem aktywności (tzw. up-regulacja) ścieżki Nrf2-HO1-zależnej [48]. Interesującym są również wyniki badań Clausen i wsp., którzy wykazali, że podanie fumaranu (działającego przez szlak aktywacji czynnika Nrf2) w modelu pMCAO warunkowało: wzrost poziomu białka Nrf2, zwiększenie ekspresji Hsp72, wzrost poziomu cytokiny zapalnej IL-10 oraz obniżenie poziomu cytokiny IL-12p70 [11].

Wnioski jakie można wysunąć, z publikowanych wyników prac wskazują na potencjalną neuroprotekcję, warunkowaną aktywacją czynnika Nrf2. Innymi słowy, sugeruje się, że aktywacja czynnika Nrf2 (endogenna, egzogenna) może minimalizować skutki uszkodzeń warunkowanych niedotlenieniem. Oczywiście, wskazana funkcja czynnika Nrf2 wymaga jeszcze wielu dodatkowych badań.

ZABURZENIA DEPRESYJNE

Zaburzenia depresyjne stanowią istotny problem zdrowia psychicznego na świecie. Statystyki wskazują na coraz wyższą zachorowalność szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Szacuje się że stanowią one 4,4% globalnego obciążenia wszystkimi chorobami. Rocznie na depresję cierpi ponad 350 milionów osób. Niestety coraz częściej diagnozuje się ją w grupie osób młodych w tym również u dzieci [49].

W badaniach przedklinicznych zaburzeń depresyjnych, stosuje się zwierzęce modele depresji umożlwiające indukowanie zachowań podobnych do depresji

(ang. *depression like-behavior*). Obecnie w literaturze naukowej, opublikowano nie wiele prac oceniających rolę czynnika Nrf2 w regulacji zachowań typu depresyjnego.

W zwierzęcym modelu wymuszonej bezradności (ang. *learned helplessness*), w grupie doświadczalnej zwierząt wykazano obniżenie poziomu białek Keap1 oraz Nrf2 w korze przedczołowej i zakręcie zębatym hipokampa szczurów – strukturach mózgowych szczególnie istotnych w patogenezie depresji [46]. Z kolei w modelu przewlekłego łagodnego stresu (ang. *chronic mild stress,* CMS) naukowcy obserwowali obniżony poziom białka Nrf2 w korze przedczołowej grupy stresowanej [28]. Badania te sugerują, że ścieżka Keap1-Nrf2 jest zaangażowana w mechanizmy odporności na działanie czynników stresowych, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju zaburzeń depresyjnych. Bouvier i wsp., w szczurzym modelu porażki konfrontacji społecznej (ang. *social defeat*) oraz CMS wykazali zależność wykształcenia u zwierząt podatności (wrażliwości) na czynniki stresowe z utrzymującym się stresem oksydacyjnym. Co więcej zaburzona homeostaza oksydacyjna była skorelowana z niskim poziomem białka BDNF. Naukowcy również zaobserwowali, że niski poziom białka BDNF hamował translokację czynnika Nrf2 do jądra komórkowego konstytutywnie blokując aktywację enzymów antyoksydacyjnych i tym samym przywrócenie homeostazy oksydacyjnej [6].

Równie interesujące są wyniki, uzyskane z wykorzystaniem modeli transgenicznych. U myszy pozbawionych genu kodującego Nrf2, odnotowano zachowania (objawy) podobne do depresji u ludzi, tj. wydłużony czas bezruchu, czy anhedonia (brak odczuwania przyjemności). Obserwowanym zmianom behawioralnym towarzyszyły liczne zmiany biochemiczne, np. podwyższony poziom głównych cytokin zapalnych w surowicy krwi (m.in. interleukiny 6, interleukiny 10) oraz obniżony poziom białka BDNF i jego receptora TrkB (receptor z rodziny kinazy związanej z tropomiozyną; ang *tropomyosin receptor kinase B*, TrkB) w korze przedczołowej, polu CA3 i zakręcie zębatym hipokampa [19]. W innym badaniu u myszy Nrf2-KO wykazano również, zmieniony profil białek, takich jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor,* VEGF) i synaptofizyna, w porównaniu do szczepu dzikiego [27]

W badaniach *post mortem* w korze grzbietowo-bocznej przedczołowej (pole 9 Brodmanna) pacjentów z dużą depresją (ang. *major depressive disroder,* MDD*),* obserwowano spadki poziomu białka Nrf2 w porównaniu z grupą kontrolną [29].

Podsumowując, powyższe badania wskazują na istotną rolę Nrf2 w patomechanizmie wielu schorzeń układu nerwowego. Tym samym białko to wydaje się stanowić obiecujący punkt uchwytu dla nowoczesnych form terapii opisanych zaburzeń. Szczególnym zainteresowaniem naukowców cieszą się aktywatory czynnika Nrf2 (farmakologiczna aktywacja ścieżki Keap1-Nrf2) o wysokim potencjale terapeutycznym.

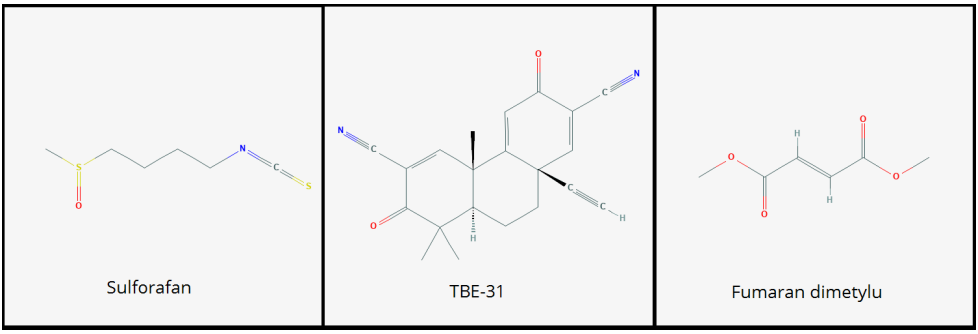
AKTYWATORY CZYNNIKA Nrf2 – JAKO POTENCJALNY CEL TERAPII WYBRANYCH CHORÓB ZWIĄZANYCH Z UKŁADEM NERWOWYM

SULFORAFAN

Sulforafan (*1-izotiocyjano-4-metylosulfinylobutan*, SFN) to siarkowy związek organiczny, którego prekursorem jest glukorafanina, występująca w warzywach krzyżowych, takich jak brokuły, czy kalafior [19]. Jest to związek o niskiej toksyczności oraz wysokiej biodostępności. Wykazuje on zdolność przenikania przez barierę krew-mózg, co jest cechą pożądaną dla wykorzystania go w potencjalnej terapii chorób związanych z zaburzeniem funkcji układu nerwowego [8]. W kontekście badań nad terapią chorób neurodegeneracyjnych, SFN oceniany jest przede wszystkim pod względem regulacji neuroplastyczności oraz procesu neurogenezy. Wyniki badań wskazują, że SFN łagodzi deficyty poznawcze w zwierzęcych modelach AD. Co więcej wykazuje on zdolność do ochrony komórek nerwowych (neuroprotekcja) przed mechanizmami cytotoksycznymi związanymi z agregacją białka amyloidu-beta [47]. Zastosowanie SFN w mysim modelu choroby Parkinsona warunkowało wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, indukując tym samym efekt neuroprotekcyjny. Związek ten hamował również nadmierną aktywację mikrogleju w odpowiedzi na reakcję zapalną wykazując potencjalne właściwości przeciwzapalne [20]. Potencjał neuroprotekcyjny sulforafanu wykazano również w badaniach nad potencjalizacją terapii udaru niedokrwiennego mózgu. Zastosowanie SFN warunkowało ochronę komórek przed stanem niedokrwienia, co było związane z aktywacją ścieżki Nrf2-zależnej [37]. Równie interesujące wydają się badania wskazujące na potencjalne przeciwdepresyjne działanie sulforafanu. Jego aktywność antydepresyjną i przeciwlękową wykazano np. w modelu chronicznego łagodnego stresu [44]. Z kolei badania naszego zespołu, po raz pierwszy ukazały, że sulforafan odwraca zachowania depresyjno-podobne w modelu usunięcia opuszek węchowych, który jest modelem depresji agitowanej (najczęstszej przyczyny samobójstw u ludzi) u myszy [33].

TBE-31

TBE-31 to związek, który dzięki obecności chemicznej grupy izocyjanianowej (Ryc. 3) ma zdolność łączenia się z białkiem Keap1, prowadząc tym samym do uwolnienia czynnika Nrf2 z kompleksu cytoplazmatycznego [32]. Działanie TBE-31 oceniano zarówno w badaniach *in vitro* (regulacja procesu neurogenezy komórek PC12 – komórki pochodzące z guza chromochłonnego wywodzące się z linii neuroblastów) [45] jak i *in vivo* prowadzonych z wykorzystaniem modeli różnych chorób. W schorzeniach związanych z układem nerwowym interesującym są wyniki wskazujące na potencjalne działanie przeciwzapalne tego związku.



RYCINA 3. Wybrane aktywatory czynnika Nrf2. Warto zwrócić uwagę na nukleofilowe grupy chemiczne, od których zależy wysokie powinowactwo do reszt cysteinowych białka Keap1 (warunkujące zmianę konformacji białka Keap1 i uwolnienie Nrf2 z kompleksu cytoplazmatycznego). Grupa izotiocyjanianowa (N=C=S) dla sulforafanu, dla TBE-31 grupa cyjanianowa,(C≡N), dla fumaranu dimetylu grupa karbonylowa zawarta w wiązaniu estrowym (C=O). Opracowano na podstawie [50]
FIGURE 3. The chemical structure of Nrf2 activators.
Significance role of nucleophilic chemical groups, on which the high affinity for the cysteine residues of the Keap1 protein is dependent (modification of cysteine residues in Keap1 protein subsequently leading to Nrf2 release from the cytoplasmic complex). The isothiocyanate group (N = C = S) for sulforaphane, the cyanate group, (C≡N) for TBE-31; the carbonyl group contained in the ester bond (C = O) for dimethyl fumarate. Based on [50]

W modelu depresji indukowanym podaniem lipopolisacharydu, po zastosowaniu TBE-31 we krwi myszy obserwowano m.in. obniżenie poziomu czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor α,* TNF-α*),* stanowiącego najlepiej opisaną cytokinę prozapalną. Związek ten również wykazywał działanie przeciwdepresyjne (m.in. zmniejszył czas bezruchu myszy w teście zawieszenie za ogon oraz teście wymuszonego pływania) [45].

FUMARAN DIMETYLU (ang. *dimethyl fumarate*, DMF)

Fumaran dimetylu ma już zastosowanie kliniczne w leczeniu postaci rzutowo-remisyjnej (najczęstsza postać) stwardnienia rozsianego. Lek Tacfidera (nazwa handlowa) jest doustnym estrem kwasu fumarowego, zawierającym aktywny metabolit w postaci fumaranu dimetylu. Obecnie jest to jedyny zarejestrowany lek działający bezpośrednio na czynnik Nrf2 (regulacja szlaku Nrf2-zależnego) [26]. Badania kliniczne trzeciej fazy wykazały, że DMF warunkował zmniejszenie częstości nawrotów postaci rzutowo remisyjnej stwardnienia rozsianego w porównaniu do grupy osób otrzymujących placebo [5]. Lek Tecfidera według zaleceń producenta winien być przyjmowany w postaci doustnej w dawkach: 120 do 240 mg dwa razy dziennie. Prace naukowe nad rolą DMF wciąż są intensywnie realizowane. Dla przykładu Wang i wsp., w badaniach prowadzonych na

progenitorowych komórkach nerwowych, wykazali że DMF zmniejszył produkcję ROS indukowaną H_2O_2. Co więcej, ten aktywator czynnika Nrf2 hamował komórkowe procesy apoptotyczne oraz zwiększył poziom mRNA i białka Nrf2. Autorzy także zasugerowali zaangażowanie wewnątrzkomórkowego szlaku Nrf-2-ERK1/2 MAPK w regulacji neuroprotekcji indukowanej przez DMF [39]. Efekt neuroprotekcyjny fumaranu został również ukazany w zwierzęcym modelu udaru niedokrwiennego mózgu [11].

PODSUMOWANIE

Czynnik transkrypcyjny Nrf2 jako „molekularny strażnik" niewątpliwie spełnia istotną rolę w regulacji procesów antyoksydacyjnych i zapalnych komórki. Liczne wyniki badań naukowych, wskazują na szereg zmian w regulacji ścieżki Nrf2-zależnej w przebiegu chorób, w patogenezie których dochodzi do zaburzenia homeostazy oksydacyjno-zapalnej w tym schorzeń neurodegeneracyjnych, udaru niedokrwiennego mózgu czy też zaburzeń nastroju. Zaprezentowane w niniejszym artykule wyniki badań, wskazują na potencjalną istotność aktywacji (szczególnie egzogennej) ścieżki Nrf2 w terapii wybranych jednostek chorobowych związanych z dysfunkcją układu nerwowego. W tym aspekcie aktualnie prowadzonych jest wiele prac, które wskazują, że aktywatory Nrf2 (tj. sulforafan, TBE-31, fumaran dimetylu,) indukują wielokierunkowe działanie m.in. antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwdepresyjne, przeciwlękowe czy neuroprotekcyjne. Istotnym potwierdzeniem roli aktywacji ścieżki Nrf2 w potencjalizacji powszechnie stosowanych metod farmakoterapii jest zarejestrowanie leku Tecfidera w leczeniu postaci rzutowo-remisyjnej stwardnienia rozsianego. Równie ciekawym wydają się być badania, których celem jest określenie roli czynnika Nrf2 jak i jego aktywatorów w patogenezie oraz farmakoterapii zaburzeń depresyjnych. Wiedza na temat roli Nrf2 w przebiegu zaburzeń depresyjnych jest stosunkowo mała, nie mniej w bazach naukowych obserwuję się coraz więcej prac podejmujących tę tematykę. Na podstawie przedstawiony wyników wydaje się, że sulforafan jako związek bioaktywny charakteryzujący się niską toksyczności jest najlepiej opisanym aktywatorem Nrf2 mogącym mieć istotne znaczenie w potencjalizacji terapii zaburzeń depresyjnych. Należy również mieć na uwadze fakt, że regulacja aktywności komórkowej czynnika Nrf2 może przebiegać odmiennie dla danych schorzeń układu nerwowego. Co więcej, należy mieć świadomość konieczności kontroli egzogennej aktywacji czynnika Nrf2, gdyż przedłużająca się aktywacja może zaindukować efekt negatywny w postaci progresji choroby. W przedstawionej tematyce artykułu wciąż jest wiele pytań, na które naukowcy poszukują odpowiedzi. W zakresie biologii komórki najistotniejszym jest dokładne poznanie

i opisanie molekularnych kaskad reakcji zaangażowanych w modulacje aktywności transkrypcyjnej czynnika Nrf2, jak i regulacji jego aktywacji komórkowej w periodyce długoterminowej. Bez wątpienie czynnik Nrf2 jest interesującym ale i również obiecującym cele molekularnych mogącym wyznaczyć nowe kierunki farmakoterapii chorób o podłożu neurobiologicznym oraz neurologicznym.

PODZIĘKOWANIA

Praca została częściowo sfinansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (UMO/2016/23/N/NZ4/01337; kierownik projektu: mgr inż. Patrycja Pańczyszyn-Trzewik) oraz działalności statutowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

LITERATURA

[1] AHMED SMU, LUO L, NAMANI A, WANG XJ, TANG X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; **1863**(2): 585-597.

[2] BAIRD L, LLÈRES D, SWIFT S, DINKOVA-KOSTOVA AT. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**(38): 15259-15264.

[3] BAKUNINA N, PARIANTE CM, ZUNSZAIN PA. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology* 2015; **144**(3): 365-373.

[4] BLANDINI F, ARMENTERO MT, MARTIGNONI E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008; S124-129.

[5] BOMPREZZI R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord* 2015; **8**(1): 20-30.

[6] BOUVIER E, BROUILLARD F, MOLET J, CLAVERIE D, CABUNGCAL JH, CRESTO N, DOLIGEZ N, RIVAT C, DO KQ, BERNARD C, BENOLIEL JJ, BECKER C. Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression. *Mol Psychiatry*. 2017; **22**(12):1701-1713.

[7] CHANG CY, KUAN YH, LI JR, CHEN WY, OU YC, PAN HC, CHEN CJ. Docosahexaenoic acid reduces cellular inflammatory response following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J Nutr Biochem* 2013; **24**(12): 2127-2137.

[8] CHEN D, HUANG C, JIN J, WU Y, CHEN Z. Effects of sulforaphane in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 2019; **853**: 153-168.

[9] CHEN J, ZHANG Z, CAI L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. *Diabetes Metab J* 2014; **38**(5): 337-345.

[10] CHEN PC, VARGAS MR, PANI AK, SMEYNE RJ, JOHNSON DA , KAN YW , JOHNSON JA. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(8): 2933-2938.

[11] CLAUSEN BH, LUNDBERG L, YLI-KARJANMAA M, MARTIN NA, SVENSSON M, ALFSEN MZ, FLÆNG SB, LYNGSØ K, BOZA-SERRANO A, NIELSEN HH, HANSEN PB, FINSEN B, DEIERBORG T, ILLES Z, LAMBERTSEN KL Fumarate decreases edema volume and improves functional outcome after experimental stroke. *Exp Neurol*. 2017; **295**:144-154.

[12] CUADRADO A. NRF2 in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Toxicol* 2016; **1**: 46-53.
[13] CYKOWIAK M, KRAJKA-KUŹNIAK V. Nrf2 jako terapeutyczny punkt uchwytu w profilaktyce i terapii chorób cywilizacyjnych. *Farmacja Współczesna* 2019; **12**: 42-49.
[14] DESHMUKH P, UNNI S, KRISHNAPPA G, PADMANABHAN B. The Keap1-Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophys Rev* 2017; **9**(1): 41-56.
[15] FÃO L, MOTA SI, REGO AC. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res Rev* 2019; **54**:100942.
[16] FISCHER R, MAIER O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev* 2015; **31**: 70569.
[17] GAWEŁ M., POTULSKA-CHROMIK A. Choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimera i Parkinsona. *Postępy Nauk Medycznych* 2015; **28**(7): 468-476.
[18] GUO Y, Yu S, ZHANG C., KONG ANT.: Epigenetic regulation of Keap1-Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med* 2015; **88**: 337-349.
[19] HASHIMOTO K. Essential role of Keap1-Nrf2 signaling in mood disorders: overview and future perspective. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 1182.
[20] JAZWA A, ROJO AI, INNAMORATO NG., HESSE M, FERNÁNDEZ-RUIZ J, CUADRADO A. Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. *Antioxid Redox Signal* 2011; **14**(12): 2347-2360.
[21] KAŹMIERSKI R. Diagnostyka i leczenie chorych w ostrej fazie udaru niedokrwiennego mózgu. *Anaesthesiology & Rescue Medicine/Anestezjologia i Ratownictwo* 2014; **1**: 62-75.
[22] KOWIAŃSKI P, LIETZAU G, DZIEWIĄTKOWSKI J, MORYŚ J. Doświadczalne modele zwierzęce udaru niedokrwiennego mózgowia. *Udar Mózgu. Problemy Interdyscyplinarne* 2009; **11**(2): 70-79.
[23] KRYSZTOFIAK A, KRAJKA-KUŹNIAK V. Kiedy obrona staje się niebezpieczna-czynnik transkrypcyjny Nrf2 a nowotwory. *Postepy Hig Med Dosw* 2015; **69**: 140-152.
[24] LEUNG CH, ZHANG JT, YANG GJ., LIU H, HAN QB, MA DL. Emerging Screening Approaches in the Development of Nrf2-Keap1 Protein–Protein Interaction Inhibitors. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(18): 4445.
[25] LI R, JIA Z, ZHU H. Regulation of Nrf2 Signaling. *React. Oxyg Species (Apex)* 2019; **8**(24): 312.
[26] LINKER RA, LEE DH, RYAN S, VAN DAM AM, CONRAD R, BISTA P, ELLRICHMANN G. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 2011; **134**(3): 678-692.
[27] MARTIN-DE-SAAVEDRA MD, BUDNI J, CUNHA MP, GÓMEZ-RANGEL V, LORRIO S, DEL BARRIO L. CUADRADO A. Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. *Psychoneuroendocrinology* 2013; **38**(10): 2010-2022.
[28] MARTIN-HERNÁNDEZ D, BRIS ÁG, MACDOWELL KS, GARCIA-BUENO B, MADRIAL JL, LEZA JC, CASO JR. Modulation of the antioxidant nuclear factor (erythroid 2-derived)-like 2 pathway by antidepressants in rats. *Neuropharmacology* 2016; **103**: 79-91.
[29] MARTIN-HERNÁNDEZ D, CASO JR., MEANA J J, CALLADO LF, MADRIGAL JL, GARCIA-BUENO B, LEZA JC. Intracellular inflammatory and antioxidant pathways in postmortem frontal cortex of subjects with major depression: effect of antidepressants. *J Neuroinflammation* 2018; **15**(1): 251.
[30] MOI P, CHAN K, ASUNIS I, CAO A, KAN YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(21): 9926-9930.
[31] MOTA SI, COSTA RO, FERREIRA IL, SANTANA I, CALDEIRA GL, PADOVANO C, OLIVEIRA CR. Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2015; **1852**(7): 1428-1441.

[32] ONYANGO EO, FU L, GRIBBLE GW. Synthesis of a dicyano abietane, a key intermediate for the anti-inflammatory agent TBE-31. *Org Lett* 2013; **16**(1): 322-324.
[33] PAŃCZYSZYN-TRZEWIK P, SOWA-KUĆMA M., STACHOWICZ K, MISZTAK P, NOWAK G. Antidepressant-like effect of (R, S)-sulforaphane (an activator of Nrf2) in the olfactory bulbectomy model in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2019; **29**: 128-129.
[34] RAMSEY CP, GLASS CA, MONTGOMERY MB, LINDL KA, RITSON GP, CHIA LA, HAMILTON RL, CHU CT, JORDAN-SCIUTTO KL. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; **66**: 75-85.
[35] ROJO AI, PAJARES M, RADA P, NUÑEZ A, NEVADO-HOLGADO AJ, KILIK R., CUADRADO A. NRF2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer's patients and worsens APP and TAU pathology. *Redox Biol* 2017; **13**: 444-451.
[36] SANDBERG M, PATIL J, D'ANGELO B, WEBER SG, MALLARD C. NRF2-regulation in brain health and disease: implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology* 2014; **79**: 298-306.
[37] SUN Y, YANG T, MAO L, ZHANG F. Sulforaphane protects against brain diseases: Roles of cytoprotective enzymes. *Austin J Cerebrovasc Dis Stroke* 2017; **4**(1): 1054
[38] VINISH M, ANAND A, PRABHAKAR S. Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations. *Acta Biochim Pol*. 2011; **58**(2): 165-169.
[39] WANG Q, CHUIKOV S, TAITANO S, WU Q, RASTOGI A, TUCK SJ, COREY JM, LUNDY SK, MAO-DRAAYER Y. Dimethyl Fumarate Protects Neural Stem/Progenitor Cells and Neurons from Oxidative Damage through Nrf2-ERK1/2 MAPK Pathway. *Int J Mol Sci*. 2015; **16**(6): 13885-13907.
[40] WANG Y, SANTA–CRUZ K, DECARLI C, JOHNSON JA. NAD(P)H: quinone oxidoreductase activity is increased in hippocampal pyramidal neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; **21**(4): 525-531.
[41] WEI Y, LIU D, ZHENG Y, HAO C, LI H, OUYANG W. Neuroprotective Effects of Kinetin Against Glutamate-Induced Oxidative Cytotoxicity in HT22 Cells: Involvement of Nrf2 and Heme Oxygenase-1. *Neurotox Res*. 2018; **33**(4):725-737.
[42] WIĘDŁOCHA M, STAŃCZYKIEWICZ B, JAKUBIK M, RYMASZEWSKA J. Wybrane mysie modele oparte na mutacji genów APP, MAPT oraz presenilin wykorzystywane w badaniach nad patogenez ą choroby Alzheimera. *Postepy Hig Med Dosw* 2012; **66**: 415-430.
[43] WILLIAMSON TP, JOHNSON DA. JOHNSON JA. Activation of the Nrf2-ARE pathway by siRNA knockdown of Keap1 reduces oxidative stress and provides partial protection from MPTP-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2012; **33**(3): 272-279.
[44] WU S, GAO Q, ZHAO P, GAO Y, XI, Y, WANG X, MA Y. Sulforaphane produces antidepressant-and anxiolytic-like effects in adult mice. *Behav Brain Res* 2016; **301**: 55-62.
[45] YAO W, ZHANG JC, ISHIMA T, REN Q, YANG C, DONG C, HASHIMOTO K. Antidepressant effects of TBE-31 and MCE-1, the novel Nrf2 activators, in an inflammation model of depression. *Eur J Pharmacol* 2016; **793**: 21-27.
[46] ZHANG JC, YAO W, DONG C, HAN M., SHIRAYAMA Y, HASHIMOTO K. Keap1-Nrf2 signaling pathway confers resilience versus susceptibility to inescapable electric stress. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2018; **268**(8): 865-870.
[47] ZHANG R, MIAO QW, ZHU CX., ZHAO Y, LIU L, YANG J, AN L. Sulforaphane ameliorates neurobehavioral deficits and protects the brain from amyloid β deposits and peroxidation in mice with Alzheimer-like lesions. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2015; **30**(2): 183-191.
[48] ZHAO Y, FU B, ZHANG X, ZHAO T, CHEN L, ZHANG J, WANG X. Paeonol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury via upregulating expression of pAkt, Nrf2, HO-1 and ameliorating BBB permeability. *Brain Res Bull.* 2014; **109**: 61-67.
[49] https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression
[50] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 04.03.2020
Przyjęto: 15.04.2020
Magdalena Sowa-Kućma
Zakładu Fizjologii Człowieka, Instytut Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski
e-mail: msowa@ur.edu.pl, magda.sowa.kucma@gmail.com

AUTOIMMUNOLOGICZNE CHOROBY TARCZYCY – PRZEGLĄD LITERATURY

AN OVERVIEW OF AUTOIMMUNE THYROID DISEASES

Weronika SKOCZEK, Łukasz SALAMAGA, Wiktor SZYMAJDA, Bartosz ZALESKI Maksymilian SZYMCZAK, Mikołaj ARASZEWSKI, Kinga BRZEZIŃSKA, Maciej OWECKI

Katedra Medycyny Społecznej i Zakład Zdrowia Publicznego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: W ostatnim czasie rozwinęły się możliwości poznania dokładnych mechanizmów oraz przyczyn autoimmunologicznych schorzeń tarczycy. Podstawą jest dogłębne zrozumienie fizjologii i anatomii gruczołu tarczowego oraz zasad działania układu immunologicznego, w zrozumieniu patomechanizmu powstawania zmian strukturalnych oraz funkcjonalnych tarczycy. Po objaśnieniu tych fundamentalnych kwestii, skupiliśmy się na przedstawieniu istotnych klinicznie schorzeń z typu autoagresywnych zapaleń tarczycy, manifestujących się hipertyreozą tak jak choroba Gravesa- Basedowa oraz hipotyreozą na przykładzie zapalenia tarczycy Hashimoto. Immunologiczne aspekty łączące oba te schorzenia, to potencjalne miejsca innowacyjnych terapii celowanych. Bazują one głównie na przywróceniu równowagi pomiędzy klasami limfocytów prozapalnych (Th17), a limfocytów regulatorowych (Treg) w oparciu o hamowanie interleukiny-6 (IL-6) czy też czynnika transkrypcji Foxp3. Uwzględnione zostały także czynniki genetyczne, społeczne oraz środowiskowe mające bezpośredni wpływ na rozwijanie tych chorób, by pokazać złożoność procesu rozwijania autoimmunologicznych chorób tarczycy.

Słowa kluczowe: gruczoł tarczowy, nadczynność tarczycy, niedoczynność tarczycy, choroba Hashimoto, choroba Gravesa-Basedowa

Summary: Recently our possibilities of understanding the complexity of mechanisms and backgrounds of the autoimmune disorders have expanded. It is crucial to comprehensively understand physiology and anatomy of the thyroid gland as well as the immunological side of the problem to fully apprehend the pathomechanism of the structural and functional thyroid changes. We provided the overview of the most fundamental matters, however we emphasized the clinical relevance of the autoaggressive inflammations of the thyroid, manifesting as hyperthyroidism like Grave's disease or hypothyroidism by the example of the Hashimoto's thyroiditis. Mutual immunological aspects of those disorders are an

auspicious places for the targeted therapies. They are based mostly on returning balance between the proinflammatory lymphocytes T such as Th17 and the regulatory classes such as Treg by inhibiting an interleukin 6 (IL-6) or the transcriptive factor Foxp3. We also considered the importance of genetics, social and environmental factors to holistically show the complexity of the development of autoimmune thyroiditis.

Keywords: thyroid gland, hyperthyroidism, hypothyroidism, Hashimoto's disease, Graves' disease

ANATOMIA I FIZJOLOGIA TARCZYCY

ANATOMIA

Tarczyca jest wysoce unaczynionym nieparzystym gruczołem zlokalizowanym w przednio-dolnej części szyi i rozciąga się od kręgu C5 do T1. Od strony powierzchownej jest pokryta mięśniem szerokim szyi, mięśniem mostkowo-gnykowym oraz mostkowo-tarczowym. Tarczyca kształtem przypomina literę H i składa się z dwóch płatów, prawego i lewego oraz części środkowej – węziny, która łączy oba płaty. Waga gruczołu tarczowego wynosi od 15-20g i jest wyższa u mężczyzn, natomiast wymiary każdego z płatów wynoszą 4cm x 2cm x 2-3cm, a węziny 2cm x 2cm x 2-6mm [2].

U ok. 50% populacji występuje płat piramidowy wyrastający z jednego z płatów tarczycy lub węziny, kieruje się on pionowo do chrząstki tarczowatej, zazwyczaj w stronę lewą. Tarczyca pokryta jest warstwami powięzi szyjnej (głównie blaszki przedtchawiczej), a jej część przednia pokryta jest mięśniami podgnykowymi, natomiast ze strony bocznej przylega do mięśnia mostkowo-obojczykowo-sutkowego [12].

Ponadto gruczoł tarczowy pokrywa dwuwarstwowa włóknista torebka. Wewnętrzna warstwa torebki wnika w głąb gruczołu, tworząc przegrody, które dzielą tarczycę na płaty i płaciki zawierające pęcherzyki z trójjodotyroniną i tyroksyną. Od strony tylnej blaszka środkowa powięzi głębokiej szyi tworzy więzadło Berry'ego, które łączy oba płaty tarczycy z dwoma pierwszymi pierścieniami tchawiczymi oraz chrząstką pierścieniowatą [12]. Warto wspomnieć, że w obrębie tylnej części płatów tarczycy znajdują się 4 gruczoły przytarczyczne (po 2 na każdym płacie), które leżą pomiędzy dwiema warstwami torebki pokrywającej tarczycę [60].

Gruczoł tarczowy jest zaopatrywany w krew przez 2 parzyste naczynia, tętnicę tarczową górną, która jest odgałęzieniem tętnicy szyjnej zewnętrznej i biegnie do jednego z płatów tarczycy, gdzie oddaje 3 końcowe gałęzie, tylną, przednią, boczną, które bezpośrednio unaczyniają gruczoł. Drugim naczyniem jest tętnica tarczowa dolna, która jest gałęzią pnia tarczowo-szyjnego. Tętnica ta oddaje swoje gałęzie gruczołowe na tylnej części płata tarczycy, gdzie tworzą one liczne zespolenia z gałęziami gruczołowymi tętnicy tarczowej górnej. Zdolność tarczycy do tworzenia silnych zespoleń zewnątrzgruczołowych z okolicznymi narządami

(krtań, tchawica, przełyk), powoduje, że podwiązanie 4 tętnic tarczowych np. podczas operacji przy chorobie Gravesa-Basedowa nie powoduje obumarcia gruczołu.

Tarczyca jest bogato unerwiona przez włókna współczulne i przywspółczulne, które odchodzą z części szyjnej pnia współczulnego, a także przez odgałęzienia nerwu błędnego (X), nerw krtaniowy górny i nerw krtaniowy wsteczny [4].

FIZJOLOGIA

Do prawidłowej syntezy hormonów tarczycy niezbędny jest jod, który dostarczany jest do organizmu wraz z pożywieniem w formie organicznej. W procesie trawienia jod ulega redukcji do formy jodku (I^-), i w takiej formie jest substratem do syntezy hormonów tarczycy. Zwiększone zapotrzebowanie organizmu na jod występuje w trakcie ciąży oraz podczas karmienia piersią [43]. Transport anionu jodkowego z naczyń krwionośnych do wnętrza komórek pęcherzykowych tarczycy jest transportem aktywnym i wymaga NIS (symportera sodowo-jodowego) [14]. W komórkach pęcherzykowych tarczycy aniony jodkowe ulegają utlenieniu do jodu dzięki peroksydazie tarczycowej (TPO). Następnie jod łączy się kowalencyjnie z tyreoglobuliną tworząc prekursory hormonów tarczycy:

1) monojodotyrozynę (MIT),
2) dijodotyrozynę (DIT),

w zależności od liczby atomów jodu w tych cząsteczkach [19].

W wyniku połączenia MIT (donora) oraz sąsiedniego DIT (akceptora) w komórkach pęcherzykowych tarczycy powstaje trijodotyronina (T_3), natomiast gdy połączeniu ulegną 2 sąsiadujące cząsteczki DIT, powstaje tyroksyna. Tyroksyna stanowi ok. 80-90% wydzielanych hormonów, resztę stanowi T_3 [36]. W wyniku działania enzymu dejodynazy (D1, D2, D3) T_4 może ulegać przemianom do T_3 oraz rT_3 (0.9% wszystkich hormonów tarczycy) [3].

Na syntezę i metabolizm hormonów tarczycy mają wpływ 3 główne czynniki:

1) stymulacja przez TSH,
2) dostępność jodu w organizmie,
3) aktywność dejodynazy.

TSH stymuluje wzrost syntezy hormonów tarczycy na wielu etapach. Odpowiada za wzrost aktywności NIS, syntezę tyreoglobuliny oraz bezpośrednie wydzielanie hormonów do krwioobiegu. Sekrecja TSH przez przedni płat przysadki mózgowej jest stymulowana poprzez TRH, wydzielany przez podwzgórze. By uniknąć hiperstymulacji wydzielanie TRH i TSH regulowane jest na zasadzie ujemnego sprzężenie zwrotnego przez T_3 i T_4 [25]. Niedobór jodu prowadzi do obniżenia syntezy T_3 i T_4 i wzrostu sekrecji TSH. Natomiast nadmiar tego pierwiastka hamuje jodowanie tyreoglobuliny, co również prowadzi do zmniejszonej syntezy hormonów tarczycy – efekt Wolffa i Chaikoffa [59]. Gruczoł tarczowy syntetyzuje również kalcytoninę (w komórkach C), hormon regulujący gospodarkę wapniową we krwi [23].

NIEDOCZYNNOŚĆ TARCZYCY

Jest to jednostka chorobowa w której tarczyca wydziela niedostateczną ilość hormonów.

Częstość występowania związana jest z:
– płcią – częściej dotyka kobiety,
– rasą – częściej choruje rasa biała,
– chorobami autoimmunologicznymi,
– zespołem Downa oraz Turnera [5].

PRZYCZYNY

Przyczyny niedoczynności tarczycy dzielimy na pierwotne i wtórne. Do wtórnych zaliczamy problemy z wydzielaniem TSH przez przysadkę (guzy, zapalenia, martwicę itp.) lub TRH przez podwzgórze.

Przyczyny pierwotne związane są z dysfunkcją samej tarczycy. Można je podzielić na wrodzone oraz nabyte. Przyczyny wrodzone są to między innymi mutacje w genach *PAX8 i TTF-2 NKX2.1, NKX2.5,* które powodują niedostateczny wzrost tarczycy oraz mutacje w genach *DUOX2*, *DUOXA2, DEHAL1, SECISBP2* , które są odpowiedzialne za zaburzenia w syntezie hormonów tarczycy [46].

Natomiast przyczyny nabyte to:

– niedostateczna ilość jodu w diecie powoduje, że tarczyca nie wytwarza wystarczającej ilości hormonów, gdyż jod jest niezbędny do syntezy tych hormonów,

– nadmiar jodu w diecie (efekt Wolffa-Chaikoffa) powoduje zmniejszenie ilości wytwarzanych hormonów [38],

– uszkodzenie tarczycy (radioterapia okolic szyi, częściowe usunięcie chirurgiczne).

W badaniach przeprowadzonych w 2018 roku 42% pacjentów wykształciło niedoczynność tarczycy jako powikłanie po radioterapii [11],

– zapalenia tarczycy. Dzielimy je ze względu na etiologię na ostre infekcyjne, ostre nieinfekcyjne, podostre oraz autoimmunologiczne (np. choroba Hashimoto)

– spożywanie niektórych leków [46].

DIAGNOSTYKA NIEDOCZYNNOŚCI

Niedoczynność tarczycy diagnozujemy poprzez oznaczenie stężenia TSH (norma: 0.47 -4.64 mU/L), stężenie wolnej tyroksyny (f) oraz wolnej trójjodotyroniny (fT3). W niedoczynności wtórnej poziom TSH może być obniżony, normalny lub lekko podwyższony podczas gdy stężenie fT3 i fT_4 jest obniżone. Natomiast w niedoczynności pierwotnej poziom TSH jest podwyższony, a poziom fT_3 i fT_4 obniżony. W postaci subklinicznej poziom TSH jest podwyższony oraz o normalnym poziomie fT_3 i fT_4. Trzeba pamiętać że poziom TSH, zależny jest od pory roku (w okresie zimowym i wiosennym obserwuję się wzrost w porównaniu do reszty pór roku) oraz od pory dnia (wieczorem wyższy) [5].

Jednak same oznaczenie powyższych hormonów nie rozwiązuje ostatecznie problemu przyczyny niedoczynności. W dalszej diagnostyce stosuje się:

– badanie USG,

– oznaczanie przeciwciał przeciwtarczycowych,

– dokładny wywiad (wykluczenie niedoboru jodu w diecie, przewlekłe choroby wpływające na poziom hormonów),

– biopsja tarczycy,

– scyntygrafia tarczycy [16]

NADCZYNNOŚĆ TARCZYCY

Jest to jednostka chorobowa, w której tarczyca wydziela nadmierną ilość hormonów (T_3 i T_4). Występuje znacznie rzadziej niż niedoczynność tarczycy [55].

PRZYCZYNY

Tak samo jak w przypadku niedoczynności, przyczyny nadczynności dzielimy na pierwotne oraz wtórne. Pierwotne przyczyny nadczynności polegają na dysfunkcji samego gruczołu tarczowego:

– gruczolak tarczycy- nazywany jest gorącym, ponieważ wychwytuje większą ilość jodu do produkcji nadmiernej ilości hormonów tarczycy. Częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem i niedoborem jodu w diecie [49].

– choroba Gravesa-Basedowa,

– zapalenie tarczycy – skutkuje uwolnieniem wcześniej już wytworzonego hormonu do krwioobiegu. W dalszym przebiegu choroby związanej z zapaleniem tarczycy może wywołać niedobór hormonów tarczycy z powodu uszkodzenia miąższu gruczołu [8],

– genetyczne – występują mutacje w genie kodującym receptor TSH, co powoduje sporadyczną lub rodzinną nieautoimmunologiczną nadczynność tarczycy [20],

– osoby przyjmujące hormonoterapię tarczycy – nawet 20% populacji przyjmujących hormony występuje postać subkliniczna [10],

– w początkowej fazie ciąży podwyższony poziom dejodynazy jodotyroninowej, która rozkłada hormony T_3 i T_4 do form nieaktywnych, powoduje zwiększoną aktywność tarczycy. Z powodu podwyższonego poziomu estrogenów zwiększa się stężenie białka transportującego hormony tarczycy. Ponadto w czasie ciąży rośnie stężenie gonadotropiny kosmówkowej, która to ma podobna strukturę do TSH, przez co stymuluje tarczyce do nadmiernej syntezy hormonów. Ostatnim czynnikiem powodującym zwiększenie stężenia T_3 i T_4 jest dyfuzja tych hormonów przez łożysko, co zwiększa zapotrzebowanie organizmu kobiety na te substancje. Stężenie hormonów T_3 i T_4 na początku ciąży jest podwyższone, natomiast TSH obniżone [8].

Przyczyny wtórne wiążą się z nadmiernym wydzielaniem TSH przez przysadkę. Najczęstszą przyczyną tego jest obojętnochłonny gruczolak przysadki [55].

DIAGNOSTYKA NADCZYNNOŚCI

Podstawą w diagnozie nadczynności tarczycy jest oznaczenie stężenia TSH oraz T_3 i T_4 we krwi. W nadczynności pierwotnej rozróżniamy postać jawną oraz subkliniczną. W nadczynności subklinicznej poziom TSH jest obniżony lub nieoznaczalny, natomiast poziom hormonów tarczycy jest prawidłowy. W postaci jawnej stężenie TSH jest obniżone, natomiast T_3 i T_4 jest podwyższone. W nadczynności wtórnej poziom TSH jak i hormonów tarczycy jest podwyższony. Dalsza diagnostyka polega na przeprowadzeniu badań:

– oznaczanie przeciwciał przeciwko peroksydazie tarczycowej (TPO) oraz przeciwko receptorowi TSH, jednak mają one mniejsze znaczenie niż przy diagnostyce niedoczynności tarczycy,

– badanie wychwytu radioaktywnego jodu (I-) przez tarczycę, jest to badanie różnicujące przyczyny pierwotnej nadczynności,

– w nadczynności może występować również: anemia, limfocytoza, granulocytoza oraz podwyższone stężenia ASPAT, ALAT, ALP [47, 33].

ZABURZENIA STRUKTURY TARCZYCY

Tarczyca jest jednym z narządów organizmu człowieka, który jest bardzo podatny na powstawanie nieprawidłowości w jego budowie. Duży procent przypadłości przebiega bezobjawowo, dlatego ciężko jest ustalić dokładną statystykę tego zjawiska. Występuje wiele różnych czynników i przyczyn wywołujących zaburzenia w strukturze tarczycy.

Przykłady nieprawidłowości:

ZABURZENIA WRODZONE

Są one spowodowane nieprawidłową embriogenezą gruczołu tarczowego (dysgenezja tarczycy). Mogą się przejawiać w różny sposób, najczęściej jako:

- agenezja tarczycy, czyli całkowite niewykształcenie się narządu,
- hemiagenezja – częściowy brak,
- hipoplazja, gdy gruczoł posiada zmniejszoną objętość,
- ektopia, która oznacza nieprawidłową lokalizację gruczołu.

Takie wady są główną przyczyną prowadzącą do wrodzonej niedoczynności tarczycy [21].

WOLE

Wole nietoksyczne, inaczej zwane również obojętnym, to powiększenie tarczycy niewpływające na jej funkcjonowanie. Może mieć ono charakter miąższowy (wole miąższowe), czyli bez żadnych zgrubień. Gdy w badaniu palpacyjnym wyczuwalne są guzki, wtedy zmiana ta jest nazywana wolem guzkowym. Inna klasyfikacja bierze pod uwagę częstotliwość występowania wola i różnicuje go na przypadki sporadyczne (częstość poniżej 5%) i endemiczne (>5%) [39].

Na świecie głównym czynnikiem wywołującym powstawanie wola jest niedobór jodu. Jest to bardzo ważny mikroelement wchodzący w skład hormonów tarczycy- jego brak prowadzi do nadprodukcji TSH, co stymuluje komórki pęcherzykowe do wzrostu. W krajach rozwiniętych problem zniknął, ze względu na wprowadzenie do obiegu soli jodowanej. Inne częste czynniki ryzyka rozwoju wola nietoksycznego to m.in. okresowo zwiększone zapotrzebowanie na jod, np. w czasie ciąży, czy też palenie papierosów (dym zawiera toksyczne dla gruczołu tiocyjanki). Z nieleczonego wola obojętnego może powstawać wole guzkowe nadczynne, znane jako choroba Palmera. Ma ono autonomiczną zdolność syntezy T_3 i T_4 [31].

W przypadkach nadczynności i niedoczynności tarczycy stymulowane jest powstawanie wola toksycznego, które ma istotny wpływ na funkcjonowanie tarczycy. W krajach rozwiniętych główną tego przyczyną są choroby o podłożu autoimmunologicznym, np. choroba Gravesa-Basedowa i zapalenie tarczycy typu Hashimoto [39].

W wielu przypadkach wole prezentuje się bez objawów związanych z uciskiem na inne narządy, ale zdarza się, że u niektórych ludzi występują problemy z przełykaniem i oddychaniem. Ponadto może pojawiać się charakterystyczna chrypka spowodowana podrażnieniem strun głosowych, kaszel oraz uczucie "zatykania" w gardle [24].

GUZKI TARCZYCY

Guzki tarczycy niezwykle częsta patologią, która w większości pojawia się u płci żeńskiej. Guzki są niewielkie i często dopiero przy zastosowaniu badania ultrasonograficznego lekarze są w stanie je wykryć. Warto zaznaczyć, że w zdecydowanej większości, bo aż w 95% guzki te nie są zmianami złośliwymi. Decydującym badaniem odróżniającym zmiany łagodne od złośliwych jest biopsja cienkoigłowa [15].

DIAGNOSTYKA

Fizjologicznie tarczyca nie jest widoczna oraz przeważnie nie da się jej wyczuć palpacyjnie. Podstawą diagnostyczną, więc nie będzie badanie przedmiotowe, a badanie obrazowe, np. USG, KT, scyntygrafia. Ponadto badanie serologiczne w kierunku chorób tarczycy (fT_4, fT_3, TSH) pomoże w podaniu przyczyny zaburzenia struktury lub na podstawie jego wyników będzie można zdecydować o dalszym postępowaniu diagnostycznym.

PODSTAWY DZIAŁANIA UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Układ immunologiczny jest systemem trudnym do precyzyjnego zlokalizowania w ludzkim ciele. Wynika to z faktu iż, w dużej mierze jest zintegrowany z tkankami innych układów. Co ciekawe udowodniono, że masa wszystkich komórek tego układu jest równa masie mózgu. Układ odpornościowy zbudowany

jest z tkanki limfatycznej (przede wszystkim grasica i szpik kostny) oraz komórek biorących udział w odpowiedzi obronnej organizmu. Leukocyty to komórki odgrywające kluczową rolę w odpowiedzi odpornościowej organizmu. Dzielą się na bazofile, eozynofile, neutrofile, monocyty, limfocyty oraz komórki dendrytyczne [52].

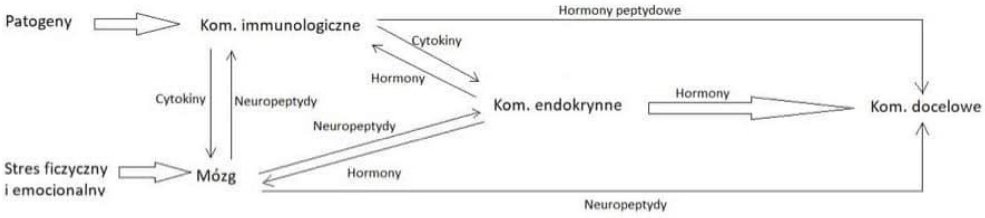
System immunologiczny odpowiada za rozpoznawanie oraz pozbywanie się komórek z nieprawidłowościami rozwojowymi oraz wzrostowymi. Ma ona miejsce w przypadkach nowotworzenia, podczas których dochodzi do niekontrolowanej proliferacji komórek, zaburzającej prawidłowe funkcjonowanie zdrowych tkanek. Do funkcji tego układu należy również eliminowanie obumarłych oraz uszkodzonych komórek, a także obrona przed czynnikami patogennymi, do których należą między innymi bakterie i wirusy. Nieprawidłowości działania układu immunologicznego mogą wynikać z błędnego rozpoznawania własnych i obcych komórek. W wyniku tego dochodzi do zwalczania komórek należących do gospodarza i procesów autoimmunizacyjnych. Jest to przyczyną występowania chorób autoimmunologicznych takich jak cukrzyca typu 1, czy choroba Gravesa-Basedowa. Nadmierna odpowiedź immunologiczna leży u podłożu powstawania alergii. Jest to stan, w którym tkanki stają się nadwrażliwe na działanie konkretnego czynnika. Jednak brak reakcji ze strony układu odpornościowego na obce antygeny spowodowany jest chorobami immunosupresyjnymi takimi jak AIDS [52].

W ludzkim organizmie odpowiedź immunologiczną dzielimy na wrodzoną i nabytą. Infekcje spowodowane przez drobnoustroje są wykrywane przez nieswoisty układ odpornościowy, co powoduje jego natychmiastową reakcję, a także wygenerowanie długotrwałej odpowiedzi adaptacyjnej. Odporność wrodzoną stanowią naturalne bariery, które są pierwszą linią obrony organizmu. Zaliczamy do nich skórę, urzęsiony nabłonek dróg oddechowych, a także warstwy śluzowe pokrywające drogi moczowo-płciowe i przewód pokarmowy. Ich główną funkcją jest stworzenie fizycznej zapory, zapobiegającej wniknięciu bakterii do organizmu. W mechanizmie wrodzonej odporności, po rozpoznaniu obcych antygenów, immunocyty niszczą i atakują patogeny, które zdołały przejść przez bariery obronne. Odpowiedź nabyta jest specyficzna antygenowo, co oznacza, że reaguje na obecność konkretnych antygenów i cząsteczek. Uczestniczą w niej głównie limfocyty T i B oraz komórki NK. Komórki plazmatyczne powstają z limfocytów B i mają zdolność do wytwarzania przeciwciał. Pobudzone limfocyty T atakują i likwidują zakażone komórki (limfocyty cytotoksyczne) oraz mogą pełnić funkcje regulatorowe (limfocyty pomocnicze). Komórki NK biorą udział w fazie początkowej odpowiedzi nieswoistej, a także niszczą komórki zakażone przez wirusy lub objęte procesem nowotworowym [52].

Podzbiorem limfocytów T są limfocyty Treg, będące komórkami supresyjnymi istotnymi w procesach autoimmunizacji oraz procesach zapalnych. Mają zdolność do ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 [26]. Limfocyty Treg

stanowią 10% komórek CD4+, co determinuje ich dużą rolę w utrzymaniu homeostazy, a także odporności organizmu [50]. Mają zasadnicze znaczenie w chorobach o podłożu autoimmunologicznym, gdyż odpowiadają za utrzymanie tolerancji immunologicznej na własne antygeny. Przy chorobach autoimmunologicznych i zapalnych napływ limfocytów Treg powoduje stłumienie zapalenia, co skutkuje zahamowaniem postępu choroby. Dzieje się tak, ponieważ Treg wykazują efekt supresorowy wobec podziałów limfocytów efektorowych, co skutkuje zahamowaniem produkcji cytokin prozapalnych [40]. Niedobór komórek Treg występuje na przykład u osób z reumatoidalnym zapaleniem stawów, czy też z toczniem rumieniowatym układowym [37].

Jest coraz więcej dowodów na istnienie związku pomiędzy układem immunologicznym, nerwowym oraz endokrynnym (Ryc. 1). Jednym z nich jest obecność wspólnych cząsteczek sygnałowych, a także ich receptorów. Obrazują to funkcje limfocytów, które są zdolne do wydzielania tyreotropiny, ACTH, hormonu wzrostu i kortykoliberyny. Również hormony produkowane w ludzkim organizmie mogą mieć wpływ na funkcjonowanie komórek układu immunologicznego. W wyniku stresu dochodzi do wzrostu stężenia kortyzolu, co wpływa na zmniejszenie powstawania przeciwciał, proliferacji limfocytów oraz aktywności komórek NK. Interakcja pomiędzy układami nerwowym, endokrynnym i odpornościowym jest dwukierunkowa. Do komunikacji tych układów dochodzi za pośrednictwem cytokin, neuropeptydów oraz hormonów. Mają na nie wpływ stres fizyczny, a także emocjonalny, przekazywane przez mózgowie oraz patogeny wykrywane przez komórki immunologiczne. Układ nerwowy kontroluje gruczoły endokrynne poprzez wydzielanie hormonów tropowych. Są one również kontrolowane przez układ odpornościowy, który również ma zdolność do sekrecji tych hormonów. Mózg i komórki immunologiczne współpracują poprzez wydzielanie cytokin przez leukocyty oraz produkcję neuropeptydów przez ośrodkowy układ nerwowy [52].



RYCINA 1. Ten model pokazuje interakcje chemiczne zachodzące między układami: nerwowym, hormonalnym i immunologicznym (zmodyfikowano wg. Silverthorn DU, Fizjologia zintegrowane podejście 2018 [52])

FIGURE 1. This model shows chemical interactions that occur between nervous, endocrine and immune systems [52]

ZABURZENIA FUNKCJI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Układ odpornościowy składa się z wielu struktur i ma za zadanie chronić nas przed czynnikami szkodliwymi oraz chorobami. Ważną rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego odgrywa integralność procesu obronnego oraz umiejętność odróżnienia komórek obcych, bądź chorych od komórek zdrowych. Zaburzenia w funkcjonowaniu układu immunologicznego mogą prowadzić do zwiększenia wpływu czynników szkodliwych na nasz organizm jak i powstawania różnych chorób w tym chorób o podłożu autoimmunologicznym, czy rozwoju nowotworów [30]. Zaburzenia funkcji układu odpornościowego mogą mieć różną postać, taką jak: niedobory odporności, autoimmunizacje oraz nadwrażliwość na dany czynnik. Powszechnie uważano, iż zaburzenia w funkcjonowaniu układu odpornościowego są wynikiem jednego lub większej ilości defektów, które prowadzą do zwiększonej podatności na zakażenia. Jak już wiadomo, spektrum zaburzeń układu odpornościowego ciągle wzrasta i wciąż poznawane są nowe mechanizmy odpowiedzialne za nieprawidłowości w jego funkcjonowaniu [45].

WRODZONE ZABURZENIA UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Wrodzone zaburzenia układu odpornościowego stanowią bardzo zróżnicowaną grupę zaburzeń. Poznanych zostało ponad 250 wad genetycznych odpowiedzialnych za te schorzenia, a cały czas nowe są poznawane. Możemy je podzielić na pięć klas ze względu na upośledzenie: odpowiedzi komórkowej, humoralnej bądź mieszane upośledzenie obu tych funkcji oraz upośledzenie funkcji fagocytów bądź układu dopełniacza [41]. Selektywny niedobór immunoglobulin IgA jest jedną z najczęstszych form wrodzonego zaburzenia odporności, jest hipogammaglobulinemią w której obserwuje się u pacjentów powyżej 4 roku życia obniżony poziom IgA, podczas gdy poziom IgM i IgG jest w normie. Związana jest z nieprawidłowościami w dojrzewaniu limfocytów B do produkcji IgA [62]. Częstość występowania wrodzonych zaburzeń odporności jest różna w zależności od typu zaburzenia. Selektywny niedobór IgA występuje u 1:223 osoby do 1:1000, podczas gdy ciężkie połączone niedobory odporności są rzadsze i występują u 1:58 000 [45].

NABYTE ZABURZENIA UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Nabyte zaburzenia układu odpornościowego występują znacznie częściej niż wrodzone zaburzenia odporności, w głównej mierze wpływają na nie infekcje wirusowe oraz bakteryjne, jednak podłożem do powstawania tego rodzaju zaburzeń mogą być również leki immunosupresyjne, czy niedobory w odżywianiu[57]. Na szczególną uwagę zasługują stany wynikające z niedożywienia, gdyż są one najczęstszą przyczyną nabytych zaburzeń odporności. Należy zwrócić również

uwagę na zakażenie wirusem HIV, który często prowadzi do zaawansowanego stadium choroby AIDS (zespół nabytego upośledzenia odporności, ang. *acquired immune deficiency syndrome*), w której człowiek jest bardziej podatny na wszelkiego typu zakażenia [7].

NADWRAŻLIWOŚĆ

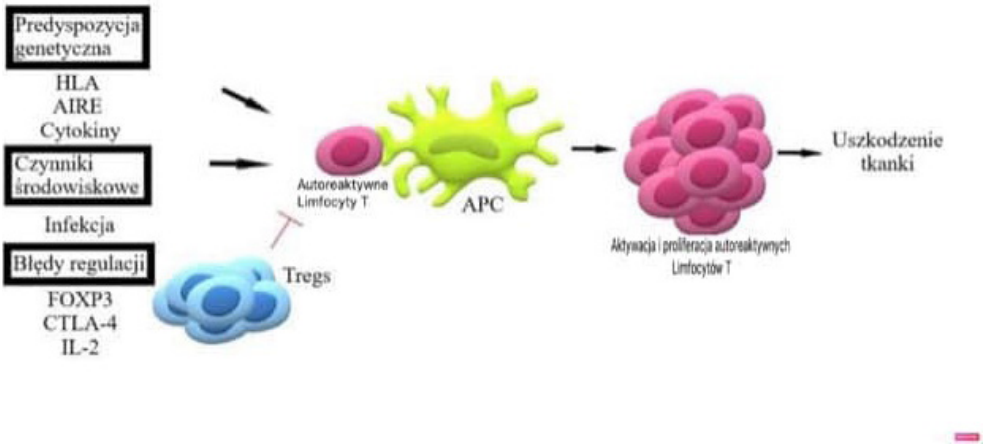
Nadwrażliwość immunologiczna to stan, w którym układ odpornościowy reaguje na obce antygeny przy powtórnym kontakcie z nimi, często reakcje te są bardzo silne. Odpowiedź ma charakter zarówno odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej. W 1963 roku Gell i Coombs sklasyfikowali reakcje nadwrażliwości w czterech kategoriach [58]:

– Typ 1(anafilaktyczna): Jest to najczęstszy typ reakcji nadwrażliwości, jej podłożem jest ponowne zetknięcie z antygenem określanym jako alergen. Podczas tych reakcji wydzielanie są immunoglobuliny IgE, które wiążą się z receptorami obecnymi na komórkach tucznych oraz bazofilach tak następuje „uczulenie" tych komórek, a po ponownym zetknięciu z tym samym antygenem zachodzi degranulacja komórek tucznych i bazofili podczas której wydzielane są mediatory takie jak min. histamina, leukotrieny i prostaglandyny. Najczęściej reakcje te występują po zetknięciu z alergenami pochodzenia odzwierzęcego, żywnością czy kurzem [57].

– Typ 2 (cytotoksyczny): Ten typ reakcji nadwrażliwości występuje stosunkowo rzadko i spowodowany jest przez immunoglobuliny klasy IgG i IgM, które wiążą się własnymi komórkami pacjenta co następnie aktywuje układ dopełniacza i dochodzi do śmierci komórek [29]. Przykładem tego typu nadwrażliwości jest choroba hemolityczna noworodków czy zespół Goodpastaure'a [57].

– Typ 3 (kompleksów immunologicznych): Podobnie jak w typie 2 udział biorą immunoglobuliny klasy IgM i IgG które tworzą kompleksy antygen-przeciwciało z rozpuszczalnymi białkami. Kompleksy te odkładają się w tkankach i aktywują mastocyty i fagocyty oraz inicjują kaskadę dopełniacza, co w rezultacie powoduje uszkodzenie tkanki[42]. Przykładem tego typu reakcji jest np. choroba posurowicza [51].

– Typ 4 (komórkowy): Reakcje te są niezależne od przeciwciał. Podstawą powstawania tego typu nadwrażliwości jest nadmierna stymulacja Limfocytów T oraz monocytów/makrofagów. Komórki te uwalniają cytokiny co prowadzi do śmierci komórek i uszkodzenia tkanki [57]. Przykładami występowania tego typu nadwrażliwości są choroby takie jak np. sarkoidoza, czy kontaktowe zapalenie skóry [1].



RYCINA 2. Mechanizmy autoimmunizacji (zmodyfikowane wg. Rosenblum M et al. Mechanism of human autoimmunity [48]). HLA (ang. *Human Leukocyte Antigen*) − element głównego kompleksu zgodności tkankowej, AIRE − regulator autoimmunologiczny, Tregs − limfocyty regulatorowe, APC − komórka prezentująca antygen
FIGURE 2. Mechanism of autoimmunity [48]

AUTOIMMUNIZACJA

Choroby autoimmunologiczne dotykają 3-5% ogólnej populacji, mogą występować w każdym wieku, ale wiele chorób ma swój specyficzny wiek w którym pojawiają się objawy. Obserwuje się zwiększoną częstość występowania chorób o podłożu autoimmunologicznym u kobiet. Stosunek liczby zachorowań kobiet do liczby zachorowań mężczyzn wynosi 10:1 do 1:1, wyjątkiem jest choroba Crohna, która częściej dotyka mężczyzn (tutaj wskaźnik wynosi 1:1,2) [56]. Choroby te wywoływane są przez wiele rodzajów mechanizmów min. przez produkcję przeciwciał przeciwko receptorom obecnym na komórkach, przyczyny nie są dokładnie poznane ale wierzy się, że są powodowane przez środowisko i zmiany genetyczne. Mówi się, iż polimorfizmy genetyczne prowadzą do upośledzenia regulacji dojrzewania limfocytów, które nie poprawnie reagują na własne komórki, białka itp., zaś czynniki środowiskowe przyczyniają się do ich aktywacji i proliferacji [48].

ZAPALENIE TARCZYCY HASHIMOTO

Zapalenie tarczycy typu Hashimoto to przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie gruczołu tarczowego. W chorobie tej następuje atrofia, czyli zanik gruczołu spowodowany nadmierną aktywnością limfocytów. W odpowiedzi na przeciwcia-

ła przeciw tyreoglobulinie (anty-TG) czyli glikoproteinie uczestniczącej w powstawaniu trójjodotyroniny (T_3) i tyrozyny (T_4) oraz przeciwko peroksydazie tarczycowej (anty- TPO) enzymowi, który jest niezbędny w prawidłowej gospodarce jodem. W rezultacie powstają nacieki limfocytarne, stąd kolejna nazwa tego schorzenia, czyli wole limfoidalne.

ETIOLOGIA

Choroba ta występuje ponad 7 razy częściej u kobiet [16], a ryzyko zachorowania zwiększa się wraz z wiekiem. Jej uwarunkowanie nie jest do końca poznane, lecz uważa się, że na jej rozwój wpływa zarówno podłoże genetyczne, takie jak polimorfizmy genu CTLA-4 [34], który odgrywa rolę w hamowaniu aktywności limfocytów T oraz podłoże środowiskowe, do których należy min. silny stres, nikotyna, nadmierna ilość jodu i niedobór selenu, czyli pierwiastka znajdującego się w centrum aktywnym enzymów odpowiedzialnych za ochronę komórek tarczycy przed wolnymi rodnikami powstającymi w czasie syntezy hormonów [22]. Istotne jest również znaczenie mikrobioty układu pokarmowego, gdyż pełni ona funkcję regulacyjną pomiędzy podtypami limfocytów prozapalnych, i regulatorowych [32].

OBJAWY

Zapalenie tarczycy typu Hashimoto może przebiegać bezobjawowo, co znacznie utrudnia diagnostykę, najczęściej jednak choroba ta przechodzi od eutyreozy- czyli od stanu prawidłowej funkcji hormonalnej gruczołu, przez fazę subkliniczną, w której jej funkcje nie są spełniane prawidłowo, lecz nie obserwowane są jeszcze kliniczne objawy, do stadium ostatniego, czyli do pełnej niedoczynności gruczołu. Na tym etapie pacjent najczęściej odczuwa chroniczne zmęczenie, przyrost masy ciała, pogorszenie stanu skóry, paznokci i włosów oraz problemy z koncentracją, pamięcią, a nawet depresję [16].

DODATKOWE BADANIA

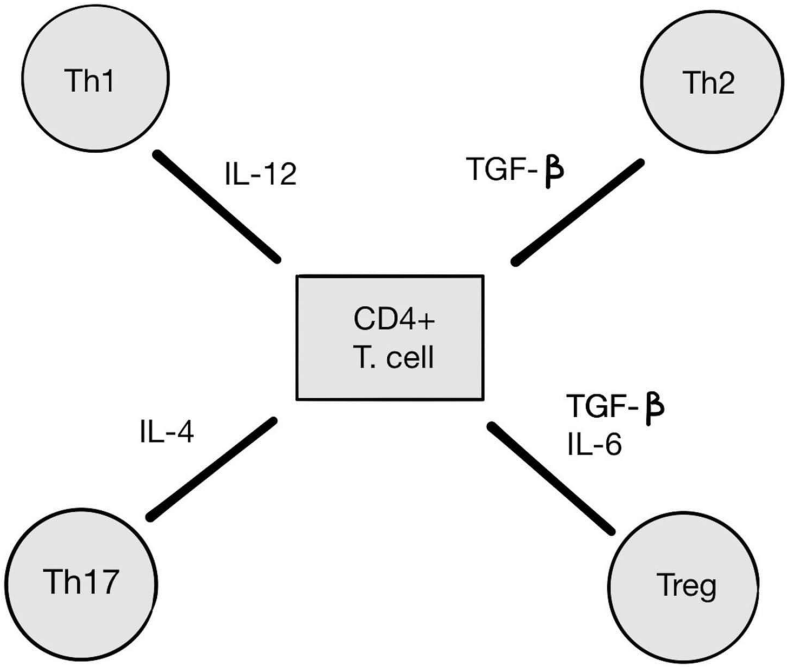
Rutynowo wykonywane są pomiary stężenia tyreotropiny (TSH) we krwi, gdzie podwyższone miano wraz z podwyższonym stężeniem T_4 są cechami niedoczynności tarczycy, natomiast brak podwyższenia T_4 może sugerować subkliniczną niedoczynność tego gruczołu. Większość chorych ma również podwyższone miano przeciwciał przeciwtarczycowych (u 90% podwyższenie anty-TPO, a u 80% podwyższenie anty-TG), jednakże u części może występować podwyższenie stężenia tylko jednego z nich. Dodatkowo zaleca się przeprowadzenie badania USG, w którym wynikiem charakterystyczny dla choroby Hashimoto jest zmniejszenie echogenności miąższu, którego przyczyną jest niszczenie tyreocytów z naciekami limfocytarnymi wraz z oznakami zwłóknienia. Jednakże, choroba może występować z wolem, zanikiem gruczołu lub z zachowaniem jego pra-

widłowej wielkości. Pomimo tak zróżnicowanego obrazu klinicznego schorzenia, do stwierdzenia jego istnienia wystarczy obecności przeciwciał przeciwtarczycowych z obrazem klinicznym lub subklinicznym choroby [16].

PRZYCZYNY AUTOIMMUNOLOGICZNE

Główną poznaną przyczyną jest nadmierna aktywność limfocytów T CD4+, które mają zdolność do różnicowania się w różne klasy limfocytów (Ryc. 3). W patomechanizmie istotną rolę pełnią limfocyty Th2 stymulujące limfocyty B i komórki plazmatyczne przeciwko antygenom występującym na powierzchni tarczycy, prowadząc do jej zapalenia. Ponadto, limfocyty Th1 oraz Th2 poprzez produkcję interferonu gamma oraz interleukiny 4 pobudzają również makrofagi do bezpośredniego niszczenia komórek pęcherzykowych tarczycy.

Jako, że zapalenie tarczycy typu Hashimoto ma podłoże autoimmunologiczne jedną z kluczowych przyczyn rozwoju tego schorzenia jest dysproporcja pomiędzy limfocytami o charakterze prozapalnym np. Th17 oraz klasą limfocytów która bierze udział w inhibicji odpowiedzi autoimmunologicznej np. limfocyty Treg. Wykazano, iż u osób chorych istnieje niższe miano limfocytów Treg w stosunku

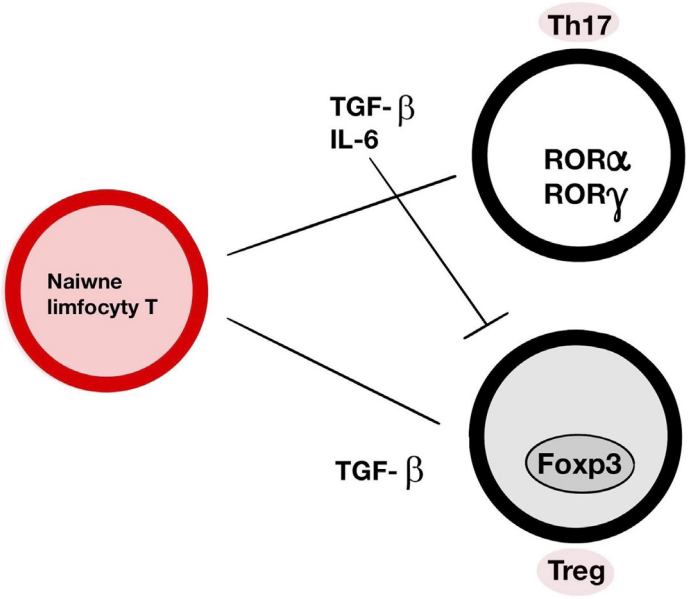


RYCINA 3. Różnicowanie limfocytów T CD4+ (zmodyfikowane wg. Pyzik A et al. Immune disorders in Hashimoto'a thyroiditis: what do we know so far? [44])
FIGURE 3. Lymphocyte T CD4+ differentiation [44]

do Th17 w porównaniu ze zdrowymi osobami, co świadczy o braku odpowiedniej inhibicyjnej odpowiedzi ze strony organizmu w przebiegu choroby Hashimoto [61].

Przyczyn tego zjawiska może być wiele, jedną z nich jest mutacja w czynniku transkrypcyjnym Foxp3, która odpowiada za niedostateczną ilość limfocytów Treg lub ich brak. Skutki tej mutacji widoczne są w badaniach przeprowadzonych na myszach, gdzie wykazano, iż całkowita inhibicja Foxp3 doprowadza do śmiertelnej autoimmunologicznej patologii wynikającej z braku supresyjnego działania Treg na Th17 oraz Th1 i Th2 [27]. Dodatkowe zwiększenie aktywności limfocytów Th1 i Th2 wzmaga produkcję cytokin oraz aktywność komórek NK i komórek dendrytycznych co dodatkowo nasila procesy autoagresji [44]. Kolejnym miejsce na szlaku różnicowania się limfocytów T, w którym może dojść do naruszenia proporcji Th17/Treg to nadprodukcja lub dysregulacja w wytwarzaniu IL-6 [28], która promuje różnicowanie naiwnych limfocytów CD4+ w klasę prozapalną Th17 (Ryc. 4), dodatkowo hamując powstawanie limfocytów regulatorowych.

Daje to jednak wiele potencjalnych miejsc na terapie celowane. Jednym z nich jest stymulacja czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w celu zwiększenia populacji limfocytów regulatorowych, co wiąże się jednak z ryzykiem chorób nowotwo-



RYCINA 4. Różnicowanie się limfocytów naiwnych T CD4+ w zależności od obecności interleukiny-6 (IL-6) w limfocyty prozapalne Th17 z równoczesnym hamowaniem limfocytów regulatorowych Treg (zmodyfikowane wg. Kimura A et al. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. [28])
FIGURE 4. Differentiation of naive lymphocytes T CD4+ into proinflammatory Th17 with inhibition of lymphocytes Treg depending on the interleukin-6 (IL-6) Treg [28]

rowych, bowiem ta klasa limfocytów bierze również udział w osłabianiu odpowiedzi na komórki nowotworowe [54]. Kolejną potencjalną terapią jest inhibicja IL-6 przeciwciałem monoklonalnym [13], co skutkowałoby zmniejszoną ilością naiwnych limfocytów T różnicujących się w klasę Th17 [28]. Wykazano poprawę po zastosowaniu tej terapii w przypadku innych chorób autoimmunologicznych takich jak np. reumatoidalne zapalenie stawów.

Ponadto w komórkach na powierzchni tarczycy u osób z zapaleniem typu Hashimoto wykazano mutacje w genach kodujących białko proapoptyczne Fas oraz FasL [17], przez co ich ekspresja jest zwiększona. Prawdopodobną tego przyczyną jest nadmierna stymulacja tych komórek przez prozapalne cytokiny produkowane przez min. makrofagi i limfocyty Th1. Badania wskazują, że następuje równoczesna zmniejszona ekspresja inhibitorów apoptozy takich jak np. Bcl-2 [35]. Oznacza to, iż w tej jednostce chorobowej następuje niszczenie komórek tarczycy zarówno w mechanizmie zwiększonej aktywności oraz dysproporcji w klasach limfocytów oraz przez nasilony proces apoptotyczny i niedostateczną jego inhibicje, co ostatecznie prowadzi do niedoczynności tego gruczołu.

LECZENIE

Leczenie przyczynowe Hashimoto nie jest jeszcze stosowane, a farmakologiczne leczenie zalecane jest u osób z kliniczną postacią choroby (tj. podwyższonym TSH i obniżonym T_4), podawane są dawki lewotyroksyny w zależności od stanu czynnościowego gruczołu. Głębsze poznanie podłoża autoimmunologicznego daje jednak nadzieję na znalezienie terapii celowanej, na przykład przywracającej balans w ilości limfocytów Th17 i Treg czy też zmniejszenie ekspresji białek proapoptotycznych na powierzchni tyreocytów, jednakże są to dopiero obiecujące pomysły, nie metody leczenia.

CHOROBA GRAVESA-BASEDOWA

OPIS

Choroba Gravesa-Basedowa jest autoimmunologiczną chorobą tarczycy będącą najczęstszą przyczyną nadczynności tarczycy- hipertyreozy, czyli zwiększonej produkcji i wydzielania hormonów gruczołu tarczowego. U jej podstaw leży autoagresja układu odpornościowego, który produkuje przeciwciała TRAb przeciwko receptorowi TSH, prowadząc do jego pobudzenia i w konsekwencji wzmożonej sekrecji tworzonych przez tarczycę hormonów [6].

OBJAWY

Zwiększenie stężenia T_3 i T_4 w chorobie Gravesa-Basedowa prowadzi do wystąpienia szeregu niespecyficznych objawów, takich jak pojawienie się lęków, drażliwości, wrażliwości na ciepło, wzrostu potliwości, spadku masy ciała, zmę-

czenia, przyspieszenia akcji serca, drżenia rąk, zaburzeń żołądkowo-jelitowych, czy zmian w cyklu menstruacyjnym kobiet. Do bardziej swoistych objawów tego schorzenia zaliczamy: obrzęk palców rąk (akropachia), obrzęk przedgoleniowy, wytrzeszcz oczu (oftalmopatia), oraz wole [18].

BADANIA

Rozpoznanie choroby opiera się na badaniu klinicznym, stwierdzeniu charakterystycznych objawów, a także na przeprowadzeniu badań dodatkowych, w których obserwujemy wysokie stężenie trijodotyroniny i tyroksyny przy obniżonym stężeniu TSH. W przypadku niejasności należy poszerzyć badania o oznaczenie miana przeciwciał TRAb, scyntygrafię tarczycy, USG z oceną przepływów i stosunek T_3/T_4 . Warto zaznaczyć, że mimo iż choroba ta może dotknąć każdego, występuje ona najczęściej u kobiet nie przekraczających 40 roku życia [53].

LECZENIE

Celem podjęcia leczenia nadczynności tarczycy jest osiągnięcie stanu eutyrozy, czyli prawidłowej funkcji hormonalnej tarczycy u pacjenta [6]. Pośród metod leczenia choroby Gravesa-Basedowa wymienia się trzy alternatywy: leczenie farmakologiczne tyreostatykami, leczenie promieniotwórczym izotopem jodu ^{131}I, oraz operację tarczycy. Jako, że wszystkie z proponowanych opcji leczenia traktowane są równorzędnie, stosowana metoda zależy w głównej mierze od sytuacji klinicznej i od wyboru pacjenta [9].

W Europie w pierwszym rzucie stosowane jest głównie leczenie tyreostatykiem, gdyż pozostałe z metod uznawane są za agresywne. Istnieją jednak przypadki, w których mają one przewagę nad terapią farmakologiczną. Użycie izotopu ^{131}I jest wskazane w przypadku wystąpienia reakcji alergicznej na stosowany tyreostatyk lub gdy pierwotna terapia okazuje się być nieskuteczna. Operacja tarczycy jest natomiast preferowana przy podejrzeniu raka gruczołu tarczowego lub przy obecności bardzo dużego wola [53].

Do farmakologicznego leczenia choroby Gravesa-Basedowa używa się tiamazolu lub w szczególnych przypadkach propylotiouracylu. Tiamazol powinno się stosować przez 12- 18 miesięcy. W trakcie trwania terapii należy kontrolować poziom TRAb. Prawidłowe wartości TSH i TRAb oznaczają, że kuracja tyreostatykami przebiega pomyślnie. Gdy po 18 miesiącach wartości TRAb nadal są podwyższone, możliwe jest przedłużenie leczenia do kolejnych 18 miesięcy. Należy jednak w tym przypadku rozważyć zmianę metody na bardziej agresywną. Po zakończeniu terapii, powinno się w dalszym ciągu obserwować pacjenta ze względu na możliwe powikłania. Do działań ubocznych tyreostatyków oprócz lekkiej reakcji alergicznej zaliczamy bardziej poważne stany, takie jak: agranulocytoza, uszkodzenie wątroby, czy zapalenie naczyń. Trzeba więc pouczyć pacjenta o prowadzeniu samoobserwacji i zgłaszaniu wszystkich niepokojących objawów [53].

Leczenie promieniotwórczym izotopem jodu uznawane jest za bardziej radykalną metodę niż terapia farmakologiczna. ^{131}I niszczy komórki tarczycy trwale obniżając produkcję syntetyzowanych w niej hormonów. Jod podawany jest doustnie w kapsułce, zazwyczaj jednorazowo. Poprawa u osoby leczonej powinna nastąpić po około 6 miesiącach. Jeżeli nie odnotowujemy polepszenia się stanu pacjenta, wówczas konieczne jest podanie kolejnej dawki ^{131}I. Informacją, o której należy pamiętać podczas stosowania tej metody jest możliwe wprowadzenie pacjenta w stan niedoczynności tarczycy, a także pojawienie się obrzęku wola, skutkującego pojawieniem się duszności. Terapia ta jest uważana za bezpieczną zarówno dla pacjenta, jak i jego rodziny. Zaleca się jednak unikania bardzo bliskiego kontaktu z dziećmi i spania w osobnym pokoju przez okres od 2 do 4 tygodni. Leczenie promieniotwórczym izotopem jodu jest stanowczo zabronione u kobiet w ciąży lub gdy kobieta planuje ciążę do 6 miesięcy po przyjęciu kapsułki zawierającej ^{131}I [6].

Operacja usunięcia tarczycy jest metodą stosowaną najczęściej w przypadku niepowodzenia poprzednich dwóch. Polega ona na wykonaniu zabiegu tyreoidektomii- wycięciu części lub całej tarczycy. Zabieg ten przeprowadzany jest w znieczuleniu ogólnym, a tarczyca usuwana jest przez niewielkie nacięcie w dolnej części szyi. Mimo, iż nie jest to operacja obarczona wysokim ryzykiem, możliwe są powikłania takie jak: krwawienie, zakażenie, czy pojawienie się chrypy. Przed zabiegiem pacjent musi być bezwzględnie doprowadzony do stanu normalizacji poziomu hormonów gruczołu tarczowego- w przeciwnym razie może dojść do bardzo niebezpiecznego chirurgicznego przełomu tarczycowego, prowadzącego nawet do śpiączki. Tyreoidektomia prawie w każdym przypadku skutkuje pojawieniem się niedoczynności tarczycy [9].

LITERATURA

[1] ACTOR JK. Introductory Immunology, 2019, wydanie II.

[2] BENVENGA S, TUCCARI G, IENI A, VITA R. Thyroid Gland: Anatomy and Physiology 2018; 382-390.

[3] BIFANCO AC ET AL. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 2002; **23**: 38-89.

[4] BOCHENEK A, REICHER M. Anatomia Człowieka, 2012, wydanie IX, Tom II,III.

[5] CENTANNI M, BENVENGA S, SACHMECHI I. Diagnosis and management of treatment-refractory hypothyroidism: an expert consensus report. *J Endocrinol Invest* 017; **40**(12): 1289-1301.

[6] CHAŁUBIŃSKI M. Osiąganie eutyreozy u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa. *Puls Medycyny* 2007.

[7] CHINEN J, SHEARER W. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **125**: 195-203.

[8] COOPER D, LAURBERG P. Hyperthyroidism in pregnancy. *The Lancet Diabetes & Endocrinology,* 2013; 238-249.

[9] DEGROOT LJ. Diagnosis and Treatment of Graves' Disease. *Endotext* 2016

[10] DONANGELO I, YOUNG S. Subclinical Hyperthyroidism: When to Consider Treatment. *Am Fam Physician* 2017; **95(11)**: 710-716.
[11] EL-SHEBINEY M ET AL. Radiotherapeutic factors affecting the incidence of developing hypothyroidism after radiotherapy for head and neck squamous cell cancer. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 2018; **30**: 33-38.
[12] FANCY T, GALLAGHER D, HORNIG JD. Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Otolaryngologic Clinics of North America* **43**: 221-227.
[13] FASCHING P ET AL. Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders. *Molecules* 2017; 5.2.4
[14] FERREIRA AC, LIMA LP, ARAÚJO RL ET AL. Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. *The Journal of Endocrinology* 2005; **184**: 69-76.
[15] GARDNER D ET AL. Endokrynologia ogólna i kliniczna Greenspana, 2011, wydanie II, tom I, II.
[16] GAWRYCHOWSKI J ET AL. Choroby tarczycy i przytarczyc, 2014, wydanie I.
[17] GIORDANO C ET AL. Potential involvement of Fas and its ligand in he pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 1997; 960.
[18] GIRGIS CH, CHAMPION B, WALL J. Current Concepts in Graves' Disease. *Therpeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* 2011; 135-144.
[19] GODLEWSKA M, ARCZEWSKA KD, RUDZINSKA M ET AL. Thyroid peroxidase (TPO) expressed in thyroid and breast tissues shows similar antigenic properties. *PLoS OnE* 2017; **12(**6): 2-11.
[20] GOZU HI ET AL. Genetics and phenomics of inherited and sporadic non-autoimmune hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrino* 2010; **125**(2 Suppl 2): 195-203.
[21] GRANI G ET AL. Molecular defects in thyroid dysgenesis. *Clinical Genetics* 2019; 3-4.
[22] GUASTAMACCHIA E ET AL. Selenium and Iodine in Autoimmune Thyroiditis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2015.
[23] HALL J. Guyton and Hall textbook of medical physiology, 2015, wydanie XIII.
[24] HENNESSEY J ET AL. Goiter. *MD The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013*; v*olume **98**, issue 1.
[25] HOERMANN R, MIDGLEY JE, LARISCH R, DIETRICH J.W. Homeostatic control of the thyroid-pituitary Axis: Perspectives for diagnosis and treatment. *Front Endocrinol (Lausanne) 2015;* **20**: 6-177.
[26] HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; **299 (5609)**:1057-1061.
[27] KIM JM ET AL. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007; 193.
[28] KIMURA A ET AL. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology* 2010; 1831-1833.
[29] KING T. Elsevier's Integrated Pathology, 2007, wydanie I.
[30] KISHIYAMA JL ET AL. Disorders of the Immune System. *Pathophysiology of Disease – An Introduction to Clinical Medicine* 2014, rozdział 3.
[31] KOCHMAN M ET AL. Powiększenie tarczycy, 2014.
[32] KOHLING HL ET AL. The microbiota and autoimmunity: Their role in thyroid autoimmune diseases. *Clin Immunol* 2017; 64.
[33] KRAVETS I. Hyperthyroidism: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* 2016; **93(5)** : 363-370.
[34] KRISTIANSEN OP ET AL. CTLA-4 in autoimmune diseases-a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* 2000.
[35] LACKA K ET AL. The role of apoptosis in the etiopathogenesis of autoimmune thyroiditis. *Pol Merkur Lekarski* 2012.
[36] LANNI A, MORENO M, LOMBARDI A ET AL. 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *The FASEB Journal* 2005; **19**: 1552-1554.

[37] LAWSON CA, BROWN AK, BEJARANO V, DOUGLAS SH ET AL. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25 high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* 2006.; **45(10):** 1210-1217.
[38] LEUNG AM, BRAVERMAN LE. Consequences of excess iodine. *Nat Rev Endocrinol* 2014; **10(3)**: 136-142.
[39] LEWIŃSKI A ET AL. Endokrynologia kliniczna – choroby tarczycy, 2017, tom II.
[40] LEWKOWICZ P, LEWKOWICZ N, TCHÓRZEWSKI H. Limfocyty T regulatorowe CD4+ CD25+: fizjologia i rola tych komórek w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej. *Postepy Hig Med Dosw* 2005; **59**: 362-370.
[41] MCCUSKER C, UPTON J, WARRINGTON R. Allergy Asthma *Clin Immunol.* 2018; **14**(Suppl 2): 61.
[42] NUSSENBLATT RB. Uveitis (Fourth Edition), 2010, 423-433.
[43] PENNINGTON JA, YOUNG BE. Total diet study nutritional elements, 1982-1989. *Journal of the American Dietetic Association* 1991; **91**: 179-183.
[44] PYZIK A ET AL. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J Immunol Res* 2015; 4.
[45] RAJE NS, DINKAR C. Overview of Immunodeficiency Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am* 2015; **35(4)**: 599-623.
[46] RASTOGI MV, LAFRANCHI SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis* 5 2010; 17.
[47] REID JR, WHEELER SF. Hyperthyroidism: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* 2005; **72(4)**: 623-630.
[48] ROSENBLUM MD, REMEDIOS KA, ABBAS AK. Mechanism of human autoimmunity. *J Clin Invest.* 2015; **125(6)**: 2228-2233.
[49] ROSS DS, BURCH HB, COOPER DS ET AL. American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. *Thyroid* 2016; volume 26, issue 10.
[50] SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, ONO M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *CellPress* 2008; **133(5):** 775-787.
[51] SHELDON J, RICHES PG. Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects (Third Edition), 2014.
[52] SILVERTHORN DU. Fizjologia zintegrowane podejście, 2018, wydanie I, s. 67,768.
[53] SZCZEPAŃSKA E, GIETKA-CZERNEL M, JASTRZĘBSKA H. Trudności w leczeniu choroby Gravesa-Basedowa. *Borgis – Postępy Nauk Medycznych* 2017; 683-688.
[54] TANAKA A. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research* 2017; 114.
[55] TOPLISS DJ, EASTMAN CJ. Diagnosis and management of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Med J Aust.* 2004.
[56] WANG L, WANG FS, GERSHWIN ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* 2015; **278(4)**: 369-95.
[57] WARRINGTON R ET AL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2011.
[58] WAYNE RT, CUNNINGHAM PT. Hypersensitivity: Immunological. Wiley Online Library 2015.
[59] WOLFF J, CHAIKOFF IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *The Journal of Biological Chemistry* 1948; **174**: 555-564.
[60] WOŹNIAK W. Anatomia Człowieka. Podręcznik dla studentów i lekarzy, 2003, wydanie II, s.207,208.
[61] XUE H ET AL. The possible role of $CD4^+CD25$(high)$Foxp3^+/CD4^+IL\text{-}17A^+$ cell imbalance in the autoimmunity of patients with Hashimoto thyroiditis. *Endocrine* 2015; 8.
[62] YEL L. Selective Ig A deficiency. *J Clin Immunol* 2010; **30(1)**: 10-16.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 17.06.2020
Przyjęto: 14.07.2020
Maciej Owecki
Zakład Zdrowia Publicznego
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Rokietnicka 4, 60-806 Poznań
tel.: 61 658 42 75
e-mail: mowecki@ump.edu.pl

WYBRANE METODY IZOLACJI I DETEKCJI KRĄŻĄCYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W RÓŻNYCH TYPACH NOWOTWORÓW

SELECTED ISOLATION AND DETECTION METHODS OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN VARIOUS TUMORS

Paula KAMIŃSKA[1], Karolina BUSZKA[1,2], Joanna BUDNA-TUKAN[1]

[1]Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
[2]Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Streszczenie: Na całym świecie obserwuje się wzrost zachorowań na nowotwory różnego typu. Nierzadko ich leczenie wiąże się z wieloma trudnościami, stąd duże nadzieje pokłada się w nowoczesnych metodach diagnostycznych, które pozwolą wykryć chorobę w jak najwcześniejszym stadium. Ważnym aspektem klinicznym jest także skuteczny monitoring choroby, który pozwala przewidywać jej przebieg i kontrolować efekty terapii. Duże nadzieje pokłada się w detekcji krążących komórek nowotworowych (ang. *Circulating Tumor Cells*, CTC), które mogą być wykorzystane zarówno w diagnostyce, jak i kontroli efektywności leczenia. Z uwagi na ich małą liczbę w układzie krążenia, ciągle poszukuje się nowych metod izolacji i charakterystyki CTC oraz udoskonala już znane rozwiązania, w celu osiągnięcia jak największych korzyści klinicznych. W artykule przedstawiono wybrane, szeroko stosowane techniki izolacji i detekcji CTC, jak również omówiono ich wykorzystanie w wybranych nowotworach, tj. czerniaku, raku prostaty, płuc i jelita grubego.

Słowa kluczowe: krążące komórki nowotworowe, detekcja CTC, czerniak, rak prostaty, rak płuc, rak jelita grubego

Summary: The increase in the incidence rate of various types of cancer is noticed around the world. Frequently, cancer treatment is associated with many difficulties, hence many hopes are related to modern diagnostic methods, able to detect the disease at the earliest possible stage. An important clinical aspect is also effective disease monitoring, which allows to predict its course and control the effects of therapy. Thus, there is a great interest in Circulating Tumor Cells (CTC), which might be used in both diagnostics and monitoring of cancer diseases. Due to their low concentration in the circulatory system, new methods of CTC isolation and detection are constantly being sought

and the already known solutions are being improved to achieve the greatest clinical benefits. This article presents selected, widely used CTC isolation and characterization techniques as well as their application in various cancers: melanoma, prostate, lung and colorectal cancer.

Keywords: circulating tumor cells, CTC detection, melanoma malignant, prostate cancer, lung cancer, colorectal cancer

WPROWADZENIE

W ostatnich latach, krążące komórki nowotworowe (ang. *Circulating Tumor Cells*, CTC) zyskały popularność wśród badaczy. Wiele publikacji naukowych sugeruje ich wysoką przydatność, jako markera w diagnostyce różnych typów nowotworów. Do najszerzej opisanych z nich należy: rak stercza, rak płuc, rak jelita grubego, a relatywnie nowe doniesienia wskazują także na użyteczność CTC w czerniaku złośliwym. Oprócz diagnostyki chorób nowotworowych, wskazuje się na ich znaczenie w predykcji przebiegu choroby oraz monitoringu efektywności nowoczesnych terapii leczniczych, takich jak immunoterapia. Pomimo niedogodności związanych z małą liczbą CTC we krwi, co utrudnia ich wprowadzenie do rutynowego postępowania, powstają coraz bardziej doskonałe metody izolacji i detekcji CTC, a FDA (ang. *Food And Drug Administration*) zaakceptowało jedną z nich – system CellSearch® w diagnostyce raka piersi, prostaty i jelita grubego. Obecnie stosowane metody są nadal poddawane analizom porównawczym, w celu odnalezienia najlepszej, pozwalającej na efektywną detekcję i charakterystykę krążących komórek nowotworowych, a co za tym idzie poprawę sytuacji klinicznej wielu pacjentów. W artykule przedstawiono przegląd wybranych metod izolacji i detekcji CTC oraz ukazano ich praktyczne wykorzystanie w czterech typach nowotworów: czerniaku złośliwym, raku prostaty, płuc i jelita grubego.

KRĄŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Pierwsze doniesienia na temat krążących komórek nowotworowych zostały zaprezentowane w 1869 roku [61]. Są to komórki nowotworowe, które trafiają do układu krążenia w wyniku oderwania od guza pierwotnego [2]. By mogło ono nastąpić, komórki nowotworowe muszą okresowo ulegać odwracalnym zmianom fenotypowym w wyniku przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition,* EMT). Podczas EMT dochodzi do zmian w obrębie cytoszkieletu komórki oraz utraty białek adhezyjnych – komórki zyskują mobilność, co umożliwia transport z pierwotnego ogniska do innych, odległych i podatnych tkanek. W docelowym miejscu komórki osiedlają się w wyniku procesu odwrotnego do EMT – przejścia mezenchymalno–nabłonkowego (ang. *Mesenchy-*

mal-Epithelial Transition, MET). Mechanizm inwazji oparty na tych procesach jest jednym z popularniejszych wyjaśnień powstawania przerzutów, choć niektóre dane wskazują, że CTC o pośrednim fenotypie są najbardziej plastyczne, a zatem bardziej agresywne i odporne na klasycznie stosowane metody leczenia [66, 81].

Krążące komórki nowotworowe są klasyfikowane na podstawie najczęstszej lokalizacji w organizmie. Te znajdujące się w szpiku kostnym i węzłach chłonnych określane są mianem DTC (ang. *Disseminated Tumor Cells*) lub ITC (ang. *Isolated Tumor Cells*) i są przyczyną powstawania nawrotów choroby po długim czasie od resekcji [2]. Najczęstsze określenie – krążące komórki nowotworowe, w rzeczywistości odnosi się do komórek krążących w naczyniach krwionośnych lub limfatycznych, choć w literaturze funkcjonuje jako pojęcie szersze, obejmujące wszystkie typy [11]. W czerniaku CTC noszą miano CMC (ang. *Circulating Melanoma Cells*) [67].

CTC we krwi mogą występować także w postaci agregatów, które nazywa się CTM (ang. *Circulating Tumor Microembrioli*). Zawierają one od kilku do kilkudziesięciu komórek krążących w układzie naczyniowym i prezentują bardzo wysoką zdolność do tworzenia przerzutów. Odpowiedzialna za tworzenie agregatów jest glikoproteina CD44, która jednocześnie chroni je przed specyficznym rodzajem apoptozy – anoikis, do którego dochodzi w wyniku niewystarczającej interakcji między komórką a macierzą [81, 15].

Agregaty mogą odrywać się bezpośrednio z guza lub powstawać w wyniku akumulacji pojedynczych CTC. Pomimo połączonej formy, posiadają zdolność do skutecznej separacji i diapedezy [4]. W niektórych przypadkach agregaty komórek mogą tworzyć zatorowość mikrozrostową w naczyniach, a niedotlenienie spowodowane embolizacją i/lub uwalnianiem TGF–β przez płytki krwi może indukować EMT komórek nowotworowych, co sprzyja atakowaniu narządów [39].

Wiele doniesień naukowych pojawiających się na przestrzeni lat sugeruje, że na podstawie obserwacji krążących komórek nowotworowych można dokonać diagnozy choroby nowotworowej, predykcji jej przebiegu [61, 60, 49], a ponadto monitoringu leczenia, co jest szczególnie przydatne w testowaniu nowych terapii. Uwaga naukowców coraz bardziej skupia się na doskonaleniu metod detekcji CTC, ze szczególnym uwzględnieniem tych, które pozwalają rozróżnić żywe komórki nowotworowe od martwych. Jest to istotne, ponieważ obecność tych pierwszych wiąże się ze zdolnością do tworzenia przerzutów, gwałtownym przebiegiem choroby oraz gorszym rokowaniem [3].

METODY IZOLACJI I DETEKCJI KRĄŻĄCYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Krążące komórki nowotworowe są wykrywane najczęściej w niewielkich próbkach krwi obwodowej [92]. Większość analiz polega na ocenie liczebności komórek i ich charakterystyce. Niektóre z metod pozwalają również na izolację

CTC i przeprowadzenie oznaczeń molekularnych [60]. Liczba wykrytych komórek waha się od 0 do ponad 10 000 na 10 ml krwi [92]. Utrudnieniem w analizie jest wysoka heterogenność CTC, która obserwowana jest nawet w komórkach pochodzących z tego samego guza [64]. Ponadto, z uwagi na relatywnie niską częstotliwość występowania krążących komórek nowotworowych wśród dużej liczby komórek krwi [67], właściwą analizę należy poprzedzić etapem wzbogacenia, czyli zwiększenia koncentracji docelowych komórek w próbce [2].

W celu oceny CTC istotnym jest oddzielenie ich od otaczających komórek krwi [49]. Wśród wielu opracowanych metod izolacji istnieją dwa podstawowe podejścia: systemy zależne od znaczników, czyli metody izolacji oparte na wykrywaniu specyficznych powierzchniowych markerów CTC (i/lub leukocytów) oraz systemy niezależne od znaczników, którymi są metody niezależne od specyficznych markerów, oparte na właściwościach fizycznych lub biologicznych CTC [54, 2].

Antygenem powierzchniowym charakterystycznym dla leukocytów jest glikoproteina CD45, która służy do selekcji negatywnej w wielu technikach [13,11], a najczęściej wykorzystywanym antygenem, charakterystycznym dla wielu typów nowotworów jest EpCAM (ang. *Epithelial Cell Adhesion Molecule*) [13], specyficzny marker tkanki nabłonkowej. Najnowsze techniki zależne od znaczników projektowane są tak, by wykrywać CTC na podstawie innych, bardziej specyficznych dla danego nowotworu antygenów.

Większość proponowanych technik ogranicza się do analizy niewielkich próbek krwi w warunkach *in vitro*, choć nie jest to jedyne rozwiązanie. Możliwa jest także izolacja krążących komórek nowotworowych w warunkach *in vivo*, poprzez umieszczenie w żyle przedramienia detektora pokrytego przeciwciałami np. anty–EpCAM. Zaletą tego rozwiązania jest znacznie większa objętość analizowanej krwi niż w przypadku pojedynczej próbki, a tym samym potencjalnie wyższa efektywność wykrycia krążących komórek nowotworowych [11].

CELLSEARCH®

Zaaprobowany przez FDA do diagnostyki i monitorowania przebiegu raka prostaty, przerzutującego raka piersi i raka płuc, system CellSearch® polega na wychwytywaniu immunomagnetycznym i oznaczaniu fluorescencyjnym komórek posiadających ekspresję poszukiwanych markerów. Próbkę stanowi krew pełna. Na rynku dostępne są różne zestawy pozwalające na identyfikację: komórek śródbłonka (ekspresja CD146), nabłonkowych (ekspresja EpCAM) oraz komórek czerniaka (ekspresja MCAM/CD146). We wszystkich zestawach, immunoselekcja negatywna opiera się zwykle na wykorzystaniu antygenu CD45, w celu usunięcia z próbki leukocytów. Odczynnik DAPI dołączony do zestawu, pozwala wybarwić jądra komórkowe [89].

Procedura obejmuje dwa główne etapy: przygotowanie próbki oraz właściwą analizę, która polega na zliczaniu i identyfikacji CTC. Wykorzystywane są dwa

rodzaje odczynników: odczynnik wychwytujący, zawierający cząstki posiadające rdzeń magnetyczny, pokryte przeciwciałem i odczynniki stosowane w barwieniu immunofluorescencyjnym. Cząstki z rdzeniem magnetycznym wytwarzają pole magnetyczne pozwalające na separację komórek, a ostateczna klasyfikacja komórek opiera się na kompatybilności fenotypów lub w oparciu o metody detekcji mRNA [89, 13].

Dostępne zestawy kontrolne zawierają linie komórkowe wykazujące ekspresję pożądanych markerów, pozwalające na wiarygodny odczyt uzyskanych wyników.

Niedogodnością metody jest niezdolność do wykrywania komórek nowotworowych, które nie wykazują ekspresji antygenu EpCAM, którego zanik obserwowany jest w efekcie procesu EMT [17].

EPISPOT

EPISPOT (ang. *Epithelial ImmunoSPOT*), czyli modyfikacja techniki ELISPOT (ang. *Enzyme-Linked ImmunoSPOT*), opiera się na detekcji białek, wydzielanych przez żywe krążące komórki nowotworowe. Martwe komórki, w odróżnieniu od tych pierwszych, nie są zdolne do produkcji i sekrecji białek, a przede wszystkich do tworzenia przerzutów [11]. Duża liczba wykrytych żywych komórek świadczy o gwałtownym postępie choroby.

Pierwszym etapem jest wzbogacenie, które może być oparte na właściwościach fizycznych i biologicznych komórek. System RosetteSep™ pozwala na szybką, relatywnie prostą izolację komórek. Leukocyty i inne niepożądane komórki tworzą tetrameryczne kompleksy z przeciwciałami (ang. *Rosettes*). W wyniku wirowania na gradiencie gęstości, kompleksy te opadają na dno probówki, pozostawiając oczyszczone krążące komórki nowotworowe, które można poddać dalszej analizie [11, 79].

Następnie, komórki przez krótki czas są hodowane na membranie pokrytej przeciwciałami, wychwytującej produkowane białka. Związane białka są następnie wybarwiane dzięki zastosowaniu drugiego, wyznakowanego fluorochromem przeciwciała. Analiza przeprowadzana jest z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Każdy pozytywny sygnał reakcji odpowiada obecności pojedynczej CTC. Technika może być wykorzystywana do detekcji właściwie każdego typu nowotworu przy zastosowaniu przeciwciał przeciwko charakterystycznym dla niego białkom [3].

ADNATEST®

AdnaTest® należy do metod immunomagnetycznej selekcji pozytywnej. Czułość i swoistość wykrywania są zapewnione przez zastosowanie kombinacji przeciwciał, które wiążą się z różnymi epitopami i antygenami, uwzględniając zmienność ekspresji antygenów CTC [90].

W pierwszym etapie – zwiększania koncentracji komórek, kulki pokryte przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom powierzchniowym selektywnie je wychwytują [57, 18]. Zazwyczaj wykorzystywane są 3 różne przeciwciała cha-

rakterystyczne dla antygenu danego nowotworu, co pozwala uniknąć fałszywie pozytywnych wyników [90, 18]. Wychwycone komórki są wykrywane za pomocą metod PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) poprzez analizę grupy transkryptów specyficznych dla danego typu nowotworu [18, 57].

MAGSWEEPER

Inną, niekomercyjną metodą detekcji CTC, opartą na immunomagnetycznej separacji jest MagSweeper [88].

Do uzyskanej próbki krwi dodawane są wyznakowane magnetycznie przeciwciała anty-EpCAM (przeciwciało monoklonalne BerEP4) w celu selektywnego wyznakowania komórek pochodzenia nabłonkowego. Następnie wyznakowane komórki są wychwytywane z mieszaniny komórek krwi dzięki zastosowaniu wirujących prętów magnetycznych. Technologia MagSweeper umożliwia izolację rzadkich krążących komórek nowotworowych z krwi obwodowej pacjenta, bez konieczności jej lizy [88, 6, 78, 80]. Przeprowadzane są 2 cykle, z których każdy składa się z 3 etapów: wychwytywania, płukania i uwalniania komórek. W etapie wychwytywania pręty magnetyczne „wyławiają" docelowe komórki z próbki krwi. Etap płukania służy eliminacji niezwiązanych komórek i otrzymaniu czystej populacji CTC. Ostatni etap służy uwolnieniu komórek, które mogą być następnie analizowane [78]. Do czynników, które decydują o skuteczności metody należą: specyficzność zastosowanych przeciwciał, ograniczone wiązania niespecyficzne (niezwiązane z interakcją antygen-przeciwciało) oraz siła magnetyczna, odpowiednia do przyciągnięcia komórki [80]. Możliwe jest także zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko innym markerom powierzchniowym, co daje możliwości rozszerzenia metody na nowotwory niewykazujące ekspresji antygenu EpCAM [78].

NANOVELCRO CHIP

NanoVelcro Chip zaliczana jest do metod wykorzystujących podłoże nanostrukturalne, na którym immobilizowane są biotynylowane przeciwciała anty-EpCAM. Przepływające przez chip krążące komórki nowotworowe są wyłapywane przez przeciwciała i unieruchamiane na nośniku. W kolejnym kroku związane komórki są barwione, np. na obecność cytokeratyn, a następnie zliczane. Przedstawiono jak dotąd cztery generacje NanoVelcro, a każda z nich służy innej analizie CTC. W pierwszej generacji zastosowano podłoże nanostrukturalne (SiNS), nad którym umieszczono microfluidyczny mikser, umożliwiające zliczanie związanych komórek [42, 52]. Druga generacja służy izolacji CTC. W tej technice wykorzystuje się podłoże polimerowe i laserową analizę mikroskopową (ang. *Laser Microdissection,* LMD). W trzeciej generacji termoreaktywne szczotki polimerowe, poruszające się na SiNS, wychwytują i uwalniają CTC, przy jednoczesnym zachowaniu żywotności komórek i ich integralności molekularnej. W celu oczyszczania CTC z dobrze zachowanymi transkryptami

RNA, stosuje się czwartą generację NanoVelcro, w której wykorzystano specyficzny nanomateriał przewodzący o charakterze polimeru [42].

Test NanoVelcro, zaaprobowany przez dwie instytucje, wykazuje stałą skuteczność w wychwytywaniu CTC z próbek pacjentów [52].

CELLCOLLECTOR®

CellCollector® (GILUPI GmbH) jest pierwszą na świecie metodą do izolacji CTC *in vivo* [74, 36]. Technika ta umożliwia wyłapanie CTC bezpośrednio z krwi obwodowej poprzez aplikację detektora w żyle ramiennej pacjenta [30]. Detektor, będący drutem ze stali nierdzewnej, posiada tzw. funkcjonalizowaną końcówkę [84, 36]. Jest ona pokryta 2μm warstwą złota oraz hydrożelową warstwą, do której kowalencyjnie przyłączone są przeciwciała. Najszerzej przetestowaną wersją detektora jest ta, wykorzystująca humanizowane mysie przeciwciała anty-EpCAM (HEA125). Dzięki ich obecności z krwi pacjenta „wyławiane" są EpCAM-pozytywne komórki CTC [84, 30]. Drut wprowadzany jest do żyły pacjenta na 30 minut, podczas których ma on kontakt z około 1 litrem krwi, co znacznie zwiększa szansę na izolację rzadkich komórek, jakimi są CTC w stosunku do metod *ex vivo* [30, 74]. Ponadto, zaletą urządzenia jest jego wysoka swoistość – w testach kontrolnych, przeprowadzonych na krwi zdrowych ochotników nie stwierdzono sygnałów fałszywie pozytywnych [30, 74].

Metoda niesie ze sobą małe niedogodności w postaci dyskomfortu porównywalnego do tego, odczuwanego podczas pobierania krwi oraz ryzyka omdleń, niedociśnienia czy zasinień [25]. Nie odnotowano jednak poważnych skutków ubocznych stosowania detektora [74], a w 2012 roku został on zatwierdzony przez Conformite Europeenne (CE) [36]. Test ten dzięki temu, że jest bezpieczny, dość łatwy i szybki w użyciu, potencjalnie mógłby być stosowany w placówkach medycznych do szybkiego diagnozowania pacjentów, nawet we wczesnych stadiach choroby [21, 30].

METODY OPARTE NA ANALIZIE PCR

Metody PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), również prowadzone w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*), są popularnymi metodami oceny ekspresji genów w różnych komórkach i tkankach [5]. Krążące komórki nowotworowe, poruszając się w układzie krwionośnym, uwalniają do niego materiał genetyczny, egzosomy oraz białka. Niektóre z metod koncentrują się na detekcji CTC na podstawie obecności jego ctDNA (ang. *Circulating Tumor DNA*) lub RNA. Mogą one stanowić samodzielne metody detekcji CTC lub łączone są z innymi technikami.

RT-PCR (ang. *Reverse-Transcription PCR*) jest jedną z powszechniejszych metod wykrywania mRNA białek nowotworowych. Zaletą tej metody jest wysoka wykrywalność CTC mimo zmiennego profilu ekspresji charakterystycznych antygenów [38, 48].

RT-qPCR (ang. *Reverse transcription-quantitative PCR*) jest czułą metodą oceny ilościowej mRNA, pozwalającą na wykrycie rzadkich transkryptów i małych wariacji w ekspresji genów, co jest szczególnie istotne w analizie CTC. Ocena ilościowa może być absolutna lub relatywna – absolutna pozwala uzyskać precyzyjną liczbę kopii mRNA, ale wymaga skonstruowania krzywej kalibracyjnej przy użyciu standardów o znanym stężeniu. Natomiast w drugim przypadku określa się ilość materiału genetycznego w próbce eksperymentalnej, jako jej krotność w stosunku do kalibratora [40].

Nowszymi metodami detekcji są ddPCR (ang. *Droplet-Based Digital PCR*) i NGS (ang. *Optimized Next Generation Sequencing*). Wykazują one wysoką czułość, specyficzność i precyzję wykrywania rzadkich sekwencji, a także pozwalają uwzględnić heterogenność i zmienność nowotworu. Ponadto, inwazyjność tych metod jest minimalna, co czyni je przydatnymi w regularnym monitoringu chorych [63]. Szczególnie przydatna jest tu technika NGS, składająca się z 4 etapów: ekstrakcji DNA [94, 34], przygotowania DNA [94, 37], etapu wzbogacenia i właściwego sekwencjonowania [94].

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE METOD IZOLACJI I DETEKCJI CTC W RÓŻNYCH TYPACH NOWOTWORÓW

CZERNIAK

Czerniak skóry (ang. *Cutaneous Melanoma Malignant*) wywodzi się z nieprawidłowych melanocytów. Choć statystycznie występuje rzadko – stanowi około 1% wśród innych nowotworów skóry, z uwagi na szybki rozwój i związane z tym utrudnione leczenie, współczynnik śmiertelności w przypadku tej choroby jest wysoki. Skłania to do poszukiwania nowych metod diagnostycznych, pozwalających również na monitoring przebiegu choroby [1].

Według klasyfikacji czerniaka proponowanej przez Światową Organizację Zdrowia, wyróżnia się jego 4 podstawowe podtypy: czerniak szerzący się powierzchownie (ang. *Superficial Spreading Melanoma,* SSM), czerniak wywodzący się ze złośliwej plamy soczewicowatej (łac. *Lentigo Maligna Melanoma,* LMM), czerniak guzkowy (ang. *Nodular Melanoma,* NM) oraz czerniak akralny (ang. *Acrolentiginous Melanoma,* ALM) [9, 47].

Poszczególne podtypy różnią się między sobą lokalizacją, cechami histologicznymi, grubością zmian oraz wiekiem pacjentów [47]. Zachorowaniu sprzyja w większości przypadków nadmierna ekspozycja na promieniowanie UV i związane z nią poparzenia słoneczne oraz uwarunkowania genetyczne, przejawiające się w występowaniu dużej liczby znamion czy charakterystycznych cech wyglądu określanych, jako fototyp pierwszy w skali Fitzpatricka (jasny kolor skóry, oczu, włosów) [68]. Najczęstsze mutacje w czerniaku związane są z genami *NF1*,

NRAS, *KIT* oraz *BRAF*. Te ostatnie dominują typie non-CSD (ang. *Non-Cumulative Skin Damage*), który nie jest związany z uszkodzeniem posłonecznym [76].

Klasyczna diagnostyka czerniaka opiera się na wycięciu podejrzanej zmiany skórnej i poddaniu tkanki ocenie histopatologicznej. Wykrycie nieprawidłowych komórek sugeruje powtórny zabieg chirurgiczny z poszerzeniem marginesu pierwotnego wycięcia [56] i biopsję węzła wartowniczego, w celu opanowania procesu przerzutowania. Proponowanym leczeniem w przypadku wystąpienia przerzutów jest terapia systemowa [86]. Wykorzystanie radioterapii w leczeniu czerniaka zostało zakwestionowane z uwagi na fakt, że jego komórki wykazują w stosunku do niej oporność [28]. Istnieje hipoteza, że radioterapia wzmaga efekty immunoterapii, która jest nowym i obiecującym podejściem w walce z czerniakiem [23].

Alternatywą dla klasycznej diagnostyki czerniaka jest detekcja CMC. Ich izolacja i charakterystyka oparta jest głównie na wykazaniu obecności antygenów powierzchniowych, tj. MCAM (ang. *Melanoma Cell Adhesion Molecule ,* MCAM/MUC18/CD146), MART-1 (ang. *Melanoma Antigen Recognized by T cells 1/Melan-A*) [53], opisywany, jako sprzyjający progresji czerniaka [67, 95, 46], a ponadto przydatny w oznaczeniach immunocytochemicznych [43] oraz MAGE-A3 (ang. *Melanoma Antigen A3*), obiecujący, jako cel immunoterapii w czerniaku [70].

Obecność MART-1, MAGE-A3 jak również antygenów PAX3 (ang. *Paired Box 3*) i GM2/GD2 (ang. *Ganglioside GM2/ Ganglioside GD2*) została skorelowana ze stopniem zaawansowania choroby i skróconym przeżyciem [29]. W celu wykrycia ekspresji genu *MAGE–A3* zastosować można RT-qPCR, który wykazuje swoistość i czułość w zakresie analitycznym [33]. CMC wykrywać można tą metodą również na podstawie obecności mRNA tyrozynazy, która ulega ekspresji na melanocytach i komórkach czerniaka [72].

Z kolei metoda ddPCR pozwala wykryć charakterystyczne dla choroby mutacje *BRAF* (BRAFV600E), *NRAS* oraz *TERT* i może być wykorzystana w monitorowaniu efektów leczenia po zastosowaniu immunoterapii i ewentualnych nawrotów choroby [20, 73].

Antygen EpCAM nie ma praktycznego zastosowania w izolacji i detekcji CMC ze względu na brak jego ekspresji na komórkach pochodzenia melanocytarnego [67, 93]. Większość metod, jako docelowy wykorzystuje antygen MCAM, np. CellSearch® CMC kit, lub bazuje na właściwościach fizycznych i/lub biologicznych tych komórek.

Metodą konkurencyjną do CellSearch® pod względem efektywności jest S100-EPISPOT. W analizie EPISPOT kluczowe jest wykrycie produkowanych przez CMC białek z rodziny s100, szczególnie: s100A1, s100A13 oraz s100B [91]. CellSearch® nie pozwala rozróżnić komórek żywych od martwych, stąd EPISPOT może okazać się lepszą metodą do oceny prawdopodobieństwa wystąpienia przerzutów. Analiza porównawcza obu metod wykazała, że CellSearch®

charakteryzował się większą wartością prognostyczną (istotny związek z całkowitym przeżyciem), jednak S100-EPISPOT okazał się znacznie czulszą techniką, wykazując wyższy odsetek pacjentów, z co najmniej dwiema CMC [16].

RAK PROSTATY

W 2018 roku odnotowano 1,28 miliona nowych przypadków zachorowań na raka prostaty i około 360 tysięcy zgonów nim wywołanych [22]. Postęp medycyny przyczynił się do udoskonalenia metod rezonansu magnetycznego, obrazowania funkcjonalnego i poprawy stratyfikacji ryzyka [50]. Pomimo to, nowotwór ten nadal stanowi poważny problem medyczny, z uwagi na trudności z właściwym doborem terapii, odpowiedniej dla łagodnej bądź złośliwej formy [87, 32]. Komórki nowotworowe przedostają się drogą węzłów chłonnych najczęściej do wątroby i płuc. Częste są również przerzuty kostne, które objawiają się silnym bólem kości, hiperkalcemią i częstymi złamaniami [87]. Wystąpienie przerzutów wiąże się z wysokim ryzykiem zgonu.

Ścisły monitoring choroby i leczenie miejscowe są rozwiązaniem preferowanym u pacjentów, u których stężenie białka PSA (ang. *Prostate Specific Antigen*) nie przekracza 10 ng/ml, a co za tym idzie nowotwór ma wolniejszy przebieg. W leczeniu miejscowym stosuje się radioterapię i zabiegi chirurgiczne, jednak często wiążą się one z obniżającymi jakość życia objawami, tj. zaburzeniami seksualnymi, czy nietrzymaniem moczu [7, 50]. W przypadku wystąpienia przerzutów, leczeniem z wyboru jest chemioterapia. Ponadto w chorobie stosuje się leczenie przeciwandrogenowe (ang. *Androgen Deprivation Therapy*, ADT) [50, 82].

Rutynowe badania przesiewowe w kierunku raka prostaty mają na celu wczesne wykrycie choroby i określenie jej stadium. Do tej pory za najbardziej użyteczne uważa się określenie stężenia białka PSA w surowicy pacjentów [59, 7], przyczyniające się do znacznego obniżenia śmiertelność z powodu tego nowotworu [59]. Niestety, pomimo powszechnego zastosowania, marker ten nie jest specyficzny dla raka prostaty, a jego obecność wykazano również w przypadku zmian o charakterze łagodnym, co może prowadzić do zbędnych biopsji narządu. Stąd, potrzeba znalezienia bardziej specyficznego markera w rutynowej diagnostyce raka prostaty [24]. Za takie biomarkery uważa się obecnie krążące komórki nowotworowe, ich materiał genetyczny, czy egzosomy, wraz z zawartymi w nich białkami i RNA, określane wspólnym mianem płynnej biopsji.

Metody wykrywania CTC mogą przyczynić się do poprawy diagnostyki nowotworu prostaty i monitoringu efektów leczenia, a ponadto uzupełnić powszechnie stosowane testy diagnostyczne. Nadrzędnym celem tych działań jest skuteczna identyfikacja pacjentów z rakiem wysokiego ryzyka [10].

Jedną ze stosowanych w tym celu technik jest AdnaTest®. W przypadku raka prostaty bazuje ona na detekcji antygenów KLK3 (ang. *Kallikrein Related Peptidase 3*), KLK2 (ang. *Kallikrein Related Peptidase 2*), PSMA (ang. *Prostate-*

-*Specific Membrane Antygen*), HOXB13 (ang. *Homeobox Protein 13*), GRHL2 (ang. *Grainyhead Like Transcription Factor* 2), FOXA1 (ang. *Forkhead Box A1*), a także obecności krótkich form receptora androgenowego (ang. *Androgen Receptor*, AR). W analizie genów wyżej wymienionych białek znajduje zastosowanie technika molekularna ddPCR.

Bazująca na ekspresji antygenu EpCAM, technologia CellSearch®, charakteryzowała się porównywalną czułością i niższą skutecznością w zestawieniu z opisywanymi AdnaTest® i ddPCR [18]. Ponadto, technika AdnaTest®, zależnie od zastosowanego wariantu, wykazała obecność CTC u pacjentów w różnych stadiach raka stercza, również tych z przerzutami, obecność nowotworowych komórek macierzystych, a nawet komórek ulegających EMT. Bezdyskusyjną zaletą omawianej technologii okazała się szeroka gama stosowanych markerów, tj. PSA, PSMA, AR, C-MET (ang. *Tyrosine-Protein Kinase Met*), C-KIT (ang. *Tyrosine-Protein Kinase Kit*) oraz syntetazy tymidylanowej (ang. *Thymidylate Synthetase,* TYMS), pozwalających na stratyfikację pacjentów według stadium zaawansowania nowotworu [71].

Z kolei MagSweeper wykazuje podobną efektywność wychwytu CTC do metody CellSearch®, jednak w przeciwieństwie do niej, pozwala na izolację czystej subpopulacji żywych krążących komórek nowotworowych, z dobrze zachowanym transkryptomem. Pozwala to na dalsze przeprowadzenie analiz molekularnych, dostarczających cennych informacji klinicznych [14].

Użyteczny klinicznie okazał się również system NanoVelcro. Jak dotąd zastosowano go do monitorowania przebiegu terapii systemowej w raku prostaty. Analizy dotyczyły korelacji liczby CTC ze stanem klinicznym pacjentów przed i po 4-10 tygodniach terapii [52].

Technologia EPISPOT, wykrywająca wyłącznie produkty żywych komórek, w przypadku raka prostaty jest ukierunkowana na białko PSA oraz FGF2 (ang. *Fibroblast Growth Factor*). Badania, w których zastosowano ten test, u pacjentów ze zlokalizowanym nowotworem prostaty, wykazywały wykrywalność CTC w zakresie 58,7%-71% [45, 75].

Z kolei CellCollector®, dający możliwość analizy większych objętości krwi poprzez bezpośrednie wychwytywanie CTC z krwi pacjenta, cechował się wyższą czułością i efektywnością w stosunku do metody CellSearch® [30].

Porównanie trzech metod identyfikacji krążących komórek nowotworowych – CellSearch®, EPISPOT i CellCollector®, w badaniu pacjentów z miejscowym nowotworem prostaty pokazało, że system CellSearch® charakteryzował się najniższym wskaźnikiem wykrywalności CTC, wynoszącym zaledwie 14%, w stosunku do CellCollector® i EPISPOT, których wykrywalność stanowiła odpowiednio 48% i 42% [12]. Wytłumaczeniem tak zaskakującego wyniku w przypadku metody CellSearch® mógł być fakt, że u pacjentów bez przerzutów ilość krążących we krwi CTC jest znacznie mniejsza [65].

RAK PŁUC

Rak płuc w skali globalnej jest najbardziej śmiertelną chorobą nowotworową. Mimo znacznych postępów w diagnostyce i leczeniu, raporty WHO podsumowujące skalę zachorowań i zgonów na nowotwory wykazały, że nowe przypadki raka płuc zdiagnozowano u 2 milionów przedstawicieli obu płci. W tym samym roku z powodu tej choroby zmarło ponad 1,5 miliona pacjentów [22].

Wyróżnia się cztery typy histologiczne raka płuc: gruczolakoraki, raki płaskonabłonkowe, niedrobnokomórkowe oraz drobnokomórkowe [85, 55]. Choć w większości przypadków rak płuc jest wywoływany paleniem tytoniu, siła tej zależność jest determinowana typem histologicznym raka. Raki drobnokomórkowe i płaskonabłonkowe uważa się za wywołane wyłącznie paleniem, zaś gruczolakoraki nie są w tak dużym stopniu z nim powiązane [55].

Pięcioletnie przeżycie pacjenta ze zlokalizowanym rakiem płuc jest 13 razy wyższe od pacjentów z rakiem płuc z odległymi przerzutami [77, 96, 27]. Niestety przy obecnych metodach diagnostycznych, takich jak tomografia komputerowa (CT) lub pozytronowa tomografia emisyjna (PET) około 40% pacjentów z rakiem płuc w momencie diagnozy prezentuje obecność przerzutów. Dlatego też, istotnym jest opracowywanie specyficznych metod diagnostycznych do wczesnego wykrycia i leczenia pacjentów.

Jako złoty standard w diagnostyce raka płuca uznaje się badanie histopatologiczne. Jest ono jednak metodą inwazyjną, nie zawsze jednoznaczną, która obarczona jest ryzykiem odmy opłucnowej lub krwotoku. Najczęściej wybieranymi markerami nowotworowymi w diagnozowaniu raka płuc są: CEA (ang. *Carcino Embryonie Antigen*), CYFRA 21-1 (ang. *Cytokeratin Fragment Antigen 21-1*), SCCA (ang. *Squamous Cell Carcinoma Antigen*), NSE (ang. *Neuron Specific Enolase*) i CA 242 (ang. *Carbohydrate Antigen 242*). Niestety ich czułość i swoistość nie są w pełni satysfakcjonujące [41].

Większość metod detekcji CTC, wykorzystywanych w diagnostyce raka płuc opiera się na ekspresji antygenu powierzchniowego EpCAM. Inne, stosowane markery to HER2 (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), MUC1 (ang. *Mucin 1*) oraz cytokeratyny 8, 18 i 19 [51, 8, 62].

Dobrze rokującą metodą detekcji CTC w raku płuc jest AdnaTest®. Uważa się, że test ten charakteryzuje się większą czułością wykrywania CTC w niedrobnokomórkowym raku płuc w stosunku do referencyjnej metody CellSearch®. Za pomocą AdnaTest® CTC wykazano u 29% badanych, podczas gdy CellSearch® umożliwił ich wykrycie tylko u 15% pacjentów. Korzystne wydaje się być połączenie obu metod – wykrywalność CTC wzrosła wówczas do 40% [35].

Inną, stosunkowo nową techniką detekcji CTC u pacjentów z rakiem płuc jest metoda CellCollector®. Można ją uznać za wysoce skuteczną, gdyż CellCollector® umożliwił detekcję CTC (≥1 CTC) u 58% badanych pacjentów, podczas gdy detekcja CTC za pomocą "złotego standardu" CellSearch® okazała się pozytywna

u 27% pacjentów [30]. W innym badaniu CellCollector® został zastosowany do detekcji CTC u pacjentów we wczesnym stadium niedrobnokomórkowego raka płuc, gdzie CTC wykryto aż u 94,1% pacjentów [26].

Metody detekcji CTC niezależne od konkretnego markera, wykorzystują określone fizyczne lub biologiczne właściwości tych komórek do ich izolacji. Obejmują one separację na podstawie gęstości, wielkości (Screencell®), określonych właściwości elektrycznych (dielektroforeza) oraz zdolności inwazyjnej CTC (VitaAssay™) [54].

RAK JELITA GRUBEGO

Według raportu WHO, w 2018 roku na świecie nowotwór jelita grubego został wykryty u ponad miliona pacjentów i spowodował śmierć 500 tysięcy osób [22].

Rozwój raka jelita grubego jest procesem długotrwałym. W procesie transformacji nabłonka, prowadzącym do powstania raka jelita grubego, dochodzi do co najmniej 5 zmian na poziomie molekularnym, głównie na drodze dwóch szlaków. W 85% raków jelita grubego dochodzi do niestabilności chromosomalnej (CIN), zaś 15% przypadków jest spowodowane zdarzeniami powodującymi niestabilność mikrosatelitarną (MSI), znaną również, jako błąd replikacji (RER) [44].

Do czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka jelita grubego należy palenie tytoniu, spożywanie czerwonego i/lub przetworzonego mięsa, alkoholu, niewielkie spożycie warzyw i owoców, otyłość czy cukrzyca typu II [19].

Rutynowa kolonoskopia jest stosowana w diagnostyce wczesnych stadiów nowotworu, jednak jej inwazyjność zniechęca pacjentów do regularnych badań. Wśród osób, u których zdiagnozowano raka jelita grubego, około 20% będzie przechodzić chorobę z przerzutami. Regionalne węzły chłonne, wątroba, płuca i otrzewna to w przypadku raka jelita grubego najczęstsze miejsca przerzutów. Perforacja i/lub niedrożność jelit wiąże się ze złym rokowaniem, bez względu na stadium nowotworu [83].

Stosując różne metody detekcji CTC u pacjentów z rakiem jelita grubego (np. CellSearch®) stwierdzono niższe stężenie CTC w porównaniu z rakiem prostaty czy piersi. Może to być spowodowane wiązaniem EpCAM-pozytywnych CTC w wątrobie, obserwowane w raku jelita grubego [69]. Niedogodności te spowodowały konieczność zastosowania innych rozwiązań u pacjentów z tym typem raka. Dobre rezultaty przyniosło połączenie dwóch metod – CellSearch® i AdnaTest®, w celu zwiększenia skuteczności detekcji CTC [69, 58, 31]. Połączenie to spowodowało wzrost wskaźnika wykrywania z 30% do 50% (wskaźnik dla testów wykonanych osobno wynosił 30% dla AdnaTest® i 33% dla CellSearch®) [31].

Do detekcji CTC u pacjentów z rakiem jelita grubego zastosowano również CellCollector®. Badania porównawcze objęły CellCollector® i metodę referencyjną CellSearch®. Wyniki pokazały, że za pomocą pierwszej z nich wykryto 135 komórek, zaś przy użyciu CellSearch® 161. Podkreślono jednak, że za pomocą

CellCollector® wykryto ≥1 CTC u 41,3% pacjentów, a za pomocą CellSearch u 31,3%. Wyniki sugerują zatem, że detekcja CTC u pacjentów z rakiem jelita grubego za pomocą CellCollector® nie charakteryzuje się lepszą wydajnością w porównaniu do technologii CellSearch® [21].

PODSUMOWANIE

Wczesne wykrycie choroby nowotworowej u pacjentów daje większe możliwości leczenia i zwiększa szanse na przeżycie. Tradycyjne metody diagnostyczne nie zawsze pozwalają na wykrycie choroby w jej początkowym stadium, a część z nich nie należy do bezpiecznych czy komfortowych dla pacjenta. Dobrym wyborem wydaje się być detekcja i charakterystyka krążących komórek nowotworowych, jako markerów choroby oraz w celu oceny przebiegu jej leczenia. Istnieje wiele metod izolacji i detekcji CTC, które mogą opierać się zarówno na obecności specyficznych markerów na powierzchni komórek jak i ich fizycznych właściwościach. Warto podkreślić, że metody detekcji CTC cechują się zróżnicowaną skutecznością w różnych typach raków. Niemniej jednak, wykazano, że ich łączenie znacząco poprawia wydajność detekcji. Pewnym jest, że metody te będą ulegać ciągłemu ulepszaniu, już teraz stanowiąc dobre narzędzie diagnostyczne w wielu typach nowotworów.

LITERATURA

[1] ALI Z, YOUSAF N, LARKIN J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl* 2013; **11(2)**: 81-91.

[2] ALIX-PANABIÈRES C, SCHWARZENBACH H, PANTEL K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012; **63**: 199-215.

[3] ALIX-PANABIÈRES C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* 2012; **195**: 69-76.

[4] ALLEN TA, ASAD D, AMU E, HENSLEY MT, CORES J, VANDERGRIFF A, TANG J, DINH P-U, SHEN D, QIAO L, SU T, HU S, LIANG H, SHIVE H, HARRELL E, CAMPBELL C, PENG X, YODER JA, CHENG K. Circulating tumor cells exit circulation while maintaining multicellularity, augmenting metastatic potential. *J Cell Sci* 2019; **132(17)**: jcs231563.

[5] BACHMAN J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol* 2013; **530**: 67-74.

[6] BANKÓ P, LEE SY, NAGYGYÖRGY V, ZRÍNYI M, CHAE CH, CHO DH, TELEKES A. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J Hematol Oncol* 2019; **12(1)**: 48.

[7] BARRY MJ, SIMMONS LH. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. *Med Clin North Am* 2017; **101(4)**: 787-806.

[8] BOUILLEZ A, ADEEGBE D, JIN C, HU X, TAGDE A, ALAM M, RAJABI H, WONG K–K, KUFE D. MUC1-C promotes the suppressive immune microenvironment in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2017; **6(9)**: e1338998.

[9] BROEKAERT SM, ROY R, OKAMOTO I, VAN DEN OORD J, BAUER J, GARBE C, BARNHILL RL, BUSAM KJ, COCHRAN AJ, COOK MG, ELDER DE, MCCARTHY SW, MIHM MC, SCHADENDORF D, SCOLYER RA, SPATZ A, BASTIAN BC. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; **23(6)**: 763-770.

[10] BRONCY L, PATERLINI-BRÉCHOT P. Clinical Impact of Circulating Tumor Cells in Patients with Localized Prostate Cancer. *Cells* 2019; **8(7)**: 676.
[11] BUDNA J, ŚWIERCZEWSKA M, JANKOWIAK A, ZABEL M. Detekcja krążacych komórek nowotworowych przy zastosowaniu techniki EpiSPOT. *Post Biol Komórki* 2015; **42(3)**: 401-416.
[12] BUDNA-TUKAN J, ŚWIERCZEWSKA M, MAZEL M, CIEŚLIKOWSKI WA, IDA A, JANKOWIAK A, ANTCZAK A, NOWICKI M, PANTEL K, AZRIA D, ZABEL M, ALIX-PANABIÈRES C. Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-Metastatic High-Risk Prostate Cancer before and after Radiotherapy Using Three Different Enumeration Assays. *Cancers (Basel)* 2019; **11(6)**: 802.
[13] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, LOIRAT D, COUSSY F, PIERGA J-Y, BIDARD F-C. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol* 2017; **22(3)**: 421-430.
[14] CANN GM, GULZAR ZG, COOPER S, LI R, LUO S, TAT M, STUART S, SCHROTH G, SRINIVAS S, RONAGHI M, BROOKS JD, TALASAZ AH. mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS One* 2012; **7(11)**: e49144.
[15] CAO Z, LIVAS T, KYPRIANOU N. Anoikis and EMT: Lethal „Liaisons" during Cancer Progression. *Crit Rev Oncog* 2016; **21(3-4)**: 155-168.
[16] CAYREFOURCQ L, DE ROECK A, GARCIA C, STOEBNER P-E, FICHEL F, GARIMA F, PERRIARD F, DAURES J-P, MEUNIER L, ALIX-PANABIÈRES C. S100-EPISPOT: A New Tool to Detect Viable Circulating Melanoma Cells. *Cells* 2019; **8(7)**: 755.
[17] CHIKAISHI Y, YONEDA K, OHNAGA T, TANAKA F. EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a ‚universal CTC-chip'. *Oncol Rep* 2017; **37(1)**: 77-82.
[18] DANILA DC, SAMOILA A, PATEL C, SCHREIBER N, HERKAL A, ANAND A, BASTOS D, HELLER G, FLEISHER M, SCHER HI. Clinical Validity of Detecting Circulating Tumor Cells by AdnaTest Assay Compared With Direct Detection of Tumor mRNA in Stabilized Whole Blood, as a Biomarker Predicting Overall Survival for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients. *Cancer J* 2016; **22(5)**: 315-320.
[19] DEKKER E, TANIS PJ, VLEUGELS JLA, KASI PM, WALLACE MB. Colorectal cancer. *Lancet* 2019; **394(10207)**: 1467-1480.
[20] DIEFENBACH RJ, LEE JH, RIZOS H. Monitoring Melanoma Using Circulating Free DNA. *Am J Clin Dermatol* 2019; **20(1)**: 1-12.
[21] DIZDAR L, FLUEGEN G, VAN DALUM G, HONISCH E, NEVES RP, NIEDERACHER D, NEUBAUER H, FEHM T, REHDERS A, KRIEG A, KNOEFEL WT, STOECKLEIN NH. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer patients using the GILUPI CellCollector: results from a prospective, single-center study. *Mol Oncol* 2019; **13(7)**: 1548-1558.
[22] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, MATHERS C, PARKIN DM, PIÑEROS M, ZNAOR A, BRAY F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; **144(8)**: 1941-1953.
[23] FRANCESCHINI D, FRANZESE C, NAVARRIA P, ASCOLESE AM, DE ROSE F, DEL VECCHIO M, SANTORO A, SCORSETTI M. Radiotherapy and immunotherapy: Can this combination change the prognosis of patients with melanoma brain metastases?. *Cancer Treat Rev* 2016; **50**: 1-8.
[24] FUJITA K, NONOMURA N. Urinary biomarkers of prostate cancer. *Int J Urol* 2018; **25(9)**: 770-779.
[25] GALENA HJ. Complications occurring from diagnostic venipuncture. *J Fam Pract* 1992; **34(5)**: 582-584.
[26] GASIOROWSKI L, DYSZKIEWICZ W, ZIELINSKI P. In-vivo isolation of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients by CellCollector. *Neoplasma* 2017; **64(6)**: 938-944.
[27] GELVAN A, RISUM S, LANGER SW. Incidence and survival from lung cancer in Greenland is comparable to survival in the Nordic countries. *Dan Med J* 2015; **62(4)**: A5033.
[28] GORAYSKI P, BURMEISTER B, FOOTE M. Radiotherapy for cutaneous melanoma: current and future applications. *Future Oncol* 2015; **11(3)**: 525-534.
[29] GORGES K, WILTFANG L, GORGES TM, SARTORI A, HILDEBRANDT L, KELLER L, VOLKMER B, PEINE S, BABAYAN A, MOLL I, SCHNEIDER SW, TWAROCK S, MOHR P,

FISCHER JW, PANTEL K. Intra-Patient Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Blood of Melanoma Patients. *Cancers (Basel)* 2019; 11(11): 1685.

[30] GORGES TM, PENKALLA N, SCHALK T, JOOSSE SA, RIETHDORF S, TUCHOLSKI J, LÜCKE K, WIKMAN H, JACKSON S, BRYCHTA N, VON AHSEN O, SCHUMANN C, KRAHN T, PANTEL K. Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clin Cancer Res* 2016; **22(9)**: 2197-2206.

[31] GORGES TM, STEIN A, QUIDDE J, HAUCH S, RÖCK K, RIETHDORF S, JOOSSE SA, PANTEL K. Improved Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer by the Combination of the CellSearch® System and the AdnaTest®. *PLoS One* 2016; **11(5)**: e0155126.

[32] GROZESCU T, POPA F. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life* 2017; **10(1)**: 5-12.

[33] GRUSELLE O, COCHE T, LOUAHED J. Development of a Quantitative Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of MAGE-A3-Positive Tumors. *J Mol Diagn* 2015; **17(4)**: 382-391.

[34] GUHA P, DAS A, DUTTA S, CHAUDHURI TK. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. *J Clin Lab Anal* 2018; **32(1)**: e22181.

[35] HANSSEN A, WAGNER J, GORGES TM, TAENZER A, UZUNOGLU FG, DRIEMEL C, STOECKLEIN NH, KNOEFEL WT, ANGENENDT S, HAUCH S, ATANACKOVIC D, LOGES S, RIETHDORF S, PANTEL K, WIKMAN H. Characterization of different CTC subpopulations in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 2016; **6**: 28010.

[36] HE Y, SHI J, SHI G, XU X, LIU Q, LIU C, GAO Z, BAI J, SHAN B. Using the New CellCollector to Capture Circulating Tumor Cells from Blood in Different Groups of Pulmonary Disease: A Cohort Study. *Sci Rep* 2017; **7(1)**: 9542.

[37] HEAD SR, KOMORI HK, LAMERE SA, WHISENANT T, VAN NIEUWERBURGH F, SALOMON DR, ORDOUKHANIAN P. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques* 2014; **56(2)**: 61-77.

[38] HINZ S, HENDRICKS A, WITTIG A, SCHAFMAYER C, TEPEL J, KALTHOFF H, BECKER T, RÖDER C. Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients – a prospective study. *BMC Cancer* 2017; **17(1)**: 53.

[39] HONG Y, LI Z, ZHANG Q. A circulating tumor cell cluster-based model for tumor metastasis (Hypothesis). *Oncol Lett* 2016; **12(6)**: 4891-4895.

[40] HO-PUN-CHEUNG A, BASCOUL-MOLLEVI C, ASSENAT E, BOISSIÈRE-MICHOT F, BIBEAU F, CELLIER D, YCHOU M, LOPEZ-CRAPEZ E. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 31.

[41] HUANG H, SHI Y, HUANG J, WANG X, ZHANG R, CHEN H. Circulating tumor cells as a potential biomarker in diagnosis of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Respir J* 2018; **12(2)**: 639-645.

[42] JAN YJ, CHEN JF, ZHU Y, LU Y-T, CHEN SH, CHUNG H, SMALLEY M, HUANG Y-W, DONG J, CHEN L-C, YU H-H, TOMLINSON JS, HOU S, AGOPIAN VG, POSADAS EM, TSENG H-R. NanoVelcro rare-cell assays for detection and characterization of circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2018; **125**: 78-93.

[43] JOSHI P, JACOBS B, DERAKHSHAN A, MOORE LR, ELSON P, TRIOZZI PL, BORDEN E, ZBOROWSKI M. Enrichment of circulating melanoma cells (CMCs) using negative selection from patients with metastatic melanoma. *Oncotarget* 2014; **5(9)**: 2450-2461.

[44] KAUH J, BRAWLEY OW, BERGER M. Racial disparities in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 2007; **31(3)**: 123-133.

[45] KUSKE A, GORGES TM, TENNSTEDT P, TIEBEL A-K, POMPE R, PREIßER F, PRUES S, MAZEL M, MARKOU A, LIANIDOU E, PEINE S, ALIX-PANABIÈRES C, RIETHDORF S, BEYER B, SCHLOMM T, PANTEL K. Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients. *Sci Rep* 2016; **6**: 39736.

[46] LEI X, GUAN CW, SONG Y, WANG H. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell Int* 2015; **15(1)**: 3.
[47] LEITER U, EIGENTLER T, GARBE C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2014; **810**: 120-140.
[48] LI K, BROWNLEY A. Primer design for RT-PCR. *Methods Mol Biol* 2010; **630**: 271-299.
[49] LIANIDOU ES, MARKOU A, STRATI A. The Role of CTCs as Tumor Biomarkers. *Adv Exp Med Biol* 2015; **867**: 341-367.
[50] LITWIN MS, TAN HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA* 2017; **317(24)**: 2532-2542.
[51] LIU S, LI S, HAI J, WANG X, CHEN T, QUINN MM, GAO P, ZHANG Y, JI H, CROSS DAE, WONG K–K. Targeting *HER2* Aberrations in Non-Small Cell Lung Cancer with Osimertinib. *Clin Cancer Res* 2018; **24(11)**: 2594-2604.
[52] LU YT, ZHAO L, SHEN Q, GARCIA MA, WU D, HOU S, SONG M, XU X, OUYANG W-H, OUYANG WW-L, LICHTERMAN J, LUO Z, XUAN X, HUANG J, CHUNG LWK, RETTIG M, TSENG H-R, SHAO C, POSADAS EM. NanoVelcro Chip for CTC enumeration in prostate cancer patients. *Methods* 2013; **64(2)**: 144-152.
[53] MA J, FRANK MH. Isolation of Circulating Melanoma Cells. *Methods Mol Biol* 2015; 10.1007/7651_2015_300.
[54] MALY V, MALY O, KOLOSTOVA K, BOBEK V. Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *In Vivo* 2019; **33(4)**: 1027-1037.
[55] MEZA R, MEERNIK C, JEON J, COTE ML. Lung cancer incidence trends by gender, race and histology in the United States, 1973-2010. *PLoS One* 2015; **10(3)**: e0121323.
[56] MISHRA H, MISHRA PK, EKIELSKI A, JAGGI M, IQBAL Z, TALEGAONKAR S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; **144(12)**: 2283-2302.
[57] MÜLLER V, RIETHDORF S, RACK B, JANNI W, FASCHING PA, SOLOMAYER E, AKTAS B, KASIMIR-BAUER S, PANTEL K, FEHM T, DETECT STUDY GROUP. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Res* 2012; **14(4)**: R118.
[58] NORMANNO N, CERVANTES A, CIARDIELLO F, DE LUCA A, PINTO C. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. *Cancer Treat Rev* 2018; **70**: 1-8.
[59] ORNSTEIN DK, PRUTHI RS. Prostate-specific antigen. *Expert Opin Pharmacother* 2000; **1(7)**: 1399-1411.
[60] PANTEL K, HILLE C, SCHER HI. Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer: From Discovery to Clinical Utility. *Clin Chem* 2019; **65(1)**: 87-99.
[61] PAOLETTI C, HAYES DF. Circulating Tumor Cells. *Adv Exp Med Biol* 2016; **882**: 235-258.
[62] PERZANOWSKA A, FATALSKA A, WOJTAS G, LEWANDOWICZ A, MICHALAK A, KRASOWSKI G, BORCHERS CH, DADLEZ M, DOMANSKI D. An MRM-Based Cytokeratin Marker Assay as a Tool for Cancer Studies: Application to Lung Cancer Pleural Effusions. *Proteomics Clin Appl* 2018; **12(2)**: 10.1002/prca.201700084.
[63] POSTEL M, ROOSEN A, LAURENT-PUIG P, TALY V, WANG-RENAULT SF. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev Mol Diagn* 2018; **18(1)**: 7-17.
[64] POWELL AA, TALASAZ AH, ZHANG H, CORAM MA, REDDY A, DENG G, TELLI ML, ADVANI RH, CARLSON RW, MOLLICK JA, SHETH S, KURIAN AW, FORD JM, STOCKDALE FE, QUAKE SR, PEASE RF, MINDRINOS MN, BHANOT G, DAIRKEE SH, DAVIS RW, JEFFREY SS. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One* 2012; **7(5)**: e33788.
[65] RACK B, SCHINDLBECK C, JÜCKSTOCK J, ANDERGASSEN U, HEPP P, ZWINGERS T, FRIEDL TWP, LORENZ R, TESCH H, FASCHING PA, FEHM T, SCHNEEWEISS A, LICHTENEGGER W, BECKMANN MW, FRIESE K, PANTEL K, JANNI W, SUCCESS STU-

DY GROUP. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; **106(5)**: dju066.

[66] RAJA R, PANDEY A, KUMAR P. Epithelial to mesenchymal plasticity: role in cancer progression. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2020; **25**: 838-873.

[67] RAPANOTTI MC, CAMPIONE E, SPALLONE G, ORLANDI A, BERNARDINI S, BIANCHI L. Minimal residual disease in melanoma: circulating melanoma cells and predictive role of MCAM/MUC18/MelCAM/CD146. *Cell Death Discov* 2017; **3**: 17005.

[68] RASTRELLI M, TROPEA S, ROSSI CR, ALAIBAC M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014; **28(6)**: 1005-1011.

[69] RIETHDORF S, O'FLAHERTY L, HILLE C, PANTEL K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev* 2018; **125**: 102-121.

[70] ROEDER C, SCHULER-THURNER B, BERCHTOLD S, VIETH G, VON DEN DRIESCH P, SCHULER G, LÜFTL M. MAGE-A3 is a frequent tumor antigen of metastasized melanoma. *Arch Dermatol Res* 2005; **296(7)**: 314-319.

[71] RUSSO GI, BIER S, HENNENLOTTER J, BEGER G, PAVLENCO L, VAN DE FLIERDT J, HAUCH S, MAAS M, WALZ S, RAUSCH S, BEDKE J, MORGIA G, STENZL A, TODENHÖFER T. Expression of tumour progression-associated genes in circulating tumour cells of patients at different stages of prostate cancer. *BJU Int* 2018; **122(1)**: 152-159.

[72] SALVIANTI F, COSTANZA F, SONNATI G, PINZANI P. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells by Quantitative Real-Time PCR. *Methods Mol Biol* 2020; **2065**: 139-151.

[73] SALVIANTI F, MASSI D, DE GIORGI V, GORI A, PAZZAGLI M, PINZANI P. Evaluation of the liquid biopsy for the detection of BRAFV600E mutation in metastatic melanoma patients. *Cancer Biomark* 2019; **26(3)**: 271-279.

[74] SAUCEDO-ZENI N, MEWES S, NIESTROJ R, GASIOROWSKI L, MURAWA D, NOWACZYK P, TOMASI T, WEBER E, DWORACKI G, MORGENTHALER NG, JANSEN H, PROPPING C, STERZYNSKA K, DYSZKIEWICZ W, ZABEL M, KIECHLE M, REUNING U, SCHMITT M, LÜCKE K. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol* 2012; **41(4)**: 1241-1250.

[75] SCHWARZENBACH H, ALIX-PANABIÈRES C, MÜLLER I, LETANG N, VENDRELL J-P, REBILLARD X, PANTEL K. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15(3)**: 1032-1038.

[76] SHAIN AH, BASTIAN BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016; **16(6)**: 345-358.

[77] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; **65(1)**: 5-29.

[78] SIEUWERTS AM, JEFFREY SS. Multiplex molecular analysis of CTCs. *Recent Results Cancer Res* 2012; **195**: 125-140.

[79] SOLER A, CAYREFOURCQ L, MAZEL M, ALIX-PANABIÈRES C. EpCAM-Independent Enrichment and Detection of Viable Circulating Tumor Cells Using the EPISPOT Assay. *Methods Mol Biol* 2017; **1634**: 263-276.

[80] TALASAZ AH, POWELL AA, HUBER DE, BERBEE JG, ROH K-H, YU W, XIAO W, DAVIS MM, PEASE RF, MINDRINOS MN, JEFFREY SS, DAVIS RW. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106(10)**: 3970-3975.

[81] TAYOUN T, FAUGEROUX V, OULHEN M, ABERLENC A, PAWLIKOWSKA P, FARACE F. CTC-Derived Models: A Window into the Seeding Capacity of Circulating Tumor Cells (CTCs). *Cells* 2019; **8(10)**: 1145.

[82] TEO MY, RATHKOPF DE, KANTOFF P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med* 2019; **70**: 479-499.

[83] THANIKACHALAM K, KHAN G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* 2019; **11(1)**: 164.

[84] THEIL G, FISCHER K, WEBER E, MEDEK R, HODA R, LÜCKE K, FORNARA P. The Use of a New CellCollector to Isolate Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Different Stages of Prostate Cancer and Clinical Outcomes – A Proof-of-Concept Study. *PLoS One* 2016; **11(8)**: e0158354.
[85] TRAVIS WD, LUBIN J, RIES L, DEVESA S. United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer* 1996; **77(12)**: 2464-2470.
[86] VAN ZEIJL MC, VAN DEN EERTWEGH AJ, HAANEN JB, WOUTERS MW. (Neo)adjuvant systemic therapy for melanoma. *Eur J Surg Oncol* 2017; **43(3)**: 534-543.
[87] WANG G, ZHAO D, SPRING DJ, DEPINHO RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev* 2018; **32(17-18)**: 1105-1140.
[88] WANG Y, NAVIN NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell* 2015; **58(4)**: 598-609.
[89] www.cellsearchruo.com/ruo-products/kits [dostęp: 01.06.2020]
[90] www.qiagen.com/us/applications/liquid-biopsy/ctc [dostęp: 02.06.2020]
[91] XIONG TF, PAN FQ, LI D. Expression and clinical significance of S100 family genes in patients with melanoma. *Melanoma Res* 2019; **29(1)**: 23-29.
[92] XU MJ, DORSEY JF, AMARAVADI R, KARAKOUSIS G, SIMONE CB, XU X, XU W, CARPENTER EL, SCHUCHTER L, KAO GD. Circulating Tumor Cells, DNA, and mRNA: Potential for Clinical Utility in Patients With Melanoma. *Oncologist* 2016; **21(1)**: 84-94.
[93] YANAGITA M, LUKE JJ, HODI FS, JÄNNE PA, PAWELETZ CP. Isolation and characterization of circulating melanoma cells by size filtration and fluorescent in-situ hybridization. *Melanoma Res* 2018; **28(2)**: 89-95.
[94] YOHE S, THYAGARAJAN B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2017; **141(11)**: 1544-1557.
[95] YOSHIOKA S, FUJIWARA H, HIGUCHI T, YAMADA S, MAEDA M, FUJII S. Melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) is expressed on human luteinizing granulosa cells: enhancement of its expression by hCG, interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Mol Hum Reprod* 2003; **9(6)**: 311-319.
[96] YU JB, SOULOS PR, CRAMER LD, DECKER RH, KIM AW, GROSS CP. Comparative effectiveness of surgery and radiosurgery for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer* 2015; **121(14)**: 2341-2349.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 01.07.2020
Przyjęto: 22.07.2020
Paula Kamińska
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań
tel.: 61 854 64 55
e-mail: kaminska.p19@gmail.com

CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY MeCP2 – KRYTYCZNY REGULATOR EPIGENETYCZNY W MÓZGU

TRANSCRIPTION FACTOR MeCP2 – A CRITICAL EPIGENETIC REGULATOR IN THE BRAIN

Katarzyna SZMYT[1], Maciej SUPERSON[1],
Patrycja PAŃCZYSZYN-TRZEWIK[2],
Ruslan ZAVATSKYI[2], Magdalena SOWA-KUĆMA[2]

[1]Studenckie Koło Naukowe Fizjologii „Neuron", Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski
[2]Zakład Fizjologii Człowieka, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

Streszczenie: MeCP2 to białko powszechnie występujące w różnych tkankach ludzkiego organizmu, którego najwyższy poziom odnotowuje się w mózgu. Ze względu na jego zdolność do wiązania się zarówno z metylowanym DNA jak i do kompleksów modyfikujących chromatynę, MeCP2 może zarówno odczytywać wzory modyfikacji epigenetycznych jak i brać udział w powstawaniu nowych. Najwyższą ekspresję osiąga w dojrzałych neuronach i pozostaje wysoka przez całe życie, co podkreśla jego ważną funkcję w dorosłym mózgu. Konsekwencją niedoborów tego białka są nieprawidłowości w rozwoju aksonów i dendrytów, a także neurotoksyczność. Mutacje *MECP2* mogą manifestować się w postaci występowania wielu zaburzeń (w większości choroby o podłożu neurobiologicznym), jak np. zespół Retta, czy ciężka encefalopatia noworodkowa. Poza tym, MeCP2 może odgrywać ważną rolę w rozwoju uzależnień oraz zaburzeń depresyjnych, a także nowotworów.

Słowa kluczowe: MeCP2, regulacja epigenetyczna, czynnik transkrypcyjny, choroby neurologiczne, rozwój mózgu

Summary: MeCP2 protein is distributed in various tissues of the human body, with the highest level recorded in the brain. MeCP2 can act as a transcription factor capable of either activating or repressing transcription. It can bind to both methylated DNA and chromatin-modifying complexes. *MECP2* expression increase during development and remain high throughout life which underlines its important function in the adult brain. It is know, that MeCP2 is responsible for the proper

maturation of neuron cells, synaptogenesis and general development of the nervous system. The consequence of its deficiencies are abnormalities in the development of axons and dendrites, as well as neurotoxicity. Mutations in the *MECP2* gene can result in many disorders. Most of them are neurobiological diseases, such as Rett syndrome or neonatal encephalopathy. In addition, MeCP2 may play an important role in the pathomechanisms of addiction and depressive disorders as well as cancer.

Keywords: MeCP2, epigenetic regulation, transcription factor, neurobiological disease, brain development

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich lat zainteresowanie epigenetyką znacznie wzrosło, a termin ten coraz częściej pojawia się nie tylko w kontekście badań molekularnych, ale również i tych z zakresu fizjologii, czy nawet ekologii. Został on zaproponowany w 1942 r. przez Waddingtona i definiuje dziedzinę nauki zajmującą się badaniem zmian zachodzących w ekspresji/funkcji genów, które nie wynikają bezpośrednio ze zmian sekwencji nukleotydów (mutacji) w DNA [14]. Pod wpływem działania różnych czynników zewnętrznych (np. stres, dieta, styl życia) dochodzi do licznych modyfikacji DNA oraz białek histonowych prowadzących do zmian w strukturze chromatyny. Konsekwencją tego jest zmiana dostępności promotorów genów dla czynników transkrypcyjnych i białek enzymatycznych, co prowadzi do modyfikacji procesów transkrypcji DNA na RNA, a tym samym zmian ekspresji określonych genów. Co ciekawe zmiany epigenomu mogą być dziedziczone międzypokoleniowo i coraz częściej łączone są z patogenezą wielu chorób, w tym nowotworów i zaburzeń o podłożu neurobiologicznym [47].

Do najważniejszych mechanizmów epigenetycznych zaliczamy: metylację/demetylację DNA, biochemiczne modyfikacje (w tym acetylacja/deacetylacja, fosforylacja/defosforylacja, metylacja/demetylacja, sumoilacja) białek chromatyny, oraz oddziaływanie małych niekodujących (mikro) RNA Wśród najczęściej badanych, szczególnie w kontekście patomechanizmów chorób, są zmiany profilu metylacji DNA oraz acetylacji i metylacji białek histonowych [9, 10].

Proces metylacji DNA katalizowany jest przez enzymy z rodziny DNA metylotransferaz (ang. *DNA methyltransferases*, DNMTs), które są odpowiedzialne za przyłączanie grupy metylowej (-CH_3) do piątego węgla cytozyny (powstaje 5-metylocytozyna, 5mC) w miejscach określanych jako wyspy CpG (regiony w genomie o podwyższonej zawartości dinukleotydów CpG). Procesem przeciwnym do metylacji jest reakcja demetylacji katalizowana przez DNA demetylazy takie jak: glikozydaza tyminy (ang. *Thymine-DNA glycosylase,* TDG), deaminaza cytozyny (*ang. cytosine deaminase,* AID) czy białka TET (ang. *Ten-eleven Translocation*)

[54]. Jak wskazują liczne badania, metylacja DNA odgrywa istotną rolę w rozwoju i przebiegu chorób nowotworowych (np. nowotwory piersi, płuc, prostaty, okrężnicy czy białaczki) [9], chorób psychicznych (np. schizofrenia) [40], neurodegenaracyjnych [18, 43] oraz w procesach starzenia się ludzkiego organizmu [26].

Kolejną ważną grupę zmian epigenetycznych stanowią modyfikacje histonów. Histony to grupa białek zasadowych tworzących rdzenie, na które nawinięta jest nić DNA, formując strukturę chromatyny. Wyróżnia się 5 typów histonów: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Trzy pierwsze są szczególnie bogate w aminokwas lizynę, zaś dwa kolejne, najbardziej konserwatywne, w argininę. Końce białek (tzw. ogony histonowe) ulegają licznym modyfikacjom potranslacyjnych polegających najczęściej na przyłączaniu niewielkich grup metylowych, bądź acetylowych [6]. Reakcje acetylacji/deacetylacji możliwe są dzięki zaangażowaniu enzymów, odpowiednio acetylotransferaz histonów (ang. *histone acetyltransferase*, HAT) i deacetylaz histonów (ang. *histone deacetylase*, HDAC 1-11 podzielone na trzy klasy) [38]. Metylacja białek histonowych jest z reguły procesem bardziej złożonym, polegającym na dołączaniu jednej, dwu lub trzech grup metylowych (odpowiednio: mono-, di- lub trimetylacja) do aminokwasu lizyny przy aktywności metylotransferaz histonów. Zasadniczo konsekwencją acetylacji histonów jest aktywacja ekspresji genów, zaś deacetylacja wiąże się z jej zahamowaniem. Metylacja histonów, w zależności od ilości przyłączonych grup metylowych i miejsca ich przyłączenia, może wywierać efekt aktywujący lub hamujący [6].

Uważa się, że modyfikacje epigenetyczne białek wpływają na strukturę chromatyny w dwojaki sposób. Po pierwsze zmieniają (nasilają lub osłabiają) oddziaływanie histon-histon bądź histon-DNA, przez co w istotny sposób modulują stopień kondensacji chromatyny. Rozluźnienie chromatyny ułatwia przyłączenie się polimerazy RNA oraz czynników transkrypcyjnych do promotora genów i aktywację procesu transkrypcji. Przeciwnie jej kompresja prowadzi do zahamowania ekspresji genów. Drugi mechanizm działania modyfikacji związany jest z ich aktywującym lub hamującym wpływem na wiązanie białek regulujących strukturę chromatyny. Białka te odczytują znaczenie danego wzoru modyfikacji i powodują dalsze modyfikacje chromatyny – samodzielnie lub poprzez rekrutację innych czynników [18]. Przykładem może być czynnik MeCP2 (ang. *Methyl-CpG binding protein 2*), który jest wielofunkcyjnym białkiem zaangażowanym w regulację licznych procesów zachodzących w jądrze komórkowym. Ze względu na fakt, że MeCP2 może aktywnie wiązać 5mC w DNA, początkowo przypisano mu rolę represyjną. Niedawno wykazano, że białko może również oddziaływać z 5-hydroksymetylowanymi cytozynami (5hmC) w regionach wydłużania aktywnych transkrypcyjnie genów oraz uczestniczy w rekrutacji zarówno korepresorów jak i koaktywatorów transkrypcji. W związku z tym MeCP2 postrzegany jest obecnie jako (pozytywny lub negatywny) regulator transkrypcji genów [41].

ZNACZENIE MeCP2 W ROZWOJU I FUNKCJONOWANIU MÓZGU

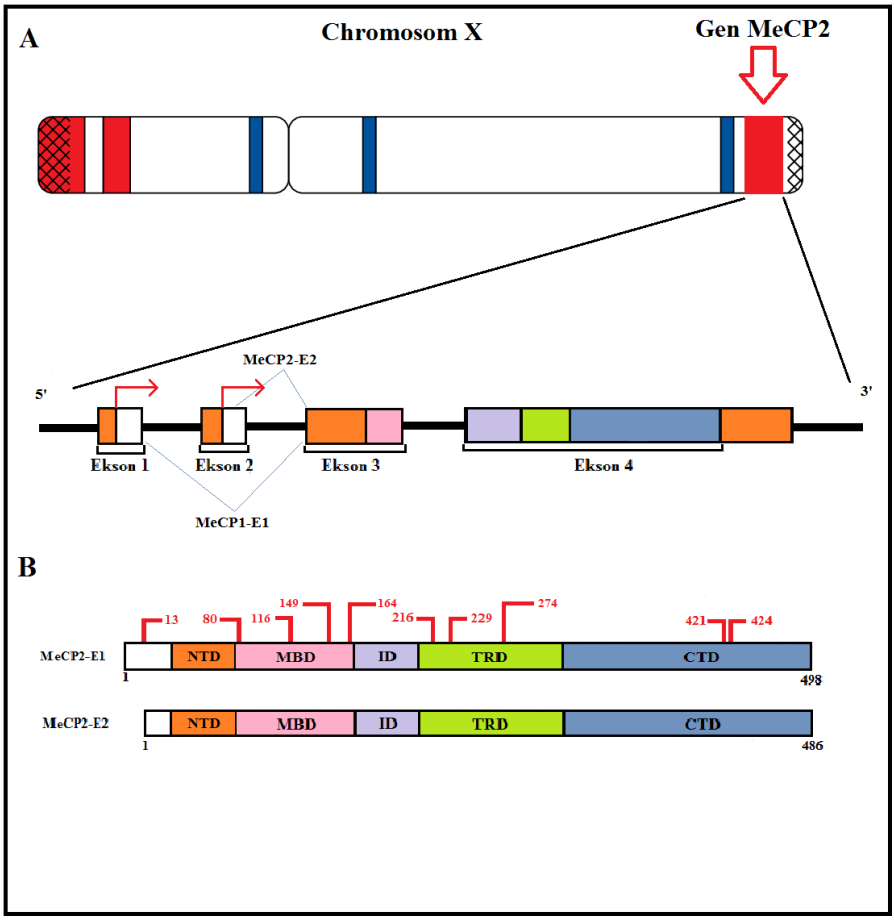
OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA MeCP2

Białko MeCP2 występuje powszechnie w różnych tkankach ludzkiego organizmu, jednakże nie z taką samą intensywnością. W płucach, śledzionie, a przede wszystkim w mózgu (głównie w neuronach, w mniejszym stopniu w komórkach glejowych) obserwuje się jego najwyższą ekspresję. Z drugiej strony w wątrobie, sercu, nerkach, czy jelicie cienkim notuje się niższe niż średnia, poziomy białka MeCP2 [23, 11, 44]. We wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego u myszy poziom MeCP2 jest niski, wzrasta natomiast w późniejszych jego etapach. Najwyższą ekspresję osiąga w dojrzałych neuronach i pozostaje wysoki przez całe dorosłe życie, co podkreśla jego ważną funkcję w dorosłym mózgu. U ludzi widoczny wzrost ekspresji MeCP2 następuje od połowy ciąży i stopniowo zwiększa się aż do 10 roku życia. Wiadomo, że ten czynnik transkrypcyjny odgrywa kluczową rolę w dojrzewaniu i różnicowaniu neuronów, synaptogenezie i rozwoju układu nerwowego [23]. Brak lub obniżenie aktywności MeCP2 skutkuje nieprawidłowym rozwojem dendrytów i aksonów (w konsekwencji zaburzeniami w rozwoju mózgowia) oraz nasileniem procesów neurotoksyczności wynikających z nadmiernego uwalniania kwasu glutaminowego [31].

MeCP2 to prawdopodobnie jedno z najlepiej oraz najdokładniej opisanych białek jądrowych należących do rodziny MBD (zawierają specyficzne domeny wiążące grupy metylowe; ang. *methyl-CpG-binding domain*, MBD). W ludzkim organizmie kodowane jest przez składający się z około 76 tysięcy par zasad (kpz) gen *MECP2,* który zlokalizowany jest przy końcu długiego ramienia chromosomu X w regionie q28. Zbudowany jest z czterech eksonów (kodujące części genów) oraz trzech intronów (niekodujące części genów) (Ryc. 1A). Gen *MECP2* jest regulowany negatywnie przez wiązanie niehistonowych białek chromosomalnych HMGN (ang. *High Mobility Group Nucleosome*) oraz pozytywnie przez czynnik wzmacniający 2C miocytów (ang. *Myocyte-specific Enhancer Factor* 2C, MEF2C). Istotną rolę w regulacji ekspresji genu odgrywają również mikroRNA, takie jak miR-132, rmiR-7b, miR-483-5p, miR-155/miR-802 oraz miR-181 [3].

U myszy i ludzi alternatywne składanie genu *mecp2/MECP2* prowadzi do wytworzenia dwóch izoform białkowych (MeCP2E1 – 498 aminokwasów i MeCP2E2 – 468 aminokwasów) [2, 49]. Obydwie izoformy różnią się przede wszystkim okresem półtrwania (E1 – 4 godziny, E2 – 100 godzin). Izoforma E1 to główna forma MeCP2 i ta, która jest silniej ekspresjonowana (ok. 90% całkowitego MeCP2) w mózgu [3], stąd będzie ona przedmiotem dalszych rozważań.

Białko MeCP2, którego łączna masa wynosi ok. 53 kDa, utworzone jest przez 5 ułożonych kolejno charakterystycznych części: domena N-końcowa (ang. *N-terminal domain*, NTD), domena odpowiadająca za wiązanie metylowanego DNA



RYCINA 1. A. Lokalizacja genu MeCP2 na chromosomie X, oraz jego organizacja z zaznaczeniem miejsc rozpoczęcia transkrypcji izoformy E1 oraz E2 białka MeCP2 (czerwone strzałki), **B.** Schematyczna organizacja budowy białka MeCP2 z uwzględnieniem jego 5 domen oraz poglądowym oznaczeniem miejsc potranslacyjnej fosforylacji (czerwone kreski wraz z numerami oznaczającymi numer modyfikowanego aminokwasu). Opracowano na podstawie [3]

FIGURE 1. A. Localization of the MeCP2 gene on the X chromosome, and its organization with marking of transcription start points for the E1 and E2 isoforms (red arrows), **B.** Schematic organization of the MeCP2 protein structure, including its 5 domains and an illustrative designation of post-translational phosphorylation sites (red lines with numbers denoting the number of the modified aminoacids). Based on [3]

(ang *Methyl-CpG-binding domain*, MBD), domena pośrednia (ID) stabilizująca MBD, domena odpowiadająca za represję transkrypcji DNA (ang. *transcriptional repression domain*, TRD) oraz domena C-końcowa (ang. *carboxy terminal domain,* CTD) [35] (Ryc. 1B). Spośród wymienionych, dwie domeny – MBD oraz TRD

związane są z represją transkrypcji, która odbywa się poprzez interakcje z metylowanym DNA, pozostałe zaś biorą udział w innych oddziaływaniach MeCP2 [2].

Analiza budowy przestrzenną białka pozwala stwierdzić, że składa się ono w: 4% z α-helis, 21% z β-harmonijek, a w 13% z β-zakrętów. Co bardzo interesujące, aż 60% białka MeCP2 nie tworzy żadnych struktur, które można by jasno przyporządkować do którejś konkretnej grupy [1]. Stwierdzono również, że jedynie domena MBD wykazuje obecność zdefiniowanych, wyraźnych struktur III-rzędowych. Pozostałe fragmenty MeCP2 są natomiast jednym z najlepszych przykładów wewnętrznie nieuporządkowanego białka [2].

AKTYWACJA MeCP2

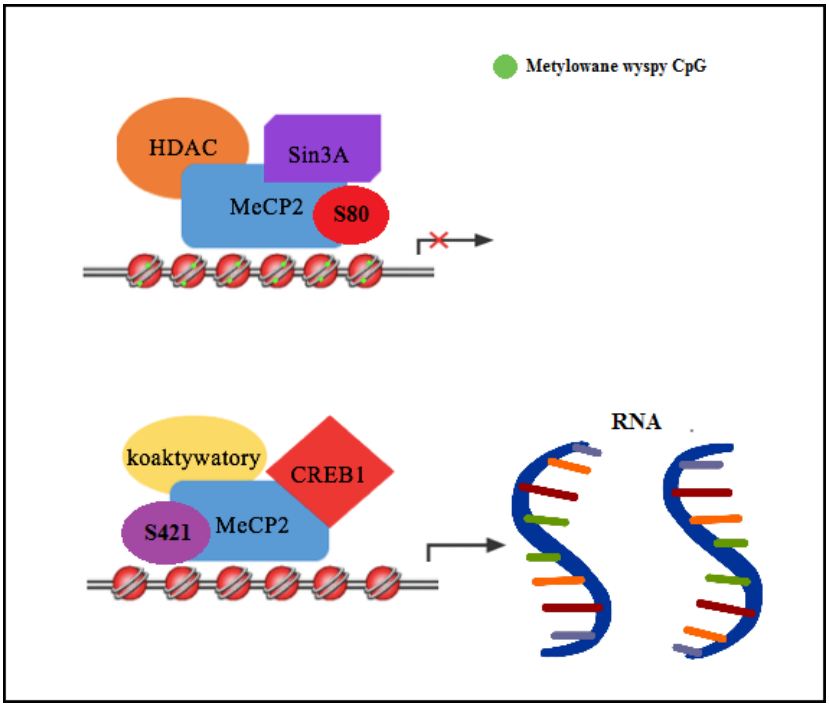
Jak większość białek pełniących istotne funkcje w organizmie żywym, tak i białko MeCP2 podlega ścisłej regulacji, której zadaniem jest dostosowanie jego aktywności do obecnych potrzeb ustroju. Aktywacja oraz inaktywacja białek zachodzi na drodze licznych modyfikacji potranslacyjnych, które często tworzą wielopoziomowe sprzężone łańcuchy wspólnych korelacji i dzięki temu umożliwiają zachowanie równowagi ustroju [5].

W neuronach niepobudzonych MeCP2 reguluje ekspresję genów poprzez wiązanie się z dinukleotydami CpG w promotorach różnych genów, gdzie jest również związany z innymi represorami takimi jak: deacetylaza histonów (np. HDAC1, HDAC2) i metylotransferaza histonów oraz ko-represor Sin3a (znaczenie domeny TRD) (Ryc. 2). W rezultacie dochodzi do kondensacji chromatyny i zablokowania dostępu dla maszynerii transkrypcyjnej. Aktywacja neuronu indukuje zmiany w cząsteczce MeCP2, co prowadzi do jej uwolnienia z regionu promotora i dysocjacji kompleksu korepresora. Dochodzi do hiperacetylacji chromatyny, która umożliwia transkrypcję właściwych genów [15].

Mechanizm regulacji aktywności białka MeCP2 opiera się zasadniczo na 6 procesach chemicznych, do których zalicza się: fosforylację, acetylację, acylację, metylację, ubikwintynację oraz sumoilację. Obecnie wiedza na temat możliwych modyfikacji potranslacyjnych białka MeCP2 jest bardzo obszerna, stąd w tym artykule autorzy skupią się wyłącznie na zjawisku fosforylacji, które jest kluczowe dla prawidłowej regulacji epigenetycznej w mózgu.

Główne miejsca fosforylacji MeCP2 znajdują się na aminokwasie seryna w pozycjach: 13, 80, 116, 149, 164, 216, 229, 274, 421 a także 424 łańcucha polipeptydowego i dotyczą różnych domen (Ryc. 1B), przy czym z, punktu widzenia prawidłowego rozwoju oraz funkcjonowania mózgu najważniejsze wydaje się dodanie grupy fosforanowej w pozycjach S80 oraz S421 [13].

W neuronach niepobudzonych MeCP2 jest ściśle związany z trzecim promotorem genu kodującego czynnik transkrypcyjny pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived nurotrophic factor,* BDNF), czyli białko kluczowe dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania mózgu, w tym procesu synatogenezy. Aktywacja



RYCINA 2. MeCP2 jako pozytywny lub negatywny regulator transkrypcji genów.
W represji transkrypcyjnej (u góry) MeCP2 wiąże metylowane wyspy CpG, rekrutuje deacetylazy histonowe i korepresory (np. Sin3A) indukując wyciszenie genów. Podczas aktywacji (u dołu) MeCP2, wiąże niemetylowane promotory, rekrutuje CREB1 i koaktywatory. Opracowano na podstawie [15]
FIGURE 2. MeCP2 as a positive or negative gene transcription regulator.
In transcriptional repression (top), MeCP2 binds methylated CpG islands, recruits histone deacetylases and co-repressors (e.g. Sin3A) inducing gene silencing. During transcriptional activation (bottom), MeCP2 binds unmethylated promoters, recruits CREB1 and co-activators. Based on [15]

neuronów wiąże się z depolaryzacją błony komórkowej i napływem jonów wapnia do komórki, co skutkuje fosforylacją MeCP2 S421 w mechanizmie zależnym od kinazy zależnej od jonów wapnia i kalmoduliny II/IV (ang. *Ca2+/calmodulin--dependent protein kinase II/IV*, CaMKII/IV). Kolejno dochodzi do uwolnienia MeCP2 z promotora genu BDNF, dzięki czemu możliwa jest transkrypcja i synteza tego białka. Wskazuje się, że fosforylacja w pozycji S421 jest kluczowa dla prawidłowego rozwoju i funkcji synapsy. Dodatkowo odgrywa istotną rolę w regulowaniu procesów uczenia się i pamięci oraz procesu zwanego skalowaniem synaptycznym, czyli sytuacji w której synapsy w ośrodkowym układzie nerwowym same regulują swoją aktywność i stan pobudzenia proporcjonalnie do stymulacji, którą otrzymują od sąsiadujących neuronów dzięki istnieniu pętli ujemnych

sprzężeń zwrotnych [12]. Wyniki badań przeprowadzonych na myszach wskazują, że mutacja białka MeCP2 w miejscu S421 uniemożliwiająca jego fosforylację może negatywnie wpływać na przetwarzanie nowych doświadczeń [13].

Pod wpływem depolaryzacji neuronu dochodzi również do defosforylacji MeCP2 w pozycji S80, co umożliwia dysocjację białka od chromatyny. Z kolei jego ponowna fosforylacja przez kinazę białkową 2 oddziałującą z homeodomeną (ang. *Homeodomain-interacting protein kinase 2*, HIPK2) przyczynia się do indukcji apoptozy. Z przeprowadzonych badań z wykorzystaniem myszy genetycznie modyfikowanych wynika, że powstanie mutacji w pozycji 80 może prowadzić do zaburzeń lokomotoryki [13, 50].

Prócz zaprezentowanej przeciwstawnej regulacji MeCP2 przez aktywność neuronów, która sugeruje, że fosforylacja S421 odgrywa większą rolę w aktywnych neuronach, zaś S80 ma większe znaczenie w neuronach spoczynkowych, niedawno zidentyfikowano kolejną modyfikację, tym razem dotyczącą treoniny w pozycji 308. Pod wpływem depolaryzacji neuronów dochodzi do fosforylacji w domenie TRD MeCP2, czego konsekwencją jest blokada interakcji białka z kompleksem ko-represorowym receptora jądrowego (ang. *nuclear receptor co--repressor*, NCoR), co skutkuje aktywacją transkrypcji m.in. genu kodującego czynnik transkrypcyjny Npas4 (ang. *Neuronal PAS Domain Protein*, czynnik który promuje rozwój synaps hamujących na neuronach pobudzających) i związaną z tym aktywację transkrypcji BDNF [3]. Istotnym elementem kontroli poziomu i aktywności białka MeCP2 jest oddziaływanie transkryptu genu z mikroRNA (zwłaszcza miR132/212) oraz wzajemna relacja pomiędzy MeCP2 a czynnikiem transkrypcyjnym CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*) [4]. Biosynteza obydwu białek jest bowiem wzajemnie zależna. Mysie białko MeCP2 indukuje aktywność genu *creb*, natomiast nadmiar białka CREB hamuje biosyntezę MeCP2 [8].

ZNACZENIE MeCP2 W PATOMECHANIZMIE CHORÓB

MeCP2 to kluczowy czynnik zaangażowany w prawidłowy rozwój mózgu, w związku z tym zaburzenia jego funkcji, będące najczęściej wynikiem zmian ekspresji (utrata ekspresji lub nadekspresja) kodującego go genu, mogą prowadzić do bardzo poważnych konsekwencji, wśród których dominują choroby o podłożu neurobiologicznym. Spośród opisywanych w literaturze, zespół Retta wydaje się być najważniejszym ze schorzeń bezpośrednio związanym z mutacjami występującymi w genie *MECP2.* Do innych możemy zaliczyć np. ciężką encefalopatię noworodkową, zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorder,* ASD) oraz upośledzenia umysłowe sprzężone z chromosomem X (ang. *X-linked mental retardation, XLMR*) [32, 33, 52]. Prócz tego, MeCP2 może odgrywać ważną rolę w rozwoju uzależnień oraz zaburzeń depresyjnych [3].

***Zespół Retta* (*ang. Rett syndrome*, *Rett's disorder*, *RTT*)**

Zespół zaburzeń neurorozwojowych, którego nazwa pochodzi od nazwiska austriackiego pediatry Andreasa Retta, który po raz pierwszy opisał je w 1965 r., a następnie uczestniczył w pracach nad opracowaniem kryteriów diagnostycznych schorzenia [24].

RTT charakteryzuje się stosunkowo normalnym rozwojem przez pierwsze 6 do 18 miesięcy życia, po czym następuje stopniowa utrata wyuczonych umiejętności, która prowadzi do ciężkiej niepełnosprawność intelektualnej oraz utraty mowy. Osoby z RTT cierpią z powodu ataksji, czyli zaburzeń koordynacji ruchowej, niekontrolowanych ruchów rąk, problemów z oddychaniem, lęków i niepokojów (częsty płacz), czy napadów padaczkowych [22].

Przez długi okres czasu nie znane były przyczyny rozwoju RTT. Wiadomo było jednak, że pojawia się głównie u dziewczynek (częstotliwość ok. 1:10.000 żywych urodzeń), co pozwalało przypuszczać, iż jego występowanie może mieć związek z chromosomem X. W 1999 r. opisano pierwszą mutację genu związanego z zespołem Retta, która dotyczyła *MECP2*. Jak się okazuje zmiany w sekwencji DNA tego genu są z reguły niewielkie i mogą dotyczyć różnych miejsc. Zachodzą one najczęściej *de novo* (rodzinne występowanie RTT bardzo rzadkie) i występują u ponad 95% pacjentów z typową i u ok. 40% osób z atypową postacią Zespołu Retta [51]. Co warto podkreślić, prace mające na celu wyjaśnienie roli MeCP2 w patofizjologii RTT przyczyniły się do znacznego rozwoju wiedzy na temat struktury i natury tego białka. Aktualnie znanych jest blisko 300 mutacji w genie kodującym białko MeCP2, które mogą mieć związek z występowaniem RTT. W tym, ponad 60% stanowią mutacje punktowe polegające na zamianie nukleotydu C na T w obrębie 8 dinukleotydów CpG, szczególnie zlokalizowanych w trzecim i czwartym eksonie genu [48]. Prócz tego stwierdza się delecje (utrata części genu), rzadziej insercje (wstawienie dodatkowych nukleotydów) lub duplikacje (zwielokrotnienie sekwencji nukleotydów) [22]. U pacjentów z nietypowym przebiegiem RTT zidentyfikowano również mutacje innych genów, w tym cyklinozależnej kinazy 5 (CDKL5), Netryny G1, czy FOXG1 [17, 20].

Znaczenia mutacji genu *MECP2* oraz powstającego na jego matrycy białka upatruje się przede wszystkim w kontekście zaburzonej ekspresji genów, w których transkrypcję jest zaangażowane. Do chwili obecnej opisano kilka genów regulowanych przez MeCP2, jednakże szczególnego znaczenia nadaje się regulacji ekspresji *A2BP1* (ang. *ataxin 2-binding protein 1*), *GAMT* (ang. *guanidinoacetate N-methyltransferase*) i przede wszystkim *BDNF*. Nieprawidłowe funkcjonowanie dwóch pierwszych genów determinuje występowanie poważnych zaburzeń intelektualnych, rozwoju mowy, czy padaczki, co wydaje się bezpośrednio wiązać z RTT [22]. Szczególną rolę przypisuje się możliwości regulacji ekspresji BDNF, czyli kluczowego czynnika neurotroficznego występującego w mózgu odpowie-

dzialnego przede wszystkim za prawidłowe kształtowanie się połączeń nerwowych [30]. U pacjentek z zespołem Retta obserwuje się również zmniejszoną ekspresję genu *GABR3* kodującego podjednostkę β3 receptora $GABA_A$ (receptor głównego neuroprzekaźnika hamującego w mózgu – kw. γ-aminomasłowego, GABA). Z drugiej strony obserwuje się nadmierne uwalnianie glutaminianu przez komórki mikrogleju, prawdopodobnie na skutek nasilonej aktywacji transporterów aminokwasów pobudzających EAAT 1 i 2 (ang. *Na^+-dependent glutamate transporters 1, 2*) oraz wzrost poziomu receptora AMPA (receptor jonotropowy dla głównego aminokwasu pobudzającego w mózgu – kw. glutaminowego) [45]. Wszystko to w konsekwencji może prowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy GABA i kw. glutaminowym prowadzącej do nadmiernego pobudzenia w mózgu. W efekcie dochodzi do obserwowanego w przebiegu RTT, nasilenia procesów oksydacyjnych w komórce (produkcja wolnych rodników tlenowych) prowadzących do oksydacyjnych uszkodzeń lipidów i białek. Co istotne, aktywacja powyższych procesów może skutkować również obniżoną syntezą BDNF w mózgu [34].

Pomimo intensywnych badań, etiologia zespołu Retta wciąż jest zbyt słabo poznana, co znajduje odbicie w braku skutecznych terapii. Obecnie stosowane leczenie objawowe nacelowane jest na łagodzenie skutków, a nie zlikwidowanie przyczyny choroby. Najatrakcyjniejszą strategią terapeutyczną wydaje się być przywrócenie prawidłowej ekspresji *MECP2* poprzez wstawienie dodatkowych kopii genu, jednak podejmowane próby kończą się z reguły niepowodzeniem. Wynika to z faktu, że tak jak niedobory białka MeCP2 niosą ze sobą poważne konsekwencje, podobnie jego nadmiar (obserwowany np. w zespole duplikacji MeCP2, ang. *MECP2 duplication syndrome*) powoduje zaburzenia charakteryzujące się dysfunkcją neurologiczną, niepełnosprawnością intelektualną i niektórymi cechami podobnymi do RTT. U myszy nadekspresja MECP2 powoduje hipoaktywność i drgawki [51].

Uzależnienia

Uzależnienie jest zaburzeniem psychicznym, które charakteryzuje się kompulsywnym (nawracającym) szukaniem i przyjmowaniem narkotyku lub innej substancji uzależniającej, pomimo poważnych konsekwencji, jakie niesie za sobą ich przyjmowanie [25]. Długa ekspozycja na substancje uzależniające zmienia wzór ekspresji genów w mózgu, co uważa się za podstawę występowania w/w objawów psychopatologicznych. Wykazano, że indukowane narkotykami długotrwałe neuroadaptacje powstałe w mózgu są częściowo zależne od mechanizmów epigenetycznych, w tym aktywności MeCP2. Na przykład przedłużone, nieograniczone, samopodawanie kokainy zwiększa ekspresję MeCP2 w wielu obszarach mózgu, podczas gdy indukowane lentiwirusem obniżenie ekspresji MeCP2 w prążkowiu (struktura mózgowa) skutkowało ograniczeniem spożycia kokainy, co sugeruje udział tego białka w niekontrolowanym przyjmowaniu narkotyków [7, 29]. Indu-

kowana kokainą ekspresja MeCP2 może wpływać na powstające po ekspozycji na narkotyk adaptacje komórkowe za pomocą różnych mechanizmów. Wielokrotne podania kokainy prowadzą do hipermetylacji promotora genu CDKL5 (ang. *cyclin dependent kinase like 5*), przez co obserwuje się zwiększone wiązanie MeCP2 i osłabienie ekspresji genu skutkujące zmianami plastycznymi w jądrze półleżącym w mózgu [16]. Z drugiej strony kokaina powoduje represję transkrypcji poprzez aktywację miR-212 i miR-132 [13]. Co istotne, jednorazowe podania kokainy oraz amfetaminy powodowały wzrost fosforylacji MeCP2 S421 w prążkowiu [16]. Wnikliwa analiza wykazała, że MeCP2 jest fosforylowany wyłącznie w małej populacji szybko rosnących interneuronów GABA-ergicznych. Zaobserwowano również wzajemną korelację między poziomami ekspresji MeCP2 w sytuacji spożywania kokainy, a zmianami acetylacji białek histonowych [6, 42]. Przy powtarzającej się ekspozycji na kokainę zauważono zmniejszający się poziom acetylacji histonów w neuronach GABA-ergicznych. Prócz tego obserwowano inne zmiany w poszczególnych histonach, które były uwarunkowane okresem podawania (podania jednorazowe lub długotrwałe) kokainy. Na przykład, po 10-dniowym, 2-godzinnym podawaniu kokainy poziom MeCP2 zwiększył się, co pozytywnie korelowało z poziomem BDNF w hipokampie i prążkowiu [37].

Zaburzenia nastroju

W społeczeństwach wysokorozwiniętych zaburzenia nastroju stanowią wiodącą przyczyną niesprawności i niezdolności do pracy. Do najważniejszych zaliczamy depresję, która obecnie jest najczęściej diagnozowanym zaburzeniem psychicznym [21]. Pomimo kilkudziesięciu lat badań mających na celu wyjaśnienie patomechanizmu depresji, nasza wiedza na ten temat jest w dalszym ciągu niewystarczająca, co przekłada się na brak laboratoryjnych markerów diagnostycznych oraz niską skuteczność dostępnych form farmakoterapii. Nowe kierunki badań nad zaburzeniami depresyjnymi wskazują, że istotną rolę w etiopatogenezie depresji mogą odgrywać mechanizmy epigenetyczne (włącznie z MeCP2), indukowane przez działanie różnych czynników środowiskowych (np. stres) [10].

W kontroli zachowania i emocji kluczową rolę odgrywa serotonina i związana z nią transmisja serotoninergiczna w mózgu. Pacjentom z zespołem Retta bardzo często towarzyszy występowanie zachowań agresywnych i lękowych oraz zmiennych stanów emocjonalnych, którym towarzyszą zmiany aktywności neuronów aminergicznych i obniżone poziomy serotoniny. U myszy pozbawionych genu MeCP2 (ang. *mecp2 knock-out*) obserwowano obniżone poziomy zarówno serotoniny jak i dopaminy w mózgu [13]. W kontekście zaburzeń depresyjnych, dyskutuje się przede wszystkim znaczenie fosforylacji MeCP2 S421.

W 2012 r. zostały opublikowane dwie prace amerykańskiego zespołu, które przypisują kluczową rolę fosforylacji czynnika MeCP2 w przeciwdepresyjnym działaniu citalopramu (leku z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrot-

nego serotoniny, SSRI) oraz imipraminy (z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, TLPD). Badania behawioralne przeprowadzone na myszach szczepu dzikiego oraz z genetycznym knock-in (KI; zamiana seryny w pozycji 421 na alaninę, która uniemożliwia fosforylację p-S421-MeCP2; MeCP2S421A), wykazały zwiększoną wrażliwość myszy z mutacją na działanie środowiskowych czynników stresogennych i brak odpowiedzi na długotrwałe podania imipraminy po przewlekłym stresie socjalnym. Ponadto wykazano wzrost poziomu p-S-421-MeCP2 w mózgu po chronicznych podaniach imipraminy u myszy typu dzikiego, poddanych procedurze przewlekłego stresu socjalnego. Podobne zmiany w lokalizacji ufosforylowanej formy białka MeCP2 odnotowano również w jądrze półleżącym po podaniach citalopramu. Wyniki tych badań wskazują, że fosforylacja MeCP2 jest niezbędna do adaptacji behawioralnej indukowanej antydepresantem, ponieważ myszy z mutacją MeCP2S421A nie zareagowały na przewlekłe leczenie przeciwdepresyjne [27, 28].

Inne schorzenia

W kontekście zaburzeń związanych z regulacją MeCP2 obecnie najczęściej badane są zaburzenia o podłożu neurobiologicznym. Białko to jednak ze względu na swą lokalizację, może odgrywać również istotną rolę w patomechanizmie innych zaburzeń. Wykazano między innymi związek pomiędzy MeCP2, a chorobami nowotworowymi. W procesach nowotworowych, takich jak rak płuc, wątroby, piersi czy jelita grubego, funkcja MeCP2 jest związana z regulacją epigenetyczną genów związanych z rakiem, w szczególności z mechanizmami obejmującymi hipermetylację promotorów tych genów [39]. W raku żołądka wykazano, że głębokość nacieku miejscowego jest związana z poziomem białka MeCP2, który podlega ścisłej regulacji przez miR-212 [53]. W przypadku raka prostaty, który jest najczęstszym rakiem występującym u mężczyzn, MeCP2 kontroluje różnicowanie się komórek oraz ich apoptozę [46]. Ponadto MeCP2 wiąże się także z innymi nowotworami, takimi jak szpiczak, nowotwory krwi czy rak szyjki macicy [19].

PODSUMOWANIE

Białko MeCP2 to jeden z najważniejszych czynników transkrypcyjnych w organizmie człowieka (w szczególności w mózgu), który ze względu na możliwość wszechstronnego oddziaływania na epigenom komórki, określane jest mianem krytycznego regulatora epigenetycznego. Prócz możliwości wiązania się z metylowanym DNA w jądrze komórkowym, posiada również zdolność rekrutowania innych czynników transkrypcyjnych, białek represorowych czy aktywatorów transkrypcji. Ponadto może również oddziaływać z innymi czynnikami modyfikującymi białka chromatyny (np. HDAC). W związku z tym, MeCP2 jako jedno z nielicznych białek w komórce,

może uczestniczyć zarówno w odczycie jak powstawaniu nowych wzorów epigenetycznych. Aktualnie wiedza na temat MeCP2 jest stosunkowo duża, a do lepszego poznania zarówno jego struktury jak i funkcji, niewątpliwie przyczyniła się identyfikacja mutacji w genie *MECP2* jako głównej przyczyny zespołu *Retta*. Białko MeCP2 odpowiada za prawidłowy wzrost oraz funkcjonowanie mózgu, szczególnie poprzez udział w aktywacji syntezy czynnika BDNF w neuronach. Zarówno ekspresja *MECP2* jak i aktywność powstałego na jego matrycy białka, podlega wielowymiarowej regulacji w komórce. Do najważniejszych mechanizmów, które mogą przyczyniać się do aktywacji/dezaktywacji białka należy zaliczyć katalizowane przez różne kinazy białkowe procesy fosforylacji/defosforylacji indukowane w momencie pobudzenia komórki. Badania ostatnich lat wskazują, że nieprawidłowości w ekspresji genu lub aktywności białka MeCP2 mogą przyczyniać się do rozwoju licznych chorób o podłożu neurobiologicznych, w tym wspomnianego już zespołu *Retta*. Ponadto MeCP2 może pełnić znacząca rolę w rozwoju uzależnień od substancji psychoaktywnych, zaburzeń depresyjnych, czy innych schorzeń neurorozwojowych. Ponadto stwierdzono również związek pomiędzy MeCP2 a niektórymi typami nowotworów u ludzi. Co ważne, nadmierna ekspresja MECP2 jest równie niebezpieczna jak i jego niedobór, co znacznie ogranicza możliwość stosowania terapii genowych polegających na włączeniu dodatkowych kopii do kodującego genu.

Niewątpliwie MeCP2 jest istotnym i krytycznym czynnikiem dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania mózgu, stąd dokładniejsze poznanie jego natury może w przyszłości przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów wielu chorób, być może w przyszłości wyznaczyć również nowe kierunki poszukiwania skutecznych terapii różnych zaburzeń, szczególnie tych związanych z układem nerwowym.

PODZIĘKOWANIA

Praca została częściowo sfinansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (UMO-2013/09/D/NZ7/02520; Kierownik projektu: dr hab. M. Sowa-Kućma, prof. UR) oraz działalności statutowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

LITERATURA

[1] Adams VH, Mcbryan SJ, Wade PA, Woodcock CL, Hansen JC. Intrinsic disorder and autonomous domain function in the multifunctional nuclear protein, MeCP2. *J Biol Chem* 2007; **282**: 15057-15064.

[2] Adkins NL, Georgel PT. MeCP2: structure and function This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled 31st Annual International Asilomar Chromatin and Chromosomes Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem Cell Biol* 2011; **89**: 1- 11.

[3] Ausió J. MeCP2 and the enigmatic organization of brain chromatin. Implications for depression and cocaine addiction. *Clin Epigenetics* 2016; **8**: 58.
[4] Ausió J. Role of MeCP2 in neurological disorders: current status and future perspectives. *Epigenomics* 2018; **10**: 5- 8.
[5] Bellini E, Pavesi G, Barbiero I, Bergo A, Chandola C, Nawaz Ms, Rusconi L, Stefanelli G, Strollo M, Valente Mm, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N. MeCP2 post-translational modifications: a mechanism to control its involvement in synaptic plasticity and homeostasis*? Front Cell Neurosci* 2014; **13**: 236.
[6] Carlberg C, Molnár F. The histone code. *In Human Epigenomics*. Springer, Singapore 2018; 75-88.
[7] Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich Jb, Zwiller J. Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacology* 2006; **70**: 487-492.
[8] Chahrour M, Jung Sy, Shaw C, Zhou X, Wong St, Qin J, Zoghbi Hy. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 2008; **320:** 1224-1229.
[9] Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, Han J, Wei X. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials*. Signal Transduct Target Ther* 2019; **17:** 62.
[10] Chmielewska N, Szyndler J, Maciejak P, Płaźnik A. Epigenetic mechanisms of stress and depression. *Psychiatr Pol* 2019; **53**: 1413-1428.
[11] Cobolli Gigli C, Pozzi D, Rossi Rl, Scaramuzza L, Rossetti G, Pagani M, Kilstrup-Nielsen C, Matteoli M, Landsberger N. Defects During Mecp2 Null Embryonic Cortex Development Precede the Onset of Overt Neurological Symptoms. *Cereb Cortex* 2016; **26**: 2517- 2529.
[12] Czajkowski R. Receptory nukleotydowe w uczeniu i plastyczności neuronalnej. *Postępy Biochemii* 2014; **60**: 506-513.
[13] Damen D, Heumann R. MeCP2 phosphorylation in the brain: from transcription to behavior. *Biol Chem* 2013; **394**: 1595- 1605.
[14] Deans C, Maggert Ka. What do you mean,"epigenetic"?. Genetics 2015; **199**: 887-896.
[15] Della Ragione F, Filosa S, Scalabrì F, D'esposito M. MeCP2 as a genome-wide modulator: the renewal of an old story. *Front Genet* 2012; **3**: 181.
[16] Deng Jv, Rodriguiz Rm, Hutchinson An, Kim Ih, Wetsel Wc, West Ae. MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 1128-1136.
[17] Dziwota E, Fałkowska U, Adamczyk K, Adamczyk D, Stefańska A, Pawęzka J, Olajossy M. Silent angels the genetic and clinical aspects of Rett syndrome. *Curr Problems Psychiatry* 2016; **17**: 282-296.
[18] Esposito M, Sherr Gl. Epigenetic Modifications in Alzheimer's Neuropathology and Therapeutics. *Front Neurosci* 2019;**13**: 476.
[19] Ezeonwuka Cd, Rastegar M. MeCP2-related diseases and animal models. *Diseases* 2014; **2**: 45-70.
[20] Fahmi M, Yasui G, Seki K, Katayama S, Kaneko-Kawano T, Inazu T, Kubota Y, Ito M. In Silico Study of Rett Syndrome Treatment-Related Genes, *MECP2*, *CDKL5*, and *FOXG1*, by Evolutionary Classification and Disordered Region Assessment. *Int J Mol Sci* 2019; **8**: 20.
[21] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990- 2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; **392**: 1789-1858.
[22] Gomathi M, Padmapriya S, Balachandar V. Drug Studies on Rett Syndrome: From Bench to Bedside. *J Autism Dev Disord* 2020. doi: 10.1007/s10803-020-04381-y.
[23] Gulmez Karaca K, Brito Dv, Oliveira Am. MeCP2: A Critical Regulator of Chromatin in Neurodevelopment and Adult Brain Function. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 4577.
[24] Hagberg B, Goutières F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J. Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Develop* 1985; **7**: 372-373.
[25] Heinbockel T, Csoka Ab. Epigenetic Effects of Drugs of Abuse. *Int J Environ Res Public Health* 2018; **25**: E2098.

[26] Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Gen* 2018; 19: 371-384.
[27] Hutchinson An, Deng Jv, Aryal Dk, Wetsel Wc, West Ae. Differential regulation of MeCP2 phosphorylation in the CNS by dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology* 2012; **37**: 321-337.
[28] Hutchinson An, Deng Jv, Cohen S,West Ae. Phosphorylation of MeCP2 at Ser421 contributes to chronic antidepressant action. *J Neurosci* 2012; **32***:* 14355-14363.
[29] Im Hi, Hollander Ja, Bali P, Kenny Pj. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 1120-1127.
[30] Jin W. Regulation of BDNF-TrkB Signaling and Potential Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease. *J Clin Med* 2020; **17**: E257.
[31] Jin Xr, Chen Xs, Xiao L. MeCP2 Deficiency in Neuroglia: New Progress in the Pathogenesis of Rett Syndrome. *Front Mol Neurosci* 2017; **10**: 316.
[32] Kadam Sd, Sullivan Bj, Goyal A, Blue Me, Smith-Hicks C. Rett Syndrome and CDKL5 Deficiency Disorder: From Bench to Clinic. *Int J Mol Sci* 2019; **15**: E5098.
[33] Kong Y, Zhou W, Sun Z. Nuclear receptor corepressors in intellectual disability and autism. *Mol Psychiatry* 2020. doi: 10.1038/s41380-020-0667-y.
[34] Li W, Pozzo-Miller L. BDNF deregulation in Rett syndrome. *Neuropharmacology* 2014; **76**: 737-746.
[35] Liyanage Vr, Rastegar M. Rett syndrome and MeCP2. *Neuromol Med* 2014; **16**: 231-264.
[36] Lotti F, Geronzi U, Grosso S. Electroencephalographic and epilepsy findings in mecp2 duplication syndrome. A family study. Brain Dev 2019; **41**: 456-459.
[37] Mcginty Jf, Whitfield Jr Tw, Berglind Wj. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Res* 2010; **1314**: 183-193.
[38] Misztak P, Pańczyszyn-Trzewik P, Sowa-Kućma M. Histone deacetylases (HDACs) as therapeutic target for depressive disorders. Pharmacol Rep 2018; **70**: 398-408.
[39] Parry L, Clarke Ar. The roles of the methyl-CpG binding proteins in cancer. *Genes & cancer* 2011; **2**: 618-630.
[40] Pries Lk, Gülöksüz S, Kenis G. DNA Methylation in Schizophrenia. *Neuroepigenomics in Aging and Disease*. Springer 2017; 211- 236.
[41] Qu Y, Yang Q, Sui F, Lu R, Dang S, Ji M, Hou P. A strategy for accurate quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at CpG sites within gene promoter. *J Biomed Nanotech* 2015; **11**: 1016-1026.
[42] Rogge Ga, Wood Ma.The role of histone acetylation in cocaine-induced neural plasticity and behavior. *Neuropsychopharmacology* 2013; **38**: 94-110.
[43] Saldi Tk, Gonzales Pk, Larocca Tj, Link Cd. Neurodegeneration, Heterochromatin, and Double-Stranded RNA. *J Exp Neurosci* 2019; **13**: 179069519830697.
[44] Shahbazian Md, Antalffy B, Armstrong Dl, Zoghbi Hy. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 115- 124.
[45] Shovlin S, Tropea D. Transcriptome level analysis in Rett syndrome using human samples from different tissues. *Orphanet J Rare Dis* 2018; **13**: 113.
[46] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; **65**: 5-29.
[47] Skinner Mk, Guerrero-Bosagna C. Role of CpG deserts in the epigenetic transgenerational inheritance of differential DNA methylation regions. *BMC Genomics* 2014; **15**: 692.
[48] Stembalska A, Gil J, Pesz Ka. Rett syndrome. Classical form and preserved speech variant as a different phenotype effect of deletion with the same starting point in MeCP2 gene-report of 2 cases. *Med Wieku Rozwoj* 2011; **15**: 445-450.
[49] Takeguchi R, Takahashi S, Kuroda M, Tanaka R, Suzuki N, Tomonoh Y, Ihara Y, Sugiyama N, Itoh M. MeCP2_e2 partially compensates for lack of MeCP2_e1: A male case of Rett syndrome. *Mol Genet Genomic Med* 2020; **8**: e1088
[50] Tao J, Hu K, Chang Q, Wu H, Sherman N E, Martinowich K, Sun Ye. Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. *PNAS* 2009; **106**: 4882-4887.

[51] Vashi N, Justice Mj. Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies. *Mamm Genome* 2019; **30**: 90-110.
[52] Vidal S, Xiol C, Pascual-Alonso A, O'callaghan M, Pineda M, Armstrong J. Genetic Landscape of Rett Syndrome Spectrum: Improvements and Challenges. Int J Mol Sci 2019; **12**: 3925.
[53] Wada R, Akiyama Y, Hashimoto Y, Fukamachi H, Yuasa Y. miR-212 is downregulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer. *Int J Cancer* 2010; **127**: 1106-1114.
[54] Zhang X, Witzig Te, Wu X. DNA Demethylation and Epigenetics. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. Springer 2019; 281-292.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 04.03.2020
Przyjęto: 15.04.2020
Magdalena Sowa-Kućma
Zakładu Fizjologii Człowieka, Instytut Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski
e-mail: msowa@ur.edu.pl, magda.sowa.kucma@gmail.com

METYLOTRANSFERAZY ARGININY I ICH WPŁYW NA EPIGENOM

PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASES AND THEIR INFLUENCE ON EPIGENOME

Joanna JANISIAK, Patrycja KOPYTKO, Maciej TARNOWSKI

Streszczenie: Metylotransferazy argininy (PRMT) są rodziną enzymów epigenetycznych katalizujących przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny na resztę argininy w ogonach histonowych lub białkach niehistonowych. Wśród rodziny PRMT wyróżnia się 9 enzymów nazwanych zgodnie z numeracją PRMT1 – PRMT9. Ze względu na przebieg katalizowanej reakcji metylotransferazy argininy zostały podzielone na 3 klasy: I, II oraz III. Pierwszy etap reakcji we wszystkich klasach przebiega w ten sam sposób i polega na wytworzeniu monometyloargininy. Kolejny etap metylacji przebiega odrębnie dla każdej klasy enzymów: PRMT I katalizuje powstanie asymetrycznie dimetylowanej argininy, PRMT II prowadzi do wytworzenia symetrycznie dimetylowanej argininy, natomiast PRMT III umożliwia jedynie powstanie monometyloargininy. Zjawisko metylacji na resztach argininy ogonów histonowych prowadzi do zmiany architektury chromatyny, kontrolując w ten sposób jej aktywność transkrypcyjną. Metylotransferazy argininy regulują wiele procesów komórkowych, w tym: wzrost, proliferację i różnicowanie komórek; transkrypcję; naprawę uszkodzeń DNA; przetwarzanie RNA, transdukcję sygnału; modulują funkcjonowanie układu odpornościowego oraz umożliwiają utrzymanie homeostazy glukozy. Niestety dysregulacja poziomu metylotransferaz argininy może prowadzić do powstania nieprawidłowych wzorców metylacji. Konsekwencją tego zjawiska jest nieprawidłowe funkcjonowanie ważnych szlaków sygnalizacyjnych w komórce, prowadzące do rozwoju chorób przewlekłych. W niniejszej pracy udowodniliśmy, iż nieprawidłowy poziom metylotransferaz argininy sprzyja wystąpieniu: cukrzycy, chorób układu sercowo-naczyniowego, astmy oskrzelowej oraz licznych nowotworów złośliwych.

Słowa kluczowe: metylotransferazy argininy, metylacja, arginina, choroby przewlekłe

Summary: Protein arginine methyltransferases (PRMTs) are a family of epigenetic enzymes that catalyze the transfer of a methyl group from S-adenosylmethionine to an arginine residue in histone tails or nonhistone proteins. Among the PRMT family there are nine enzymes named according to the numbering PRMT1 – PRMT9. Due to the course of the catalyzed reaction, arginine methyltransferases have been divided into three classes: I, II and III. The first stage of the reaction in all classes proceeds in the same way and consists in the production of monomethylarginine. In the second stage of the reaction is the methylation stage and is separate for each enzyme class: PRMT I catalyzes the

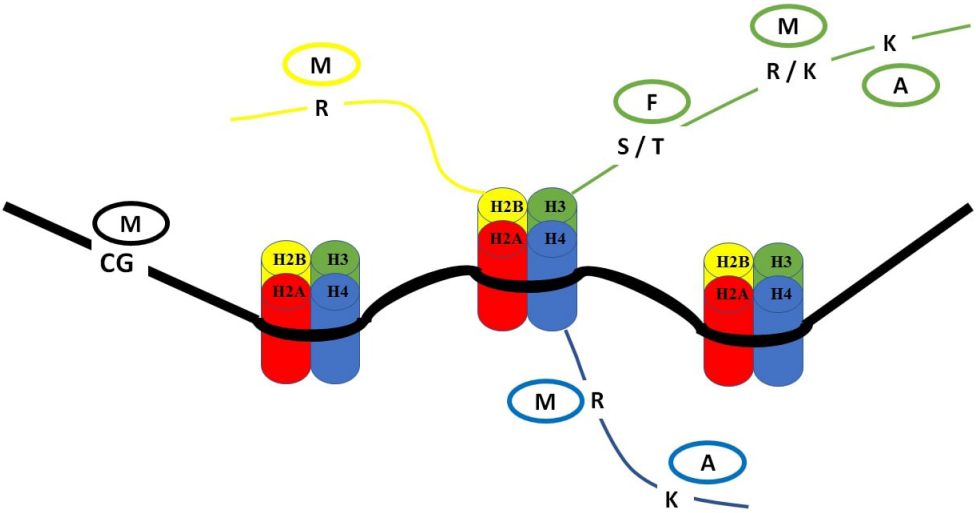
formation of asymmetrically dimethylated arginine, PRMT II leads to the production of symmetrically dimethylated arginine, while PRMT III only allows the formation of monomethylarginine. The methylation reaction on histone tail arginine residues leads to a change in the chromatin architecture, thus controlling its transcriptional activity. Arginine methyltransferases control many cellular processes, including: cell growth, proliferation and differentiation; transcription; repair of DNA damage; RNA processing, signal transduction; modulate the functioning of the immune system and enable the maintenance of glucose homeostasis. Unfortunately, dysregulation of arginine methyltransferases may lead to abnormal methylation patterns. The consequence of this reaction is the malfunctioning of important signaling pathways in the cell, leading to the development of chronic diseases. In this study we have proved that abnormal levels of arginine methyltransferases are conducive to the occurrence of: diabetes, cardiovascular diseases, bronchial asthma and numerous malignant tumors.

Keywords: Protein arginine methyltransferases, methylation, arginine, chronic diseases

WPROWADZENIE

U eukariontów DNA znajduje się w jądrze komórki, gdzie ulega asocjacji z białkami, tworząc chromatynę. Powstały kompleks nukleoproteinowy kontroluje wszystkie procesy jądrowe z udziałem DNA (transkrypcja, replikacja i naprawa DNA) [41]. Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom, który utworzony jest z oktameru histonów rdzeniowych (H2A, H2B, H3 i H4), wokół którego owinięte jest 147 bp DNA. Poszczególne nukleosomy są połączone za pomocą DNA łącznikowego [3]. Początkowo sądzono, iż białka histonowe pełnią jedynie funkcję strukturalną, niezbędną do upakowania chromatyny. Obecnie wiadomo, że N-końcowe ogony histonów są nieustrukturyzowane i wystają na zewnątrz rdzenia nukleosomu, dzięki czemu mogą ulegać licznym modyfikacjom potranslacyjnym (ang. *translational modification* PTM) [41]. Do najlepiej poznanych PTM zalicza się: metylację, acetylację oraz fosforylację [50]. Powstałe w ten sposób zmiany epigenetyczne w obrębie histonów koordynują powinowactwo do białek związanych z chromatyną, dzięki czemu modulują jej architekturę i regulują aktywność transkrypcyjną (Ryc. 1) [5]. Gdy sznur nukleosomów ulega rozluźnieniu, materiał genetyczny jest łatwo dostępny dla czynników transkrypcyjnych i następuje wzmożona ekspresja genów. Natomiast ścisłe upakowanie chromatyny uniemożliwia proces transkrypcji [28, 56].

Metylacja białek histonowych uważana jest za najtrwalszą modyfikację epigenetyczną związaną zarówno z aktywacją transkrypcji jak i jej represją [70]. Przyłączenie grupy metylowej do reszty aminokwasowej białka histonowego wywołuje zmiany w architekturze chromatyny, prowadząc do jej relaksacji lub kondensacji [78]. Głównym miejscem metylacji w ogonach histonów są podstawowe aminokwasy łańcuchów bocznych reszt lizyny (K) i argininy (Arg, R) [7]. Łańcuchy boczne lizyny mogą być mono-, di-, lub trimetylowane, natomiast łańcuch boczny argininy może być mono- lub dimetylowany (symetrycznie lub asymetrycznie) [6].



RYCINA 1. Schemat modyfikacji epigenetycznych. Zmiany epigenetyczne obejmują: metylację wysp CpG w nici DNA oraz potranslacyjne modyfikacje reszt aminokwasowych ogonów histonowych (arginina (R), lizyna (K), seryna (S), tyrozyna (T)), które podlegają: metlacji (M), acetylacji (A) oraz fosforylacji (F)
FIGURE 1. Epigenetic changes include: methylation of CpG islands in the DNA strand and post-translational modifications of the amino acid residues of histone tails (arginine (R), lysine (K), serine (S), tyrosine (T)), which are subjected to: methylation (M), acetylation (A) and phosphorylation (F)

Uniwersalnym i najważniejszym donorem grupy metylowej (-CH3) w procesie metylacji w organizmie człowieka jest S-adenozylometionina (SAM, AdoMet) [32]. Przyłączenie –CH3 do reszt aminokwasów znajdujących się na ogonach histonów katalizowane jest przez metylotransferazy histonowe (ang. *histone methyltransferase,* HMT). Istnieją 2 główne typy HMT: specyficzne dla lizyny: (ang. *histone lysine methyltransferase,* HKMT) i dla argininy: (ang. *protein argininę methyltransferase,* PRMT), które katalizują przeniesienie -CH3 z AdoMet na odpowiedni aminokwas [32, 65]. W niniejszej pracy skupiono się na scharakteryzowaniu rodziny metylotransferaz argininy oraz zaburzeniu poziomu PRMT w patogenezie wybranych chorób przewlekłych.

METYLACJA ARGININY

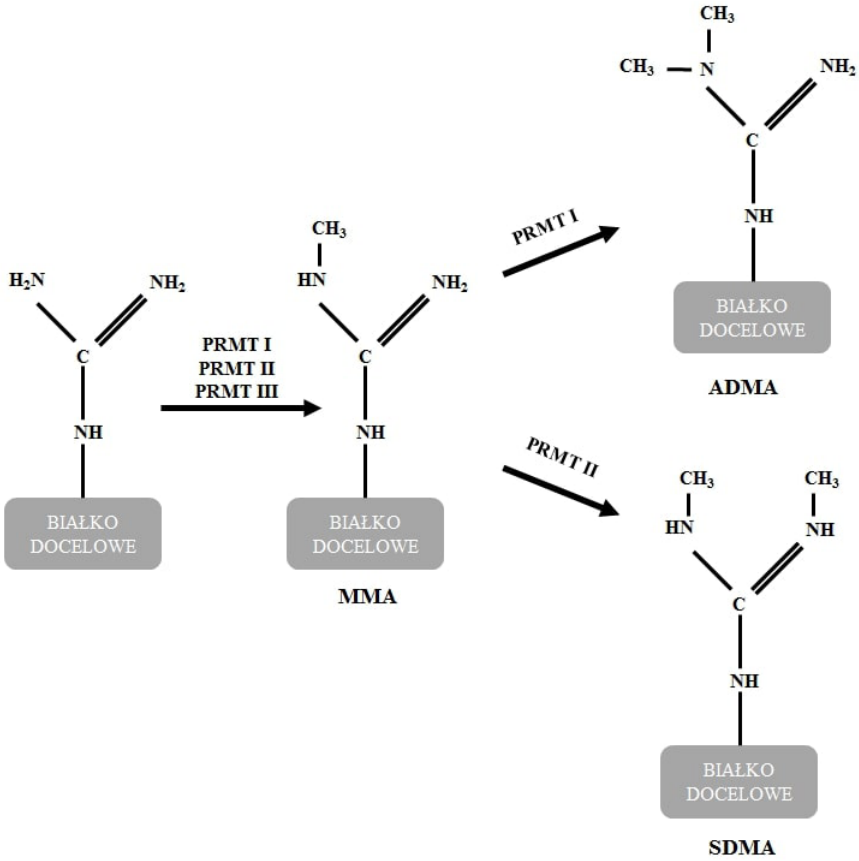
Arginina jest aminokwasem o charakterze silnie zasadowym, posiadającym najdłuższy łańcuch boczny wśród naturalnie występujących aminokwasów. Łańcuch boczny argininy jest dodatnio naładowany, dlatego często wytwarza wiązania wodorowe i wchodzi w interakcje z kwasami nukleinowymi [25, 64]. Arg

zawiera grupę guanidynową, która zapewnia wytworzenie 5 wiązań wodorowych. W fizjologicznym pH grupa guanidynowa ma charakter protonowy, jednak w obecności metylotransferaz argininy może ulegać metylacji na jednym lub obu końcowych resztach azotu [43, 74]. W przeciwieństwie do innych PTM, kowalencyjne przyłączenie –CH3 nie zmienia ogólnego ładunku argininy, gdyż ładunek ten jest pochłaniany przez rezonans w grupie guanidynowej [74]. Każdorazowe przyłączenie grupy metylowej do argininy skutkuje uwolnieniem 1 donoru wodoru, wpływając na zmianę konformacji aminokwasu, czyniąc go bardziej hydrofobowym [44]. Metylacja Arg jest reakcją wysokoenergetyczną, a przyłączenie grupy –CH3 wymaga zużycia 12 cząsteczek ATP [25].

Metylacja argininy jest ważną modyfikacją epigenetyczną, odgrywającą kluczową rolę w regulacji transkrypcji i strukturalnej przebudowie chromatyny [23, 54]. Uznano, iż przyłączenie –CH3 do R jest najbardziej rozpowszechnionym typem metylacji białek jądrowych i cytoplazmatycznych w komórkach ssaków i obejmuje od 0,7 do 1% całkowitych reszt argininy. Reakcja metylacji argininy katalizowana jest przez rodzinę enzymów metylotransferaz argininy i polega na przeniesieniu grupy metylowej z AdoMet do substratu argininowego, uzyskując resztę metyloargininy i S-adenozylohomocysteinę (SAH) [30]. Znane są 3 rodzaje metyloarginin: monometyloarginina (Rme1), asymetryczna dimetyloarginina (Rme2a) i symetryczna dimetyloarginina (Rme2s) [86]. Metylacja specyficznych miejsc R w histonach wpływa na interakcje chromatyny. Zmiana ta odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów, bowiem metylacja histonów w pozycji H4R3me2a, H3R2me2s, H3R17me2a, H3R26me2a odpowiada za aktywację transkrypcji, natomiast H3R2me2s, H3R8me2a, H3R8me2s, H4R3me2s równoznaczna jest z jej represją. Ponadto PRMT posiadają wiele substratów, które są białkami niehistonowymi. Białka te zaangażowane są w liczne procesy komórkowe, w tym: różnicowanie, cykl komórkowy, apoptozę, endocytozę oraz transport RNA [13, 54].

METYLOTRANSFERAZY ARGININY

W organizmie człowieka znanych jest 9 różnych metylotransferaz argininy, kodowanych przez geny *PRMT1-PRMT9*. Większość enzymów ulega ekspresji we wszystkich tkankach, wyjątek stanowi PRMT8, którego ekspresja ograniczona jest wyłącznie do ośrodkowego układu nerwowego [55]. Metylotransferazy argininy wyrażają zróżnicowaną lokalizację subkomórkową, mogą być obecne w jądrze komórkowym, w cytoplazmie lub równocześnie w obu przedziałach komórki [10]. Ze względu na końcowy produkt reakcji przyłączenia grupy metylowej do reszty R, metylotransferazy argininy zostały podzielone na 3 klasy: PRMT I, PRMT II



RYCINA 2. Reakcja metylacji argininy przez PRMT klasy I, II, III
FIGURE 2. Arginine methylation by type I, II, III PRMTs

i PRMT III (Ryc. 2). Pierwszy etap reakcji we wszystkich klasach przebiega w ten sam sposób i polega na wytworzeniu monometyloargininy (ang. *monomethylarginine*, MMA) [18]. Kolejny etap metylacji przebiega odrębnie dla każdej klasy enzymów: PRMT I katalizuje powstanie asymetrycznie dimetylowanej argininy (ang. *asymmetric dimethylarginine,* ADMA), PRMT II prowadzi do wytworzenia symetrycznie dimetylowanej argininy (ang. *symmetric dimethylarginine,* SDMA), natomiast PRMT III umożliwia jedynie powstanie MMA [12]. PRMT wpływają na zróżnicowany zakres procesów komórkowych, w tym na: wzrost, proliferację i różnicowanie komórek; transkrypcję; naprawę uszkodzeń DNA; przetwarzanie RNA, transdukcję sygnału; modulują funkcjonowanie układu odpornościowego oraz umożliwiają utrzymanie homeostazy glukozy [45, 50, 53, 82].

METYLOTRANSFERAZY ARGININY KLASY I

Wśród członków metylotransferaz argininy klasy I są PRMT: 1, 2, 3, 4, 6, 8. Enzymy te katalizują przeniesienie –CH3 do tego samego atomu azotu grupy guanidynowej argininy, produktem reakcji jest asymetryczna dimetyloarginina (ω-N^G,N^G-*dimetyloarginina*) [75].

PRMT1 jest główną metylotransferazą argininy u ssaków. Szacuje się, że PRMT1 odpowiada za około 80% wszystkich znaków metylacji argininy w genomie człowieka [52, 28, 41]. Enzym preferencyjnie metyluje histon 4 przy argininie 3, generując wytworzenie H4R3me2a. Powstały znak epigenetyczny związany jest z aktywacją transkrypcji i jest niezbędny do późniejszej acetylacji H3 i H4. Co ciekawe pierwsze 5 reszt aminokwasowych H2A i H4 jest identyczne, dlatego przypuszcza się, iż większość modyfikacji w H4R3 sprawdza się również w przypadku H2AR3 [74]. Ponadto PRMT1 katalizuje asymetryczną dimetylację argininy w białkach: wiążących RNA; uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego, onkogenach i białkach supresorowych [33]. Gen kodujący PRMT1 może wytwarzać co najmniej 7 różnych izoform, poprzez alternatywne składanie pre-mRNA. Każda z powstałych izoform ma unikalną N-końcową sekwencję i nieco inną masę cząsteczkową. Dodatkowo izoformy PRMT1 różnią się aktywnością enzymatyczną, specyficznością substratową i lokalizacją tkankową [3, 13]. Największą ekspresję wykazuje PRMT1v1 i prawdopodobnie to ta izoforma opisywana jest w literaturze jako PRMT1 [5]. Metylotransferaza argininy 1 wykrywana jest zarówno w jądrze komórkowym jak i w cytoplazmie i posiada substraty w obydwu przedziałach komórkowych [10]. Enzym wymagany jest do prawidłowej embriogenezy, progresji cyklu komórkowego, żywotności komórek oraz transdukcji sygnału [41]. Myszy pozbawione ekspresji genu *PRMT1* umierają jako zarodki. Brak PRMT1 prowadzi do niestabilności genomowej i zatrzymania podziałów komórkowych [30, 38]. Enzym reguluje naprawę uszkodzeń w podwójnej nici DNA poprzez metylację: *MRE11*, *BRCA1*, *TP53* [64]. PRMT1 pośredniczy w metylacji motywu RGG/RG w białku związanym z ubikwitynacją (UBAP2L). Modyfikacja ta jest niezbędna do właściwego przyłączenia kinetochoru do mikrotubuli w celu postępu mitozy [56]. Ponadto PRMT1 utrzymuje zdolność do samoodnowy krwiotwórczych komórek progenitorowych, aktywuje limfocyty B oraz uczestniczy w regeneracji mięśni szkieletowych [20, 27, 39, 41].

Metylotransferaza argininy 2 (PRMT2) wykazuje w 50% sekwencję homologiczną do domeny katalitycznej występującej w PRMT1 [61, 88]. Enzym katalizuje asymetryczną dimetylację histonów: H3R8 i H4 [54, 74]. PRMT2 na swoim N-końcu zawiera domenę SH3, która rozpoznaje motywy białkowe bogate w prolinę i pozwala na wiązanie się z N-końcową domeną PRMT8, w celu kierowania tym enzymem do substratu białkowego [30, 43, 57]. Aktywność PRMT2 może hamować transkrypcję poprzez zmniejszenie wiązania NF-KB do DNA, powodując akumulację jądrową IKB-α i zwiększając podatność na apoptozę [30]. Ponadto

metylotransferaza argininy 2 reguluje ekspresję receptora androgenowego (AR) i estrogenowego (ER) oraz wpływa na interakcję z białkiem Rb [34, 51, 68].

Metylotransferaza argininy 3 znajduje się wyłącznie w cytoplazmie, więc enzym bezpośrednio nie wpływa na epigenom [25]. PRMT3 na swoim N-końcu posiada domenę palca cynkowego, która umożliwia rozpoznawanie substratu [13, 49]. Enzym katalizuje metylację białka rybosomalnego 40s oraz uczestniczy w prawidłowym dojrzewaniu białka rybosomalnego 80s [8, 74].

Metylotransferaza argininy 4 znana jest również pod nazwą CARM1 (ang. *co-activator-associated arginine methyltransferase 1*). CARM1 został zidentyfikowany jako pierwszy członek rodziny PRMT posiadający właściwości regulujące transkrypcję, dzięki czemu jest najlepiej scharakteryzowanym PRMT pod kątem roli aktywatora transkrypcji [5, 9]. Enzym katalizuje metylację histonu 3 w pozycji R17 i R26 [85]. Znak epigenetyczny H3R17me2a obejmuje region promotorowy: *TFF1*, *E2F1*, *OCT4*, *SOX2* [4]. Z kolei metylacja H3R26me2a zachodzi w górnym regionie promotora genu kodującego cyklinę E1, odgrywającej istotną rolę w momencie poprzedzającym wejście komórek w fazę S cyklu komórkowego [43]. Istotne jest, że PRMT4 sam ulega modyfikacjom potranslacyjnym. Enzym może być fosforylowany oraz ulega autometylacji w pozycji R551 w eksonie 15, w efekcie czego zahamowana zostaje jego dimeryzacja i wiązanie SAM [5, 13, 34]. PRMT4 dzięki funkcji koaktywatora transkrypcji reguluje wiele kluczowych procesów biologicznych, takich jak: składanie RNA, naprawa DNA, progresja cyklu komórkowego oraz autofagia [38, 64]. Wykazano, że metylotransferaza argininy 4 uczestniczy w procesie miogenezy oraz adipogenezy. Dodatkowo enzym aktywuje receptory jądrowe dla: androgenu, estrogenu i tyroksyny [9, 13].

Metylotransferaza argininy 6 jest jedynym enzymem klasy I PRMT, który eksprymowany jest wyłącznie w jądrze komórkowym. PRMT6 uczestniczy w metylacji H3R2 oraz R3 w histonanach H4 i H2A [13]. W zależności od miejsca metylacji powstała modyfikacja biochemiczna może powodować aktywację lub represję transkrypcji. Przyłączenie grupy metylowej do H4R3 i H2AR3 skutkuje aktywacją transkrypcji, natomiast metylacja w pozycji H3R2 antagonizuje aktywujący znak H3K4me3, hamując transkrypcję [25, 64, 74]. Substratami niehistonowymi dla PRMT6 są: *HOXA2*, *TSP-12*, *HMG1A*, *HMG1B* oraz białka supresorowe: p21 i p53 [46]. Głównym zadaniem enzymu jest regulacja procesów jądrowych, takich jak ekspresja genów i naprawa nici DNA oraz kontrola wątrobowej glukoneogenezy [4, 45, 85].

PRMT8 w warunkach fizjologicznych ma ograniczoną dystrybucję do ośrodkowego układu nerwowego [8, 37]. Enzym wykazuje bardzo duże podobieństwo do PRMT1, a sekwencje nukleotydowe obydwu metylotransferaz pokrywają się ze sobą w około 80% [37, 52]. PRMT8 posiada 2 miejsca autometylacji, a przyłączenie grupy metylowej do enzymu skutkuje obniżeniem jego powinowactwa do AdoMet [21]. Dodatkowo PRMT8 na swoim N-końcu posiada miejsce mirystyla-

cji, które wiąże enzym z błoną plazmatyczną [8]. Usunięcie N-końcowej domeny promuje aktywność enzymatyczną PRMT8 i powoduje asymetryczną dimetylację histonów H2A i H4 oraz zasadowego białka mieliny [54]. W obrębie N-końcowego regionu PRMT8 znajdują się dwie sekwencje bogate w prolinę. Mogą one wiązać wiele domen SH3, w tym domenę znajdującą się w PRMT2 [64]. Nowo odkryty wariant transkryptu metylotransferazy argininy 8 (wariant 2) pozbawiony jest charakterystycznego dla PRMT8 o pełnej długości N-końcowego motywu zdolnego do mirystylacji, dzięki czemu enzym lokalizuje się w jądrze komórki. Lokalizacja jądrowa wskazuje na aktywność epigenetyczną enzymu [37]. Myszy z wyciszoną ekspresją genu PRMT8 wykazują zmniejszoną siłę mięśniową w wyniku przedwczesnej destabilizacji połączeń nerwowo-mięśniowych [73].

METYLOTRANSFERAZY ARGININY KLASY II

Członkami PRMT klasy II są: PRMT5 i PRMT9. Głównym zadaniem PRMT II jest przenoszenie grupy metylowej do niezmodyfikowanego atomu azotu grupy guanidynowej monometyloarginy, tworząc białka o symetrycznych resztach dimetylowanych (ω-N^G,N'^G-*dimetyloarginina*). Enzymy tej klasy są słabiej scharakteryzowane, w większości przypadków działają jako represory transkrypcji [12].

PRMT5 jest enzymem powszechnie występującym we wszystkich tkankach eukariontów. Szczególnie wysoki poziom ekspresji genu *PRMT5* wykrywany jest w sercu, mięśniach szkieletowych oraz w jądrach [4]. Enzym katalizuje powstanie większości symetrycznie dimetylowanych arginin, a głównymi celami PRMT5 są: H2AR3, H3R2, H3R8 i H4R3 [2, 69]. Aktywność metylotransferazy argininy 5 związana jest z represją transkrypcji spowodowaną zmianą struktury chromatyny [44, 83]. Musani i wsp. dowiedli, że PRMT5 może metylować ponad 1000 białek w organizmie człowieka, zawierających motyw RGG/RG, wyniki te oparto na sekwencji przewidywanych miejsc domniemanej metylacji [60]. Głównymi substratami niehistonowymi enzymu są: *TP53*, *ASK1*, *PDCD4*, *CRN5*, *EGFR*, *RAF*, *E2F-1*, *FEN-1*, *AR*, *PDGFRα*, *ST7* oraz *RB* [49, 52]. Trzeciorzędowa struktura PRMT5 tworzy postać dwudomenową, posiadającą na swoim N-końcu tzw. „beczułkę" izomerazy triozofosforanowej (TIM) [54]. Enzym często występuje w kompleksie z białkiem MEP50, co zwiększa jego aktywność katalityczną [13, 44]. PRMT5 jest niezbędny do utrzymania puli komórek krwiotwórczych, a brak aktywności genu kodującego PRMT5 u dorosłych myszy powoduje uwidocznioną niedokrwistość z powodu pancytopenii. Enzym uczestniczy również w licznych procesach komórkowych, m.in. w: montażu aparatu Golgiego, biogenezie rybosomów oraz regulacji regeneracji tkanki mięśniowej [13].

Metylotransferaza argininy 9 wykrywana jest w: nerkach, skórze, układzie krwiotwórczym oraz w ośrodkowym układzie nerwowym. Enzym katalizuje symetryczne przeniesienie 2 grup metylowych do histonów H2A i H4 [29]. PRMT9 posiada 2 miejsca wiążące AdoMet, a na swoim N-końcu ma 3 motywy powtó-

TABELA 1. Wykaz substratów poszczególnych PRMT i ich funkcja w organizmie człowieka
TABLE 1. List of substrates of individual PRMTs and their function in the human body

PRMT	SUBSTRAT	FUNKCJA
PRMT1	H4R3, BRCA1, MRE11, TP53, UBAP2L, EGFR, CDKN1, BCR, SPT5, PABP1, ILF3, GADD45G, AML-ETO, MLL-EEN,	Koaktywator transkrypcji Transdukcja sygnału Naprawa DNA Enzym wymagany do prawidłowej embriogenezy Uczestniczy w progresji cyklu komórkowego Utrzymanie populacji pluripotencjalnych komórek macierzystych Aktywacja limfocytów B Regeneracja mięśni szkieletowych
PRMT2	H3R8, H4, CNND1, CCNA2, CCNB1, AR, ER, RB, SNAIL	Hamowanie transkrypcji Aktywacja receptora: androgenowego, estrogenowego, progesteronowego
PRMT3	rpS2, hnRNPA1, FMRP, PABP1	Utrzymanie homeostazy rybosomalnej
PRMT4	H3R17, H3R26, TFF1, E2F1, OCT4, SOX2, CCNE1, RB, BAF155, GAPDH, MDH1, PELP1, CBP/p300	Naprawa DNA Składanie RNA Uczestniczy w progresji cyklu komórkowego Autofagia Miogeneza Adipogeneza Aktywacja receptora: androgenowego, estrogenowego, tyroksynowego,
PRMT5	H2AR3, H3R2, H3RH8, H4R3, TP53, ASK1, PDCD4, CRN5, EGFR, RAF, E2F-1, FEN-1, ST7, PDGFRα, RB, NM23, CNND1, CNND2, CNNE1, BCL2L, IAP-2	Represor transkrypcji Składanie RNA Transdukcja sygnału Utrzymywanie puli komórek krwiotwórczych Biogeneza rybosomów Montaż Aparatu Golgiego Różnicowanie komórek
PRMT6	H3R2, H4R3, H2AR3, HOXA2, TP53, TSP-12, TSP1, HMG1A, HMG1B, OCT4, NANOG, HIV Tat, HMGA1α,	Aktywator i supresor transkrypcji Naprawa nici DNA Regulacja pluripotencji komórek Kontrola wątrobowej glukoneogenzey Regulacja aktywacji receptora estrogenowego
PRMT7	H3R2, H3R17, H3R19, CTCFL, SMD3, ASS1, EEF2, TWIST, SNAIL, ZEB1, ZEB2, MMP-2, MMP-9	Utrzymanie puli mięśniowych komórek satelitarnych Metylacja męskiej linii germinalnej
PRMT8	H2A, H4, SOX2, NANOG, OCT4	Funkcje specyficzne dla mózgu
PRMT9	H2A, H4, SNAIL, SAP145	Regulacja alternatywnego składania RNA Modulacja dojrzewania małych rybonukleoprotein jądrowych

rzeń tetratrikopeptydowych (ang. *tetratricopeptide repeat,* TPR), umożliwiających interakcje białko-białko [54]. Powtórzenia TPR są niezbędne do aktywności enzymatycznej, ponieważ PRMT9 pozbawione jakiegokolwiek z 3 powtórzeń tetratikopeptydowych jest nieaktywne [74]. Enzym uczestniczy w regulacji alternatywnego splicingu oraz moduluje dojrzewanie małych rybonukleoprotein jądrowych [29].

METYLOTRANSFERAZY ARGININY KLASY III

PRMT7 jest jedynym przedstawicielem metylotransferaz argininy klasy III. Początkowo uważano, iż enzym w zależności od substratu może prowadzić do powstania mono- lub dimetyloargininy. Obecnie wiadomo, iż teza ta jest błędna, a niewłaściwa interpretacja wyników spowodowana była niedokładnym oczyszczeniem enzymu z PRMT5 [80]. PRMT7 posiada 2 miejsca wiązania AdoMet, znajdujące się na N- i C-końcu. Badania krystalograficzne wykazały, że SAM łączy się jedynie z N-końcową domeną, natomiast drugi moduł wiążący AdoMet przez PRMT7 jest zajęty przez jon cynku i pełni funkcję pseudodimeru [29]. Metylotransferaza argininy 7 katalizuje monometylację histonów: H3R2, H3R17 oraz H3R19 [43]. Substratami niehistonowymi enzymu są: *CTCFL*, *SMD3*, *ASS1* i *EEF2* [30]. PRMT7 uważany jest za marker komórek pluripotencjalnych [43]. Enzym umożliwia utrzymanie puli mięśniowych komórek satelitarnych, a jego brak powoduje opóźnioną aktywację różnicowania miogennego i utratę właściwości komórek macierzystych, powodując niezdolność zaangażowania się do naprawy tkanek i defekty regeneracyjne mięśni [74].

AKTYWNOŚĆ KATALITYCZNA PRMT

Każdy z członków rodziny metylotransferaz argininy wykazuje preferencje w stosunku do metylowanego motywu substratu. PRMT: 1, 2, 3, 8, 9 katalizują przyłączenie grupy metylowej w regionach bogatych w glicynę i argininę, tzw. motywach GAR (ang. *glycine/arginine-rich motif*) [8]. CARM1 uczestniczy w metylacji substratów o motywach bogatych w prolinę, glicynę i metioninę (PGM, ang. *proline/glycine/methionine motif*), PRMT5 metyluje motywy GAR i PGM, natomiast PRMT7 rozpoznaje substraty składające się z pary reszt argininy oddzielonych innym aminokwasem RxR [67, 78]. Przypuszcza się, że obecność glicyny w metylowanych motywach zwiększa elastyczność konformacyjną argininy i ułatwia dostęp argininy do miejsca aktywnego PRMT [13].

Metylotransferazy argininy posiadają 2 miejsca wiążące: kieszeń wiążącą substrat oraz miejsce wiązania kofaktora. Kieszeń substratu argininy posiada 2 powszechnie konserwatywne reszty kwasu glutaminowego (Glu258 i Glu267), dzięki czemu powierzchnia katalityczna jest ujemnie naładowana, zatem jest w stanie dobrze złapać ładunek dodatni grupy guanidynowej docelowej reszty

argininy [79, 82]. Kieszeń wiążąca substrat i miejsce wiązania kofaktora są połączone przez wąski kanał hydrofobowy, wystarczająco duży, aby końcowa amina substratu znalazła się w odległości wiązania kofaktora. Końcowa amina substratu ulega nukleofilowej substytucji za pomocą SAM, następuje przeniesienie grupy metylowej do reszty docelowej, przekształcając SAM w SAH, który jest uwalniany przez enzym. W niektórych przypadkach w zależności od klasy enzymu proces ten może być powtórzony, aby dodać kolejne reszty metylowe do argininy [79, 86]. W przypadku jedynego członka metylotransferaz argininy klasy III – PRMT7, badania krystalograficzne różnych ontologów enzymu wykazały, że kieszeń wiążąca substrat jest za wąska i uniemożliwia formowanie produktu dimetylowanego z powodu niekorzystnych efektów sferycznych [30, 80].

ZABURZENIA POZIOMU METYLOTRANSFERAZ ARGININY W PATOGENEZIE CHORÓB PRZEWLEKŁYCH

Metylotransferazy argininy zaliczane są do grupy enzymów epigenetycznych, a ich aktywność w istotny sposób kształtuje architekturę chromatyny. PRMT działając jako aktywatory lub represory transkrypcji mogą prowadzić do zaburzenia podstawowych procesów zachodzących w komórkach oraz modulować ich odpowiedź na sygnały pochodzące ze środowiska zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego [89, 90]. Przypuszcza się, iż zwiększony lub obniżony poziom PRMT może powodować rozwój chorób przewlekłych, przede wszystkim: cukrzycy, chorób układu krążenia, chorób kości i stawów, astmy oskrzelowej oraz chorób nowotworowych [76].

ZABURZENIA POZIOMU PRMT PROWADZĄCE DO ROZWOJU CUKRZYCY

Pod nazwą cukrzyca kryje się szereg chorób metabolicznych, których wspólną cechą jest utrzymujący się stan hiperglikemii, wynikający z nieprawidłowego wydzielania i/lub działania insuliny [48]. Jedną z głównych przyczyn odpowiedzialnych za rozwój choroby jest niezdrowy styl życia, obejmujący dietę bogatą w węglowodany oraz brak ruchu [71]. Coraz więcej dowodów wskazuje, iż cukrzyca może mieć również podłoże dziedziczne, a jednym z czynników epigenetycznych sprzyjających rozwojowi choroby może być dysregulacja poziomu metylotransferaz argininy [36].

Głównym aktywatorem transkrypcji genów uczestniczących w glukoneogenezie wątrobowej jest FoxO1 [11, 15]. Wykazano, że jego nadekspresja w hepatocytach zwiększa glukoneogenzę, natomiast jej obniżenie bądź całkowite wyciszenie zmniejsza wytwarzanie glukozy w wątrobie [58]. Coraz więcej dowodów wskazuje, że enzym PRMT1 uczestniczy w regulacji glukoneogenezy wątrobowej

zależnej od FoxO1 [19]. Metylotransferaza argininy 1 promuje w hepatocytach asymetryczną dimetylację FoxO1 w argininach 248 i 250, obniżając w ten sposób zdolność insuliny do zmniejszonego wytwarzania glukozy. Zatem podwyższony poziom enzymu PRMT1 promuje zwiększoną glukoneogenezę i może przyczynić się do rozwoju cukrzycy [40].

Iwasaki i wsp. dowiedli, że insulina indukuje przemieszczenie PRMT1 do frakcji błonowej komórki. Dzięki zmianie lokalizacji subkomórkowej enzym uczestniczy w aktywacji IR-IRS-1. Zjawisko to sprzyja wychwytowi glukozy i upakowaniu jej w mięśniach szkieletowych. Analiza ekspresji *PRMT1* wykazała obniżony poziom genu w tkankach wątroby i trzustki u szczurów ze stwierdzoną cukrzycą typu 2, wskazując, że zbyt niski poziom PRMT1 może upośledzać wychwyt glukozy do komórek i prowadzić do przedłużającego się stanu hiperglikemii [42].

Kolejnym enzymem, który może przyczynić się do rozwoju chorób metabolicznych jest PRMT6. Metylotransferaza argininy 6 uczestniczy w asymetrycznej dimetylacji histonu 4 w argininie 3, wzmagając aktywność receptorów jądrowych [13]. PRMT6 może regulować glukoneogenzę wątrobową poprzez aktywację zależnego od CRTC2 szlaku transkrypcyjnego w wątrobie [35]. Enzym katalizuje dimetylację wielu reszt argininy na N-końcu CRTC2, wzmacniając w ten sposób interakcję pomiędzy CRTC2 i CREB w rejonie promotorowym genów glukoneogennych. Porównanie poziomu PRMT6 w wątrobie myszy zdrowych i chorych na cukrzycę typu 2 wykazało zwiększoną ilość PRMT6 w hepatocytach myszy z insulinoopornością. Co ciekawe wyciszenie aktywności genu *PRMT6* u chorych myszy przywraca normoglikemię [40].

DYSREGULACJA METYLOTRANSFERAZ ARGININY W PATOGENEZIE CHORÓB UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO

Choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią najczęstszą przyczynę zgonów w Polsce. Większość zdarzeń śmiertelnych spowodowana jest udarem bądź zawałem mięśnia sercowego. Główną przyczyną występowania incydentów sercowo-naczyniowych są: nadciśnienie tętnicze, otyłość, dyslipidemia, palenie wyrobów tytoniowych oraz cukrzyca. Istnieją jednak doniesienia, że w rozwój chorób układu krążenia mogą być pośrednio zaangażowane metylotransferazy argininy [87].

Tlenek azotu, który uczestniczy w regulacji systemu sercowo-naczyniowego, jest syntetyzowany przez endogenną syntezę nadtlenku azotu (ang. *Nitric oxide synthases,* NOS) wydzielaną przez komórki śródbłonka. Monometyloarginina oraz asymetryczna dimetyloarginina, które są produktami aktywności PRMT, posiadają właściwości hamujące NOS. Inhibicja syntezy tlenku azotu poprzez upośledzenie szlaku NO/NOS prowadzi do dysfunkcji śródbłonka naczyniowego

[83]. Tlenek azotu jest niezbędny do utrzymania homeostazy endotelium. Uczestniczy między innymi w modyfikacji lipoproteiony o małej gęstości, funkcji płytek krwi i leukocytów oraz w proliferacji komórek mięśni gładkich. Chen i wsp. dokonali analizy genetycznej mającej na celu porównanie profilu ekspresji genów regulujących szlak NO/NOS wśród pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą układu sercowo-naczyniowego oraz w grupie kontrolnej. Analizie poddano geny *PRMT1 – PRMT3* oraz *DDAH* (produkt genu jest odpowiedzialny za proteolizę i degradację asymetrycznej dimetyloargininy). Otrzymane wyniki wykazały, iż pacjenci z chorobą wieńcową mają znacznie obniżoną ekspresję genu *DDAH* oraz zwiększoną ekspresję genów *PRMT1 – PRMT3* [14]. Co potwierdza, iż nadmierna ekspresja metylotransferaz argininy może wywierać niekorzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy i sprzyjać rozwojowi miażdżycy i nadciśnienia tętniczego.

ROLA PRMT W ROZWOJU ASTMY OSKRZELOWEJ

Astma oskrzelowa zaliczana jest do najczęściej występujących chorób przewlekłych wśród pacjentów pediatrycznych. Dolegliwość ta jest przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych, charakteryzującym się odwracalnym skurczem oskrzeli, świstami, kaszlem, uciskiem w klatce piersiowej oraz dusznością. Patomechanizm astmy oskrzelowej zależy od czynników środowiskowych oraz od predyspozycji genetycznych, uczestniczących w wywołaniu reakcji immunologicznej i niekontrolowanej produkcji immunoglobuliny E. Rozwojowi astmy oskrzelowej może sprzyjać zwiększone stężenie PRMT1 [17].

Tkankowa przebudowa subepitelialnych komórek mezenchymalnych jest główną przyczyną zwłóknień i stanów zapalnych, prowadzących do rozwoju astmy oskrzelowej. Dane literaturowe wykazują związek pomiędzy dysfunkcją mitochondriów w fibroblastach dróg oddechowych a wystąpieniem astmy. Sun i wsp. dokonali analizy porównawczej poziomu PRMT1 w komórkach fibroblastów pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowaną astmą oskrzelową oraz od grupy kontrolnej. Wyniki doświadczenia jednoznacznie wskazują, iż w grupie badanej poziom PRMT1 był znacznie podwyższony. Nadekspresja genu *PRMT1* prowadzi do zaburzenia funkcjonowania mitochondriów poprzez sygnalizację TGF-β→SMAD2/3→C/EBPβ→PRMT1→P-GC-1α. Obniżenie aktywności PRMT1 swoistym inhibitorem AMI-1 prowadzi do zmniejszenia dysmorficznych mitochondriów w tkance płucnej, świadcząc o tym, iż PRMT może okazać się skutecznym celem terapeutycznym astmy oskrzelowej [76].

Nadekspresja *PRMT1* może przyczynić się również do indukcji stanu zapalnego w tkance płucnej poprzez stymulację eotaksyny-1 i *CCR3* oraz zwiększać wytwarzanie interleukiny 4 (Il-4). Obniżenie ekspresji genu *PRMT1* w szczurzym modelu astmy oskrzelowej prowadzi do zmniejszenia poziomu Il-4, a także do zniesienia infiltracji eozynofilii do płuc, łagodząc objawy zapalenia płuc oraz przeciwdziałając rozwojowi astmy oskrzelowej [77].

DYSREGULACJA PRMT PROWADZĄCA DO ROZWOJU CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Nowotwory stanowią zróżnicowaną grupę chorób, w których komórki pod wpływem licznych mutacji i transformacji nowotworowych zatraciły zdolność różnicowania się w dojrzałe komórki, tworzące tkanki [16]. Coraz więcej dowodów wskazuje, że w patogenezę chorób nowotworowych zaangażowane są zmiany epigenetyczne, które powodują dysregulację kluczowych genów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy komórkowej [47]. Jedną z obserwowanych modyfikacji epigenetycznych w procesie nowotworzenia jest zaburzenie metylacji argininy spowodowane nieprawidłową aktywnością odpowiednich metylotransferaz (PRMT) [89, 90].

Apoptoza odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu, poprzez indukowanie programowanej śmierci nieprawidłowych komórek. W warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy proliferacją a apoptozą komórek, dzięki obecności białek pro- i antyapoptycznych. Jednym z białek zapobiegających apoptozie jest CFLARL, którego poziom jest podwyższony w przypadku wielu nowotworów [42]. Wykazano, iż gen *CFLARL* ulega metylacji przy argininie 122, a za proces przyłączenia grupy metylowej odpowiada rodzina metylotransferaz argininowych. Li i wsp. dokonali analizy poziomu PRMT1 i PRMT5 w komórkach ludzkiego nowotworu płuc. Wyniki wykazały, iż nadekspresja genu *PRMT5* powoduje zwiększenie poziomu CFLARL poprzez zmniejszenie ubikwitynacji białka. Dodatkowo PRMT5 może hamować oddziaływania pomiędzy CFLARL i ITCH, wpływając na ligazę ubikwitynową E3. Z kolei nadekspresja genu *PRMT1* powoduje zwiększenie ubikwitynacji i degradacji CFLARL, wzmagając oddziaływania pomiędzy CFLARL i ITCH [59].

PRMT2 dzięki aktywacji receptorów jądrowych może indukować rozwój nowotworów hormonozależnych [65]. Zwiększona ilość metylotransferazy argininy 2 poprzez aktywację receptora: estrogenowego i progesteronowego promuje wzrost i progresję nowotworu, zwiększając tempo proliferacji komórek rakowych, zaburzając ich cykl podziałowy oraz sprzyjając nadmiernej migracji i adhezji [89, 90].

Zwiększone stężenie metylotransferazy 6 zostało potwierdzone w przypadku nowotworu pęcherza, płuc oraz w raku gruczołu sutkowego. PRMT6 uczestniczy w metylacji genów supresorowych: p21 i p16. Przyłączenie grupy metylowej do argininy 156 w p21 wspomaga fosforylację treoniny w pozycji 145, prowadząc do zniesienia funkcji przeciwnowotworowych i zwiększenia oporności na czynniki cytotoksyczne. Ponadto metylacja p16 katalizowana PRMT6 zakłóca czynność CDK4, uniemożliwiając blokadę cyklu komórkowego [49].

Podwyższony poziom PRMT7 sprzyja progresji choroby nowotworowej [31]. Wysokie stężenie enzymu związane jest z nadmierną aktywnością genów zaangażowanych we wzrost inwazyjności komórek rakowych: *MMP-2*, *MMP-9*, *ZEB2*, *TWIST*, *SNAIL* [81].

PRMT9 działa jako onkogen w przypadku raka wątrobowokomórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma,* HCC). Ekspresja metylotransferazy argininy 9 ulega znacznemu podwyższeniu w tkankach HCC w porównaniu do tkanek nierakowych. Dowiedziono, iż pacjenci ze zwiększonym poziomem metylotransferazy argininy 9 mają krótszy czas przeżycia i wyższy odsetek nawrotów choroby. Jiang i wsp. dowiedli, iż PRMT9 wzmaga migrację i inwazję komórek oraz sprzyja transformacji epitelialno-mezynchemalnej (ang. *epithelial–mesenchymal transition,* EMT) poprzez regulację szlaku PI3K / Akt / GSK-3β / Snail [45].

PODSUMOWANIE

Metylotransferazy argininy są rodziną enzymów epigenetycznych, odpowiedzialnych za metylację reszt argininy w ogonach histonowych lub białkach niehistonowych. Katalityczne przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny na aminową resztę argininy białek histonowych prowadzi do zmiany konformacji chromatyny, kontrolując w ten sposób jej aktywność transkrypcyjną. Reakcja ta jest powszechna i dotyczy około 1% reszt argininy w całym genomie człowieka.

Proces metylacji argininy jest niezbędny do zachowania homeostazy organizmu. Metylotransferazy argininy uczestniczą w regulacji wielu kluczowych zjawisk takich jak: proliferacja, różnicowanie i dojrzewanie komórek. Ponadto enzymy kontrolują transdukcję sygnału, składanie mRNA oraz proces naprawy nici DNA, warunkując prawidłowe funkcjonowanie organizmu.

Niestety coraz więcej dowodów wskazuję, iż nieprawidłowy poziom metylotransferaz argininy może sprzyjać wystąpieniu chorób przewlekłych takich jak: cukrzyca, choroby układu sercowo-naczyniowego, astmy oskrzelowej oraz nowotworów złośliwych. Podwyższony lub obniżony pozom PRMT powoduje nieprawidłową metylację argininy, prowadząc do dysregulacji kluczowych genów odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowej gospodarki węglowodanowej, dezaktywację genów supresorowych oraz może przyczynić się do powstania stanów zapalnych.

Rola metylotrasferaz argininy w rozwoju poszczególnych chorób przewlekłych powinna zostać dogłębnie zbadana, co być może umożliwiłoby w przyszłości opracowanie nowych terapii celowanych opartych na modulowaniu poziomu PRMT.

LITERATURA

[1] ALAM H, GU B, LEE MG. Histone methylation modifiersin cellular signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 2015; **23**: 4577-4592.

[2] AMANO Y, MATSUBARA D, YOSHIMOTO T, TAMURA T, NISHINO H, MORI Y, NIKI T. Expression of protein arginine methyltransferase-5 in oral squamous cell carcinoma and its significance in epithelial-to-mesenchymal transition. *Pathol Int* 2018; **68**: 359-366.

[3] BALDWIN RM, BEJJDE M, TRINKLE-MULCAHY L, COTE J. Identification of the PRMT1v1 and PRMT1v2 specific interactomes by quantitative mass spectrometry in breast cancer cells. *Proteomics* 2015; **15**: 2187-2197.
[4] BALDWIN RM, HAGHANDISH N, DANESHMAND M, AMIN S, PARIS G, FALLS TJ, BELL JC, ISLAM S, COTE J. Protein arginine methyltransferase 7 promotes breast cancer cell invasion through the induction of MMP9 expression. *Oncotarget* 2015; **20**: 3013-3032.
[5] BALDWIN RM, MORETTIN A, COTE J. Role of PRMTs in cancer: Could minor isoforms be leaving a mark? *World J Biol Chem* 2014; **5**: 115-129.
[6] BANNISTER AJ, KOUZARDIES T. Reversing histone methylation. *Nature* 2005; **436**: 1103-1106.
[7] BANNISTER AJ, SCHNEIDER R, KOUZARIDES T. Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 2002; **109** :801-806.
[8] BAO J, DI LORENZO A, LIN K, LU Y, ZHONG Y, SEBASTIAN MM, MULLER WJ, YANG Y, BEDFORD MT. Mouse Models of Overexpression Reveal Distinct Oncogenic Roles for Different Type I Protein Arginine Methyltransferases. *Cancer Res* 2019; **79**: 21-32.
[9] BAO J, ROUSSEAUX S, SHEN J, LIN K, LU Y, BEDFORD MT. The arginine methyltransferase CARM1 represses p300•ACT•CREMτ activity and is required for spermiogenesis. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**: 4327-4343.
[10] BEDFORD MT. The Family of Protein Arginine Methyltransferases. *The Enzymes* 2006; **24**: 31-50.
[11] BIGGS WH, MEISENHELDER J, HUNTER T, CAVENEE WK, ARDEN KC. Kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7421-7426.
[12] BLACKWELL E, CEMAN S. Arginine methylation of RNA-binding proteines regulates cell function and differentiation. *Mol Reprod Dev* 2012; **3**: 163- 175.
[13] BLANC RS, RICHARD S. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell* 2017; **65**: 8-24.
[14] BOURAS G, DEFTEREOS S, TOUSOULIS D, GIANNOPOULOS G, CHATZIS G, TSOUNIS D, CLEMAN MW, STEFANADIS C. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Promising Biomarker for Cardiovascular Disease? *Curr Top Med Chem* 2013; **13**: 180-200.
[15] BRUNET A, BONNI A, ZIGMOND MJ, LIN MZ, JUO P, HU LS, ANDERSON MJ, ARDEN KC, BLENIS J, GREENBERG ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; **96**: 857-868.
[16] BUJAK J, KOPYTKO P, LUBECKA M, PIOTROWSKA K, TARNOWSKI M. Zaburzenia miRNA w patogenezie nowotworów przewodu pokarmowego. *Ludzie nauki w kręgu interdyscyplinarnych badań* 2018; **2**: 135-146.
[17] BUKOWCZAN Z, KURZAWA R, PISIEWICZ K. Częstość występowania astmy oskrzelowej u dzieci w Polsce, *Alergia Asma Immunol* 1996; **1**: 20-24.
[18] CARLSON SM, GOZANI O. Emerging technologies to map the protein methylome. *J Mol Biol* 2014; **426**: 3350-3362.
[19] CHOI D, OH KJ, HAN HS, YOON YS, JUNG CY, KIM ST, KOO SH. Protein arginine methyltransferase 1 regulates hepatic glucose production in a FoxO1-dependent manner. *Hepatology* 2012; **56**: 1546-1556.
[20] DE MAJO F, CALORE M. Chromatinremodelling and epigeneticstateregulation by non-codingRNAs in the diseasedheart. *Noncoding RNA Res* 2018; **3**: 20-28.
[21] DILLON MBC, RUST HL, THOMPSON PR, MOWEZ KA. Automethylation of Protein Arginine Methyltransferase 8 (PRMT8) Regulates Activity by Impeding S-Adenosylmethionine Sensivity. *J Biol Chem* 2013; **39**: 27872-27880.
[22] FLIS S, FLIS K, SPŁAWIŃSKI J. Modyfikacje epigenetyczne a nowotwory. *J Oncol* 2007; **57**: 427-434.
[23] FULTON MD, BROWN T, ZHENG YG. Mechanisms and Inhibitors of Histone Arginine Methylation. *Chem Rec* 2018; **12**: 1792-1807.
[24] FYODOROV DV, ZHOU B-R, SKOULTCHI AI, BAI Y. Emergingroles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; **19**:192-206.
[25] GAYATRI S, BEDFORD MT. Readersof histone methylarginine marks. *Biochem Biophys Acta* 2014; 8: 702-710.

[26] GHAYAD SE, RAMMAL G, SARKIS O, BASMA B, GHAMLOUSH F, FAHS A, KARAM M, HARAJLI M, RABEH W, MOUWAD JE, ZALZALI H, SAAB R. The histone deacetylase inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) as a therapeutic agent in Rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 2019; **20**: 271-283.
[27] GHILDIYAL R, SEN E. Concerted action of histone methyltransferases G9a and PRMT-1 regulates PGC-1α-RIG-I axis in IFNγ treated glioma cells. *Cytokine* 2017; **89**: 185-193.
[28] GOU Y, LI J, GUPTA R, CHO I, HO T.V, CHAI Y, MERRILL A, WANG J, XU J. Prmt1 regulates craniofacial bone formation upstream of Msx1. *Mech Dev* 2018; **152**: 13-20.
[29] HADJIKYRIACOU A, YANG Y, ESPEJO A, BEDFORD MT, CLARKE SG. Unique Features of Human Protein Arginine Methyltransferase 9 (PRMT9) and Its Substrate RNA Splicing Factor SF3B2. *J Biol Chem* 2015; **290**: 16723-16743.
[30] HAGHANDISH N, BALDWIN RM, MORETTIN A, DAWIT HT, ADHIKARY H, MASSON JY, MAZROUI R, TRINKLE-MULCAHY L, COTE J. PRMT7 methylates eukaryotic translation initiation factor 2α and regulates its role in stress granule formation. *Mol Biol Cell* 2019; **30**: 778-793.
[31] HADJIKYRIACOU A, CLARKE S.G. Caenorhabditis elegans PRMT-7 and PRMT-9 Are Evolutionary Conserved Protein Arginine Methyltransferases with Distinct Substrate Specificities. *Biochemistry* 2017; **56**: 2612-2626.
[32] HAGHANDISH N, BALDWIN RM, MORETTIN A, DAWIT HT, ADHIKARY H, MASSON JY, MAZROUI R, TRINKLE-MULCAHY L, CÔTÉ J: PRMT7 methylates eukaryotic translation initiation factor 2α and regulates its role in stress granule formation. *Mol Biol Cell* 2019; **30**: 778-793.
[33] HALBY L, MARECHAL N, PECHALRIEU D, CURA V, FRANCHINI DM, FAUX C, ALBY F, TROFFER-CHAERLIER N, KUDITHIPUDI S, JELTSCH A, AOUADI W, DECROLY E, GUOLLEMOT JC, PAGE P, FERROUD C, BONNEFOND L, GUIANVARC'H D, CAVARELLI J, ARIMONDO PB. Hijacking DNA methyltransferase transition state analogues to produce chemical scaffolds for PRMT inhibitors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018; **373**: doi: 10.1098/rstb.2017.0072.
[34] HAMMOND CM, STROMME CB, HUANG H, PATEL DJ, GROTH A. Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; **18**: 141-158.
[35] HAN H.S, CHOI D, CHOI S, KOO S.H. Rolesof protein arginine methyltransferases in the control of glucose metabolism. *Endocrinol Metab* 2014; **4**: 435-440.
[36] HAN HS, JUNG C.Y, YOON YS, CHOI S, CHOI D, KANG G, PARK KG, KIM S.T, KOO SH. Arginine methylation of CRTC2 is critical in the transcriptional control of hepatic glucose metabolism. *Sci Signal* 2014; **7**: doi: 10.1126/scisignal.2004479.
[37] HATANAKA Y, TSUSALA T, SHIMIZU N, MORITA K, SUZUKI T, MACHIDA S, SATOH M, HONDA A, HIROSE M, KAMIMURA S, OGONUKI N, NNAKAMURA T, INOUE K, HOSOI Y, DOHMAE N, NAKANO T, KURUMIZAKA H, MATSUMOTO K, SHINKAI Y, OGURA A. Histone H3 Methylated at Arginine 17 IS Essential for Reprogramming the Paternal Genome in Zgotes, *Cell Rep* 2017; **20**: 2756-2765.
[38] HERNANDEZ SJ, DOLIVO DM, DOMINKO T. PRMT8 demonstrates variant-specific expression in cancer cells and correlates with patient survival in breast, ovarian and gastric cancer. *Oncol Lett* 2017; **13**: 1938-1989.
[39] HOLLIDAY R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 2006; **2**: 76-80.
[40] HUANG L, WANG Z, NARAYANAN N, YANG Y. Arginine methylation of the C-terminus RGG motif promotes TOP3B topoisomerase activity and stress granule localization. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**: 3061-3074.
[41] HYE-SOOK H, DAHEE C, SERI C, SEUNG-HOI K. Roles of Protein Arginine Methyltransferases in the Control of Glucose Metabolism, *Endocrinol Metab* 2014; **29**: 435-440.
[42] INFANTINO S, LIGHT A, O'DONNELL K, BRYANT V, AVERY D.T, ELLIOT M, TANGYE S.G, BELZ G, MACKAY F, RICHARD S, TARLINTON D. Arginine methylation catalyzed by PRMT1 is required for B cell activation and differentiation. *Nat Commun* 2017; **8**: doi: 10.1038/s41467-017-01009-1.
[43] IWISAKI H. Impaired PRMT1 activity in the liver and pancreas od type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sciences* 2009; **85**: 161-166.

[44] JAHAN S, DAVIE J.R. Protein arginine methyltransferases (PRMTs): role in chromatin organization. *Adv Biol Regul* 2015; **57**: 173-184.
[45] JAIN K, JIN CY, CLARKE SG. Epigenetic control via allosteric regulation of mammalian protein arginine methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: 10101-10106.
[46] JIANG H, ZHOU Z, JIN S, Xu K, ZHANG H, XU J, SUN Q, WANG J, XU J. PRMT9 promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via activating PI3K/Akt/GSK-3β/Snail signaling. *Cancer Sci* 2018; **109**: 1414-1427.
[47] KLEINSCHMIDT MA, DE GRAFF P, VAN TEEFFELN HA, TIMMERS HT. Cell cycle regulation by the PRMT6 arginine methyltransferase through repression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *PloS One*, 2012; **7**: doi:10.1371/journal.pone.0041446.
[48] KOPYTKO P, BUJAK J, LUBECKA M, TARNOWSKI M. Analogi somatostatyny jako metoda leczenia nowotworów neuroendokrynnych. *Poszerzamy horyzonty* 2018; **7**: 192-201.
[49] KORZENIOWSKA K, JABŁECKA A. Cukrzyca (Część I), *Farmacja współczesna* 2008; **1**: 231-235.
[50] KUHN P, XU W. Protein arginine methyltransferases: nuclear receptor coregulators and beyond. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2009; **87**: 299-342.
[51] LATTOUF H, POULARD C, LE ROMANCER M. PRMT5 prognostic value in cancer. *Oncotarget* 2019; **34**: 3151-3153.
[52] LI L, ZHANG Z, MA T, HUO R. PRMT1 regulates tumor growth and metastasis of human melanoma via targeting ALCAM. *Mol Med Rep* 2016; **14**: 521-528.
[53] LI M, AN W. XU L. LIN Y, SU L, LIU X. The arginine methyltransferase PRMT5 and PRMT1 distinctly regulate the degradation of anti-apoptotic protein $CFLAR_L$ in human lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; **38**: doi: 10.1186/s13046-019-1064-8.
[54] LI X, WANG C, JIANG H, LUO C. A patent review of arginine methyltransferase inhibitors (2010-2018). *Expert Opin Ther Pat* 2019; **29**: 97-114.
[55] LI Y, ZHU R, WANG W, FU D, HOU J, JI S, CHEN B, HU Z, SHAO X, YU X, ZHAO Q, ZHANG B, DU C, BU Q, HU C, TANG Y, ZHONG L, YANG S, ZHAO Y, CEN X. Arginine Methyltransferase 1 in the Nucleus Accumbens Regulates Behavioral Effects of Cocaine. *J Neurosci* 2015; **37**: 12890-12902.
[56] LITT M, QIU Y, HUANG S. Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep* 2009; **2**: 131-141.
[57] MADEA M, HASEGAWA H, SUGIYMA M, HYODO T, ITO S, CHEN D, ASANO E, MASUDA A, HASEGAWA Y, HAMAGUCHI M, SENGA T. Arginine methylation of ubiquitin-associated protein 2-like is required for the accurate distribution of chromosomes. *FASEB J* 2016; **30**: 312-323.
[58] MARTIN C, ZHANG Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **11**: 838-849.
[59] MATSUMOTO M, POCAJ A, ROSSETTI L, DEPINHO R.A, ACCILI D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab* 2007; **6**: 208-216.
[60] MINGYUE L, WENTAO A, LINYAN X, YIDAN L, LING S, XIANGGOU L. The arginine methyltransferase PRMT5 and PRMT1 distinctly regulate the degradation of anti-apoptotic protein $CFLAR_L$ in human lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 64.
[61] MUSANI D, BOK J, MASSIGNANI E, WU L, TABAGLIO T, IPPOLITO MR. CUOMO A, OZBEK U, ZORGATI H, GHOSHDASTIDER U, ROBINSON RC, GUCCIONE E, BONALDI T. Proteomics profiling of arginine methylation defines PRMT5 substrate specificity. *Sci Signal* 2019; **575**: doi: 10.1126/scisignal.aat8388.
[62] NAKAKIDO M, DENG, SUZUKI T, DOHMAE N, NAKAMURA Y, HAMAMOTO R. PRMT6 increases cytoplasmic localization of p21CDKN1A in cancer cells through arginine methylation and makes more resistant to cytotoxic agents. *Oncotarget* 2015; **31**: 30957-30967.
[63] OH TG, BAILEY P, DRAY E, SMITH AG, GOODE J, ERIKSSON N, FUNDER JW, FULLER PJ, SIMPSON ER, TILLEY WD, LEEDMAN PJ, CLARKE CL. GRIMMOND S, DOWHAN DH, MUSCAT GE. PRMT2 and RORγ expression are associated with breast cancer survival outcomes. *Mol Endocrinol* 2014; **28**: 1166-85.

[64] PAWLICKA K, PERRIGUE P, BARCISZEWSKI J. Epigenetyczna kontrola procesów komórkowych. *NAUKA* 2018; **2**: 115-128.
[65] PENG C, WONG CC. The story of protein arginine methylation: characterization, regulation, and function. *Expert Rev Proteomics* 2017; **14**: 157-170.
[66] POULARD C, CORBO L, LE ROMANCER M.: Protein arginine methylation/demethylation and cancer. *Oncotarget* 2016; **41**: 67532-67550.
[67] PRANHU L, CHEN L, WEI H, DEMIR Ö, SAFA A, ZENG L, AMARO RE, O'NEIL BH, ZHANG ZY, LU T: Development of an AlphaLISA high throughput technique to screen for small molecule inhibitors targeting protein arginine methyltransferases. *Mol Biosyst* 2017; **21**: 2509-2520.
[68] RAN T, LI W, PENG B, XIE B, LU T, LU S, LIU W. Virtual Screening with a Structure-Based Pharmacophore Model to Identify Small-Molecule Inhibitors of CARM1. *J Chem Inf Model* 2019; **59**: 522-534.
[69] RODENHISER D, MANN M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; **174**: 341-348.
[70] SHAILESH H, ZAKARIA ZZ, BAIOCCHI R, SIF S. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) dysregulation in cancer. *Oncotarget* 2018; **94**: 36705-36718.
[71] SHI Y. WHESTINE JR. Dynamic reglation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell* 2007; **25**: 1-14.
[72] SIERADZKI J. Otyłość a cukrzyca. *Przew Lek* 2000; **7**: 90-97.
[73] SIMANDI Z, PAJER K, KAROLYI K, SIELER T, JIANG LL, KOLOSTYAK Z, SARI Z, FEKECS Z, PAPP A, PATSALOS A, CONTRERAS GA, REHO B, PAPP Z, GUO X, HORVATH A, KISS G, KERESZTESSY Z, VAMOSI G, HICKMAN J, XU H, DORMANN D, HORTOBAGYI T, ANTAL M, NÓGRADI A, NAGY L. Arginine Methyltransferase PRMT8 Provides Cellular Stress Tolerance in Aging Motoneurons. *J Neurosci* 2018; **38**: 7683-7700.
[74] SMITH E, ZHOU W, SHINDIAPINA P, SIF S, LI C, BAIOCCHI RA. Recent advances in targeting protein arginine methyltransferase enzymes in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2018; **22**: 527-545.
[75] STOPA N, KREBS JE, SHECHTER D. The PRMT5 argnine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. *Cell Mol Life Sci* 2015; **11**: 2041-2059.
[76] SUN O, FANG L, TANG X, LU S, TAMM M, STOLZ D, ROTH M. TGF-β Upregulated Mitochondria Mass through the SMAD2/3→C/EBPβ→PRMT1 Signal Pathway in Primary Human Lung Fibroblasts. *J Immunol* 2019; **202**: 37-47.
[77] SUN Q, YANG X, ZHONG B, JIAO F, LI C, LI D, LAN X, SUN J, LU S. Upregulated protein arginine methyltransferase 1 by IL-4 increases eotaxin-1 expression in airway epithelial cells and participates in antigen-induced pulmonary inflammation in rats. *J Immunol* 2012; **188**: 3506-3512.
[78] TEPERINO R, SCHOONJANS K, AUWERX J. Histone methyl transferases and demethylases: cant hey link metabolism and transcription? *Cell Metab* 2010; **4**: 321-327.
[79] TEWARY SK, ZHENG YG, HO MC. Protein arginine methyltransferases: insights into the enzyme structure and mechanism at the atomic level. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**: 2917-2932.
[80] THAKUR A, HEVEL JM, ACEVEDO O. Examining Product Specificity in Protein Arginine Methyltransferase 7 (PRMT7) Using Quantum and Molecular Mechanical Simulations. *J Chem Inf Model* 2019; **59**: 2913-2923.
[81] VHUIYAN M, THOMAS D, HOSSEN F, FRANKEL A. Targeting protein argininr N-methyltransferases with peptide-based inhibiors: opportunities and challengs. *Future Med Chem* 2013; **18**: 2199-21206.
[82] WANG SM, DOWHAN DH, MUSCAT GEO. Epigenetic arginine methylation in breast cancer: emerging therapeutic strategies. *J Mol Endocrinol* 2019; **63**: 223-237.
[83] WONG C, PENG C. The story of protein arginine methylation:characterization, regulation, and function, *Expert Rev Proteomics* 2017; **2**: 157-170.
[84] YE Y, ZHANG B, MAO R, ZHANG C, WANG Y, XING J, LIU Y.C, LUO X, DING H, YANG Y, ZHOU B, JIANG H, CHEN K, LUO C, ZHENG M. Discovery and optimization of selective inhib-

itors of protein arginine methyltransferase 5 by docking-based virtual screening. *Org Biomol Chem* 2017; **17**: 3648-3661.
[85] YEOM C, KIM D, PARK M, CHOI J, JEONG J, WI A, PARK W, HAN H, PARK S. Insulin-induced CARM1 upregulation facilitates hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **3**: 568-574.
[86] YOST JM, KORBOUKH I, LIU F, GAO C, JIN J. Targets in epigenetics: inhibiting the methyl writers of the histone code. *Curr Chem Genomics* 2011; **5**: 72-84.
[87] ZDROJEWSKI T, IGNASZEWSKA-WYRZYKOWSKA A, WIERUCKI Ł, JANUSZKO W, SZPAJER M, KRUPA-WOJCIECHOWSKA B, WYRZYKOWSKI B. Modelowy projekt prewencji chorób układu krążenia na przykładzie doświadczeń Programu SOPKARD, *Via Medica* 2004; **2**: 115-129.
[88] ZHAO X, ZHOU D, LIU Y, LI C, ZHAO X, LI Y, LI W. Ganoderma lucidum polysaccharide inhibits prostate cancercell migration via the proteinarginine methyltransferase 6 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2018; **17**: 147-157.
[89] ZHONG J, CAO RX, LIU JH, LIU YB, WANG J, LIU L.P, CHEN YJ, YANG J, ZHANG QH, WU Y, DING WJ, HONG T, XIAO XH, ZU XY, WEN GB. Nuclear loss of protein arginine N-methyltransferase 2 in breast carcinoma is associated with tumor grade and overexpression of cyclin D1 protein. *Oncogene* 2014; **48**: 5546-5558.
[90] ZHU K, JIANG C, TAO H, LIU J, ZHANG H, LUO C. Identification of a novel selective small-molecule inhibitor of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) by virtual screening, resynthesis and biological evaluations. *Bioorg Med Chem Lett* 2018; **28**: 1476-1483.

Redaktor prowadzący − Michał Nowicki

Otrzymano: 06.05.2020
Przyjęto: 15.06.2020
Joanna Janisiak
Katedra i Zakład Fizjologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
e-mail: joanna.janisiak@gmail.com

WYKŁADNIKI STANU ZDROWIA JAMY USTNEJ PACJENTÓW CHORUJĄCYCH NA MUKOWISCYDOZĘ Z UWZGLĘDNIENIEM ANALIZY CZYNNIKÓW ETIOLOGICZNYCH

ORAL HEALTH STATUS AND INFLUENTIAL RISK FACTORSIN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Tamara PAWLACZYK-KAMIEŃSKA

Zakład Stomatologii Grup Ryzyka, Katedra Stomatologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Choroby układowe niejednokrotnie są przyczyną zmian w jamie ustnej. Dotychczasowe badania dotyczące stanu zdrowotnego jamy ustnej pacjentów chorujących na mukowiscydozę nie określają w sposób jednoznaczny problemów stomatologicznych tej grupy pacjentów. Dane z piśmiennictwa mówią o podobnej lub wyższej frekwencji defektów szkliwa u pacjentów chorujących na mukowiscydozę w porównaniu z grupą kontrolną, oraz o podobnej lub niższej intensywności próchnicy w dzieci i młodzieży, ale o wyższej u osób dorosłych. Własności śliny mogą stanowić u tych pacjentów wiodący czynnik w powstawaniu oraz progresji próchnicy zębów. Natomiast wśród etiologicznych uwarunkowań chorób jamy ustnej sprawcza rola czynnika bakteryjnego wydaje się mniej znacząca, co prawdopodobnie jest skutkiem częstej i długoterminowej farmakoterapii infekcyjnej. W przedstawionej pracy dokonano analizy wyników badań naukowych dotyczących stanu zdrowotnego jamy ustnej pacjentów z mukowiscydozą. Wydaje się, że rozwój skutecznych metod terapii wobec dłuższego czasu przeżycia tych pacjentów wskazuje na konieczność opracowania standardów opieki stomatologicznej nie tylko dla dzieci, ale również dla osób w wieku dorosłym, głównie celem zmniejszenia zagrożenia w kontekście autoinfekcji.

Słowa kluczowe: mukowiscydoza, jama ustna, defekty szkliwa, próchnica zębów, płytka bakteryjna

Summary: Systemic diseases may have their manifestation in the oral cavity. Previous studies concerning the oral health status of cystic fibrosis patients do not explicitly determine the dental risks in these group of patients. The data shows in cystic fibrosis patients compared to healthy controls an equal or higher frequency of enamel defects, similar or lesser caries intensity in children and adolescents, and higher caries intensity in cystic fibrosis adults. In this group of patients, saliva properties

might be a crucial etiological factor in the development and progression of dental caries. Among the dental caries risk factors, the bacterial agent seems to be less significant, which can probably be explained by the frequent and long-term infectious pharmacotherapy. The paper analyses scientific evidence relating to oral health status in cystic fibrosis patients. The development of diagnostics and effective therapies indicates the need to develop standards of dental care not only for cystic fibrosis children but also for cystic fibrosis adults, mainly to reduce the risk of autoinfection.

Keywords: cystic fibrosis, oral cavity , enamel defects, dental caries, bacterial plaque

WSTĘP

Mukowiscydoza (ang. *cystic fibrosis*, CF) jest to wieloukładowa choroba uwarunkowana genetycznie spowodowana defektem genu zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 7 w pozycji q31. Gen ten koduje transbłonowe białko CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* – błonowy regulator przewodnictwa), które tworzy, aktywowany przez cAMP (cykliczny fosforan adenozyny), kanał chlorkowy, umożliwiający bierny transport jonów chlorkowych zgodnie z ich gradientem [12, 13]. Ponadto reguluje dyfuzję jonów HCO_3^-, Na^+, K^+ i Ca^{2+}, a także wody z i do wnętrza komórki. Białko CFTR znajduje się po apikalnej stronie komórek nabłonkowych błony komórkowej: dróg oddechowych, przewodów trzustkowych, przewodu pokarmowego, dróg żółciowych, gruczołów potowych, układu rozrodczego, gruczołów ślinowych, a także innych komórek pochodzenia nabłonkowego, min. komórek szkliwotwórczych (ameloblastów) [5, 7, 9, 12, 13, 29]. Następstwem zaburzonego transportu jest zmniejszona sekrecja jonu Cl^- z komórek i nadmierna absorpcja jonu Na^+ oraz wody do ich wnętrza, co powoduje zmiany w składzie jonów na zewnątrz komórek nabłonkowych oraz, powstania gęstego, lepkiego, i zalegającego przewody wyprowadzające, śluzu. Powszechne umiejscowienie kanału chlorkowego w ludzkim organizmie tłumaczy dlaczego mukowiscydoza jest chorobą ogólnoustrojową, wieloukładową, charakteryzującą się polimorfizmem objawów klinicznych [12, 13].

Jama ustna stanowi niezwykle zróżnicowane środowisko. Jako integralna część organizmu podlega również wpływom wynikającym z ogólnego stanu zdrowia gospodarza, a choroby układowe mogą mieć w niej swoje wykładniki [1-4, 6, 11, 14-16, 20-28]. Nie zawsze są to objawy specyficzne, jednak powinny być uwzględniane w toku diagnostyki i terapii. Wydaje się, że w mukowiscydozie, zarówno sama choroba ogólnoustrojowa, jej genetyczne uwarunkowanie, przebieg i powikłania, a także rozpoczynająca się już we wczesnym okresie życia, farmakoterapia mogą znacząco wpływać na stan zdrowotny jamy ustnej.

Rozwój metod diagnostycznych umożliwiających wczesne rozpoznanie choroby, a także nowoczesna terapia, wpłynęły na znaczne wydłużenie przeciętnego czasu trwania życia tej grupy chorych, co z jednej strony stwarza obecnie możli-

wości zebrania kolejnych obserwacji, ale z drugiej wskazuje na konieczność opracowania standardów opieki stomatologicznej nie tylko dla dzieci, ale również dla osób w wieku dorosłym, głównie celem zmniejszenia zagrożenia w kontekście autoinfekcji. Dostępne piśmiennictwo opisujące stan jamy ustnej pacjentów chorujących na mukowiscydozę dotyczy głównie badań chorych poniżej 18. roku życia, a tylko nieliczne odnosi się do pacjentów poza wiekiem rozwojowym, głównie młodych dorosłych [11, 14-16, 20, 21, 27, 28]. W efekcie dostępne dane nie zawsze są w stanie określić zagrożenie stomatologiczne i potrzeby profilaktyczne tej grupy pacjentów. Mało jest doniesień klinicznych uwzględniających skutki innych, poza mukowiscydozą, uwarunkowań, które mogą wynikać z niewystarczających działań zapobiegawczych w okresie dzieciństwa. Jedynymi dotychczas wynikami badań stanu jamy ustnej dotyczących wyłącznie osób dorosłych są doniesienia Pawlaczyk-Kamieńska i wsp. [22, 23, 25, 26]. Stan jamy ustnej oceniano u 22 pacjentów chorujących na mukowiscydozę oraz, 22, sparowanych z nimi pod względem płci i wieku, osób zdrowych. W każdej z grup kobiety stanowiły 63.64% badanych, a średni wiek pacjentów wynosił 29.14±6.63 lata.

ZABURZENIA ROZWOJOWE SZKLIWA

W publikacjach na temat uzębienia pacjentów chorujących na mukowiscydozę, celowe wydaje uwzględnienie czasu powstania zmian patologicznych, a więc okresu pre- oraz posterupcyjnego, a zatem czy są to wrodzone zaburzenia rozwojowe, czy nabyte w postaci choroby próchnicowej [24]. Analiza piśmiennictwa dotyczącego frekwencji występowania rozwojowych zaburzeń szkliwa uzębienia mlecznego nie wykazała istotnej statystycznie różnicy pomiędzy dziećmi chorującymi na mukowiscydozę a zdrowymi rówieśnikami. Natomiast dane odnoszące się do uzębienia stałego tej grupy pacjentów donoszą o podobnej lub istotnie wyższej frekwencji defektów szkliwa w porównaniu z grupą kontrolną [14, 23, 24, 28]. Ferrazano i wsp. (2009) [14], badając 54 dzieci chorujące na mukowiscydozę i 101 dzieci zdrowych w wieku 7-12, odnotował defekty szkliwa zębów stałych w mieszanym uzębieniu, odpowiednio u 55.6% i 22.7% dzieci. Spośród wszystkich badaczy jedynie Peker i wsp. (2014) [28], nie odnotowali istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami. Zaobserwowali zmiany u 20% z 30 ogółu badanych pacjentów chorujących na mukowiscydozę o średnim wieku 10.2 lata oraz u 23.3% spośród 30 zdrowych osób o średnim wieku 9.9 lat. Wyniki badań Pawlaczyk-Kamieńska i wsp. (2019) [23] przeprowadzonych wśród dorosłej populacji pacjentów potwierdzają doniesienia o istotnie częstszym występowaniu zaburzeń rozwojowych szkliwa u osób chorujących na mukowiscydozę (55%) w porównaniu z osobami zdrowymi (23%). Ponadto, w grupie badanej, odnotowano bardziej zaawansowany stopień nieprawidłowości oraz dotyczący

większej liczby zębów. U pacjentów z mukowiscydozą zmiany obserwowane były na wszystkich grupach zębowych, a u osób zdrowych wyłącznie na zębach siecznych oraz pierwszych zębach trzonowych.

Częstsze i bardziej nasilone występowanie w uzębieniu stałym zaburzeń budowy szkliwa u pacjentów chorujących na mukowiscydozę dotychczas tłumaczono samym przebiegiem choroby, jej powikłaniami oraz przewlekłą, często parokrotną w ciągu roku, antybiotykoterapią w okresie odontogenezy [5, 9]. Należy podkreślić, że biologia szkliwa jest częścią zintegrowanej biologii systemowej, a niezwykle złożony proces jego formowania (amelogeneza) podlega tym samym anomaliom [5]. Jego przebieg mogą zakłócać nawet relatywnie niewielkie wahnięcia w środowisku otaczającym ameloblasty, w tym wzrost temperatury, hipokalcemia czy kwaśne pH [9, 18, 32]. Przeprowadzane w ostatnich latach badania laboratoryjne sygnalizują istnienie w tej grupie chorych również innego, niż dotychczas sądzono, związanego z niedoborem lub brakiem przekaźnikowego białka CFTR, tła tych nieprawidłowości. Nie w pełni wyjaśniony patomechanizm zaburzenia procesu biomineralizacji szkliwa w tej grupie chorych wskazuje, iż ważną rolę w etiologii nieprawidłowości może pełnić zakłócony transport jonów przez kanał chlorkowy [8, 10, 18, 32], zlokalizowany w szczytowej części ameloblastów. Dostępne wyniki badań nie wyjaśniają dokładnie funkcji CFTR w procesie amelogenezy, ale na obecnym etapie wiedzy uważane jest ono za jedno z dotychczas zidentyfikowanych białek stabilizujących pH wewnątrz ameloblastu oraz regulujących transport jonów Ca^{2+} przez błonę komórkową do jego wnętrza [5, 9]. Ubocznym produktem powstającym podczas formowania kryształów apatytu w procesie dojrzewania szkliwa są zakwaszające środowisko protony H^+, które, aby mógł być kontynuowany wzrost kryształów, powinny zostać zneutralizowane. Podstawową rolą kanału chlorkowego jest regulacja wymiany Cl^-/HCO_3^- przez błony komórkowe, a przez to neutralizowanie jonów H^+ oraz zapewnienie obojętnego odczynu pH, koniecznego dla transportu jonów Ca^{2+} i prawidłowego przebiegu procesu mineralizacji [7-9, 32]. Kwaśny odczyn pH niekorzystnie wpływa na cały proces tworzenie szkliwa: zakłóca aktywność ameloblastów, tworzenie macierzy organicznej szkliwa, uniemożliwia przenikanie związków nieorganicznych (głównie Ca^{2+}) przez co hamuje wzrost kryształów, a przy znacznym zakwaszeniu środowiska poniżej wartości krytycznej prowadzi do utraty związków mineralnych z już zmineralizowanego szkliwa [8, 32]. Przypuszcza się, że w wyniku defektu białka CFTR, dochodzi do zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej środowiska rozwijającego się zawiązka zęba, co klinicznie może objawiać się w postaci zaburzeń mineralizacji [5, 8, 32]. Nie wyklucza się także wpływu wtórnego, ubocznego efektu stosowanej ogólnoustrojowo antybiotykoterapii oraz zaburzeń w obrębie układu oddechowego, infekcji, bądź niedożywienia, będącego skutkiem zaburzeń funkcji układu pokarmowego [6, 24]. Ze względu na bardzo dużą wrażliwość rozwijającego się zawiązka zęba na zaburzenia systemowe, może

stanowić on biologiczny marker ogólnoustrojowy. Dotychczas niewiele wiadomo na temat oddziaływania CTFR w procesie amelogenezy zębów mlecznych, choć przypuszcza się, iż zęby, których odontogeneza zachodzi w okresie płodowym narażone są w mniejszym stopniu na działanie czynników uszkadzających [6].

PRÓCHNICA ZĘBÓW

W okresie poerupcyjnym na stan uzębienia pacjentów chorujących na mukowiscydozę ma wpływ wiele czynników, jak m.in. ogólny stan zdrowia oraz stosowana farmakoterapia, nawyki higieniczne i dietetyczne pacjenta, jego status socjoekonomiczny, regularność kontrolnych wizyt stomatologicznych [24]. Publikowane dane wskazują na brak istotnych różnic lub statystycznie istotnie niższą intensywność próchnicy u młodocianych pacjentów chorujących na mukowiscydozę w porównaniu z grupą kontrolną [3, 11, 20, 23, 24]. Wśród dorosłych pacjentów brak statystycznie istotnej różnicy w intensywności próchnicy pomiędzy grupą badaną (>19r.ż.; nie została podana liczba tych pacjentów) a kontrolną odnotowali wspomniani wcześniej Matrens i wsp. (2001) [20]. Natomiast istotnie statystycznie niższą intensywność próchnicy otrzymali Aps i wsp. (2001) [3], którzy przebadali po 10 osób z grupy badanej i kontrolnej powyżej 20 r.ż. Przeciwne wyniki opublikowała Dąbrowska i wsp. (2001) [11], badając po 10 osób z każdej z grup w wieku 13-24, gdyż odnotowali wyższą intensywność próchnicy u CF pacjentów w porównaniu z danymi uzyskanymi w grupie kontrolnej. Dane te nie zostały jednak poparte metodami analizy statystycznej. Statystycznie wyższą wartość wskaźnika intensywności próchnicy u dorosłych pacjentów chorujących na mukowiscydozę w porównaniu z wartością wskaźnika uzyskaną w grupie kontrolnej otrzymali Pawlaczyk-Kamieńska i wsp. [22, 23]. Ponadto u osób grupy badanej w porównaniu za pacjentami z grupy kontrolnej odnotowano istotnie statystycznie wyższą średnią liczbę zębów z aktywną próchnicą oraz średnią liczbę zębów usuniętych z powodu próchnicy, nie odnotowano natomiast różnicy w liczbie zębów wyleczonych. Dodatkowo wśród osób chorych nie stwierdzono żadnej osoby bez próchnicy (wartość wskaźnika=0), natomiast odsetek badanych bez ognisk choroby próchnicowej wśród osób zdrowych wynosił 14%. Wydaje się jednak, że nie można porównywać wyników uzyskanych w grupie dzieci z wynikami otrzymanymi u dorosłych, gdyż poza rozpoznanym zjawiskiem zdrowotnym w postaci mukowiscydozy stanowiącym przedmiot dociekań, które w założonej tezie badania jestem czynnikiem niezmiennym, badani pacjenci różnią się zasadniczo w wielu aspektach, mi.in.: wieku, rodzaju uzębienia (mleczne, mieszane, stałe) oraz liczby zębów stałych obecnych w jamie ustnej, a także czasu trwania choroby oraz czasu stosowanej farmakoterapii. Pewnym wytłumaczeniem złego stanu uzębienia dorosłych osób chorujących na mukowiscydozę, mogą być

wyniki badań ankietowych przeprowadzonych przez Pawlaczyk-Kamieńską i wsp. (2019) [22], które wykazały, iż głównym powodem zgłaszania się do stomatologa jest ból zęba lub widoczny ubytek próchnicowy, co wskazuje, że leczenie ma raczej charakter interwencyjny. Nieliczni kontrolują stan zdrowotny jamy ustnej regularnie. Ten fakt dowodzi brak właściwej opieki stomatologicznej w tej grupie chorych.

ŚLINA

Ważnym aspektem klinicznym, mającym wpływ na stan zdrowotny nie tylko zębów, ale całej jamy ustnej, mają właściwości śliny, która stanowi płynne środowisko jamy ustnej oraz najważniejszy czynnik wpływający na zachowanie jej homeostazy. Nawilża ona tkanki oraz chroni powierzchnie zębów i błon śluzowych przed czynnikami biologicznymi, mechanicznymi i chemicznymi [2, 10, 11, 16, 17, 22]. Jest ona również środowiskiem życia i rozwoju licznych mikroorganizmów, a jej ilość oraz optymalny skład warunkuje przebieg procesów fizykochemicznych, przyczyniając się do utrzymania równowagi ekologicznej. Ślina jest mieszaniną wydzieliny małych i dużych gruczołów ślinowych. Podobnie jak w innych gruczołach wydzielania elementem koniecznym do prawidłowego funkcjonowania przewodów wyprowadzających jest obecność białka błonowego CFTR, które zlokalizowane szczytowej części komórek walcowatych wyścielających przewody prążkowane ślinianek. Kanał chlorkowy reguluje transport jonów Na^+, K^+, Cl^-, HCO_3^- oraz wody [2, 10, 17]. W zależności od klasy mutacji genu CFTR może dochodzić do różnego stopnia uszkodzenia białka CFTR, czego skutkiem jest nieprawidłowe albo całkowite zahamowanie działania kanału chlorkowego w przewodach prążkowanych gruczołów ślinowych i zaburzenia transportu jonów oraz wody. Konsekwencją może być zmiana właściwości fizykochemicznych śliny, a także składu jakościowego i ilościowego mikroflory zasiedlającej jamę ustną [2, 10, 11, 19, 22, 30, 31].

Dostępne piśmiennictwo opisujące właściwości śliny pacjentów chorujących na mukowiscydozę dotyczy albo wyłącznie dzieci i młodzieży, albo grup obejmujących dzieci i osoby dorosłe [1, 2, 16, 17, 19]. Jedynie badania Pawlaczyk-Kamieńskiej i wsp. (2019) [22] obejmowały wyłącznie dorosłych pacjentów. W publikacjach, analizujących szybkość wydzielania śliny niestymulowanej głównie u osób w wieku rozwojowym, nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy pacjentami chorującymi na mukowiscydozę, a osobami zdrowymi [1, 2, 16, 17, 19]. Natomiast w przeprowadzonych badaniach dorosłych pacjentów stwierdzono istotnie statystycznie niższy spoczynkowy poziom nawilżenia jamy ustnej chorych w porównaniu z osobami zdrowymi. Autorzy publikacji są zgodni odnośnie szybkości/objętości wydzielanej śliny stymulowanej i wskazują na istotnie niższą jej ilość u pacjentów z mukowiscydozą w konfrontacji z wynikami

uzyskanymi u osób zdrowych. Nie są natomiast jednoznaczne wyniki analizy pH śliny. Dane z piśmiennictwa mówią o zbliżonej wartości pH u osób chorujących na mukowiscydozę oraz zdrowych badanych [10, 19, 28] lub o istotnie statystycznie niższej jej wartości u pacjentów chorujących na mukowiscydozę [16, 22, 27]. Natomiast żaden z badaczy nie wykazał istotnej statystycznie różnicy pomiędzy badanymi grupami odnośnie pojemności buforowej śliny [1, 22, 28].

Przypuszcza się, że u chorych na mukowiscydozę hiposaliwacja oraz zwiększona lepkość śliny prawdopodobnie wynika z uszkodzeni białka transbłonowego CFTR, a w efekcie z nieprawidłowego mechanizmu transportu jonów oraz wody przez błony komórkowe w przewodach wyprowadzających gruczołów ślinowych [10, 33], choć może być również skutkiem ubocznym stosowanej terapii farmakologicznej. Ponadto wadliwa regulacja wymiany Cl^-/HCO_3^- w przewodach wyprowadzających (czego konsekwencją jest brak sekrecji jonów HCO_3^- do śliny ostatecznej) być może jest przyczyną niższego pH śliny pacjentów chorych na mukowiscydozę w porównaniu ze śliną osób zdrowych. Analiza wybranych parametrów fizykochemicznych śliny pacjentów chorujących na mukowiscydozę, a w szczególności mniejsza jej ilość oraz niższe pH, wskazuje, że własności śliny, przy współistniejącym deficycie opieki stomatologicznej, mogą stanowić u tych pacjentów wiodący czynnik w powstawaniu oraz progresji próchnicy zębów [22, 23].

STAN PRZYZĘBIA

Istotnym czynnikiem sprawczym chorób jamy ustnej są długo zalegające bakteryjne osady nazębne. Badacze analizujący akumulację płytki nazębnej w populacji poniżej 18. roku życia nie odnotowali istotnych statystycznie różnic w ilości i rozprzestrzenieniu miękkich złogów nazębnych pomiędzy osobami chorującymi na mukowiscydozę, a zdrowymi rówieśnikami [3, 11, 20, 21, 24-27]. Natomiast w przeprowadzonych badaniach pośród osób dorosłych przez Pawlaczyk-Kamieńską i wsp. (2019) [22] wskaźnik oceniający rozprzestrzenienie bakteryjnej płytki nazębnej (API wg Lange i wsp.) był istotnie statystycznie wyższy u pacjentów chorujących na mukowiscydozę w porównaniu z wartością wskaźnika uzyskaną u osób zdrowych. Takiej różnicy nie odnotowano natomiast w stosunku do wskaźnika mówiącego o grubości złogów (PLI wg Silness & Löe). Obecność bakteryjnego osadu nazębnego jest skutkiem z jednej strony nieefektywnie prowadzonych zabiegów higienicznych jamy ustnej, ale z drugiej związana może być z niedostateczną ilością wydzielanej śliny. Badania osób dorosłych wykazały ujemną korelację pomiędzy ilością wydzielanej śliny a odsetkiem zębów pokrytych bakteryjną płytką nazębną (wartością wskaźnika API), co sugeruje, że ilość wydzielanej śliny przez pacjentów chorujących na mukowiscydozę można uznać, za czynnik utrudniający samooczyszczanie jamy ustnej, oraz sprzyjający akumu-

lacji drobnoustrojów płytki, która tworzy swoistą niszę ekologiczną, tzw. biofilm płytki nazębnej. Należy pamiętać, że mikroorganizmy biofilmu płytki stanowią czynnik etiologiczny zapalenia dziąseł, a w konsekwencji chorób dziąseł i przyzębia. Zaskakujący jest fakt, że u pacjentów chorujących na mukowiscydozę, w porównaniu z osobami zdrowymi, mimo większego rozprzestrzenienia płytki bakteryjnej, oraz braku różnic w jej grubości, stwierdza się istotnie statystycznie lepszy stan dziąseł (wyrażony wskaźnikiem GI wg Löe & Silness). Wszyscy badacze, oceniający stan tkanek dziąsła, zarówno u dzieci, jak i osób dorosłych, nie odnotowali istotnych statystycznie różnic w krwawieniu dziąseł pomiędzy chorującymi na mukowiscydozę a odpowiadającymi im wiekowo rówieśnikami. Dodatkowo w badaniach Pawlaczyk-Kamieńskiej i wsp. (2020) [22, 25, 26] w grupie chorych nie odnotowano wzajemnej korelacji pomiędzy ilością płytki, a stanem dziąseł. Warto nadmienić, że taką zależność stwierdzono u pacjentów zdrowych.

Niespodziewane jest również to, że w grupie chorych, w porównaniu z osobami zdrowymi, mimo statystycznie większego rozprzestrzenienia bakteryjnej płytki nazębnej, lub braku różnic w jej grubości, odnotowuje się istotnie statystycznie niższą całkowitą liczbę drobnoustrojów zalegających w szczelinie dziąsłowej, i podobną liczbę analizowanych periopatogenów [22]. Etiologia gingivitis opiera się na założeniu, że wystąpienie choroby uwarunkowane jest interakcją pomiędzy mikroorganizmami płytki nazębnej a komórkami układu odpornościowego gospodarza. Na inicjację oraz progresję choroby ma wpływ nie tylko ilość płytki nazębnej, ale jej skład, a przede wszystkim jej patogenność mikrobiologiczna [30]. W badaniach Pawlaczyk-Kamieńskiej i wsp. [22, 25, 26] w obu badanych grupach odnotowano podobną grubość płytki, podobną ilość periopatogenów, a zaobserwowany stan zapalny dziąseł u pacjentów chorujących na mukowiscydozą był istotnie statystycznie mniejszy w porównaniu ze stanem dziąseł u osób zdrowych. U osób chorych brak wzajemnej korelacji pomiędzy grubością płytki a stanem dziąseł potwierdza teorię płytki specyficznej, wg której nie wszystkie, a tylko niektóre drobnoustroje zgrupowane w postaci niespecyficznej biomasy płytki, są odpowiedzialne za powstawanie zamian patologicznych. Trzeba uwzględnić, że w tej grupie pacjentów, prawdopodobnie na skutek wieloletniej, częstej i długoterminowej farmakoterapii (również w postaci wziewnej), potencjał patogenny płytki może być zmieniony (obniżony) i być może istnieje u nich osobnicza i specyficzna równowaga ekologiczna biofilmu. Wydaje się zatem, że u pacjentów chorujących na mukowiscydozę brak zależności pomiędzy ilością złogów nazębnych a stanem dziąseł może wskazywać na stabilną, prawdopodobnie farmakologicznie uwarunkowaną, ekologię biofilmu jamy ustnej, a wśród czynników etiologicznych chorób dziąseł i przyzębia działanie czynnika bakteryjnego w tej grupie chorych wydaje się być modyfikowane. Przypuszczenie takie potwierdza brak wzajemnej zależności pomiędzy całkowitą liczbą periopatogenów a wartością wskaźnika dziąsłowego, oraz pomiędzy ilością bakterii poszczególnych kompleksów a stanem dziąseł. Korelacje takie odnotowano w gru-

pie kontrolnej. Należy podkreślić, że wszystkie kompleksy oceniane za pomocą zastosowanego przez autorów [22, 26] testu PCR mogą występować również u osób ze zdrowym przyzębiem nie dając żadnych objawów klinicznych. Nie można wykluczyć, że w niesprzyjających warunkach, na skutek zaburzenia stabilności ekosystemu bakteryjnego, potencjalnie szkodliwa mikroflora może stać się patogenna dla tkanek przyzębia. Jest to tym ważniejsze, że wyniki przeprowadzonych badań klinicznych udowodniły, iż pacjenci chorujący na mukowiscydozę wykazują mniejszą dbałość o zdrowie jamy ustnej w porównaniu z osobami zdrowymi. Znalazło to odzwierciedlenie w większej liczbie powierzchni zębów z aktywną próchnicą, większą liczbą zębów usuniętych, podobną liczbą wypełnionych oraz większym rozprzestrzenieniu bakteryjnej płytki nazębnej, a także w wynikach badań ankietowych, które wskazują, że leczenie ma raczej charakter interwencyjny, i tylko nieliczni kontrolują stan zdrowotny jamy ustnej regularnie. Dane te wskazują na brak właściwej opieki stomatologicznej przy dodatkowo niskiej ze strony samych pacjentów dbałości o zdrowie i higienę jamy ustnej [22, 25, 26].

PODSUMOWANIE

W świetle przedstawionych faktów wydaje się, że objęcie chorych na mukowiscydozę stałą opieką stomatologiczną oraz stworzenie dla nich specjalnego protokołu profilaktycznego, byłoby istotnym czynnikiem umożliwiającymi zachowanie zdrowia jamy ustnej. Prawidłowo prowadzona profilaktyka oraz konieczność dostosowania się chorych do zaleceń prozdrowotnych oraz działania ukierunkowane na zwalczanie złogów bakteryjnych, poprawę własności śliny oraz aplikację preparatów zwiększających odporność szkliwa na czynniki chorobowe, wydaje się być szansą na zachowanie uzębienia przez całe życie i eliminację innych potencjalnych patologicznych zmian w jamie ustnej. Dedykowany pacjentom chorującym na mukowiscydozę stomatologiczny protokół profilaktyczny, mający odzwierciedlać potrzeby profilaktyczno-lecznicze zarówno dzieci, jak i młodych dorosłych, byłby ścieżką postępowania dla każdego lekarza i ograniczyłby zachorowania na choroby zębów zarówno w okresie uzębienia mlecznego, jak i stałego.

LITERATURA

[1] ALKHATEEB AA, MANCI LA, PRESLAND RB, ROTHEN ML, CHI DL. Unstimulated Saliva-Related Caries Risk Factors in Individuals with Cystic Fibrosis: A Cross-Sectional Analysis of Unstimulated Salivary Flow, pH, and Buffering Capacity. *Caries Res* 2017; **51**: 1-6. doi: 10.1159/000450658

[2] APS JK, DELANGHE J, MARTENS LC. Salivary electrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes. *Clin Chem Lab Med* 2002; **40**: 345-350. doi:10.1515/CCLM.2002.055

[3] APS JK, VAN MAELE GO, CLAEYS G, MARTENS LC. Mutans streptococci, lactobacilli and caries experience in cystic fibrosis homozygotes, heterozygotes and healthy controls. *Caries Res* 2001; **35**: 407-411.

[4] APS JK, VAN MAELE GO, MARTENS LC. Oral hygiene habits and oral health in cystic fibrosis. *Eur J Paediatr Dent* 2002; **3**: 181-187.

[5] ARQUITT CK, BOYD C, WRIGHT JT. Cystic fibrosis transmembrane regulator gene (CFTR) is associated with abnormal enamel formation. *J Dent Res* 2002; **81**: 492-496.

[6] AZEVEDO TD, FEIJÓ GC, BEZERRA AC. Presence of developmental defects of enamel in cystic fibrosis patients. *J Dent Child* 2006, **73**: 159-163.

[7] BRONCKERS A, KALOGERAKI L, JORNA HJN, WILKE M, BERVOETS TJ, LYARUU DM, ZANDIEH-DOULABI B, DENBESTEN P, DE JONGE H. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in maturation stage ameloblasts, odontoblasts and bone cells. *Bone* 2010, **46**: 1188-1196. doi: 10.1016/j.bone.2009.12.002

[8] BRONCKERS AL, LYARUU DM, GUO J, BIJVELDS MJC, BERVOETS TJM, ZANDIEH-DOULABI B, MEDINA JF, LI Z, ZHANG Y, DENBESTEN PK. Composition of mineralizing incisor enamel in CFTR-deficient mice. *Eur J Oral Sci* 2015, **123**: 9-16. doi:10.1111/eos.12163

[9] CHANG EH, LACRUZ RS, BROMAGE TG, BRINGAS P JR, WELSH MJ, ZABNER J, PAINE ML. Enamel pathology resulting from loss of function in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in a porcine animal model. *Cells Tissues Organs* 2011, **194**: 249-254. doi: 10.1159/000324248.

[10] DA SILVA MODESTO KB, DE GODÓI SIMÕES JB, DE SOUZA AF, DAMACENO N, DUARTE DA, LEITE MF, DE ALMEIDA ER. Salivary flow rate and biochemical composition analysis in stimulated whole saliva of children with cystic fibrosis. *Arch Oral Biol* 2015, **60**: 1650-1654. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.08.007

[11] DĄBROWSKA E, BŁAHUSZEWSKA K, MINAROWSKA A, KACZMARSKI M, NIEDŹWIECKA-ANDRZEJEWICZ I. The state of pral health in studied population with Cysstic Fibrosis inthe Podlasie province. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* 2005, **60**: 337-341.

[12] DAVIES J, ALTON E, GRIESENBACH U. Cystic fibrosis modifier genes. *J R Soc Med* 2005; **98**: 47-54.

[13] DAVIES JC, ALTON EW, BUSH A. Cystic fibrosis. *BMJ* 2007; **335**: 1255-1259. doi:10.1136/bmj.39391.713229.AD

[14] FERRAZZANO GF, ORLANDO S, SANGIANANTONI G, CANTILE T, INGENITO A. Dental and periodontal health status in children affected by cystic fibrosis in a southern Italian region. *Eur J Paediatr Dent* 2009, 10: 65-68.

[15] FERRAZZANO GF, SANGIANANTONI G, CANTILE T, AMATO I, ORLANDO S, INGENITO A. Dental enamel defects in Italian children with cystic fibrosis: an observational study. *Community Dent Health* 2012, **29**: 106-109. doi:10.1007/s40368-014-0112-5

[16] GONÇALVES AC, MARSON FA, MENDONC¸A RM, BERTUZZO CS, PASCHOAL IA, RIBEIRO JD, RIBEIRO AF, LEVY CE. Chloride and sodium ion concentrations in saliva and sweat as a method to diagnose cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)* 2019, **95**: 443-450. doi:10.1016/j.jped.2018.04.005

[17] GONÇALVES AC, MARSON FA, MENDONÇA RM, RIBEIRO JD, RIBEIRO AF, PASCHOAL IA, LEVY CE. Saliva as a potential tool for cystic fibrosis diagnosis. *Diagn Pathol* 2013, **19**: 46. doi:10.1186/1746-1596-8-46.

[18] LACRUZ RS, NANCI A, KURTZ I, WRIGHT JT, PAINE MI. Regulation of pH During Amelogenesis. *Calcif Tissue Int* 2010, **86**: 91-103. doi:10.1007/s00223-009-9326-7

[19] LIVNAT G, BENTUR L, KUZMISNSKY E, NAGLER RM. Salivary profile and oxidative stress in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Oral Pathol Med* 2010, **39**: 16-21. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00813.x

[20] MARTENS LC, APS JKM, VAN MAELE GO. Is oral health at risk in people with cystic fibrosis? *Eur J Paediatr Dent* 2001, **2**: 21-27.

[21] NARANG A, MAGUIRE A, NUNN J, BUSH A. Oral health and related factors in cystic fibrosis and other chronic respiratory disorders. *Arch Dis Child* 2003, **88**: 702-707. doi:10.1136/adc.88.8.702
[22] PAWLACZYK-KAMIEŃSKA T, BORYSEWICZ-LEWICKA M, BATURA-GABRYEL H. Salivary Biomarkers and Oral Microbial Load in Relation to the Dental Status of Adults with Cystic Fibrosis. *Microorganisms* 2019, **7**: 692. doi.org/10.3390/microorganisms7120692
[23] PAWLACZYK-KAMIEŃSKA T, BORYSEWICZ-LEWICKA M, ŚNIATAŁA R, BATURA-GABRYEL H. Clinical evaluation of the dental hard tissues in an adult population with cystic fibrosis. *Pol Arch Intern Med* 2019, **129**: 725-727. doi: 10.20452/pamw.14918
[24] PAWLACZYK-KAMIEŃSKA T, BORYSEWICZ-LEWICKA M, ŚNIATAŁA R, BATURA-GABRYEL H, COFTA SZ. Dental and periodontal manifestations in patients with cystic fibrosis – a systematic review. *J Cyst Fibros* 2019, **18**: 762-771. doi: 10.1016/j.jcf.2018.11.007
[25] PAWLACZYK-KAMIEŃSKA T, BORYSEWICZ-LEWICKA M, ŚNIATAŁA R. Periodontal condition and periodontal risk assessment in adult patients with cystic fibrosis. *Ann Agric Environ Med* 2020, **27**: 235-239. doi: 10.26444/aaem/106087
[26] PAWLACZYK-KAMIEŃSKA T, ŚNIATAŁA R, BATURA-GABRYEL H, BORYSEWICZ-LEWICKA M, COFTA SZ. Periodontal status and subgingival biofilms in cystic fibrosis adults. *Pol J Microbiol* 2019, **68**: 377-382 doi.10.33073/pjm-2019-040
[27] PEKER S, KARGUL B, TANBOGA I, TUNALI-AKBAY T, YARAT A, KARAKOC F, ERSU R, DAGLI E. Oral health and related factors in a group of children with cystic fibrosis in Istanbul, Turkey. *Niger J Clin Pract* 2015, **18**: 56-60. doi: 10.4103/1119-3077.146980.
[28] PEKER S, METE S, GOKDEMIR Y, KARADAG B, KARGUL B. Related factors of dental caries and molar incisor hypomineralisation in a group of children with cystic fibrosis. *Eur Arch Paediatr Dent* 2014, **15**: 275-280. doi: 10.1007/s40368-014-0112-5.
[29] SAINT-CRIQ V, GRAY MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci* 2017, **74**: 93-115. doi:10.1007/s00018-016-2391-y
[30] SCANNAPIECO FA. The oral microbiome: its role in health and in oral and systemic infections. *Clin Microbiol Newsl* 2013, **35**: 163-169. doi:10.1016/j.clinmicnews.2013.09.003
[31] SHIN YH, LEE SW, KIM M, CHOI SY, CONG X, YU GY, PARK K. Epigenetic regulation of CFTR in salivary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, **481**: 31-37. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.023
[32] SUI W, BOYD C, WRIGHT JT. Altered pH regulation during enamel development in the cystic fibrosis mouse incisor. *J Dent Res* 2003, **82**: 388-392. doi:10.1177/154405910308200512.
[33] ZINN VZ, KHATRI A, MEDNIEKS MJ, HAND AR. Localization of CFTR Signaling Complexes in Human Salivary Gland Striated Duct Cells. *Eur J Oral Sci* 2015, **123**: 140-148. doi:10.1111/eos.12184.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 25.03.2020
Przyjęto: 30.05.2020
Tamara Pawlaczyk-Kamieńska
Zakład Stomatologii Grup Ryzyka, Katedra Stomatologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu,
ul. Bukowska 70, 60-812 Poznań
e-mail: tpawlaczyk@ump.edu.pl

EFFECT OF THREE-DIMENSIONAL (3D) SIMULATED MICROGRAVITY CULTURE ON MORPHOLOGY AND SECRETORY FUNCTION OF MURINE PITUITARY CELLS

Chao YANG[1*], Gaofei CHEN[2*], Kenny KUCHTA[3,4], Wei ZHANG[2]

[1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou City, China
[2]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutics University, Guangzhou City, China
[3]Zhejiang Institute of TCM and Natural Medicine, China
[4]Forschungsstelle für fernöstliche Medizin, Department of Vegetation Analysis and Phytodiversity, Albrecht von Haller Institute of Plant Sciences, Georg August University, Germany

Summary: Pituitary transplantation is an effective treatment for hypopituitarism but lack of pituitary cells with secretory function has slowed down its progress. The present study explores changes to hormone production and morphology of murine pituitary cells in pseudo-microgravity culture. It aims to improve current concepts of culture methods for pituitary cells that may provide new options for pituitary transplantation in the future. The RCCS-4H simulated microgravity 3D method was used for primary pituitary cell culture. Primary pituitary cells were isolated and cultivated in both 2D and 3D cell culture. Cell morphology was observed by visual light and immunofluorescence microscopy. Hormone production was measured by ELISA. Pituitary cells that were cultured in the 3D pseudo-microgravity system maintained their natural morphology and function. Growth rate and hormone secretion of 3D-cultured pituitary cells were higher from day 5 to day 17 as compared to that of 2D cell culture. These results indicate that pseudo-microgravity culture facilitates murine pituitary cells to maintain a natural morphology, better survival time, and physiological hormone production. This method therefore might be suitable for the cultivation of analogous human pituitary cells that may serve as excellent donor cells for cell transplantation therapy in patients with hypopituitarism.

Keywords: Pituitary Cells, 3D Cell Culture, Simulated Microgravity, Rotary Cell Culture System (RCCS), Rotating Wall Vessel Bioreactor (RWVB)

INTRODUCTION

The pituitary gland, located on the ventral side of the hypothalamus, is the most important endocrine gland in the human body. The anterior pituitary gland is the major producer of systemic hormones such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and growth hormone (GH) that play a crucial role in growth and homeostasis [7, 13]. Due to the increasing incidence of brain trauma, sella tumors [10] and the wide application of pituitary surgery and radiotherapy, the incidence of pituitary dysfunction is increasing. Pituitary dysfunction affects the secretion of various hormones in the body, resulting in endocrine disorders which can markedly reduce the patients' quality of life. At present, pituitary transplantation is an effective treatment for hypopituitarism [7, 10, 13]. However, the lack of sufficient pituitary cells with secretory function has slowed down the progress of pituitary transplantation.

In the study at hand, we used a cell culture under simulated microgravity in order to cultivate primary pituitary cells and to continuously observe their morphology, hormone secretion and growth *in vitro*. Cells naturally grow in a three--dimensional (3D) environment. The spatial arrangement of cells within this environment affects not only the microenvironment but also cell-cell interaction. These signals in turn affect differentiation, morphology and a range of cellular functions. Consequently, when drug candidates are tested using cell-based assays, the culture condition should mimic the *in vivo* environment. Traditional two-dimensional (2D) culture methods cannot accurately represent the *in vivo* cell growth environment, as it limits the interactions between cells. The most natural, tissue-mimicking method of cell growth for drug discovery applications is therefore 3D [2]. Here, we performed a 3D culture of pituitary cells under simulated microgravity provided by a rotary cell culture system (RCCS) in order to better simulate the growth environment of normal cells in the body.

METHODS AND MATERIALS

EXPERIMENTAL MATERIALS

Forty 4-7 weeks old female C57/BL6 mice obtained from the Guangdong Medical Lab Animal Center were used in this study. Ten mice were randomly selected for pituitary cell culture. The initial experiment was repeated 3 more times. The RCCS bio-reactor (model: RCCS-4H) was obtained from Synthecon Inc. (USA). The effect of gravity on cultured cells was reduced by the rotary motion of the bio-reactor which produces simulated microgravity. The bio-reactor contains a culture vessel and a 4-rotor host machine with 2 motors. Each motor controls 2 culture dishes, which can be placed in a carbon dioxide incubator. The culture vessel is screwed on the rotator, which rotates the chamber slowly around

the horizontal axis [3]. The rotational speed can be adjusted to achieve optimal culture conditions and prevent cells from adhering to the wall of chamber.

PITUITARY CELL CULTURE

Ten mice were sacrificed by cervical dislocation and sprayed with ethanol. Their heads were soaked in 75% ethanol for disinfection. The whole pituitary gland was removed via craniotomy in a biosafety cabinet, and then placed in a culture dish with DMEM/F12 medium. Penicillin-streptomycin supplemented DMEM/F12 medium was used to rinse the pituitary gland 3 times. It was then cut into small pieces ($\leq$ 1 mm^3), which were filtered with screen mesh followed by FBS-free culture medium washing. Type II collagenase was added to disperse the tissue for 45 minutes. The same amount of culture medium containing serum was added to terminate the digestion. Then centrifugation was performed for 5 min at 1500 rpm to remove supernatants. Centrifugation was repeated twice, and the supernatants removed each time were collected in a culture dish for observation.

This study used the RCCS-4H simulated microgravity 3D method [9] to culture primary pituitary cells. The medium, cells, and tissues were placed in the culture trays or columns, and all air bubbles were removed. The culture trays or columns were installed on the host machine attached to a rotary motor. The internal tissues, cells, or cell masses were in suspension due to the dual influence of a rotational tangential force and gravity. Since there was only small shearing power and no air bubbles in the culture container [1, 12] the cells remained in suspension.

Four milliliters of culture medium containing serum and antibiotics were added for dispersion, followed by culturing in an incubator containing 5% CO_2 at 37°C. Observation was not performed during the first 48 hours in order to allow cells to recover from stress during tissue preparation. Four milliliters of the pituitary cell suspension was resuspended evenly and divided into 2 groups according to the culture conditions. Eight milliliters of complete medium was added to 1 ml of the pituitary cell suspensions, which were then placed in a 75 cm^2 culture flask for culture. Thirty milliliters of complete medium was added to 3 ml of the pituitary cell suspension, which was then placed in a 3D container for culture. The air in the culture container was eliminated in the biosafety cabinet. The 3D rotary container was placed in a constant temperature incubator containing 5% CO_2 and 95% air at 37°C. The initial speed was high so that the cells in the container could be completely mixed, then the speed was lowered as appropriate.

ELISA DETERMINATION OF HORMONES

Beginning the 3rd day, samples were collected every other day, and inverted fluorescence microscope was used to observe the cellular morphology. After obtaining samples, the supernatants were collected and preserved at -20°C. ELISA was used to determine the concentration of follicle-stimulating hormone (FSH).

IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY

Pituitary cells were seeded on cover slices and fixing in 4% paraformaldehyde for 1 hour after 13, 17, 22 days. TBS-T solution containing 0.1% Triton×100 was used to wash the smears 3 times. After blocking with blocking solution, an appropriate dilution of primary antibody, mouse monoclonal antibody (Santa Cruz, USA) and rabbit polyclonal antibody (Abcam, USA) was added and the slides were incubated overnight at 4°C. Goat anti-rabbit IgG (H+L) and goat anti-mouse IgG (H+L) (Beijing Zhongshan Jinqiao Biological Technology Co., Ltd., China) were then added (1/500 dilution) and the slides were incubated for 1 hour. Finally, the nuclei were stained, and after washing 3 times an inverted fluorescence microscope was used to observe the slides.

RESULTS

MORPHOLOGICAL OBSERVATION

The 2D cultured cells are shown in figure 1. With extension of culture time, the number of cells decreased, and there were a small number of fibroblasts adhering to the wall. On the 13th day of culture, the cells completely adhered and deviant morphologies could be observed under microscopy. Some cells were elongated, some were spindle shaped and others were round. After subculture by digestion, the cells grew well and completed adhered to the wall.

The 3D cultured cells are shown in figure 2. The cells grew individually, and a small number of undigested cell masses could be observed on the first three days of culture. Under microscopy, the dispersed cells were small with strong refraction. On the 5th day, the number of cells had increased and there were some cells aggregating. On the 9th day, the number of cells had increased further and so had the cell masses. On the 13th day, these cell masses had become large (Fig. 3), there were a few single cells, and the cell masses looked nearly round or oval. Samples of cell masses were obtained for measurement, and the maximum diameter was 1000 μm. On the 17th day, isolated cells almost disappeared and the cell masses developed an oval or irregularly shape. The maximum diameter of the cell masses was 2800 μm. On the 21th day, the cell masses appeared damaged and stopped growing. The basic morphology of the cells was destroyed.

On day 1, 3, 5, 7, 9, 13, 17, and 21, cells in the 3D culture were selected for observation. On each examination day, 5 large cell masses under the same field of microscopic view were randomly selected to measure their diameters. The mean values were used to draw a growth curve graph (Fig. 3).

Supernatants were collected to determine FSH secretion (Fig. 4). Until the 5th day of culture, FSH secretion in 2D culture was higher than that in 3D culture.

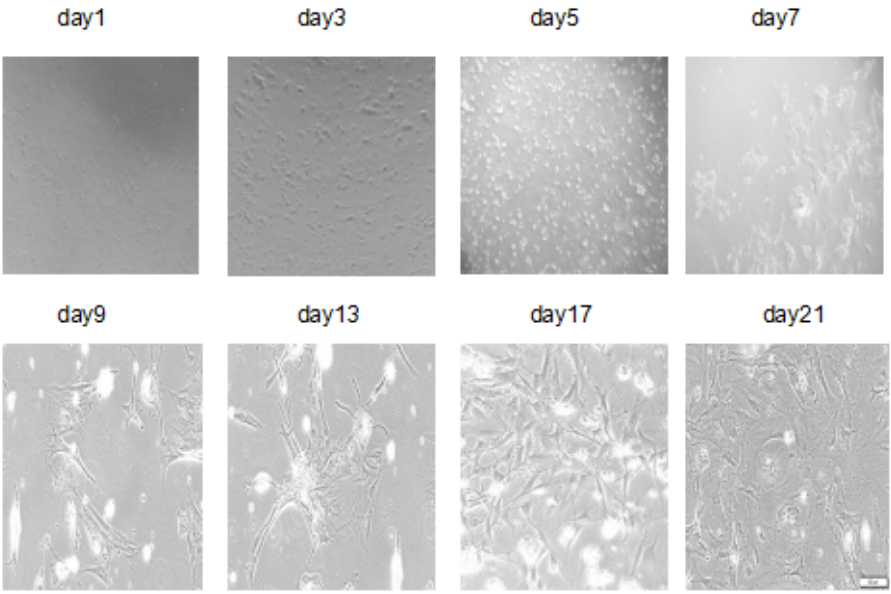


FIGURE 1. Morphological observation of 2D cultured cells

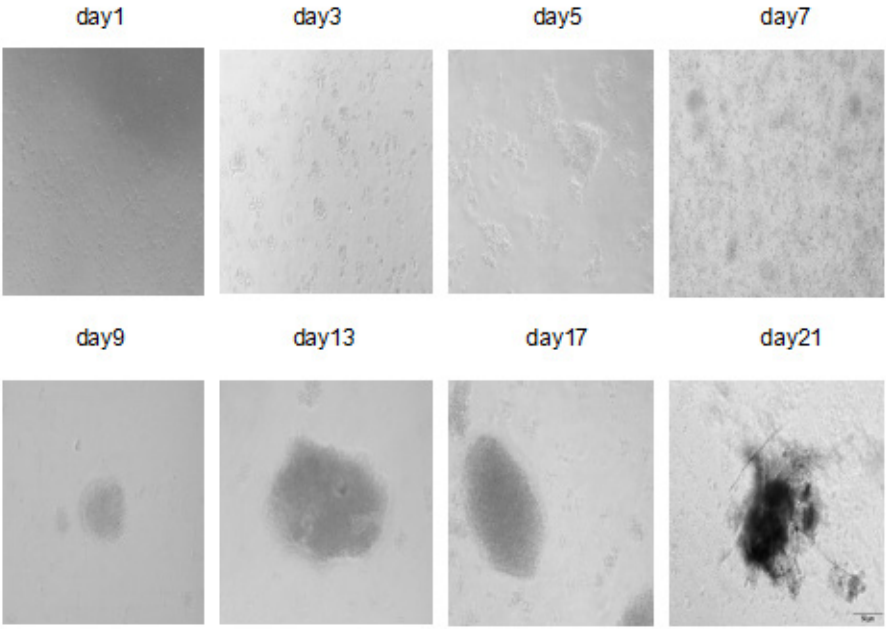


FIGURE 2. Morphological observation of 3D cultured cells

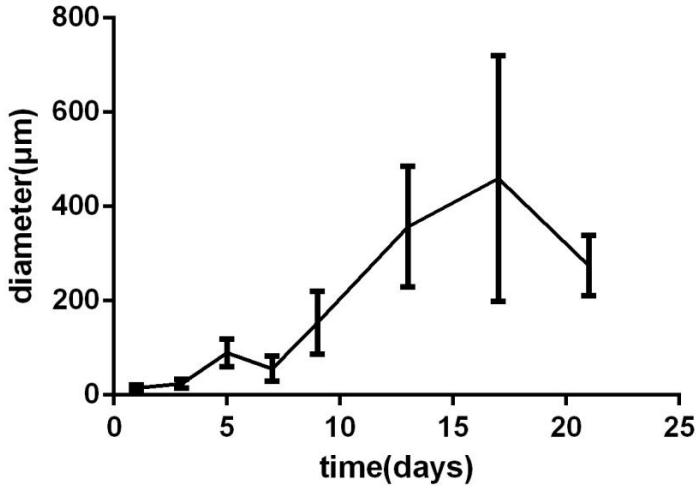


FIGURE 3. Growth curves of cell masses

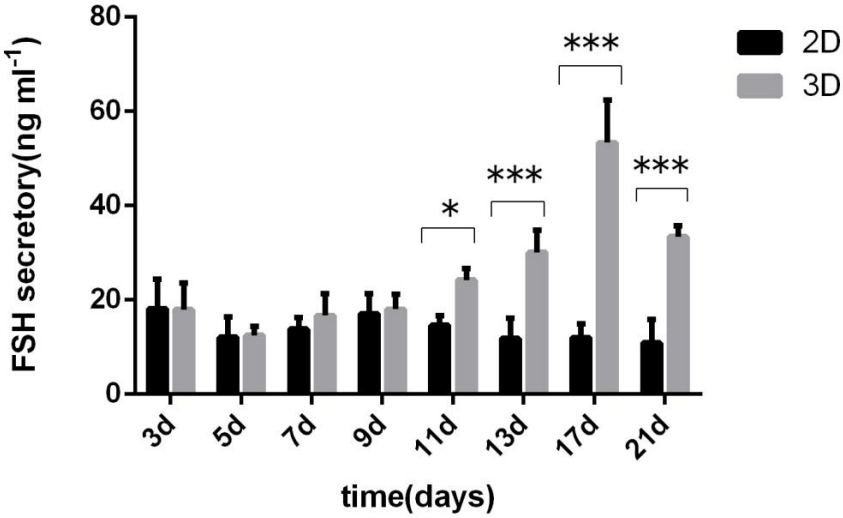


FIGURE 4. Comparison of FSH secretion of the 2D and 3D cultured pituitary cells. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$

This is most probably the case because the solutions were not changed on the first 5 days in the 2D culture. The cellular morphology and function did not change, and the cells continued to grow under the stimulation of culture mediums. Peak FSH secretion was reached on the 9th day, indicating that the 2D cultured pituitary cells maintained a good morphology for the first 9 days. In the 3D culture, after

cell masses visible to the naked-eye appeared on the 10th day, the culture mediums were replaced by half every 4 days to facilitate cell mass growth and proliferation. In the 3D culture, FSH secretion reached a maximum on the 17th day.

DETERMINATION OF CELLULAR HORMONE SECRETION

FSH secretion of the 2D and 3D cultured pituitary cells was determined by ELISA (Fig. 4). FSH reached a maximum concentration on the 9th and 17th day, respectively. There were statistical significant differences between the two groups on day 11, 13, 17, and 21.

IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY OF PITUITARY CELLS

The results of the immunofluorescence assay on day 13, 17, and 21 of the 2D and 3D cultures are shown in figure 5, 6, and 7, respectively. The fluorescence intensity of ACTH and GH is shown in Figure 8 and 9, respectively. With extension of culture time, the protein expression of ACTH and GH in the pituitary cells decreased significantly. The levels of ACTH and GH in the 2D cultured pituitary cells reached a maximum on day 13. The pituitary cell masses in the 3D culture grew well between day 13 and 17. Thereafter, the growth of the cell masses slowed down.

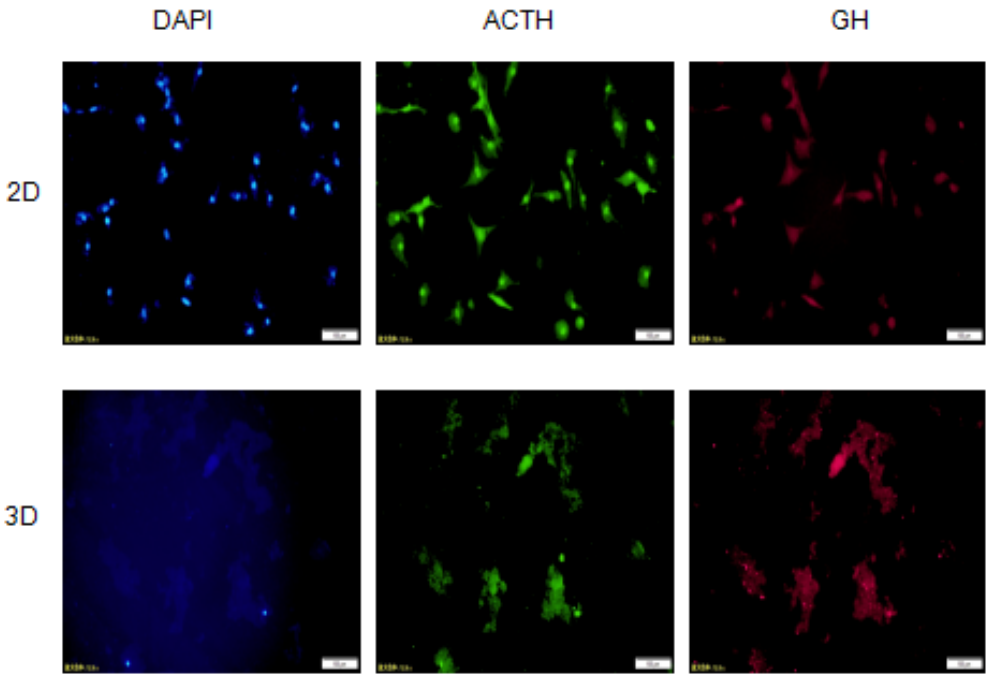


FIGURE 5. Immunofluorescence assay of 2D and 3D cultured pituitary cells on day 13

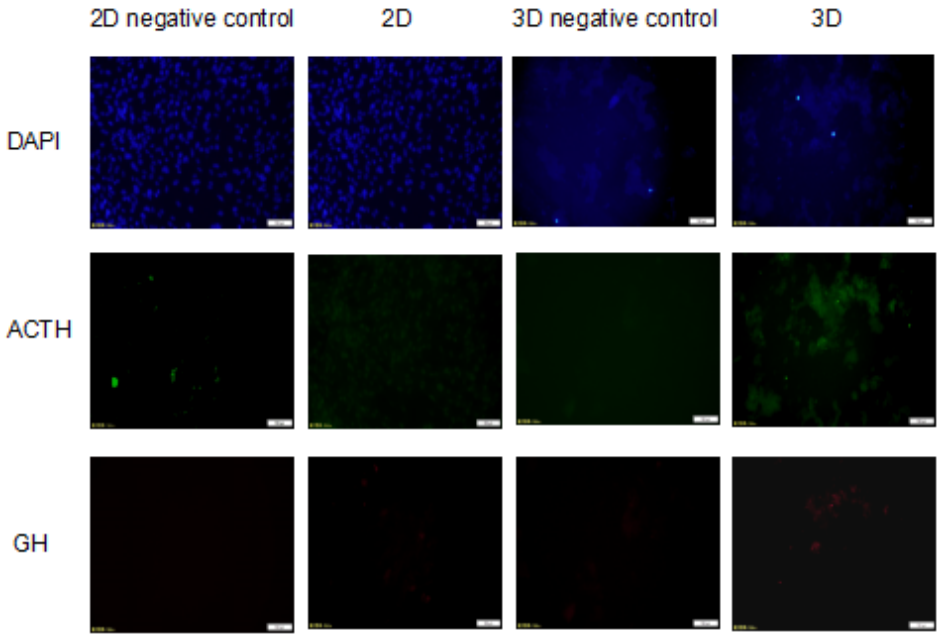


FIGURE 6. Immunofluorescence assay of 2D and 3D cultured pituitary cells on day 17

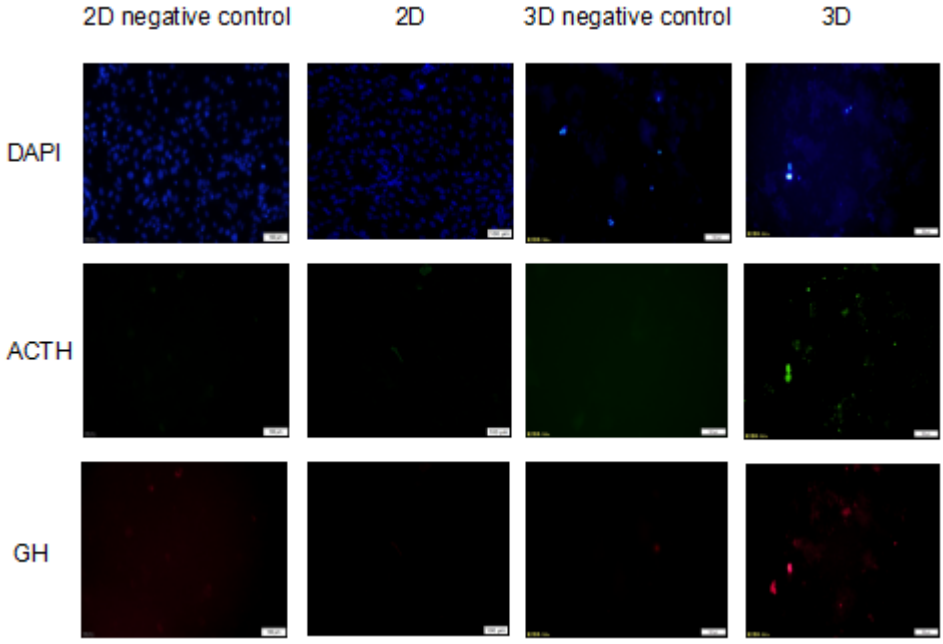


FIGURE 7. Immunofluorescence assay of 2D and 3D cultured pituitary cells on day 21

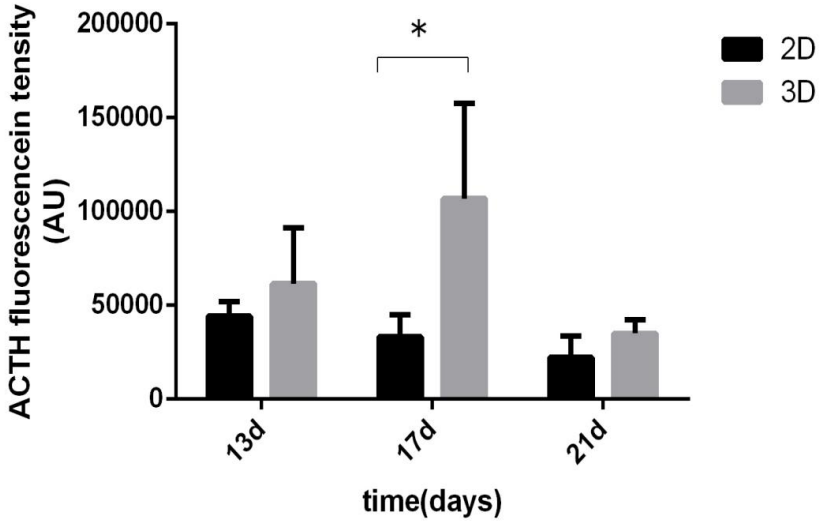


FIGURE 8. Fluorescence intensity of ACTH. * P < 0.05

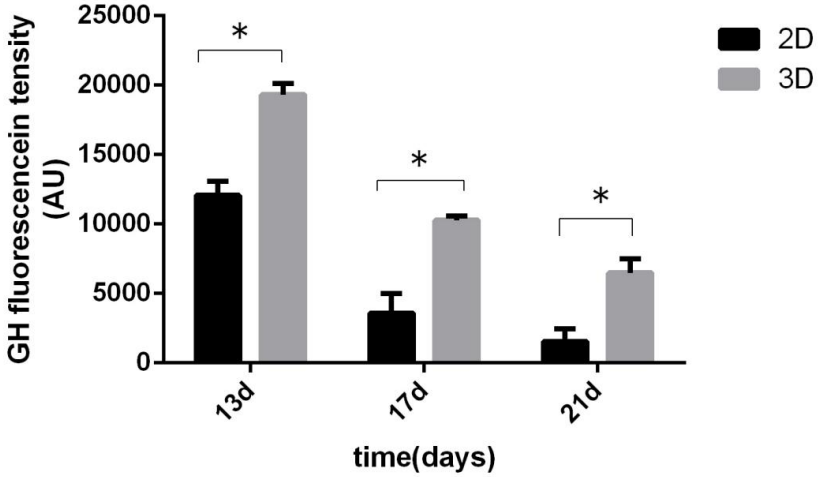


FIGURE 9. Fluorescence intensity of GH. * P < 0.05

With the extension of culture time, the expression of ACTH and GH in the 2D and 3D cultured pituitary cells were both decreased (Fig. 5-7). However, hormone secretion in the 3D culture was higher than that in the 2D culture on every day of measurement. The bar graphs of fluorescence intensity (Fig. 8, 9) showed that the 2D cultured cells had stopped secreting hormones on the 17th day in contrast to the 3D cultured cell masses. After the 2D cultured cells completely adhered to

the wall, the pituitary cells differentiated into various different cells. However, there were still some ACTH secreting pituitary cells left. On the 17th day in the 3D culture, the cell masses still secreted hormones, but grew slowly. On the 21st day, the cell masses ruptured and stopped growing. The secretion of all hormones further decreased accordingly.

DISCUSSION

The morphological observation of simulated microgravity cultured pituitary cells indicated that the pituitary cells could survive for some time, but without the addition of nerve growth factor or stimulation from the hypothalamus, the cells would stop growing and their morphology and function could only be maintained for a certain time. This is in accordance with the so called "neurotrophic hypothesis", which posits that the survival of neurons depends on the continuous retrograde supply of trophic factors from target organs [5, 6]. As both neural activity and neurotrophic factors have been experimentally demonstrated to be neuroprotective for the magnocellular neurons (MCNs) in response to axonal injury [8], the "neurotrophic hypothesis" can be regarded as correct with a high level of evidence. As far as the exact factors involved in this regulatory process are concerned, Vutskits et al. 1998 [11] were able to demonstrate *in vitro* that the programmed neuronal cell death is attributable to the loss of ciliary neurotrophic factor (CNTF) from the neurohypophysis. Additionally, an increase in intracellular cAMP is sufficient to promote and maintain neuronal survival by recruiting the neurotrophin receptor TrkB to the plasma membrane by translocation from intracellular stores [4]. None of these neuroprotective processes is typically active in a classical 2D cell culture.

In the presented microgravity 3D culture, the cells inoculated in the container remained in suspension under conditions with small shearing power, no air bubbles in the culture container and efficient oxygenation [1, 12]. As the presented results demonstrate, simulated microgravity 3D culture has certain advantages over traditional 2D cell culture. The culture time of the pituitary cells *in vitro* was prolonged. Cellular morphology could also be easily observed. This finding indicates that the cellular morphology in the 3D culture was maintained well for the first 17 days; an appropriate time for pituitary transplantation.

The comparisons of hormone secretion and protein expression showed that simulated microgravity cultured pituitary cells had better morphology and secreted a greater amount of hormones. In simulated microgravity, cultured pituitary cells grew well on the 7th and 13th day. This finding could help identify an optimal time for pituitary transplantation and benefit the development of further new cell culture methods. Since pituitary cells contain a variety of sub-types, this study may also provide a clinical reference for inducing pluripotent stem cells into pi-

tuitary cells. In addition, this study may be a reference for further quantitative and qualitative studies of the secretion of various hormones in pituitary cells, which may be helpful for pituitary transplantation.

CONCLUSION

The present study suggests that primary pituitary cells can survive and produce hormones *in vitro* in 3D culture for a period of time. This hormone production is both higher and last longer than in conventional 2D culture. This technique therefore offers advantages for pituitary cell transplantation.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The authors declare that they have no conflict of interest.

This study was funded by The Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030313799) and Guangdong pharmaceutical university (2018KCXTD017).

Use of animals in the present research project was approved (No. 0122017) on March the 16th 2017 by the animal ethical committee of the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutics University.

The current research project does not contain any studies with human participants performed by any of the authors and does therefore not require informed consent.

REFERENCES

[1] BARZEGARI A, SAEI A A. An update to space biomedical research: tissue engineering in microgravity bioreactors. Bioimpacts. 2012; 2(1): 23-32.

[2] BRESLIN S, O'DRISCOLL L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. Drug Discov Today. 2013; **18**(5-6): 240-249.

[3] HAISLER W L, TIMM D M, GAGE J A, ET AL. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. Nat. Protocols. 2013; **8**(10): 1940-1949.

[4] MEYER-FRANKE A, WILKINSON GA, KRUTTGEN A, HU M, MUNRO E, HANSON MG JR, REICHARDT LF, BARRES BA. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. Neuron. 1998; **21**(4): 681-693.

[5] OPPENHEIM RW. Cell death during development of the nervous system. Annu Rev Neurosci. 1991; **14**: 453-501.

[6] OPPENHEIM RW. The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. Trends Neurosci. 1989; **12**(7): 252-255.

[7] OZONE C, SUGA H, EIRAKU M, ET AL. Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. *Nature Communications* 2016; 7(10351).

[8] SHAHAR T, HOUSE SB, GAINER H. Neural activity protects hypothalamic magnocellular neurons against axotomy-induced programmed cell death. J Neurosci. 2004; **24**(29): 6553-6562.

[9] SUGA H, KADOSHIMA T, MINAGUCHI M, ET AL. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. Nature. 2011; **480**(7375): 57-62.
[10] SUGA H. Differentiation of pluripotent stem cells into hypothalamic and pituitary cells. *Neuroendocrinology* 2015; **101**(1): 18-24.
[11] VUTSKITS L, BARTANUSZ V, SCHULZ MF, KISS JZ. Magnocellular vasopressinergic neurons in explant cultures are rescued from cell death by ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibiting factor. Neuroscience. 1998; **87**(3): 571-582.
[12] WANG X, DU J, WANG D, ET AL. Effects of simulated microgravity on human brain nervous tissue. Neuroscience Letters. 2016; **627**(199-204).
[13] YOSHIDA S, NISHIMURA N, UEHARU H, ET AL. Isolation of adult pituitary stem/progenitor cell clusters located in the parenchyma of the rat anterior lobe. *Stem Cell Res* 2016; **17**(2): 318-329.

Editor − Michał Nowicki

Received: 08.11.2019
Accepted: 16.12.2019
Wei Zhang
Department of Neurosurgery
First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutics University
Guangzhou City, Guangdong Province 510080, China
e-mail: chyalbtrac@126.com

INFORMACJE

INFORMACJA o dostępności pełnych artykułów publikowanych w PBK oraz publikacji elektronicznej

Pełne wersje artykułów opublikowanych w „Postępach Biologii Komórki" do 2017 roku są dostępne *on line* pod: http://www.pbkom.eu/pl/pbk-publikacje. Artykuły opublikowane w roku 2018, 2019 oraz 2020 są podane w wersji skróconej, a zainteresowana osoba może uzyskać darmowy dostęp wyłącznie do streszczenia. Aby uzyskać pełen dostęp do prac z ostatnich dwóch lat należy dokonać opłaty w internetowym sklepie dostępnym pod ww. adresem.

Artykuły **przyjęte do druku** w „Postępach Biologii Komórki" w języku polskim mogą być umieszczone dodatkowo w języku angielskim w wersji elektronicznej „Postępów" (*Advances in Cell Biology*) po przysłaniu w ciągu miesiąca do Redakcji angielskiego tłumaczenia tekstu. Ta wersja „Postępów" jest indeksowana w AGROS.

Przygotowanie publikacji do umieszczenia jej w Advances in Cell Biology (ACB):

1. Pracę przyjętą do „Postępów Biologii Komórki" Autor może umieścić na półce MetaPress w j. angielskim. Dostęp do tej wersji pracy jest bezpłatny i wiele osób korzysta z tej wersji. Szczególnie artykuły przeglądowe, a takie publikują „Postępy", są bardzo cenione, gdy są dostępne bez dodatkowych opłat
2. Tytuł pracy, streszczenie oraz bibliografia pozostają takie same jak w wersji polskiej. Treść pracy w j. angielskim Autor przygotowuje tak, aby odpowiadało to wersji w j. polskim. Ilustracje kolorowe są mile widziane nawet, gdy w wersji polskiej były czarno/białe
3. Przetłumaczoną przez Autora wersję pracy: tekst (ryciny – oddzielnie) należy wysłać pocztą e-mailową do prof Michała Nowickiego na adres: mnowicki@ump.edu.pl
4. Prof Nowicki wysyła ten tekst do odpowiedniego korektora j. angielskiego. Korektor językowy powinien w ciągu l-2 tyg. odesłać poprawiony tekst prof Nowickiemu, który będzie prosić Autora o akceptację korekty
5. Poprawiony tekst po akceptacji Autora prof Nowicki przekazuje do składu a następnie jest umieszczany na stronie *Advances in Cell Biology*
6. Autor nie ponosi kosztów korekty j. angielskiego ani publikacji rycin kolorowych, jak też wersji artykułu w j. angielskim

Dotychczas opublikowane w tej wersji artykuły są dostępne pod adresem:
http://www.degruyter.com/printahead/j/acb

Warunki otrzymywania czasopisma

– złożenie zamówienia: faxem, pocztą itp.
– jednoczesne dokonanie wpłaty na konto:

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Poznaniu
Nr konta w BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209
– po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

W sytuacji, kiedy wpłata nastąpi w trakcie trwania prenumeraty, wysyłamy wszystkie zeszyty (numery) czasopisma, które ukazały się w okresie objętym prenumeratą.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna
Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty na rok 2020 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; tel. (61) 854-64-58, fax. (61) 854-64-40
email: zpodemsk@ump.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

Cena prenumeraty rocznika wynosi	na rok 2020
dla instytucji (bibliotek)	230 zł + 8% VAT
dla odbiorców indywidualnych	83 zł + 8% VAT

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2020
should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland
+48 61 854-64-58, fax. +48 61 854-64-40, email: zpodemsk@ump.edu.pl
On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland, BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209
Price per year 80 dollars USA or 55 euro

Cennik dla Autorów rycin i druku w 2020 r.

	publikacja pracy	str. druku (ponad 15) 1 str.
Cena zł	1500,00	50,00

Do ceny należy doliczyć 8% VAT.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI (PBK) drukują artykuły przeglądowe w języku polskim lub angielskim z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym oraz Słownikiem Biologii Komórki PAU 2008. Artykuły drukowane w PBK bez zgody redakcji nie mogą być publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 5000 słów (do sumy tej nie wlicza się strony tytułowej, streszczenia, podziękowań, tabel wraz z opisami, opisów rycin oraz literatury) i do 100 pozycji bibliograficznych ze szczególnym uwzględnieniem ostatnich 5 lat;
2) doniesienia z ostatniej chwili nie przekraczające 1500 słów z maksymalnie 10 pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);
3) listy do redakcji (do 350 słów).

Wszystkie artykuły, wyłącznie w wersji elektronicznej, należy kierować na adres mailowy mnowicki@ump.edu.pl

Sposób przygotowania artykułów:

1. list przewodni – kierowany przez autora prowadzącego korespondencję do kolegium redakcyjnego Postępów Biologii Komórki musi zawierać
   i. informację, że artykuł, jak dotąd, nie został opublikowany w innym czasopiśmie (z wyjątkiem streszczenia), jak i nie został wysłany do innego czasopisma celem rozważenia możliwości jego publikacji
   ii. oświadczenie autora zajmującego się korespondencją, że wszyscy współautorzy zapoznali się z treścią artykułu i zaakceptowali jego treść
   iii. oświadczenie o występowaniu lub braku konfliktu interesów autora/autorów artykułu
   iv. przedstawienie zakresu pracy (ang. contribution) włożonego przez każdego z autorów artykułu w przygotowanie manuskryptu
   v. oświadczenie, że artykuł po przyjęciu do druku w PBK przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji
2. strona tytułowa musi zawierać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona i nazwiska autorów z afiliacją, liczbę słów znajdujących się w artykule (z zastrzeżeniami podanymi wyżej), liczbę tabel i rycin, słowa kluczowe (3 – 5 słów zgodnych z Medical Subject Headings), skrót tytułu pracy (maks. 40 znaków), informację o finansowaniu artykułu oraz dane autora prowadzącego korespondencję (adres pocztowy, e-mail, numer telefonu oraz numer faxu)
3. streszczenie artykułu w języku polskim i angielskim – maksymalnie 300 słów
4. w tytule i streszczeniu można wprowadzać jedynie powszechnie przyjęte skróty (np. DNA)
5. zasadniczy tekst (Times New Roman 12 pkt., odstęp 1,5 wiersza) należy podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały (należy przyjąć następujący sposób numeracji rozdziałów i podrozdziałów: 1, 1.1, 1.1.1, 1.1.2 itd.)
6. ostateczna wersja tekstu powinna być zapisane w formacie doc. lub docx.
7. tabele wraz z opisami należy umieszczać na końcu artykułu; jednostki miar muszą być zgodne z układem SI;
8. ryciny i schematy należy zapamiętywać w formacie tiff. lub jpg. w jakości minimum 300 dpi; w przypadku publikowania mikrofotografii należy zamieszczać na nich podziałkę (scale bar); wartość podziałki należy podać w opisie mikrofotografii; jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, a zamieszcza się je w niezmienionej formie, należy podać skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na ich reprodukcję;
9. objaśnienia i podpisy rycin, zdjęć i w tabelach powinny być podane w j. polskim i angielskim
10. sposób przygotowania literatury: skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus; cytowanie literatury w tekście – z zastosowaniem nawiasu kwadratowego (np. [5]); spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

    [1] BEN-CHETRIT E, CHAN EK, SULLIVAN KF, TAN EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J Exp Med 1988; **167**: 1560-1571.

    [2] BEUTLER B. Toll-like receptors and their place in immunology. Nature 2004; **430**: 498-518.

    [3] ELSTON CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In Page DL and Anderson TJ eds. Diagnostic histopathology of the breast. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987;300-311.

Odpłatność (kwoty brutto)

1. opłata za wydrukowanie artykułu nieprzekraczającego 15 stron druku – 1500 zł
2. strona druku (powyżej 15) – dodatkowo 50 zł za jedną stronę

Skierowanie pracy do PBK celem rozważenia możliwości jej publikacji jest tożsame z akceptacją przez autorów pracy regulaminu przyjmowania, oceny i publikowania artykułów naukowych w tym czasopiśmie.

Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji maksymalnie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni od chwili otrzymania recenzji nie odpowiedzą na list redaktora.

Autor zobowiązany jest do wykonywania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 48 godzin do redakcji. Koszty spowodowane większymi zmianami tekstu, wprowadzanymi w korekcie autorskiej poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów i zmian w manuskrypcie.

Po zaksięgowaniu kwoty związanej z publikacją artykułu w Postępach Biologii Komórki na koncie fundacji wszyscy autorzy otrzymują 1 egzemplarz zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz plik PDF zawierający opracowany przez redakcję manuskrypt (wydrukowane zeszyty oraz plik PDF są wysyłane odpowiednio na adres pocztowy oraz e-mail autora zajmującego się korespondencją). Autorzy mogą również zamówić większą liczbę wydrukowanych reprintów swojej pracy, a ich koszt będzie podany do wiadomości autorów na stosownym druku zamówienia.

TREŚĆ – CONTENTS

PAŃCZYSZYN-TRZEWIK P., SUROWIEC A., WNOROWSKI J., ZAVATSKYI R., SOWA-KUĆMA M.: 101
Rola czynnika Nrf2 I jego aktywatorów w patogenezie wybranych chorób związanych z dysfunkcją układu nerwowego
The role of Nrf2 factor and its activators in the pathogenesis of selected nervous system diseases

SKOCZEK W., SALAMAGA Ł., SZYMAJDA W., ZALESKI B., SZYMCZAK M., ARASZEWSKI M., BRZEZIŃSKA K., OWECKI M.: 119
Autoimmunologiczne choroby tarczycy – przegląd literatury
An overview of autoimmune thyroid diseases

KAMIŃSKA P., BUSZKA K., BUDNA-TUKAN J.: 141
Wybrane metody izolacji i detekcji krążących komórek nowotworowych w różnych typach nowotworów
Selected isolation and detection methods of circulating tumor cells in various tumors

SZMYT K., SUPERSON M., PAŃCZYSZYN-TRZEWIK P., ZAVATSKYI R., SOWA-KUĆMA M.: 161
Czynnik transkrypcyjny MeCP2 – krytyczny regulator epigenetyczny w mózgu
Transcription factor MeCP2 – a critical epigenetic regulator in the brain

JANISIAK J., KOPYTKO P., TARNOWSKI M.: 177
Metylotransferazy argininy i ich wpływ na epigenom
Protein arginine methyltransferases and their influence on epigenome

PAWLACZYK-KAMIEŃSKA T.: 197
Wykładniki stanu zdrowia jamy ustnej pacjentów chorujących na mukowiscydozę zuwzględnieniem analizy czynników etiologicznych
Oral health status and influential risk factorsin cystic fibrosis patients

YANG CH., CHEN G., KUCHTA K., ZHANG W.: 209
Effect of three-dimensional (3D) simulated microgravity culture on morphology and secretory function of murine pituitary cells

Informacje 221

Indeks 369705