

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

Postępy Biologii Komórki

VOL. 48, ISSUE 1/2021
(1–80)

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 bchwiro@umk.pl*

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

Grzyżyna 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@skl.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 krwionośnych mnowicki@ump.edu.pl*

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

Zdzisław SMORAG – *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 CHORAŻY, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŻNICKI, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office:

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Świąteczkiego 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, 2021-03-31



1936-2021

Z głębokim żalem informujemy, iż 28.02.2021 odszedł Profesor Zbigniew Darżynkiewicz. W osobie Profesora żegnamy wybitnego naukowca, pioniera i propagatora cytometrii przepływowej w Polsce i na świecie. Profesor Darżynkiewicz był absolwentem Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warszawskiego (1960 r), tam również – w 1966 roku – uzyskał stopień doktora nauk medycznych. Później wyemigrował do Stanów Zjednoczonych, gdzie pracował w wielu instytucjach naukowych i uniwersytetach. W latach 1980-90 był członkiem Rady Naukowej Sloan-Kettering Institute for Cancer Research w Nowym Yorku i profesorem biologii komórki i genetyki na Uniwersytecie Medycznym Cornell’a.

Jego zainteresowania naukowe koncentrowały się wokół badań cyklu komórkowego i śmierci komórki, głównie apoptozy i możliwości wykorzystania cytometrii przepływowej do oceny tych procesów. Profesor był wychowawcą kilku pokoleń cytometrystów i pomysłodawcą nowych rozwiązań technologicznych w cytometrii. To On zainicjował wykorzystanie barwnika oranżu akrydyny do równoczesnej oceny zawartości DNA i RNA w komórkach, to Jemu zawdzięczamy możliwość oceny apoptozy komórek z wykorzystaniem cytometru przepływowego – był wynalazcą popularnych metod służących do oceny tego typu śmierci komórek – TUNEL, FLICA. Wreszcie, dzięki Jego inwencji, powstały cytometry skaningowe.

W uznaniu Jego dokonań, Profesor sprawował liczne funkcje w międzynarodowych towarzystwach naukowych, m.in. piastował funkcję prezydenta Cell Kinetics Society (1986-87) oraz International Society for Analytical Cytology (ISAC) (1993-1994). Był również członkiem zagranicznym Polskiej Akademii Nauk i Polskiej Akademii Umiejętności. W roku 2014 Profesor Darżynkiewicz został uhonorowany godnością doctora honoris causa swojej macierzystej uczelni – Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Podczas swojego życia w USA Profesor nigdy nie zerwał kontaktów z Polską i polskimi badaczami, wielokrotnie współorganizował w naszym kraju międzynarodowe szkoły cytometrii, podczas których dane nam było poznać ekspertów z całego świata. Wielu z nas miało okazję poznać Profesora osobiście podczas odbywania staży i stypendiów naukowych w Jego laboratorium na Uniwersytecie Stanowym Nowy York w Vallhalla.

Żegnamy Cię Mistrzu i Przyjacielu!

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Cytometrii



1936-2021

With deep regret we inform that 28.02.2021 passed away Professor Zbigniew Darzynkiewicz, an eminent scientist and world pioneer in flow cytometry. Professor Darzynkiewicz was born in 1936 in Dzisna, Vilnius region, Poland. In 1960, he graduated with honors from the Faculty of Medicine, Medical University of Warsaw, where in 1966 he obtained also his PhD degree on the basis of the thesis entitled: “Studies of the Mechanism of Teratogenic Action of Insulin on Chicken Embryo”. He had his post-graduate scholarships at the State University of New York at Buffalo and at the Medical Nobel Institute of Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Subsequently in 1969 he emigrated to the US where in a period of 1980-1990 he was the Member of the Sloan-Kettering Cancer Research Institute and the Professor of Cell Biology and Genetics at Weill Cornell Medical College, New York, NY. From 1990 he was the Professor of Pathology, Medicine and Microbiology/Immunology at the New York Medical College at Valhalla, NY, and the Director of the Brander Cancer Research Institute at this College.

Professor Darzynkiewicz was an inventor of flow cytometry-based techniques for DNA and cell cycle analysis. He pioneered the use of DNA binding dyes for measuring cell cycle and took advantage of the metachromatic nature of acridine orange to look at both DNA and RNA content simultaneously, adding another layer of depth to cell cycle analysis. Most of the apoptosis assays we still use today including DNA loss, fluorogenic caspase substrates, TUNEL and mitochondrial function during cell death were developed and/or validated by his laboratory. He was an early adopter and enthusiastic promoter of image cytometry, correlating cell imagery with cytometric analysis, and applied it to enhance the analysis of both cell cycle and apoptosis. Professor Darzynkiewicz never lost contacts with Poland and Polish scientists, being actively involved in flow cytometry development in our country. Many of us had a privilege to meet him personally either in Poland during the flow cytometry schools he co-organized or during the scholarships in his laboratory at Valhalla. Professor Darzynkiewicz was the Co-founder and became Honorary Member of the Polish Society of Cytometry (1996) and was granted Honorary Membership from the Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine (2000). In 2014 Professor Darzynkiewicz was awarded the degree of Doctor Honoris Causa from the Warsaw Medical University. Professor Darzynkiewicz was also the Foreign Member of the Polish Academy of Sciences and the Member of Polish Academy of Arts.

Rest in Peace our Master and Friend!

National Board of the Polish Society of Cytometry

ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS – ORIGIN, TISSUE AND CELLULAR SPECIFICITY, AND APPLICATION IN REGENERATIVE MEDICINE

KOMÓRKI MACIERZyste POCHODZENIA
TŁUSZCZOWEGO – POCHODZENIE, CHARAKTERYSTYKA
ORAZ ZASTOSOWANIA W MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ

Zuzanna DORNA¹, Michał JAWORSKI¹, Rafał SIBIAK^{2,3},
Maurycy JANKOWSKI⁴, Katarzyna STEFAŃSKA², Grzegorz WĄSIATYCZ⁵,
Wojciech PIENKOWSKI⁶, Marlena DUDEK-MAKUCH⁷,
Dominik LANGER⁸, Renata DAWID-PAC⁹, Marta CYKOWIAK¹⁰,
Magdalena KOWALÓWKA¹¹, Bartosz KEMPISTY^{2,4,5}

¹Student's Scientific Society, Poznań University of Medical Sciences, Poznań

²Department of Histology and Embryology,

Poznań University of Medical Sciences, Poznań

³Department of Reproduction, Chair of Obstetrics, Gynecology, and Gynecologic
Oncology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań

⁴Department of Anatomy, Poznań University of Medical Sciences

⁵Department of Veterinary Surgery, Nicolaus Copernicus University, Toruń

⁶Division of Perinatology and Women's Diseases,

Poznań University of Medical Sciences, Poznań

⁷Department of Pharmacognosy, Poznań University of Medical Sciences

⁸Department of Pharmaceutical Genetics and Microbiology,

Poznań University of Medical Sciences, Poznań

⁹Department of Natural Raw Materials in Medicine and Cosmetology,

Poznań University of Medical Sciences, Poznań

¹⁰Department of Pharmaceutical Biochemistry,

Poznań University of Medical Sciences, Poznań

¹¹Department of Bromatology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań

Summary: The application of stem cells in medicine is still a relatively new topic associated with scientists' great interest. It is a source of hope for the patients suffering from various medical conditions, which are resistant to widely used healing paths. In recent years, the attention was drawn to multipotent adipose-derived stem cells (ADSCs). They are distinguished by their proliferative and secretive abilities, as well as accessibility. In addition, they are characterised by relative ease of harvesting and culture. Their unique qualities make them seem like a great opportunity in the field of regenerative medicine, which is a dynamically developing field associated with many types of research. ADSCs have the potential to be used in the treatment of chronic, non-healing wounds, as well as in diseases such as diabetes mellitus. Their use is also taken under consideration in treatment bone and cartilage defects, as well as in aesthetic medicine, including hair regeneration therapy on patients afflicted by alopecia in androgenetic alopecia or female pattern hair loss. Due to their regenerative properties, they are also perceived as a promising possibility in treatment of neurodegenerative diseases. The knowledge acquired during such research might be a base of the creation of novel alternative therapies in many other fields of medicine.

Keywords: Adipose-derived stem cells, ADSCs, stem cells, adipose tissue, regenerative medicine, tissue engineering

Streszczenie: Wykorzystanie komórek macierzystych w medycynie jest wciąż stosunkowo nowym zagadnieniem, które wzbudza duże zainteresowanie naukowców. Jest także źródłem nadziei dla chorych cierpiących na różne dolegliwości, którzy nie reagują na standardowe metody leczenia. W ostatnich latach, zwrócono uwagę na multipotencjalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ADSCs). Wyróżniają się one swoimi szczególnymi właściwościami proliferacyjnymi i sekrecyjnymi, a także szeroką dostępnością. Co więcej, łatwo je pozyskać oraz hodować in vitro. Wyżej wymienione cechy sprawiają, że wydają się one wyjątkową okazją na poczynienie postępów w dziedzinie medycyny regeneracyjnej, która jest obiektem wielu badań i dynamicznie się rozwija. ADSCs mogą potencjalnie zostać wykorzystane w leczeniu przewlekłych, niegojących się ran w chorobach takich jak cukrzyca. Rozważa się także nad ich użytecznością w regeneracji uszkodzeń tkanki kostnej oraz chrzęstnej. Mogą być także zastosowane w medycynie estetycznej w terapiach zapobiegających utracie włosów w łysieniu androgenowym, a także łysieniu typu kobiecego. Ze względu na swoje cechy, komórki te bierze się pod uwagę także jako obiecującą możliwość w leczeniu szeregu chorób neurodegeneracyjnych. Uzyskana z tych doniesień wiedza, może być podstawą do tworzenia różnych, nowoczesnych, alternatywnych metod leczenia, także w wielu innych dziedzinach medycyny.

Słowa kluczowe: inżynieria tkankowa, komórki macierzyste tkanki tłuszczowej, medycyna regeneracyjna, tkanka tłuszczowa

INTRODUCTION

Adipose tissue, a type of loose connective tissue, partakes in energy storage and protects the body against mechanical trauma. It is also a significant endocrine organ that secretes many hormones, e.g. leptin, adiponectin, resistin, or estradiol [4]. It consists of two cellular components: adipocytes and a stromal vascular fraction (SVF). In turn, SVF comprises various cells such as preadipocytes, endothelial cells, fibroblasts, mesenchymal stem cells (MSCs), vascular smooth

muscle cells, lymphocytes, macrophages, and adipose-derived stem cells (ADSCs). The adipose tissue's specific cellular composition differs depending on the tissue's anatomical location or type. A higher amount of ADSCs can be obtained from subcutaneous than from visceral fat [7, 16]. ADSCs are considered a promising stem cell lineage because of ease of access to adipose tissue and the relatively low-invasive way of isolation. Fat can be easily harvested via liposuction in the form of lipoaspirate; less often, the surgical option can also be chosen. The most common subcutaneous adipose tissue source utilized in medical research and clinical therapies is the abdomen, thigh, and arm [34].

Adipose-derived stem cells have recently become an object of comprehensive, in-depth research due to their beneficial cellular and secretive properties combined with their ubiquitous availability and relatively simple mode of harvesting. They are a population of multipotent adult stem cells originating from mesenchymal stem cells, localized in the adipose tissue's stromal vascular fraction. Their exceptional proliferative capacity and ability to differentiate into cells of three developmental germ layers provide a number of opportunities to apply them in various treatment protocols. Moreover, ADSCs are characterized by a valuable secretome, combining many angiogenic and immunomodulating factors which might accelerate healing and regeneration [36, 17]. They are also considered the most accessible source of stem cells in the human body due to their emplacement in adipose tissue, making their collection a minimally invasive, relatively safe, and mostly painless procedure. Furthermore, they are capable of maintaining their phenotype in culture for an extended periods of time. The combination of all of the above features explains the discussion that unleashes around the subject of ADSCs and their potential application and beneficial impact in many areas of research [42].

THE ORIGIN OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS

Stem cells are unspecialized human cells with self-renewal capacity and the ability to differentiate into multiple cell lineages [37]. Different groups of stem cells vary in potency, which defines the number of cell types they can differentiate into [30]. Totipotent cells derived from morula are of the greatest potency. They can create both embryonic and extra-embryonic structures that subsequently give rise to all three germ layers and the placental cells [6]. The inner cell mass (ICM), one of the components forming blastocyst that develops 4 days post-fertilization, is the source of pluripotent cells capable of differentiation into all human organism cells. They are known as human embryonic stem cells (hESCs), having the ability to form germ layers – cellular units built of multipotent progenitor cells. Each germ layer, endoderm, mesoderm, or ectoderm, is responsible for the creation of specified tissue later in the process of human development [5,30]. In turn, adult or

somatic stem cells are located in every tissue of a mature organism. Their potency is limited, and the time necessary for the cell to proliferate is elongated. Multipotent stem cells partake in the process of healing, regeneration, and replacement of the adult cells [14]. Mesoderm, one of the three germ layers, is a source of mesenchymal stem cells, as well as hematopoietic stem cells (HSCs). MSCs located in the bone marrow stroma give rise to muscle, cartilage, bone, and adipose tissues [15]. MSCs also partake in angiogenesis, but cannot differentiate into HSCs [22]. MSCs give rise to adipose-derived stem cells (ADSCs), the population of stem cells located in the adipose tissue [1].

ADIPOSE-DERIVED STEM CELL CHARACTERISTICS

Among many types of adult stem cells, ADSCs are particularly valued not only for their common availability but also higher proliferation potential and ability to maintain their phenotype in culture for a longer period of time [42]. Another feature that speaks in their favor is the lack of ethical controversies, which surround embryonic stem cells application in clinical use. The International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) set three criteria, which are essential to determine ADSC identity. The first necessary condition, which has to be demonstrated by the cell, is its ability to adhere to plastic. Secondly, they display the expression of mesenchymal phenotypic markers CD73, CD90, and CD105, while lacking the surface marker expression of CD11b, CD14, CD19, CD45, and HLA-DR. The last indicator is the cell's ability to differentiate into preadipocytes, osteoblasts, and chondrocytes [18]. Moreover, ADSCs are responsive to inducers of non-mesenchymal cell lineages differentiation, giving rise not only to cells of mesodermal derivation but also those of the other two germ layers [2]. They can differentiate toward subpopulations such as smooth and cardiac muscle cells, keratinocytes, hepatocytes, endothelial cells, neurons, beta islet cells, macrophages, or melanocytes [2, 8, 34].

ADSCs gained attention not only for their multipotency but also secretome, which is rich in cytokines, extracellular proteins, and RNAs. Paracrinally released factors beneficially contribute to surrounding tissues through their immunomodulating properties and stimulating effect on the process of angiogenesis.

All of these features combined imply that ADSCs could be a promising and easily accessible source of stem cells in further research and clinical trials. Furthermore, the profile of these cells could be useful in the development of regenerative medicine and should be a subject of precise study [12, 20].

APPLICATION OF ADSCs IN THE REGENERATIVE MEDICINE

Large full-thickness skin defects and non-healing wounds are still a challenge for modern medicine. They might be caused by a number of reasons: from trauma, burns, and congenital defects, to of tumour resection and chronic ischemia due to diabetes mellitus or immobilization. Initially, cultured epidermal autografts (CEA) were developed, but to no satisfying avail [21]. The addition of fibroblasts produced extracellular matrix (ECM) proteins such as collagen, fibronectin, or elastin was expected to improve the process of healing. However, CEA application is limited to nonextensive cases because of their tendency to contract, recurring wound opening, and fragility [27]. Klar et al. developed dermo-epidermal skin substitutes (DESS), which for now are believed to be the most promising prospect in regenerative medicine. They consist of both epidermal and dermal layers, which guarantees resemblance to natural skin structure and provides the best cosmetic effect among other skin grafts. It is even possible to add the patient's melanocytes to obtain suitable skin color and prevent them from the harmful influence of UV radiation. Other opportunities for people suffering from traumatic wounds are treatments based on ADSCs. ADSCs support tissue repair with their proliferating and immunomodulating abilities. They are also capable of secreting VEGF, fibroblast growth factors, and anti- or proinflammatory factors. Autologous fat grafts are created by processing lipoaspirates harvested via liposuction of subcutaneous adipose tissue. The treatment is applied to soft tissues in the form of an injection enriched by cultured ADSCs. This method is valued for being minimally invasive, low risk, and sufficiently positive outcome, but it is worth mentioning that it usually has to be performed several times to obtain the expected effect [21, 35]. Zhang et al. report on clinical trials on ADSCs-NCSS, new collagen sponge scaffolds combined with extracted ADSCs, repair potential of which in full-skin defects was tested on nude mice with satisfying heal rates compared to other methods of treatment used in this trial [41]. Furthermore, Qiu et al. presented their results on the utilization of exosomes derived from adipose-derived stem cells (ADSCs-Exos), a cell-free substance obtained from extracellular vesicles secreted by ADSCs [3]. The authors bring attention to the beneficial effects of the ADSCs-Exos on skin regeneration and acceleration of the process of vascularization, without any major side effects [3, 25].

The application of ADSCs is also a subject of study in hair regeneration therapy. Their secretive properties were taken under consideration in the treatment of hair loss in conditions such as androgenetic alopecia or female pattern hair loss. ADSCs excrete various cytokines that have the ability to stimulate the process of

angiogenesis, increasing the blood supply of the hair follicle and inducing hair growth. Moreover, a lot of attention was drawn to the conditioned medium of ADSCs (ADSC-CM), which turned out to be capable of reducing oxidative stress, enhancing collagen synthesis, or suppressing cell apoptosis and inflammation [13]. ADSC-CM is a cell-free nourishing suspension, rich in ADSC-derived cytokines and growth factors. Basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), keratinocyte growth factor (KGF), and insulin-like growth factor I (IGF-I) modulate hair growth by promoting cell proliferation, angiogenesis, and fibroblast migration [9,38]. The results of research on ADSC-CM applications seem to be very promising. This therapeutic approach is considered relatively safe and inexpensive; however, the effects vary depending on the case and its severity. Alopecia affecting a significant part of the scalp, advanced age, or long history of the disease are the factors that may limit treatment efficacy due to fibrosis of hair follicles. It is worth noticing that the process of hair regrowth is time-consuming, so the outcome of the procedure is not immediate [13, 28].

Bone tissue engineering is another dynamically developing field of regenerative medicine. At present, for the patients suffering from trauma, bone structure defects, infections, and tumours, treatment options are limited to autologous and allogeneic bone grafts and artificial bone substitutes. Bone grafts are perceived as an effective method, but their utilization is associated with iatrogenic damage made to the donor's bone tissue [32]. The results of artificial bone substitutes' application show difficulties in stimulating osteoinduction, affecting the efficacy of this procedure. Conclusions made during ADSC investigation suggested that these stem cells might be a useful tool in the field of bone regenerative medicine. Research conducted on animal models seems to confirm those assumptions, indicating the impact of paracrine factor secretes such as VEGF in the process of bone remodeling [7, 19]. Probst et al., in their study, explored the potential of exploitation of cell-scaffold assemblies. There was evidence that the interaction between ADSCs and biomaterials resembling bone structure facilitated the formation of extracellular matrix and improved osteogenesis. The focus of the research were the maxillofacial bone defects, but the obtained outcomes could be transferred to clinical use in other bone disease or damage [33]. Chang et al. reported that ADSCs are also capable of modulating bone erosion and suppressing osteoclastogenesis. The results of their *in vitro* academic work show that ADSCs decrease the formation of osteoclasts in mice and humans. Furthermore, the acquired knowledge might also be a base for the creation of novel alternative healing paths in diseases such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis [11].

Treatments based on ADSCs are also studied in the subject of cartilage tissue engineering in medical conditions such as cartilage lesions, which are hard to regenerate. The mechanism of the methods is analogical to those listed above and utilizes the unique abilities of ADSCs. The application of both scaffold-free and

scaffold-based procedures is taken under consideration [24]. However, it is worth mentioning that sometimes *in vivo* trials of cartilage implantation of ADSCs derivation end unsuccessfully. This is due to the formation of ossification as a result of increased vascularisation. Xie et al. conducted research on thrombospondin-1 use in the inhibition of ossification to a satisfying outcome, improving the knowledge about cartilage defects treatment [39]. The utilization of ADSCs in the form of intra-articular injections consisting of adipose SVF and platelet-rich plasma is also discussed as a tool in reducing the ailments of patients suffering from medical conditions such as osteoarthritis or chondromalacia [31]. Numata et al. compared the effectiveness of local administration of ADSCs with intra-articular injections in a rabbit model, ruling greater efficiency of the first one of the listed [29].

Furthermore, Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have been scientist's objects of interest for years. Although much research was conducted, no effective treatment that inhibits the progression of these diseases was discovered. Due to their regenerative properties, ADSCs are perceived as a chance for patients suffering from neurodegenerative disorders. Stem cells derived from the adipose tissue have the ability to be induced to differentiate into neuronal cells. Secretion of angiogenic factors, as well as stimulation of the immune system, might also mitigate symptoms and limit neuronal damage. Other mechanisms that were taken under consideration are the capacity to reduce gliosis, the process that occurs in some of the mentioned diseases, as well as the expression of neurotrophic factors [40]. Ma et al., in their study, created ADSCs-derived extracellular vesicles (ADSCs-derived EVs) containing molecules such as cytokines, growth factors, and miRNA, and applied them to mice with Alzheimer's disease. The research showed that nasally administered ADSCs-derived EVs have the potential in the treatment by promoting neurogenesis and their neuroprotective properties by inhibiting the formation of amyloid plaques [26]. In the murine model, EVs have also prevented memory loss [23,26]. Chan et al. brought up progress in knowledge on use of ADSCs in less common diseases such as Huntington's or Parkinson's disease, as well as ALS. It is believed that neurotrophic factors produced by ADSCs such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), VEGF, and insulin-like growth factor (IGF-1) can alleviate disease symptoms. Additionally, ADSC-CM seems to be able to confer protection from 6-OHDA (6-hydroxydopamine), which directly damages neurons of substantia nigra in Parkinson's disease. In research on rats, it was proven that the application of ADSC-CM could reduce neurotoxicity and ROS influence caused by 6-OHDA. It was also reported that administration of ADSC could delay and alleviate symptoms in Huntington's disease through their secretive properties. All of the above reports are expected to be a chance for a method of alternative treatment for patients suffering from these medical conditions in the future. However, any such advancements will require further investigation [10].

CONCLUSIONS

ADSCs emerged as a promising tool in tissue engineering. While the available reports seem to be satisfactory, further in-depth research appears to be essential. Increasing the knowledge on ADSCs physiology and their potential applications seems to be crucial in elaborating novel forms of treatment in the field of regenerative medicine. Understanding these exceptional stem cells' functioning might give new opportunities to achieve satisfying effects in treatment of medical conditions which are still a challenge for the modern science.

REFERENCES

- [1] ALMALKI SG, AGRAWAL DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2016; **92**: 1-11.
- [2] ARGENTATI C, MORENA F, BAZZUCCHI M, ARMENTANO I, EMILIANI C, MARTINO S. Adipose Stem Cell Translational Applications : From Bench-to-Bedside. *Int J Mol Sci*. 2018; **19**: 3475.
- [3] QIU H, LIU S, WU K ET AL. Prospective application of exosomes derived from adipose-derived stem cells in skin wound healing : A review. *J Cosmet Dermatol*. 2020; **19**: 574-581.
- [4] FRIGOLET ME, GUTIERREZ-AGUILAR R. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex*. 2020; **156**: 142-149.
- [5] BACAKOVA L, ZARUBOVA J, TRAVNICKOVA M ET AL. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnol. Adv*. 2018; **36**: 1111-26.
- [6] BAKER CL, PERA MF. Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2018; **22**: 25-34.
- [7] BARBA M, DI TARANTO G, LATTANZI W. Adipose-derived stem cell therapies for bone regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2017; **17**: 677-89.
- [8] BELLEI B, MIGLIANO E, TEDESCO M, CAPUTO S, PICARDO M. Maximizing non-enzymatic methods for harvesting adipose- derived stem from lipoaspirate : technical considerations and clinical implications for regenerative surgery. *Sci. Rep*. 2017; **7** : 10015.
- [9] CAI Y, LI J, JIA C, HE Y, DENG C. Therapeutic applications of adipose cell- free derivatives : a review. *Stem Cell Res Ther*. 2020; **11**: 312.
- [10] CHAN T, CHEN JY, HO L ET AL. Review ADSC Therapy in Neurodegenerative Disorders. *Cell Transplant*. 2014; **23**: 549-57.
- [11] CHANG Q. Adipose-derived mesenchymal stromal cells suppress osteoclastogenesis and bone erosion in collagen-induced arthritis. *Scand J Immunol*. 2020; **92**: e12877.
- [12] DUBEY NK, MISHRA VK, DUBEY R, DENG YH, TSAI FC, DENG WP. Revisiting the advances in isolation, characterization and secretome of adipose-derived stromal/stem cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; **19**: 1-23.
- [13] FUKUOKA H, NARITA K, SUGA H. Hair Regeneration Therapy: Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther*. 2017; **12**: 531-4.
- [14] GOODELL MA, NGUYEN H, SHROYER N. Somatic stem cell heterogeneity : diversity in the blood , skin and intestinal stem cell compartments. *Nat. Publ. Gr*. 2015; **16**: 299-309.
- [15] HALL BK. Germ layers, the neural crest and emergent organization in development and evolution. *Genesis*. 2018; **56**: e23103.
- [16] HAN S, SUN HM, HWANG K, KIM S. Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells : Update on Clinical Utility and Efficacy. 2015; **25**: 145-52.

- [17] HONG P, YANG H, WU Y, LI K, TANG Z. The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells : a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther.* 2019; **10**: 242.
- [18] ID PP, ID FL, SIRAGUSA G, CIFONE MG, CINQUE B, GIULIANI M. Methods of Isolation , Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *Int J Mol Sci.* 2018; **19**: 1897.
- [19] JOURNAL AI, JIN Q, YUAN K, LIN W, NIU C, MA R. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2019; **47**: 1577-84.
- [20] KAPUR SK, KATZ AJ. AC. Review of the adipose derived stem cell secretome *Biochimie.* 2013; **95**: 2222-8.
- [21] KLAR AS, ZIMOCHE J, BIEDERMANN T. Skin Tissue Engineering: Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Biomed Res. Int.* 2017; **2017**: 9747010.
- [22] LAGARKOVA MA. Such Various Stem Cells. *Biochemistry (Mosc).* 2019; **84**: 187-9.
- [23] LEE M, BAN J, YANG S, IM W, KIM M. The exosome of adipose-derived stem cells reduces β -amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2018; **1691**: 87-93.
- [24] LI X, WANG M, JING X ET AL. Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Applications in Cartilage Tissue Engineering. 2018; **28**: 285-310.
- [25] LI X, XIE X, LIAN W ET AL. Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model. *Exp. Mol. Med.* 2018; **50**: 1-14.
- [26] MA X, HUANG M, ZHENG M ET AL. ADSCs-derived extracellular vesicles alleviate neuronal damage , promote neurogenesis and rescue memory loss in mice with Alzheimer's disease. *J Control Release.* 2020; **327**: 688-702.
- [27] MAZINI L, ROCHETTE L, ADMOU B, AMAL S, MALKA G. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020; **21**: 1306.
- [28] NARITA K, FUKUOKA H, SEKIYAMA T, SUGA H, HARI K. Sequential Scalp Assessment in Hair Regeneration Therapy Using an Adipose-Derived Stem Cell-Conditioned Medium. *Dermatol. Surg.* 2020; **46**: 819-25.
- [29] NUMATA H, NAKASE J, PH D ET AL. Effectiveness of Adhering Adipose-Derived Stem Cells to Defective Cartilage in Promoting Cartilage Regeneration in a Rabbit Model. *Arthroscopy.* 2019; **35**: 2619-2626.
- [30] OTA KI. Fuel Cells: Past, Present and Future. *IEEJ Trans. Fundam. Mater.* 2008; **128**: 329-332.
- [31] PAK J, LEE JH, KARTOLO WA, LEE SH. Cartilage Regeneration in Human with Adipose Tissue-Derived Stem Cells : Current Status in Clinical Implications. *Biomed Res Int.* 2016; **2016**: 4702674.
- [32] PARK S, HEO H, LEE K, KIM H, PYO S. Improved Bone Regeneration With Multiporous PLGA Scaffold and BMP-2-Transduced Human Adipose-Derived Stem Cells by Cell-Permeable Peptide. *Implant Dent.* 2017; **26**: 4-11.
- [33] PROBST FA, FLIEFEL R, BURIAN E ET AL. Bone regeneration of minipig mandibular defect by adipose derived mesenchymal stem cells seeded tri-calcium phosphate- poly(D , L-lactide-co-glycolide) scaffolds. *Sci Rep.* 2020; **10**: 2062.
- [34] SI Z, WANG X, SUN C ET AL. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed. Pharmacother.* 2019; **114**: 108765.
- [35] SMITH OJ, JELL G, MOSAHEBI A. The use of fat grafting and platelet-rich plasma for wound healing : A review of the current evidence. *Int Wound J.* 2019; **16**: 275-285.
- [36] SMITH RJP, REID AJ. The potential of adipose-derived stem cell subpopulations in regenerative medicine. *Regen. Med.* 2018; **13**: 357-60.

- [37] WANG X. Stem cells in tissues, organoids, and cancers. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019; **76**: 4043-70.
- [38] XIAO S, DENG Y, MO X, LIU Z, WANG D, DENG C. Promotion of Hair Growth by Conditioned Medium from Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel in C57BL/6 Mice. *Stem Cells Int.* 2020; **2020**: 9054514.
- [39] XIE A, XUE J, SHEN G, NIE L. Thrombospondin-1 inhibits ossification of tissue engineered cartilage constructed by ADSCs. *Am J Transl Res.* 2017; **9**: 3487-3498.
- [40] YEH D, CHAN T, HARN H ET AL. Adipose tissue-derived stem cells in neural regenerative medicine. *Cell Transplant.* 2015; **24**: 487-92.
- [41] ZHANG A, JIANG TAO, LI Q, JIN P, TAN Q. Experimental research on ADSCs-NCSS in wound repair. *Exp Ther Med.* 2018; **16**: 4429-4436.
- [42] ZHANG J, LIU Y, CHEN Y ET AL. Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. *Stem Cells Int.* 2020; **2020**: 8810813.

Editor – Maciej Zabel

Received: 17.03.2021

Accepted: 02.04.2021

Bartosz Kempisty Ph.D.

Department of Histology and Embryology, Department of Anatomy

Poznań University of Medical Sciences

6 Świącickiego St., 60-781 Poznań, Poland

tel./fax: +48 61 8546567 / +48 61 8546568

e-mail: bkempisty@ump.edu.pl

OVERVIEW OF RECENT FINDING ON THE POSSIBLE APPLICATION OF HUMAN STEM CELLS IN MEDICAL THERAPIES

PRZEGLĄD POTENCJALNYCH INNOWACYJNYCH TERAPII WYKORZYSTUJĄCYCH KOMÓRKI MACIERZYSTE

Michał JAWORSKI¹, Zuzanna DORNA¹, Rafał SIBIAK^{2,3},
Katarzyna STEFAŃSKA², Wojciech PIENKOWSKI⁴, Marta BUDZIŃSKA⁵,
Marek KWAŚNIEWSKI⁵, Natalia TUROWSKA⁶, Marek SIMON⁷,
Bartosz CYBUŁKA⁸, Bartosz KEMPISTY^{2,9,10}

¹Student's Scientific Society, Poznań University of Medical Sciences,
Poznań, Poland

²Department of Histology and Embryology,
Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland

³Department of Reproduction, Chair of Obstetrics, Gynecology, and Gynecologic
Oncology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland

⁴Division of Perinatology and Women's Diseases,
Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland

⁵Department of Microbiology, Poznań University of Medical Sciences,
Poznań, Poland

⁶Department of Pharmaceutical Botany and Plant Biotechnology,
Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland

⁷Department of Pathophysiology, Poznań University of Medical Sciences,
Poznań, Poland

⁸Department of General Surgery, Endocrine Surgery and Gastroenterological
Oncology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland

⁹Department of Anatomy, Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland

¹⁰Department of Veterinary Surgery, Nicolaus Copernicus University,
Toruń, Poland

Summary: Human stem cell therapies are among the most promising treatment methods for many serious diseases in most areas of medicine. Their abilities are based on relatively easy isolation methods, regenerative potential, and possible differentiation into all three germ layers. Furthermore, their autologous transplantation is well tolerated with minimal risk of rejection. Additionally, they can immunomodulate, with suppressive effects on pro-inflammatory and promotion on anti-inflammatory molecule secretion. They can also act through paracrine and autocrine pathways or stimulate angiogenesis. Furthermore, they could be modified to exhibit affinity to tumours and deliver drugs exactly into pathological tissue or create healthy tissue with the correct genetic material. In turn, in psychiatry, the change of their level in peripheral blood is directly proportional to patients' clinical conditions. All these features support the notion that the medicine of the future will probably be based on human stem cells.

Keywords: human stem cells, human pluripotent stem cells

Streszczenie: Terapie z wykorzystaniem komórek macierzystych pochodzących od ludzi są jedną z najbardziej obiecujących metod leczenia wielu poważnych chorób. Ich funkcjonalność opiera się na stosunkowo łatwej izolacji, dużym potencjale regeneracyjnym i zdolności do różnicowania się w komórki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych. Transplantacje autologiczne są dobrze tolerowane i wykazują się niewielkim ryzykiem odrzucenia przeszczepu. Dodatkowo, komórki te mają zdolność do modyfikowania reakcji zapalnych poprzez wywieranie hamującego efektu na czynniki prozapalne i pobudzającego na antyzapalne. Są zdolne do parakrynowego i autokrynowego wydzielania substancji oraz stymulowania angiogenezy. Po swoistych modyfikacjach mogą wykazywać powinowactwo do nowotworów i deponować leki dokładnie w patologicznej tkance lub tworzyć nową z prawidłowym materiałem genetycznym. W psychiatrii zmiana ich stężenia we krwi obwodowej jest wprost proporcjonalna do stanu klinicznego pacjenta. Wszystkie te cechy powodują, że badania nad ludzkimi komórkami macierzystymi mogą doprowadzić do przełomu i można przypuszczać, że staną się fundamentem nowoczesnej medycyny.

Słowa kluczowe: ludzkie komórki macierzyste, pluripotentjalne komórki macierzyste

INTRODUCTION

Human stem cells became popular in almost every area of medicine. Scientists worldwide attempt to find a perfect way of their isolation, which should be low-effort, repeatable and without controversies. Furthermore, the tissue from which the cells are obtained should have a significant regenerative potential [11]. Stem cells are a very wide concept, which includes many types of cells, but all of them are pluripotent and can differentiate into various tissues with specific properties. They also have other features which depend on the tissue in which they are located [35]. Nowadays, due to their extent, it is impossible to discuss every human stem cell in one review. Hence, the populations mentioned are e.g. mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, epidermal stem cells, embryonic stem cells, induced pluripotent human stem cells, bone marrow-derived stem cells, or cardiac stem cells. In this review, we focus on clinical treatments in

several areas of medicine, in which specific types of human stem cells show the greatest therapeutic potential.

Mesenchymal stem cells are most commonly used nowadays, characterised by relatively easy acquisition without an impact on human health [3]. In adulthood, the most commonly studied stem-cell containing tissues are adipose, muscle, and bone marrow [33]. While pluripotent stem cells are able to differentiate into all three embryonic lineages, multipotent cells, e.g. hematopoietic stem cells, differentiate into tissue specific cells, [12]. Clinical trials focus on their regenerative potential and opportunities for improved functionality of damaged tissues [36]. Adult stem cell differentiation abilities depend on their tissue of origin [7]. Unfortunately, stem cells also have the potential for unlimited proliferation, which can potentially lead to malignant progression [7]. Furthermore, some cells are modified to exhibit angiogenic, neurotrophic, and anti-inflammatory abilities [10, 20]. Other modifications cause affinity to tumours, allowing the cells to transport drugs or oncolytic viruses [20].

APPLICATION OF HUMAN STEM CELLS IN ADVANCED TREATMENT PROTOCOLS

DERMATOLOGY

One of the most popular adult stem cells are mesenchymal stem cells, which usually are obtained from umbilical cord blood. Sang Eun Lee et al. used these cells to treat patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa [22]. Four adults and two pediatric patients received three intravenous injections of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (hUCB-MSCs), which yielded no adverse side effects. The authors observed improvement in Birmingham Epidermidis Bullosa Severity Score body surface area involvement, blister counts, pain, pruritus, and quality of life. The maximal effect was observed after 56-112 days after injections [22]. MSCs were also used in vitiligo (promote cell proliferation and suppress oxidative stress-induced apoptosis in human melanocytes), melanoma (supplying $\text{INF-}\beta$ and killing effect), photoaging (stimulation of collagen and $\text{TGF-}\beta$ production, inhibition of UVB-induced apoptosis), or atopic dermatitis (suppressing T cell and B cells functions, decreasing serum IgE level) [23].

Other researchers examined the impact of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) on wound healing. They proved that ADSCs have significant potential for skin regeneration by repairing damaged or dead cells. They also have the ability to differentiate into dermal fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes. Additionally, they can also act through autocrine and paracrine pathways, stimulating the healing process. It has been shown that human stem cells can play a significant role in wound healing, as well as in anti-aging processes [24].

The next useful type of stem cells are epidermal stem cells. Researches showed potential of these multipotent cells for autologous therapies in wound healing and cutaneous repair. Their action is based primarily on angiogenesis, cell migration, proliferation, and the re-epithelialization processes [42]. Unfortunately, many factors have an impact on the effectiveness of this therapy. For example, Gertraud Eylert et al. showed that even doses of the ESC contained substances have significant importance in successful therapy [14]. Other dermatological conditions in which it is possible to use human stem cells are non-healing ulcers, critical limb ischemia [21], or radiation burns [19].

DIABETOLOGY

Embryonic stem cells (ESCs), induced pluripotent stem cells (iPSCs), and adult mesenchymal stem cells (MSCs) are primarily used in clinical trials regarding treatment of type 1 and type 2 diabetes. Controversies of ESCs isolation, which have unlimited differentiation potential, limited research on this cell type. The most common type, because of its accessibility, is mesenchymal stem cells. The most significant restriction in therapies with MSCs is their inability to successfully differentiate into B-cells of the pancreas, whose role in the pathogenesis of diabetes type 1 is vital. However, MSCs cause less exogenic insulin requirement and regression of disease advancement [34], which could be significant for maintaining the desired glucose level [32].

Mesenchymal stem cells were also applied in clinical trials on diabetic kidney disease. It is one of the most severe complications of diabetes, which strongly affects patients' quality of life. Researches showed that mesenchymal stem cells from patients with DM type 1 do not differ significantly from healthy controls, but patients with DM type 2 have MSCs with greater senescence, lower viability, angiogenic and proliferative potential, and increased apoptosis. Despite this, both autologous and allogeneic transplants resulted in a decrease in insulin requirements, levels of HbA1C and an increase in the levels of peptide-C, which is the best marker of insulin production by the pancreas [37].

ONCOLOGY

The area with the biggest potential for human stem cells is oncology. Genetically modified MSCs are promising carriers of anticancer agents, which could inhibit growth processes by blocking growth factors or expressing specific cytokines [26]. However, they also carry a significant threat of malignant differentiation. Only precisely modified stem cells would lose their potential for uncontrolled growth. Molecular cancer development mechanisms are so complicated that only their full discovery could allow clinicians to use stem cells safely [6].

NEONATOLOGY

The next continuously evolving medical problem is premature birth, resulting in many neonatal development complications. Mesenchymal stem cells were used in new therapies of neonatal disorders, e.g. bronchopulmonary dysplasia, intra-ventricular haemorrhage, or hypoxic-ischemic encephalopathy. The main function of these cells in these therapies is their secretion of a wide range of growth factors and cytokines with immunomodulating effects. On the other hand, the treatment of neonatal complications is a complex subject, so it is necessary to better understand these therapies and their long-term effects [1].

CARDIOLOGY

Human stem cells' regenerative potential is pivotal for cardiomyocytes in the myocardium [2]. Although in the past, the human heart was considered to be ultimately diversified and unable to regenerate, actual clinical studies prove that this organ can probably rebuild itself to some extent by cardiomyocyte turnover. In this context, scientists embryonic investigated are primarily stem cells, bone marrow-derived stem cells, cardiac resident stem cells, skeletal myoblast cells, cardiac stem cells, or MSCs [2, 27]. Pluripotential ESCs are sourced from the embryo's inner cell mass called the blastocyst, which poses a serious ethical problem [36]. Because of their ability to differentiate into all three germ layers, it is possible to induce them towards mesodermal lineages [15]. The greatest threat in using ESCs is the possibility of immunologic rejection or teratoma formation [2]. Furthermore, induced pluripotent stem cells can form cardiomyocytes, but also pose the risk of malignant progression, as well as are associated with relatively complicated isolation procedure. The most important influence of MSCs cardiac tissue is based on paracrine signalling (secretion transforming growth factor β , vascular endothelial growth factor [VEGF], stromal cell-derived factor, and epidermal growth factor), neovascularization (secretion pro-angiogenic factors, VEGF, hepatocyte growth factor [HGF], insulin growth factor [IGF-1]), immunomodulation (MSCs can suppress the proliferation, induce the apoptosis of T cell, and stimulate regulatory Treg cells, which improve wound healing) [6, 25, 27]. MSCs are relatively easy to obtain [40], but they are a heterogeneous population and have limited differentiation potential [27]. Their additional advantage is a reduced expression of MHC (major histocompatibility complex) class I and lack of MHC class II, allowing their full allogeneic and autologous use [5]. Systemically, cardiac stem cells promote systolic motion improvement, increasing left ventricular ejection fraction, decreasing infarct size, as well as increase NYHA score, which is a desired effect for all therapies in heart failures. Similar effects are attributed to skeletal myoblasts, which are also able to form new small vessels

[17], but are associated with more complications, such as arrhythmias [36]. Bone marrow-derived stem cells have the capability to create heart-cell tissue, but because of their multipotency, there is a risk of their differentiation into other tissues like bone, cartilage, or fat [15].

PSYCHIATRY

Psychiatry uses human stem cells in another aspect. When other medicine areas use them in therapies, psychiatrists investigate stem cells as a diagnostic tool. Stem cells in the peripheral blood and factors such as complement cascade cleavage fragments or bioactive phospholipids, responsible for influencing these cells, are thought to increase stress levels. Furthermore, in psychotic disorders, the amount of these elements was found to be higher. Hence, they have the potential to be specific markers for some psychiatric diseases and could verify treatment effectiveness [41].

PULMONOLOGY

Seyeon Oh et al. evaluated the mesenchymal stem cell application efficiency in pulmonary arterial hypertension (PAH). The best improvement in right ventricular function was noticed with application of umbilical cord blood mesenchymal stem cells (UCB-MSCs), compared ADSCs or bone marrow-MSCs (BM-MSCs). Therapies with BM-MSCs and UCB-MSCs cause right ventricular pressure overload reduction and improve the right ventricle's hemodynamic parameters. The next effect was noted in vascular remodelling after human stem cell application; therapy based on these cells showed protective effects on the medial wall thickening, perivascular fibrosis, and vascular cell proliferation [28].

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) significantly handicaps gas exchange in the lungs, which causes hypoxemia as an effect of inflammatory pulmonary oedema. ARDS is a high mortality disease, statistically close to HIV infection, breast cancer, or asthma. In ARDS treatment, the most promising solutions are based on mesenchymal stem cells. Their first function is the suppression of T-cell proliferation and modification of activities of dendritic cells, B cells, macrophages, and neutrophils. In bacterial sepsis, which is the most common cause of ARDS, MSCs change macrophage phenotype and activate CD4 and CD8 T cells, which stops inflammatory cytokine production. Their second function is supporting wound repair by controlling inflammatory cells and expression of growth factors like vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, and keratinocyte growth factor [9]. Thus, these cells affect both the critical inflammatory stage and the healing stage after the improvement of the patient's condition.

The other severe and fatal disease for which human stem cells can be the new therapeutic method is cystic fibrosis. The CFTR gene mutation, encoding a protein kinase A-regulated anion channel necessary to the absorption and secretion of

chloride and bicarbonate ions, is the cause of CF. ESCs and iPSCs with blocked CFTR genes can be useful in both in vitro and in vivo research about cystic fibrosis to better understand this illness's pathophysiology and new accelerate new treatment discovery. In clinical trials, there are suggestions that mesenchymal stem cells, with their anti-inflammatory and anti-bacterial activities, paracrine mediators, and ability to differentiate to airway epithelial cells, can be useful in tissue repair combined with cytoprotective effect. Other cells, such as autologous hematopoietic stem cells, could also be modified to express the correct CFTR gene and transplanted to the patient [8].

COVID-19

One of the newest research type involving human stem cells aims to treat complications of Coronavirus disease 2019, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Mesenchymal stem cells were used in H5N1 viral infection therapies and showed effective modification of lung pathophysiology. Recent studies from China, Spain, and the United States proved that the use of mesenchymal stem cells (umbilical cord mesenchymal stem cells) improves patient clinical conditions, confirming the results of laboratory tests. C-reactive protein, interleukin-6, tumour necrosis factor- α , ferritin, LDH, lung inflammation symptoms, and a fraction of inspired O₂ showed a decline when lymphocytes, neutrophils, interleukin-10, and pulmonary function increased [4]. Seyed-Mohammad Reza Hashemian et al., in their clinical trials, suggests similar conclusions. Additionally, a decrease in interleukin-8 and interferon- γ , and an increase in interleukin-4 was reported. All trials proved that high doses of MSCs are relatively safe, well-tolerated, and can meaningfully improve patients' clinical condition [16].

ORTOPHOEDICS

In orthopaedics, scientists try to find applications for human stem cells in treatment of several diseases. First of all, treating long-bone defects was investigated in a few trials. Durfane et al. used autologous adipose stem cells transplanted into the damaged bone in the special artificial 3D-structure. There were no observed acute or long-term side effects. Moreover, human stem cells showed a positive effect on the treatment of osteonecrosis. Bone marrow aspirate concentrate or MSCs, in a trial performed by Sen et al., showed long-term pain relief, reduced clinical joint symptoms, and improved condition of the necrotic hips. Similar effects and stimulation of progenitor cells were noticed in long bone non-union fractures, tibial osteotomies, distraction osteogenesis, spine fusion, and other fractures. In osteoarthritis, stem cells provoke cartilage regeneration and create hyaline-like tissue with usually complete coverage of damaged area by new cells [18]. Different types of stem cell injections could be successfully applied in osteoarthritis treatment [31], but it is necessary to have more data before implementing this therapy in daily practice.

NEUROLOGY

Alzheimer's disease is one of the most severe neurological illnesses. In clinical trials, scientists use embryonic stem cells, mesenchymal stem cells, brain-derived neural stem cells, and induced pluripotent stem cells. The desirable therapeutic mechanism relies on the modulation of inflammation, protection from amyloid-beta neurotoxicity, stimulation neurogenesis and synaptic connectivity, anti-amyloidogenic activity, and regeneration of depleted neural networks. Several pre-clinical studies showed positive effects with significant changes in the examination, such as decreased hippocampal amyloid b deposit and reduced number of amyloid b plaques, as well as reduced pro-inflammatory cytokines (IL-1B, TNF- α), and increased anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, TNF β). Moreover, clinical studies using MSCs showed safety and tolerability. Only one clinical trial didn't show any clinical improvement 24 months after injections, but a few still undergoing [13].

In multiple sclerosis, the best-researched cells are MSCs and bone marrow-derived cells. Many trials show promising results for stem cell therapies. Primary remyelination, which is the main goal of therapies, was observed after injections with MSCs and BMDCs. While the mechanism of this occurrence is unclear, these cells can migrate into the brain and spinal cord. Their next therapeutic function is the suppression of inflammation and immune modulation, which is also used in other areas of medicine. Moreover, neuroprotection and suppression of axon apoptosis have a meaningful impact on patient condition [38].

In Parkinson's disease, dopaminergic neurons are gradually damaged, which causes tremor, slowness of movement, rigidity, and postural instability. The first stem cell transplantation for treatment of this disease was performed using foetal cells [29, 30, 39]. Because of the ethical problems, there is no chance to create standardized therapy based on the aforementioned cells, despite the effectiveness in dopaminergic neurons' regeneration. An alternative therapy could be based on pluripotent stem cells [29], which are similar to embryonic cells, and give comparable functional properties. Scientists expect that stem cell transplantation will give similar effects to levodopa (pharmacological treatment), improve clinical conditions, reduce bradykinesia, rigidity, dystonia, tremor, pain, and improve facial expression [30].

CONCLUSIONS

Human stem cells have great potential in almost every field of medicine. Their regenerative abilities seem to be a solution for many diseases that involve significant damage of physiological tissue. On the other hand, they can also be an excellent marker for the development of various diseases. Many cell types and a wide range of isolation methods give possibilities to find a treatment suitable cell pop-

ulation showing the best effectiveness. Unfortunately, their potential for uncontrolled and untargeted differentiation is a serious threat. Obtaining the desired way to control stem cells and direct their capacity to multiplication is probably a solution for most methodological problems. Thus, the need to better understand the aforementioned cells is undeniable, but the current conclusions nevertheless offer great hopes for the development of future therapies.

REFERENCES

- [1] AHN SY, PARK WS, SUNG SI, CHANG YS. Mesenchymal stem cell therapy for intractable neonatal disorders. *Pediatr. Neonatol.* 2021; **62 Suppl 1**: 16-21.
- [2] ARBATLI S, ASLAN GS, KOCABAŞ F. Stem cells in regenerative cardiology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; **1079**: 37-53.
- [3] ARJMAND B, GOODARZI P, MOHAMADI-JAHANI F, FALAHZADEH K, LARIJANI B. Personalized regenerative medicine. *Acta Med. Iran.* 2017; **55**: 144-9.
- [4] BASIRI A, MANSOURI F, AZARI A ET AL. Stem Cell Therapy Potency in Personalizing Severe COVID-19 Treatment. *Stem Cell Rev Rep.* 2021; **17**: 193-213.
- [5] BITTLE GJ, MORALES D, DEATRICK KB ET AL. Stem cell therapy for hypoplastic left heart syndrome mechanism, clinical application, and future directions. *Circ Res.* 2018; **123** :288-300.
- [6] BUI TVA, HWANG J-W, LEE J-H, PARK H-J, BAN K. Challenges and Limitations of Strategies to Promote Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells for Cell-Based Cardiac Repair. *Korean Circ. J.* 2021; **51**: 97.
- [7] CABLE J, FUCHS E, WEISSMAN I ET AL. Adult stem cells and regenerative medicine—a symposium report. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2020; **1462**: 27-36.
- [8] CONESE M, BECCIA E, CASTELLANI S ET AL. The long and winding road: Stem cells for cystic fibrosis. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2018; **18**: 1-12.
- [9] CURLEY GF, MCAULEY DF. Stem cells for respiratory failure. *Curr. Opin. Crit. Care* 2015; **21**: 42-9.
- [10] DESGRES M, MENASCHÉ P. Clinical Translation of Pluripotent Stem Cell Therapies: Challenges and Considerations. *Cell Stem Cell* 2019; **25**: 594-606.
- [11] DING DC, CHANG YH, SHYU WC, LIN SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new era for stem cell therapy. *Cell Transplant.* 2015; **24**: 339-47.
- [12] DULAK J, SZADE K, SZADE A, NOWAK W, JÓZKOWICZ A. Adult stem cells: Hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim. Pol.* 2015; **62**: 329-37.
- [13] DUNCAN T, VALENZUELA M. Alzheimer’s disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Res. Ther.* 2017; **8**: 1-9.
- [14] EYLERT G, DOLP R, PAROUSIS A ET AL. Skin regeneration is accelerated by a lower dose of multipotent mesenchymal stromal/stem cells – a paradigm change. *Stem Cell Res. Ther.* 2021; **12**: 1-11.
- [15] GORADEL NH, HOUR FG, NEGAHDARI B ET AL. Stem Cell Therapy: A New Therapeutic Option for Cardiovascular Diseases. *J. Cell. Biochem.* 2018; **119**: 95-104.
- [16] HASHEMIAN SMR, ALIANNEJAD R, ZARRABI M ET AL. Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID-19-induced ARDS patients: a case series. *Stem Cell Res. Ther.* 2021; **12**: 1-12.
- [17] HASSANPOUR M, AGHAMOHAMADZADE N, CHERAGHI O, HEIDARZADEH M, NOURI M. Current status of cardiac regenerative medicine; An update on point of view to cell therapy application. *J. Cardiovasc. Thorac. Res.* 2020; **12**: 256-68.
- [18] IM G IL. Clinical use of stem cells in orthopaedics. *Eur. Cells Mater.* 2017; **33**: 183-96.

- [19] KANJI S, DAS H. Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. *Mediators Inflamm.* 2017; **2017**.
- [20] KIMBREL EA, LANZA R. Next-generation stem cells — ushering in a new era of cell-based therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; **19**: 463-79.
- [21] KOSARIC N, KIWANUKA H, GURTNER GC. Stem cell therapies for wound healing. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2019; **19**: 575-85.
- [22] LEE SE, LEE SJ, KIM SE ET AL. Intravenous allogeneic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *JCI Insight* 2021; **6**: 143606.
- [23] LI Y, YE Z, YANG W, ZHANG Q, ZENG J. An Update on the Potential of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Diseases. *Stem Cells Int.* 2021; **2021**.
- [24] MAZINI L, ROCHETTE L, ADMOU B, AMAL S, MALKA G. Hopes and limits of adipose-derived stem cells (ADSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; **21**: 1306.
- [25] MENASCHÉ P, VANNEAUX V. Stem cells for the treatment of heart failure. *Curr. Res. Transl. Med.* 2016; **64**: 97-106.
- [26] MOHR A, ZWACKA R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer – From cells to ghosts. *Cancer Lett.* 2018; **414**: 239-49.
- [27] MÜLLER P, LEMCKE H, DAVID R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases-Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018; **48**: 2607-55.
- [28] OH S, JANG AY, CHAE S ET AL. Comparative analysis on the anti-inflammatory/immune effect of mesenchymal stem cell therapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Sci. Rep.* 2021; **11**: 1-15.
- [29] PARMAR M. Towards stem cell based therapies for parkinson's disease. *Dev.* 2018; **145**: dev156117.
- [30] PARMAR M, GREALISH S, HENCHCLIFFE C. The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2020; **21**: 103-15.
- [31] PAS HI, WINTERS M, HAISMA HJ, KOENIS MJ, TOL JL, MOEN MH. Stem cell injections in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *Br. J. Sports Med.* 2017; **51**: 1125-33.
- [32] PÄTH G, PERAKAKIS N, MANTZOROS CS, SEUFERT J. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus — Focus on mesenchymal stem cells. *Metabolism.* 2019; **90**: 1-15.
- [33] VAN PHAM P. Clinical trials for stem cell transplantation: When are they needed? *Stem Cell Res. Ther.* 2016; **7**: 16-8.
- [34] PIXLEY JS. Mesenchymal stem cells to treat type 1 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 2020; **1866**: 165315.
- [35] RAMESHWAR P, MOORE CA, SHAH NN, SMITH CP. An update on the therapeutic potential of stem cells. *Methods in Molecular Biology.* Vol1842. 2018.
- [36] RIKHTEGAR R, PEZESHKIAN M, DOLATI S ET AL. Stem cells as therapy for heart disease: iPSCs, ESCs, CSCs, and skeletal myoblasts. *Biomed. Pharmacother.* 2019; **109**: 304-13.
- [37] SÁVIO-SILVA C, BEYERSTEDT S, SOINSKI-SOUSA PE ET AL. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Diabetic Kidney Disease: A Review of the Studies Using Syngeneic, Autologous, Allogeneic, and Xenogeneic Cells. *Stem Cells Int.* 2020; **2020**: 8833725.
- [38] SCOLDING NJ, PASQUINI M, REINGOLD SC, COHEN JA. Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis. 2017; **140**: 2776-96.
- [39] TAKAHASHI J. iPSC cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regen. Ther.* 2020; **13**: 18-22.
- [40] WERNLY B, MIRNA M, REZAR R ET AL. Regenerative cardiovascular therapies: Stem cells and beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; **20**: 1-13.
- [41] YANG G, SAU C, LAI W, CICHON J, LI W. Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science.* 2014; **344**: 1173-8.
- [42] YANG R, WANG J, CHEN X, SHI Y, XIE J. Epidermal Stem Cells in Wound Healing and Regeneration. *Stem Cells Int.* 2020; **2020**: 1-14.

Editor – Maciej Zabel

Received: 15.03.2021

Accepted: 29.03.2021

Bartosz Kempisty Ph.D.

Department of Histology and Embryology, Department of Anatomy

Poznań University of Medical Sciences

6 Świącickiego St., 60-781 Poznań, Poland

tel./fax: +48 61 8546567 / +48 61 8546568

e-mail: bkempisty@ump.edu.pl

OPTOGENETYKA JAKO NARZĘDZIE W BADANIACH NAD CHOROBAŁ ALZHEIMERA

OPTOGENETICS AS A TOOL IN THE STUDY OF ALZHEIMER'S DISEASE

Sylwia SAMOJEDNY¹, Patrycja PAŃCZY SZYN-TRZE WIK²,
Magdalena SOWA-KUĆ MA²

¹Studenckie Koło Naukowe Fizjologii „Neuron”, Instytut Nauk Medycznych,
Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

²Zakład Fizjologii Człowieka, Instytut Nauk Medycznych, Kolegium Nauk
Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

Streszczenie: Choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer's disease*, AD) jest przewlekłym, postępującym schorzeniem, którego etiopatogeneza do dziś nie została w pełni wyjaśniona. Ostępienie będące końcową częścią procesu zmian neuropatologicznych w przebiegu AD, stanowi olbrzymie obciążenie dla społeczeństwa i wymaga rozwoju nowych narzędzi (w tym nowoczesnych technik biologii molekularnej) dających możliwość lepszej charakterystyki podłoża tej choroby i wyznaczenia nowych kierunków terapeutycznych. Optogenetyka jest jedną z nowszych technik wykorzystywanych w badaniu mechanizmów chorób układu nerwowego, która umożliwia monitorowanie aktywności neuronów poprzez modyfikację ich fizjologicznych funkcji. Metoda ta polega na kontrolowaniu aktywności neuronalnej za pomocą światła. Wrażliwość komórek na światło uzyskuje się poprzez wprowadzenie do organizmu genów kanałów jonowych alg lub bakterii, które ulegają wbudowaniu w błonę komórkową, a następnie wzbudzają się po zadzia łaniu światłem. W zależności od użytego genu można uzyskać nasilenie lub zahamowanie aktywności komórki nerwowej. Niniejsza publikacja ma na celu przybliżenie podstaw optogenetyki i stanowi przegląd prac związanych z jej zastosowaniem w badaniu patomechanizmów AD.

Słowa kluczowe: choroba Alzheimera; optogenetyka; opsyny

Summary: Alzheimer's disease, (AD) is a chronic and progressive disorder whose etiology has not been fully elucidated to this day. Dementia, the final part of neuropathological changes in AD, is an enormous burden on society and requires the development of new tools (including modern molecular biology techniques) to determine the causes of this disease and setting new drug targets. Optogenetics is the new experimental method for studying the mechanisms of the nervous system disorders, which allows monitoring the activity of individual neurons by modifying their functions.

This method involves the use of light to control neural activity. Light-sensitive cells are achieved by introducing into the body genes of algae or bacteria ion channels, which are incorporated into the cell membrane and then excited when exposed to light. Depending on the gene used, the activity of the nerve cell can be increased or inhibited. The main aim of this publication was to present the current knowledge of optogenetics and its potential application in the study of AD pathomechanisms.

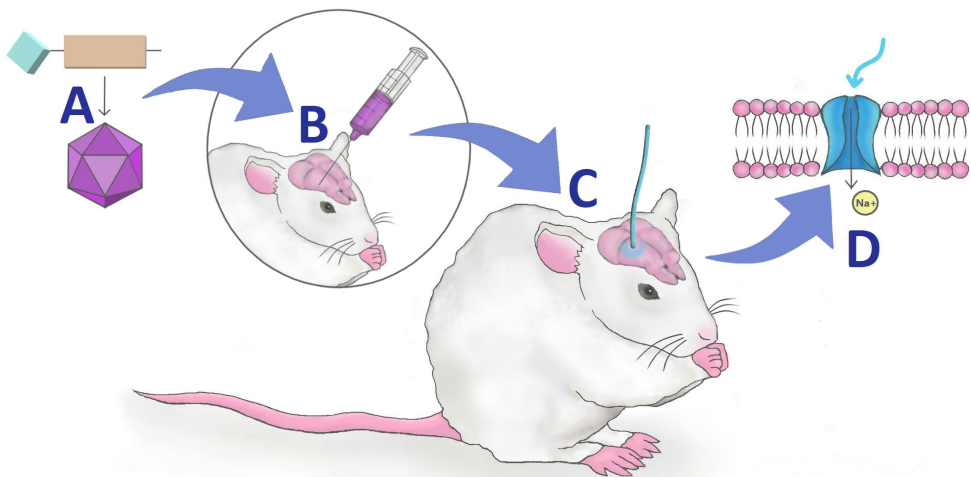
Keywords: Alzheimer's disease; optogenetics; opsins

WSTĘP

Choroba Alzheimera została opisana po raz pierwszy ponad 100 lat temu przez niemieckiego psychiatrę i neuropatologa Aloisa Alzheimera, który przez 5 lat zajmował się leczeniem 50-letniej pacjentki z postępującym zanikiem funkcji poznawczych, manifestowanym problemami z pamięcią, nieprzewidywalnym zachowaniem i ograniczoną zdolnością pojmowania otaczającej ją rzeczywistości. Po jej śmierci w 1906 r., przeprowadził sekcję zwłok, w trakcie której zauważył odmienności w mózgu i opisał je jako ogniska odkładania się nieznanego mu substancji w korze mózgu i osobliwe zmiany w neurofibrylach [30]. Obecnie wiadomo, że głównym wyznacznikiem procesów patologicznych zachodzących w mózgu jest obecność położonych zewnątrzkomórkowo złogów amyloidu beta (ang. *amyloid beta*, A β) i wewnątrzkomórkowo spletków neurofibrilarnych (ang. *neurofibrillary tangles*, NFTs), skutkująca degeneracją neuronów [31]. Dzięki nowoczesnym metodom badawczym możliwy jest ciągły postęp w lepszym rozumieniu funkcjonowania mózgu, związany zarówno z jego prawidłową pracą jak i w stanach chorobowych. Szczególnie godnym uwagi rozwiązaniem wydaje się optogenetyka, której precyzja pozwalająca na selektywną aktywację wybranych grup komórek stwarza obiecujące perspektywy badawcze.

W ujęciu ogólnym, optogenetyka jest nową i intensywnie rozwijającą się gałęzią nauki zajmującą się tworzeniem komórek wrażliwych na światło. Pierwsze spekulacje związane z jej powstaniem pojawiły się już w 1979 r., kiedy to James Watson zauważając ograniczenia ówczesnych metod, postulował powstanie techniki polegającej na pobudzaniu tylko wybranych neuronów, a nieco później, na jednym ze swoich wykładów, zaproponował wykorzystanie do tego celu światła [4]. Niezależnie od tej koncepcji, już kilka lat wcześniej (w 1971 r.), dwójka badaczy D. Oesterhelt i W. Stoeckenius odkryła w błonie bakterii *Halobacterium halobium* białko bakteriorodopsynę pełniące funkcję pompy aktywowanej zielonym światłem [24]. Następne lata przyczyniły się do opisanie nowych białek z grupy opsyn (glikoproteiny będące składnikami światłoczułych barwników) funkcjonujących jako pompy i kanały błonowe w odpowiedzi na działanie światła o określonej długości fali. Przez długi czas odkrycia te nie przekładały się na wykorzystanie białek w badaniach z użyciem żywych organizmów. Największe obawy

związane były bowiem z dostarczeniem genów opsyn, w ilości pozwalającej uzyskać wymierny efekt w postaci zmiany aktywności komórkowej. Przełom w ich wykorzystaniu nastąpił dopiero w 2005 roku, kiedy to grupa naukowców pod kierunkiem ES. Boydena z wykorzystaniem wektora lentiwirusowego zaindukowała gen kanałoropsyny ChR2 w neuronach szczurzego hipokampa (parzysta struktura zlokalizowana w płacie skroniowym mózgu), uzyskując nad nimi kontrolę po stymulacji krótkimi impulsami światła niebieskiego [3]. W tym samym roku zespół G. Nagela dowiódł, że ChR2 w komórkach nicienia *Caenorhabditis elegans* oddziałuje na jego aktywność motoryczną, gdyż po zastosowaniu niebieskiego światła aktywującego opsynę zauważono wyraźne obkurczenie ciała zwierzęcia, którego nie zaobserwowano w grupie kontrolnej [23]. Efekty były na tyle obiecujące, że już 2 lata później Zhang i współpracownicy podjęli próbę zaindukowania w neuronach motorycznych *Caenorhabditis elegans* genów zarówno ChR2 jak i halorodopsyny NpHR (ang. *halorhodopsin*), udowadniając tym samym możli-



RYCINA 1. Schemat działania optogenetyki na przykładzie zastosowania ChR2. A: wstawienie genu opsyny i znacznika fluorescencyjnego wraz z promotorem i włączenie ich do wirusa stanowiącego wektor; B: wstrzyknięcie wirusa do wybranego regionu mózgu, który dzięki promotorowi znajduje docelowe komórki i wywołuje w nich ekspresję genów opsyn; C: zastosowanie niebieskiego światła za pomocą włókna optycznego, które powoduje D: aktywację i depolaryzację neuronu. Opracowanie własne na podstawie [28]

FIGURE 1. Diagram of optogenetics on the example of the use of ChR2. A: insertion of the opsin gene and the fluorescent tag together with the promoter and their integration into the vector virus; B: injection into a selected region of the brain of the virus which, thanks to a promoter, finds target cells and expresses the opsin genes therein; C: application of blue light by means of an optical fiber which causes D: activation and depolarization of the neuron. Based on [28]

wość kontroli różnych opsyn w jednym organizmie [39]. W ten właśnie sposób powstała metoda zwana optogenetyką, która bazuje na indukowaniu genów opsyn, ukierunkowanych promotorem, do wybranych populacji neuronów, za pomocą wektora (najczęściej wirusowego), a następnie ich aktywację poprzez zadziaływanie światłem (**Ryc. 1**). Obecne próby wykorzystania tej metody koncentrują się na wielu schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego m.in. chorobie Huntingtona, chorobie Parkinsona, epilepsji czy też AD [17, 26, 37, 38]. Optogenetyka znalazła również zastosowanie w schorzeniach układu krążenia pozwalając na modulację akcji serca, czy też ciśnienia krwi, udowadniając tym samym niezwykle szerokie spektrum użycia opsyn do kontroli różnych narządów za pomocą światła [14].

OPSYNY – KLASYFIKACJA

Grupę opsyn można sklasyfikować na kilka sposobów, np. uwzględniając ich pochodzenie, funkcje, strukturę cząsteczki, czy typ chromoforu. Najczęściej dokonuje się podziału na dwa typy, mając na uwadze ich pochodzenie. Opsyny typu I występują w postaci kanału lub pompy u bakterii, glonów i archeonów. Ze względu na fakt, że znacznie szybciej wpływają na pobudliwość neuronów niż opsyny typu II, znalazły zastosowanie w modulacji aktywności komórkowej.

TABELA 1. Podział opsyn z uwzględnieniem ich źródła pochodzenia i wpływu na aktywność komórkową. Opracowanie własne na podstawie [4, 5, 9, 39]

TABLE 1. Classification of opsins considering their origin and effect on cellular activity. Based on [4, 5, 9, 39]

CHARAKTER DZIAŁANIA	OPSYNA	ŹRÓDŁO
Pobudzający	ChR2	występuje w błonie komórkowej algi <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
	VChR1	występuje w błonie komórkowej algi <i>Volvox carteri</i>
	ChETA	powstała na bazie ChR2
	ChIEF SSFO	chimera ChR2 i ChR1 syntetyczna, o długim okresie działania
Hamujący	NpHR	występuje w błonie komórkowej archebakterii <i>Natronomonas pharaonis</i>
	Arch	występuje w błonie komórkowej archebakterii <i>Halorubrum sodomense</i>

Z kolei opsyny typu II są receptorami sprzężonymi z białkiem G i zdecydowanie wolniej reagują na światło niż typ I. Występują u zwierząt, biorą udział w procesie widzenia i regulacji rytmów dobowych. Obydwa typy do swojego

działania wymagają retinalu, który po przyłączeniu się do opsyny tworzy rodopsynę. Jest to białko wrażliwe na światło, które po absorpcji fotonu światła zmienia swoją konformację, czego konsekwencją jest modyfikacja potencjału błonowego komórki [9]. Początkowo występowały obawy odnośnie braku retinalu w mózgu, ale okazało się, że mózg ssaków zawiera jego niewielkie ilości, które są wystarczające do prawidłowego działania opsyn [4].

W zależności od efektu wywieranego na komórkę, opsyny można podzielić na pobudzające i hamujące (**Tab. 1**).

OPSYNY POBUDZAJĄCE

Do tej grupy, warunkującej depolaryzację błony komórkowej, zaliczamy m.in. kanałorodopsyny: ChR2 (ang. *Channelrhodopsin-2*), VChR1 (ang. *Channelrhodopsin-1*), stopniowo działające SFOs (ang. *Step-Function Opsins*) i ultraszybkie syntetyczne ChETA (powstała na bazie ChR2 w wyniku mutacji punktowej E123T) oraz ChIEF (chimera ChR2 i ChR1) [9, 18]. ChR2 pochodzi z *Chlamydomonas reinhardtii* i jest kanałem aktywowanym niebieskim światłem, co indukuje napływ jonów sodu do wnętrza komórki i jej depolaryzację. Potwierdzono, że obecność ChR2 nie zaburza czynności błony komórkowej, nie zwiększa również ryzyka apoptotycznej śmierci neuronów [3]. ChR2 była pierwszą opsyną użytą w doświadczeniach z zakresu optogenetyki i dzięki swojej skuteczności znalazła szerokie zastosowanie w tej dziedzinie. Z kolei VChR1 pochodzi z *Volvox carteri* i również jest kanałorodopsyną wywołującą depolaryzację. W odróżnieniu od poprzedniej jest aktywowana światłem żółtym i zielonym. Ze względu na największe wzbudzenie światłem o długości fali 535 nm określa się ją jako przesuniętą w stronę czerwieni w porównaniu do ChR2 (długość fali wzbudzenia: 460 nm). Jest to niezwykle istotna cecha w sytuacjach wprowadzenia dwóch lub więcej rodzajów opsyn (i konieczności aktywacji tylko jednej z nich), dzięki której nie dochodzi do pokrywania się różnych widm [9]. ChR2 jest przedmiotem intensywnych badań i ciągłych modyfikacji, czego przykładem jest mutacja jednogenowa polegająca na zastąpieniu argininy histydyną w położeniu 134, która wywołała wzmocnienie prądów komórkowych i wolniejsze zamykanie kanałów jonowych, a wariant ten nazwano H134R. Z drugiej strony, opracowanie opsyn ChETA i ChIEF, które zamykają się szybciej, uniemożliwiło w ten sposób występowanie dodatkowych potencjałów czynnościowych po zastosowaniu pojedynczego impulsu [5, 19]. Dzięki temu ChETA znalazła zastosowanie w walce z glejakiem, gdyż dostarczenie jej i aktywacja wyłącznie w komórkach nowotworowych doprowadziła do ich nadmiernej depolaryzacji, apoptozy a w konsekwencji spadku objętości guza [36]. Przeciwnieństwem do nich jest SFO otrzymana w wyniku dokonanej zamiany cysteiny na serynę, alaninę lub treoninę w pozycji 128 łańcucha polipeptydowego białka ChR2. Mutacja ta ma na celu wydłużenie aktywności kanału nawet po wyłączeniu światła. Z drugiej strony, aktywność SFO można zahamować w dowolnym momencie poprzez zastosowanie żółtego impulsu. Kolej-

na SFO (ChR2 D156A) wykazuje funkcjonowanie do ośmiu minut, a połączenie tych obu zmian spowodowało powstanie SSFO (ang. *Stabilized SFO*) działającej do pół godziny po zakończeniu stymulacji światłem. Istotną zaletą wynikającą z jej właściwości jest duża wrażliwość na iluminację, dzięki czemu można zastosować mniej inwazyjne metody do pobudzania głębiej położonych obszarów mózgu [9].

OPSYNY HAMUJĄCE

Kolejna grupa opsyn jest wykorzystywana do hamowania aktywności neuronów. Należy do niej halorodopsyna NpHR i pompy wywołujące odprowadzenie protonów na zewnątrz komórki (np. Arch występująca w błonie komórkowej archebakterii *Halorubrum sodomense*). NpHR pochodzi z archebakterii *Natronomonas pharaonis* i powoduje napływ jonów chloru do wnętrza komórki pod wpływem żółtego światła, indukując w ten sposób hiperpolaryzację. Początkowo problemem okazała się ekspresja NpHR, do której dochodziło w retikulum endoplazmatycznym, jednak dzięki dokonanym modyfikacjom powstała jej ulepszona wersja eNpHR3.0 mająca znacznie większe powinowactwo do błony komórkowej [9]. Ekspresja opsyn jest możliwa do weryfikacji dzięki związanym z nimi barwnikami fluorescencyjnymi (np. białko 190 żółtej fluorescencji – ang. *yellow fluorescent protein*, YFP; tdTomato, mCherry) dostarczonymi wspólnie na wektorze wirusowym, umożliwiającymi późniejsze wykrycie wyznakowanych neuronów [13]. Barwniki fluorescencyjne są wzbudzone światłem o określonej długości fali (np. 530 nm dla tdTomato), a uwidocznione w ten sposób neurony analizowane mikroskopowo pod względem lokalizacji, czy gęstości ich występowania, w wybranym fragmencie badanego obszaru. Uzyskane wyniki stanowią wskaźnik dynamiki procesów, w które zaangażowane są wyznakowane populacje komórek [16].

METODY WPROWADZANIA GENÓW OPSYN

Sukces metody uzależniony jest od wielu czynników, w szczególności od prawidłowego zaindukowania genu opsyny i uzyskania jej ekspresji. Właściwe dostarczenie genu opsyny może być osiągnięte na wiele różnych sposobów. Jednym z nich jest mikroiniekcja wektora wirusowego kierowanego przez promotor specyficzny dla danej populacji komórek. Można je stosować u szerokiej grupy zwierząt, od gryzoni aż po naczelne, wprowadzając do komórki docelowej wiele kopii genów, zapewniając tym samym wysoki poziom ekspresji. Wektory te są dobrze tolerowane przez długi czas a ich działanie nie powoduje skutków ubocznych. Najczęściej stosuje się wirusy zależne od adenowirusów (ang. *adeno-associated virus*, AAV) i lentiwirusy, choć w użyciu są także wirus opryszczki (ang. *herpes simplex virus*, HSV-1) lub wirus wścieklizny [9]. Powszechnie wykorzystywanym promotorem jest acetylotransferaza cholinowa wykazująca powinowactwo

do neuronów cholinergicznym lub kinaza II α zależna od wapnia i kalmoduliny (ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Iia*, α CaMKII) [2, 20]. W przypadku α CaMKII należy jednak zachować ostrożność w aplikowaniu, gdyż zespół Miyashity wykazał, że jej 80-dniowa ekspresja w skojarzeniu z ChR2 może skutkować nieprawidłowościami w budowie aksonów w postaci cylindrycznych i kielichowatych zwyrodnień, których nie zauważono po zmianie promotora na CAG (swoją nazwę zawdzięcza wchodzącym w jego skład sekwencjom: wirusa cytomegalii – CMV, kurzej beta-aktyny oraz króliczej beta-globiny) [10, 20]. Największą niedogodnością w użyciu wektorów wirusowych jest ich ograniczona pojemność, co zmniejsza możliwości stosowania promotorów o większych rozmiarach i tym samym ogranicza ich dostarczanie do wybranych populacji komórek. Problem ten został rozwiązany dzięki transgenicznym zwierzętom posiadającym rekombinazę Cre w komórkach, do których należy wprowadzić gen opsyny. Rekombinaza Cre jest enzymem odpowiedzialnym za rekombinację DNA pomiędzy sekwencjami loxP, które występują po obu stronach dostarczanego genu opsyny. Każda z sekwencji loxP zbudowana jest z 34 par zasad, a ich ukierunkowanie względem siebie pozwala na usunięcie lub odwrócenie fragmentu DNA między nimi w obecności rekombinazy Cre. Poprzez wstrzyknięcie w wybrany obszar mózgu wektora wirusowego dostarcza się odwróconą sekwencję genu opsyny oflankowaną sekwencjami loxP. Ostatecznie, do zadziałania rekombinazy Cre i wbudowania genu opsyny w błonę neuronu powinno dojść jedynie w docelowych komórkach wykazujących ekspresję rekombinazy u transgenicznym zwierząt [33].

WZBUDZANIE ŚWIATŁEM

Warunkiem aktywacji opsyn jest ich wzbudzenie poprzez zastosowanie światła o odpowiedniej długości fali. Dokonuje się tego z reguły poprzez zastosowanie laserów lub diod elektroluminescencyjnych (LED). Rozważając wybór metody należy uwzględnić m.in. takie czynniki jak lokalizacja aktywowanych neuronów, intensywność światła, jak również koszty [35]. Obydwie te metody są inwazyjne, gdyż zarówno implantacja LED jak i włókien związanych z laserami wymaga zabiegu operacyjnego, jednak mogą być stosowane zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [5]. Implanty LED w doświadczeniach ze stymulacją powierzchniowych warstw kory mogą być umieszczone bezpośrednio nad mózgiem, ale ich użyteczność jest ograniczona w przypadku głębiej położonych regionów, gdyż mają niską wydajność w skojarzeniu z włóknami optycznymi i podczas swojej pracy generują ciepło. Włókna optyczne można przyciąć do odpowiedniej długości i umieszczać jedno- lub dwustronnie, a ich implantacja odbywa się na drodze kaniulacji [35]. Ze względu na wyżej wymienione trudności, w większości badań, wykorzystuje się lasery, które są lepiej zintegrowane ze światłowodami, mają

wysoką moc i mogą być stosowane w połączeniu z innymi metodami [9]. Jedną z nich, w celu monitorowania aktywności elektrofizjologicznej, jest użycie elektrod wolframowych lub silikonowych, których odczyt pozwala na stwierdzenie czy dana opsy na rzeczywiście została pobudzona, a jeśli tak, to z jaką mocą [5].

ZASTOSOWANIE OPTOGENETYKI W BADANIACH NAD CHOROBAŁ ALZHEIMERA

Trudności w jednoznacznym ustaleniu mechanizmów patogenezы AD i ograniczone możliwości diagnostyczno-terapeutyczne skłaniają do poszukiwania nowych metod „walki” z tą chorobą. Interesujące rozwiązanie stanowi optogenetyka, gdyż jej selektywność w aktywacji docelowych sieci neuronalnych pozwala precyzyjnie wskazać miejsca, w których dochodzi do dysfunkcji. Zastosowanie tej techniki w zwierzęcych modelach AD przyczynia się do lepszego poznania patomechanizmu choroby. Co więcej, przynosi również efekty w postaci poprawy wyników w testach behawioralnych, w porównaniu do zwierząt AD niepoddanych optogenetycznej stymulacji. Metody optogenetyczne obejmują szerokie spektrum hipotez dotyczących genezy choroby, zaś w kontekście neuroanatomicznym skupiają się przede wszystkim na formacji hipokampa. Hipokamp stanowi obiekt intensywanych badań, gdyż za pomocą rezonansu magnetycznego wielokrotnie wykazano u pacjentów z AD atrofię wszystkich jego obszarów (w szczególności CA1) w porównaniu do osób zdrowych [1, 6]. Roy i współpracownicy postanowili sprawdzić za pomocą optogenetyki, czy pogorszenie pamięci we wczesnych stadiach choroby związane jest z zaburzeniem procesu konsolidacji, czy też rekonsolidacji śladów pamięciowych, a następnie czy zmiany te można odwrócić. W doświadczeniu, myszy poddano testowi kontekstowego warunkowania strachem (ang. *contextual fear conditioning*, CFC) i zauważono, że te, które stanowiły model początkowego AD zatrzymywały się w bezruchu znacznie słabiej niż kontrolne. Następnie u obu grup, za pomocą niebieskiego światła, przy częstotliwości 20Hz aktywowano ChR2 w neuronach zakrętu zębatego hipokampa (ang. *dentate gyrus*, DG), co pozwoliło na osiągnięcie takich samych wyników, jednak efekt utrzymywał się mniej niż jeden dzień. W synapsach drogi przesywającej (połączenia kory śródwchowej z formacją hipokampa) na komórkach DG za pomocą metod optogenetycznych, przy częstotliwości 100Hz za-indukowano długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long term potentiation*, LTP), które spowodowało wzrost liczby kolców dendrytycznych (niewielkich wypustek zlokalizowanych na końcach dendrytów) warunkujących lepsze rezultaty w CFC. Natomiast zniszczenie neuronów DG na drodze ablacji przyniosło odwrotny skutek. Optogenetyczne LTP pozwoliło także myszom, z modelowanym początkowym AD, przywrócić pamięci długotrwałej, które wykazano w testach

biernego unikania i rozpoznawania nowych obiektów. Badanie to wskazuje na potencjalny związek pogorszenia pamięci z zaburzeniem procesów jej rekonsolidacji, a wybiórcze pobudzanie komórek DG jako jedną z możliwych metod w leczeniu wczesnego stadium choroby [28, 29]. Perusini i współpracownicy również powiązali spadek zdolności poznawczych z dysfunkcją DG wykorzystując mysie modele AD z indukowanym systemem rekombinazy Cre. Zaobserwowano, że zwierzęta stanowiące model AD uzyskują znacznie gorsze wyniki w testach rozpoznawania innych osobników i CFC, a także mniej chętnie spędzają czas w nowo otwartym ramieniu labiryntu w kształcie litery Y. Optogenetyczna stymulacja niebieskim światłem przy częstotliwości 10Hz spowodowała aktywację ChR2, co pozwoliło myszom AD osiągnąć podobne rezultaty w treningu CFC. Analiza immunohistochemiczna mózgow zwierząt AD wykazała brak zsynchronizowanej aktywności komórek oznaczonych białkiem wzmocnionej żółtej fluorescencji (ang. *enhanced yellow fluorescent protein*, EYFP) z pozostałymi, których markerem była ekspresja genu *Arc* występującego w neuronach glutaminergicznych formacji hipokampa i odpowiadającego m.in. za konsolidację pamięci. Z kolei u myszy poddanych optogenetycznej stymulacji aktywność tych obu populacji komórek była skoordynowana. Wyniki te wskazują, że deficyty pamięci mogą być spowodowane pobudliwością niewłaściwych komórek podczas prób przywoływania wspomnień, co może leżeć u podstaw patomechanizmu AD [27]. Zastosowanie metod optogenetycznych przy częstotliwości 40Hz wpłynęło także na modyfikację morfologiczną mikrogleju i produkcję A β w mysim modelu AD. Za pomocą ChR2 przez godzinę pobudzano niebieskim światłem interneurony regionu CA1 hipokampa, co spowodowało spadek poziomu A β . Jednym z efektów było również zmniejszenie ilości C-końcowych i N-końcowych fragmentów białka prekursorowego amyloidu (ang. *amyloid precursor protein*, APP), które może wskazywać na jego zredukowane wytwarzanie. Za pomocą sekwencjonowania RNA wykazano silną ekspresję genów odpowiedzialnych za wzrost aktywności neuronalnej takich jak: *Nr4a1*, *Arc* i *Npas4*. Zaobserwowano również zwiększoną ekspresję genów związanych z regulacją migracji, adhezji i markerów proliferacji mikrogleju. Nie zauważono zmian w ekspresji genów markerów prozapalnych (IL-6, IL1- β), czy przeciwzapalnych (IGF-1). Zarejestrowano zmiany morfologiczne komórek mikrogleju w postaci zwiększenia ich średnicy, liczby a także skrócenie trwania podstawowych procesów fizjologicznych, czyli zmian prowadzących do zwiększenia właściwości fagocytarnych. Wyniki te znalazły potwierdzenie w obserwacjach wskazujących na znaczny wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego A β (85.6% vs. 31.7%). Podobnych zmian nie odnotowano w grupie kontrolnej, co jednoznacznie wskazuje na zwiększony wychwyty A β po zastosowaniu optogenetycznej stymulacji [11]. Inne badania również z udziałem ChR2, ale przy częstotliwości 10Hz i ekspresji tej opsyny w neuronach glutaminergicznych, wykazały spadek IL-6 i kwaśnego białka włóknikowego (ang. *glial fibrillary*

acidic protein, GFAP) będącego również markerem stanu zapalnego. Zauważono, że myszy z wstrzykniętym uprzednio do DG A β , poddawane przez 7 dni 5-minutowej optogenetycznej stymulacji, uzyskiwały znacznie lepsze wyniki w teście rozpoznawania nowości niż grupa kontrolna. Spędzały one zdecydowanie więcej czasu przy nowym obiekcie, jednak efekt ten nie był już zauważalny następnego dnia. Analiza immunohistochemiczna wykazała wzrost ekspresji NeuN i synapsyny w DG, a w hipokampie – receptorów mGluR5, podjednostek receptora NMDA (NMDAR; selektywnie aktywowany przez kwas N-metylo-D-asparaginowy) – GluN1 i receptora AMPA (AMPA; selektywnie aktywowane przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy) – GluR2. Zarówno mGluR5 jak i GluN1 są zaangażowane w powstawanie LTP, długotrwałego osłabienia synaptycznego (ang. *long-term depression*, LTD) w hipokampie i procesy uczenia się, co pozwala przypuszczać że optogenetyczna stymulacja wywiera istotny wpływ na lepszą konsolidację śladów pamięciowych i wskazuje zasadniczą rolę aktywacji neuronów glutaminergicznych w procesach powstawania pamięci krótkotrwałej [12, 21, 34]. Jak wykazali Zhang i współpracownicy optogenetyczna stymulacja GABA-ergicznych neuronów regionu CA1 hipokampa o częstotliwości w zakresie fal gamma pozwoliła na normalizację ich aktywności w mysich modelach AD. Przełożyło się to na poprawę wyników w labiryncie wodnym Morrisa, gdyż zwierzęta AD, w kolejnych dniach, znacznie zmniejszyły dystans do platformy w porównaniu z grupą kontrolną, w której nie doszło do aktywacji ChR2 niebieskim światłem. Zauważono, wzrost poziomów białka LC3 i bekliny 1 stanowiących markery procesu autofagii, a także spadek ekspresji GFAP i cytokin prozapalnych takich jak: TNF α , IL-1 β , IL-6. Za pomocą analizy immunohistochemicznej wykazano również spadek poziomu A β , a uzyskane wyniki wskazują selektywną stymulację neuronów GABA-ergicznych jako skuteczną metodę odwracania deficytów pamięci w AD [38]. O’Riordan i współpracownicy badając mechanizmy neuroplastyczności w AD zauważyli, że kompetencyjni i niekompetencyjni antagoniści receptora NMDA hamują powstawanie LTD indukowanego wcześniej optogenetyczną stymulacją o niskiej częstotliwości – 1Hz przy użyciu H134R w regionie CA3 szczurzego hipokampa. Wykazano także, że w fizjologicznych warunkach LTD jest symetryczne, a po obustronnym wstrzyknięciu A β zdecydowanie łatwiej zachodzi w lewym hipokampie. Efekt ten zostaje jednak zaburzony w obecności negatywnego modulatora allosterycznego receptora mGluR5, który wiążąc się w miejscu innym niż ligandy powoduje znacznie słabszą lateralizację [25]. Metody optogenetyczne wykorzystano również w badaniach nad rolą mechanizmów kompensacyjnych w AD. Jednym z nich jest sprouting zakończeń cholinergicznych w hipokampie, czyli rozgałęzianie się aksonów, mający na celu równoważenie ubytków glutaminergicznych z kory śródwęchowej. Zastosowano mysie modele AD z ekspresją ludzkiej apolipoproteiny – APOE3 lub APOE4 ze względu na fakt, że sprouting jest zależny od ApoE, gdyż

wpływa ona na transport cholesterolu i lipidów niezbędnych do budowy błon komórkowych. Zwierzętom uszkodzono korę śródwęchową i zauważono, iż samce APOE4 osiągają znacznie gorsze rezultaty w labiryncie Barnesa. Poddano je optogenetycznej stymulacji z wykorzystaniem ChR2 i po 30 dniach zaobserwowano cholinergiczny sprouting. Dane te znalazły odzwierciedlenie w poprawie wyników w labiryncie Barnesa, gdyż myszy łatwiej znajdowały drogę do wyjścia, a także odnotowano normalizację synchronicznych potencjałów o zwiększonej częstotliwości w DG wywołanych uprzednim uszkodzeniem kory śródwęchowej [2]. Przemiany A β w przebiegu AD mogą być również związane z zaburzeniem wolnych oscylacji, czyli fal mózgowych w zakresie 0,5-1Hz odpowiedzialnych m.in. za konsolidację pamięci podczas snu [22]. Zauważono, że mysie modele AD wykazują dysfunkcję w tym przedziale częstotliwości, którą można pokonać za pomocą optogenetyki. Aktywacja neuronów piramidowych V warstwy kory somatosensorycznej za pomocą ChR2 przy 1,2Hz spowodowała znaczny wzrost mocy fal, ale efekt ten zanikał po zaprzestaniu działania niebieskim światłem. Po miesięcznej stymulacji przy 0,6Hz i kolejnym miesiącu przerwy zauważono znaczny spadek poziomu A β , podczas gdy u myszy AD niepoddanych pobudzeniu wzrósł on niemal dwukrotnie. Warty odnotowania jest również fakt, że choć ekspresja ChR2 występowała tylko po lewej stronie, to efekt, w postaci zmniejszenia zawartości A β , widoczny był w obydwu półkulach. Pogorszenie funkcji neuronów piramidowych V warstwy kory somatosensorycznej w AD wiąże się także ze zmianami zwyrodnieniowymi aksonów wynikających m.in. z zaburzonej homeostazy wapniowej. Podczas tego badania zaobserwowano że optogenetyczna aktywacja hamuje ten proces na 3 miesiące, a także przywraca ekspresję receptorów GABA_A i GABA_B[15].

PODSUMOWANIE

AD jest obecnie nieuleczalną, wolno postępującą chorobą neurodegeneracyjną o słabo wyjaśnionej etiologii. Istotną zaletą optogenetyki pozwalającą na lepsze zrozumienie tego schorzenia jest pobudzanie, bądź też hamowanie jedynie określonych grup komórek, które pozwala wskazać miejsca, gdzie dochodzi do dysfunkcji. Jak dotąd, zastosowanie optogenetyki przyczyniło się do lepszego poznania patogenezy tej choroby uwzględniając czynniki takie jak: stan zapalny, wolne oscylacje, czy mechanizmy kompensacyjne stanowiąc tym samym cenną wskazówkę w wyznaczaniu nowych koncepcji dotyczących patomechanizmów AD [2, 11, 15]. Uzyskane w modelach zwierzęcych wyniki takie jak np. poprawa funkcji pamięciowych w testach behawioralnych stwarzają również możliwość nowych kierunków badań na terapię AD [28]. Metoda ta ciągle się rozwija – powstają nowe rodzaje opsyn i promotorów, co umożliwia np. kontrolę wieloopsy-

nową. Należy zauważyć także ograniczenia tej metody. W tym aspekcie wskazuje się, że największą wadą optogenetyki jest jej inwazyjność, chociaż obecne doświadczenia pokazują, że kaniulacja nie niesie za sobą poważanych powikłań. Kolejny problem stanowi czas utrzymywania się efektów optogenetycznej stymulacji, gdyż jak wykazali Wang i współpracownicy poprawa funkcji pamięciowych zanikała następnego dnia po upływie 7 dni codziennego 5-minutowego pobudzania światłem [34]. Z drugiej strony, przy zastosowaniu optogenetycznej stymulacji przez miesiąc korzystne efekty związane z zahamowaniem zmian zwyrodnieniowych aksonów, czy też przywróceniem prawidłowej ekspresji receptorów GABA_A i GABA_B utrzymywały się znacznie dłużej, gdyż aż 3 miesiące [15]. Póki co, głównie ze względu na swoją inwazyjność, optogenetyka stosowana jest przede wszystkim w laboratoriach. Jednak niezależnie od tego, czy metoda ta będzie w przyszłości przedmiotem badań klinicznych, ma bardzo duży potencjał i może istotnie wpłynąć na wyjaśnienie podłoża wielu chorób, a to z kolei przyczynić się do efektywniejszej farmakoterapii.

LITERATURA

- [1] APOSTOLOVA LG, GREEN AE, BABAKCHANIAN S, HWANG KS, CHOU YY, TOGA AW, THOMPSON PM. Hippocampal atrophy and ventricular enlargement in normal aging, mild cognitive impairment (MCI), and Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2012; **26**:17-27.
- [2] BOTT JB, HÉRAUD C, COSQUER B, HERBEAUX K, AUBERT J, SARTORI M, GOUTAGNY R, MATHIS C. APOE -Sensitive Cholinergic Sprouting Compensates for Hippocampal Dysfunctions Due to Reduced Entorhinal Input. *J Neurosci* 2016; **36**:10472-10486.
- [3] BOYDEN ES, ZHANG F, BAMBERG E, NAGEL G, DEISSEROTH K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 2005; **8**:1263-1268.
- [4] DEISSEROTH K. Controlling the Brain with Light. *Sci Am* 2010; **303**:48-55.
- [5] FENNO L, YIZHAR O, DEISSEROTH K. The Development and Application of Optogenetics. *Annu Rev Neurosci* 2011; **34**:389-412.
- [6] FRANKÓ E, JOLY O. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Evaluating Alzheimer's disease progression using rate of regional hippocampal atrophy. *PLoS One* 2013; **8**:e71354.
- [7] GALVAN A, STAUFFER WR, ACKER L, EL-SHAMAYLEH Y, INOUE KI, OHAYON S, SCHMID M C. Nonhuman Primate Optogenetics: Recent Advances and Future Directions. *J Neurosci* 2017; **37**:10894-10903.
- [8] GERITS A, FARIVAR R, ROSEN BR, WALD LL, BOYDEN ES, VANDUFFEL W. Optogenetically Induced Behavioral and Functional Network Changes in Primates. *Curr Biol* 2012; **22**:1722-1726.
- [9] GURU A, POST RJ, HO YY, WARDEN MR. Making Sense of Optogenetics. *Int J Neuropsychopharmacol* 2015; **18**:pyv079.
- [10] HITOSHI N, KEN-ICHI Y, JUN-ICHI M. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; **108**:193-199.
- [11] IACCARINO HF, SINGER AC, MARTORELL AJ, RUDENKO A, GAO F, GILLINGHAM TZ, MATHYS H, SEO J, KRITSKIY O, ABDURROB F, ADAIKKAN C, CANTER RG, RUEDA R, BROWN EN, BOYDEN ES, TSAI LH. Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature* 2016; **540**:230-235.
- [12] ISAAC JT, ASHBY MC, MCBAIN CJ. The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron* 2007; **54**:859-871.

- [13] JIANG J, CUI H, RAHMOUNI K. Optogenetics and pharmacogenetics: principles and applications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2017; **313**:633-645.
- [14] JIANG C, LI HT, ZHOU YM, WANG X, WANG L, LIU ZQ. Cardiac optogenetics: a novel approach to cardiovascular disease therapy. *Europace* 2018; **20**:1741-1749.
- [15] KASTANENKA KV, HOU SS, SHAKERDGE N, LOGAN R, FENG D, WEGMANN S, CHOPRA V, HAWKES JM, CHEN X, BACSKAI BJ. Optogenetic Restoration of Disrupted Slow Oscillations Halts Amyloid Deposition and Restores Calcium Homeostasis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One* 2017; **12**:e0170275.
- [16] KLAPOETKE NC, MURATA Y, KIM SS, PULVER SR, BIRDSEY-BENSON A, CHO YK, MORIMOTO TK, CHUONG AS, CARPENTER EJ, TIAN Z, WANG J, XIE Y, YAN Z, ZHANG Y, CHOW BY, SUREK B, MELKONIAN M, JAYARAMAN V, CONSTANTINE-PATON M., WONG GK., BOYDEN ES. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods* 2014; **11**:338-346.
- [17] LIM SAO, SURMEIER DJ. Enhanced GABAergic Inhibition of Cholinergic Interneurons in the zQ175+/- Mouse Model of Huntington's Disease. *Front Syst Neurosci* 2021; **14**:626412.
- [18] LIN JY. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp Physiol* 2011; **96**:19-25.
- [19] MATTIS J, TYE KM, FERENCZI EA, RAMAKRISHNAN C, O'SHEA DJ, PRAKASH R, GUNAYDIN AL, HYUN M, FENNO EL, GRADINARU V, YIZHAR O, DEISSEROTH K. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat Methods* 2011; **9**:159-172.
- [20] MIYASHITA T, SHAO YR, CHUNG J, POURZIA O, FELDMAN DE. Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Front Neural Circuits* 2013; **7**:8.
- [21] MIZE RR, BUTLER GD. The NMDAR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is localized at postsynaptic sites opposite both retinal and cortical terminals in the cat superior colliculus. *Vis Neurosci* 2000; **17**:41-53.
- [22] MUEHLROTH BE, SANDER MC, FANDAKOVA Y, GRANDY TH, RASCH B, SHING YL, WERKLE-BERGNER M. Precise Slow Oscillation-Spindle Coupling Promotes Memory Consolidation in Younger and Older Adults. *Sci Rep* 2019; **9**:1940.
- [23] NAGEL G, BRAUNER M, LIEWALD JF, ADEISHVILI N, BAMBERG E, GOTTSCHALK A. Light Activation of Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses. *Curr Biol* 2005; **15**:2279-84.
- [24] OESTERHELT D, STOECKENIUS W. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halo bacterium halobium*. *Nat New Biol* 1971; **233**:149-152.
- [25] O'RIORDAN KJ, HU NW, ROWAN MJ. A β Facilitates LTD at Schaffer Collateral Synapses Preferentially in the Left Hippocampus. *Cell Rep* 2018; **22**:2053-2065.
- [26] OSAWA SI, TOMINAGA T. Application of Optogenetics in Epilepsy Research. *Adv Exp Med Biol* 2021; **1293**:557-562.
- [27] PERUSINI JN, CAJIGAS SA, COHENSEDGH O, LIM SC, PAVLOVA IP, DONALDSON ZR, DENNY CA. Optogenetic stimulation of dentate gyrus engrams restores memory in Alzheimer's disease mice. *Hippocampus* 2017; **27**:1110-1122.
- [28] ROY DS, ARONS A, MITCHELL TI, PIGNATELLI M, RYAN TJ, TONEGAWA S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature* 2016; **531**:508-12.
- [29] ROCHEFORT NL, KONNERTH A. Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep* 2012; **13**:699-708.
- [30] SERÝ O, POVOVÁ J, MÍŠEK I, PEŠÁK L, JANOUT V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol* 2013; **51**:1-9.
- [31] SONAWANE SK, UVERSKY VN, CHINNATHAMBI S. Baicalein inhibits heparin-induced Tau aggregation by initializing non-toxic Tau oligomer formation. *Cell Commun Signal* 2021; **19**:16.
- [32] STAUFFER WR, LAK A, YANG A, BOREL M, PAULSEN O, BOYDEN ES, SCHULTZ W. Dopamine Neuron-Specific Optogenetic Stimulation in Rhesus Macaques. *Cell* 2016; **166**:1564-1571.

- [33] VAN DUYNEN GD. Cre Recombinase. *Microbiol Spectr* 2015; **3**:MDNA3-0014-2014.
- [34] WANG KW, YE XL, HUANG T, YANG XF, ZOU LY. Optogenetics-induced activation of glutamate receptors improves memory function in mice with Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* 2019; **14**:2147-2155.
- [35] WARDEN MR., CARDIN JA., DEISSEROTH K. Optical Neural Interfaces. *Annu Rev Biomed Eng* 2014; **16**:103-29.
- [36] YANG F, TU J, PAN JQ, LUO HL, LIU YH, WAN J, ZHANG J, WEI PF, JIANG T, CHEN YH, WANG LP. Light-controlled inhibition of malignant glioma by opsin gene transfer. *Cell Death Dis* 2013; **4**:e893.
- [37] YU C, CASSAR IR, SAMBANGI J, GRILL WM. Frequency-Specific Optogenetic Deep Brain Stimulation of Subthalamic Nucleus Improves Parkinsonian Motor Behaviors. *J Neurosci* 2020; **40**:4323-4334.
- [38] ZHANG Z, JING Y, MA Y, DUAN D, LI B, HÖLSCHER C, LI C, WEI J, GAO A, SHANG L, TAO F, XING Y. Driving GABAergic neurons optogenetically improves learning, reduces amyloid load and enhances autophagy in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; **525**:928-935.
- [39] ZHANG F, WANG LP, BRAUNER M, LIEWALD JF, KAY K, WATZKE N, WOOD P, BAMBERG E, NAGEL G, GOTTSCHALK A, DEISSEROTH K. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 2007; **446**:633-639.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 24.05.2021

Przyjęto: 18.06.2021

Magdalena Sowa-Kućma

Zakład Fizjologii Człowieka, Instytut Nauk Medycznych

Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

al. Kopisto 2a, 35-315 Rzeszów

e-mail: msowa@ur.edu.pl

KSZTAŁT JĄDRA W KOMÓRKACH ORGANIZMÓW EUKARIOTYCZNYCH I JEGO POTENCJALNE ZNACZENIE BIOLOGICZNE

NUCLEAR SHAPE IN EUKARYOTIC CELLS AND ITS
POTENTIAL BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

Aneta W. GRYMANOWSKA, Robert K. FILIPKOWSKI

Pracownia Behawioralno-Metaboliczna, Instytut Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa

Streszczenie: Morfologia jądra ma kluczowe znaczenie w zachowaniu prawidłowego funkcjonowania komórki eukariotycznej, jednak mechanizmy kontrolujące kształt jądra komórkowego a także funkcje kształtu jądra są mało poznane. Z kolei nietypowa dla danej komórki morfologia jądra jest powiązana ze stanami chorobowymi. Najlepiej pod tym względem poznane są komórki nowotworowe, u których nietypowy kształt jądra jest jednym z elementów wykorzystywanych w diagnostyce i prognozowaniu przebiegu choroby. W niniejszej pracy omówione zostały wyniki badań nad mechanizmami regulującymi kształt jądra – w szczególności ukazana została rola lamin, białek KASH i SUN, jak również jądrowych kompleksów porowych. Omówiona została również rola kształtu w organizacji przestrzennej chromatyny, funkcjonowaniu neutrofilii, a także w rozwoju nowotworów i laminopatii.

Słowa kluczowe: błona jądrowa, laminy, chromatyna, neutrofil, komórka nowotworowa

Summary: The morphology of the nucleus is significant for proper physiological functioning of a eukaryotic cell, yet the mechanisms and functions of nuclear shape regulation remain still to be elucidated. It has long been observed that altered nuclear morphology correlates with certain disease states. Most notably, neoplastic cells in which the atypical shape of the nucleus is one of the elements used in the diagnosis and prognosis of the disease, are the best known in this respect. Here we review recent findings studying the mechanisms regulating nuclear shape, in particular the role of laminae, KASH and SUN proteins, as well as nuclear pore complexes is presented. We also show and discuss the role of nuclear shape in spatial chromatin organization, functioning of neutrophils as well as the development of cancer and laminopathies.

Keywords: nuclear membrane, lamina, chromatin, neutrophil, cancer cell

WSTĘP

Wiele elementów strukturalnych jądra komórkowego kontrolują jego kształt. Otoczka jądrowa (ang. *nuclear envelope*, NE) jest zbudowana z dwóch błon białkowo-lipidowych – zewnętrznej (ang. *outer nuclear membrane*, ONM) i wewnętrznej (ang. *inner nuclear membrane*, INM) błony jądrowej. W przestrzeni pomiędzy ONM i INM znajdują się jądrowe kompleksy porowe (ang. *nuclear pore complex*, NPC), które biorą udział w transporcie cząsteczek pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą. Do INM przylega blaszka jądrowa, która składa się z sieci delikatnych włókien białkowych, utworzonych z białek klasy lamin. Blaszkę jądrową stanowi pewnego rodzaju rusztowanie dla NE, inaczej zwane nukleoszkieletem, a laminy wchodzące w jej skład wiążą się z chromatyną. Łącznikiem pomiędzy nukleoszkieletem a cytoszkieletem jest kompleks białkowy zbudowany z białek SUN i KASH (ang. *linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*, LINC). Interakcje pomiędzy INM i białkami SUN oraz ONM z białkami KASH regulują funkcjonowanie LINC.

Zmiany kształtu jądra są powiązane z różnicowaniem, rozwojem, a także z chorobami. Odmienna morfologia jądra bardzo często występuje w komórkach nowotworowych. Fizjologiczne znaczenie odmiennego kształtu jądra nie zostało dobrze poznane, ale wiadomo, że może wpływać na organizację chromatyny a także ekspresję genów, w szczególności w kontekście rozwoju i progresji choroby nowotworowej. Dlatego też bardzo istotnym jest zrozumienie mechanizmów, które regulują kształt i rozmiar jądra.

W niniejszej pracy omówione zostaną wyniki badań niedawno opublikowanych prac, w których badano mechanizmy regulujące kształt komórki, w szczególności rolę elementów strukturalnych, takich jak cytoszkielec, otoczka jądrowa, blaszka jądrowa, jądrowe kompleksy błonowe, a także kompleks białkowy LINC. Omówiona zostanie również potencjalna funkcja odmiennego kształtu jądra i jego biologicznego znaczenia w stanach chorobowych na przykładzie komórki nowotworowej, a także w zdrowej komórce na przykładzie neutrofilu.

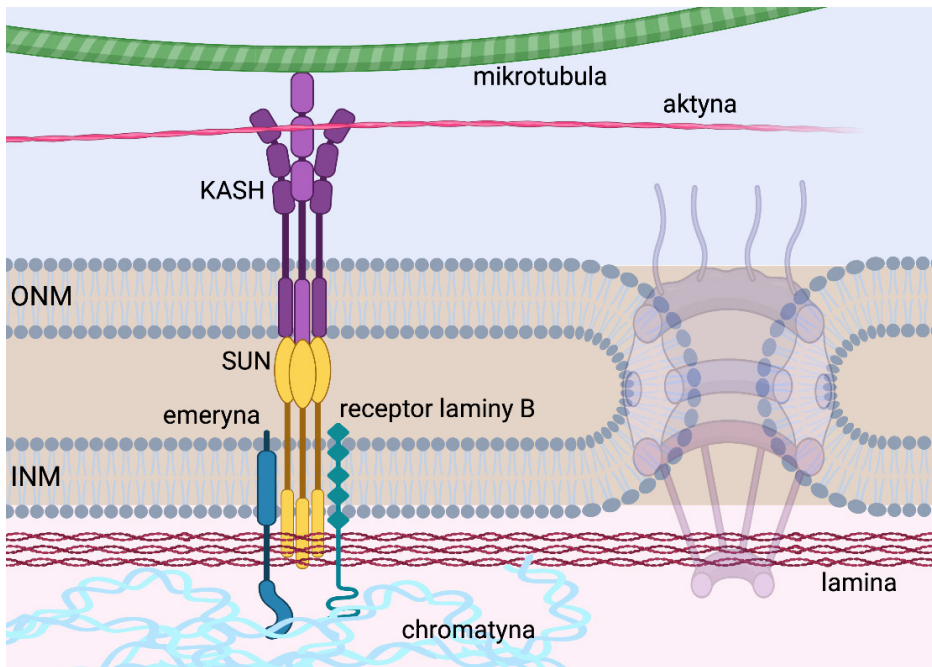
CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA KSZTAŁT JĄDRA

LAMINY

Wyniki wielu badań potwierdzają, że laminy biorą udział w regulacji kształtu jądra komórkowego. Są one głównym składnikiem blaszki jądrowej (**Ryc. 1**), występują u wszystkich zwierząt, natomiast stwierdzono ich brak u roślin, a u niższych eukariontów występują białka lamino-podobne. Istnieją dwie główne grupy lamin jądrowych: typ A/C i typ B, które tworzą sieć. U ssaków laminy typu A są kodowane przez gen *LMNA*, a laminy typu B są kodowane przez geny *LMNB1*

i *LMNB2*. Geny lamin mają wiele wariantów składania prekursorowego mRNA (np. lamina C jest wariantem składania prekursorowego mRNA genu *LMNA*). U większości bezkręgowców występuje tylko jedna izoforma laminy, podobna do laminy B występującej u ssaków.

Niektóre mutacje w genach kodujących laminy, w enzymach przekształcających laminy lub w białkach związanych z laminami odpowiadają za choroby z grupy laminopatii [9]. Jedną z najbardziej charakterystycznych cech obserwowanych w laminopatiach spowodowanych mutacją w genie *LMNA* jest nietypowa morfologia jądra, co wskazuje na znaczenie blaszki jądrowej w utrzymaniu prawidłowego kształtu jądra komórkowego. Mutacja tego typu występuje w zespole Hutchinsona-Gilforda (HGPS), tak zwanym syndromie przedwczesnego starzenia się. Pojawienie się tej mutacji prowadzi do zaburzenia stabilności struktury jądra i ekspresji genów [64]. Komórki pacjentów z HGPS wykazują zniekształcone jądra, w których charakterystyczne są wpuklenia otoczki jądrowej a także pęcherzyki jądrowe, czyli wystające fragmenty otoczki jądrowej mające kształt pęcherzy [70]. Warto podkreślić, że, normalnie starzejące się komórki wykazują podobny fenotyp [49].



RYCINA 1. Kompleks LINC składa się z białka z domeną KASH, ulokowanego w zewnętrznej błonie jądrowej (ONM) i białka z domeną SUN, zakotwiczonego w wewnętrznej błonie jądrowej (INM). Pod powierzchnią błon jądrowych znajduje się blaszka jądrowa, której głównym składnikiem są laminy. Białka SUN wchodzi w interakcje z białkami INM, natomiast białka KASH wiążą się z elementami cytoszkieletu, np. aktyną, mikrotubulami

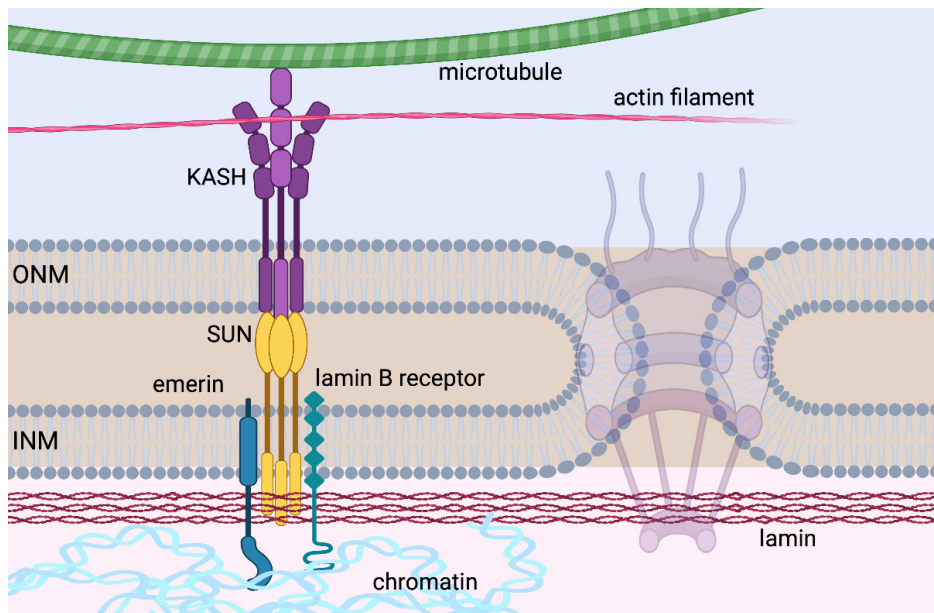


FIGURE 1. LINC is built of KASH protein domain which is placed in outer nuclear membrane (ONM) and SUN protein domain which is located in the inner nuclear membrane (INM). At the periphery of the nuclear envelope lies a meshwork nuclear lamina. SUN proteins interact with proteins located in INM, whereas KASH proteins bind to cytoskeleton, e.g. actin filaments, microtubules

W laminopatiach cechą wspólną odmiennej, zdeformowanej morfologii jądra są zmiany pojawiające się w laminach (np. mutacje w genach lamin), jednakże w każdym przypadku występuje inny efekt oddziaływania mechanicznego lamin na jądro. Mutacja laminy A, w wyniku której powstaje białko progeryna, przyczynia się do zwiększenia sztywności jądra, podczas gdy brak laminy A powoduje zmniejszenie jego sztywności [55]. Z kolei utrata przez komórki laminy B nie przyczynia się do powstania znaczących zmian lub, w niektórych przypadkach, może prowadzić do zwiększonej sztywności jądra, ale jest to zależne od ilości laminy A [50, 51, 52, 54]. Laminy A są także bardzo istotne w komórkach migrujących przez ciasne przestrzenie tkankowe, gdzie jądro komórkowe poddawane jest siłom nacisku, staje się sprężone i napięte [18, 26, 45]. Doświadczenia na jądrach komórkowych traktowanych enzymem rozkładającym chromatynę – MNazą [1, 4] pokazują, że same laminy nie są w stanie utrzymać kształtu jądra. Błazka jądrowa wygina się pod naprężeniem mechanicznym, gdy nie jest podtrzymywana przez chromatynę. Chromatyna jest heterogennym polimerem, który wypełnia przestrzeń jądra [40]. Poszczególne fragmenty chromatyny wchodzi w interakcje ze sobą, a także z elementami NE [15, 24]. Pokazano, że różnice w upakowaniu chromatyny odpowiadają zmianom jej sztywności [16, 18]. Ponadto wyniki wielu

prac pokazują, że chromatyna jest sztywnym elementem reagującym na siły mechaniczne oddziałujące na jądro [10], otoczonym elastyczną siecią lamin. Okazuje się zatem, że deformacje kształtu jądra zależą nie tylko od biomechanicznych właściwości lamin, ale również od chromatyny.

BIĄŁKA KASH I SUN

Zarówno u niższych, jak i wyższych organizmów eukariotycznych NE zawiera białka z domeną KASH i SUN, które fizycznie łączą cytoszkielet z blaszką jądrową (u wyższych eukariontów) lub chromatyną (u drożdży). Białka z domeną KASH (Klarsicht-Anc1-syne 1 homolog) są zakotwiczone w ONM, podczas gdy białka z domeną SUN (Sad1/UNC-84) są ulokowane w INM (**Ryc. 1**) [22, 30, 46]. Końce C białek z domeną KASH i SUN oddziałują ze sobą w przestrzeni międzłonowej otoczki jądrowej, tworząc mostki błonowe zwane LINC [13]. N-końiec białka z domeną SUN znajduje się w nukleoplazmie i oddziałuje z chromatyną u drożdży, a u wyższych eukariontów – z białkami INM np. emeryną, receptorem laminy B, a także z białkami nukleoszkieletu np. laminą A. Cytoplazmatyczna część białek z domeną KASH wchodzi w interakcje z różnymi elementami cytoszkieletu, w tym włóknami aktynowymi i mikrotubulami (**Ryc. 1**). Kompleks LINC odgrywa kluczową rolę w przestrzennej organizacji jądra, przemieszczaniu się chromosomów i w regulowaniu sił mechanicznych oddziałujących na jądro. Siły mechaniczne są przekazywane przez kompleks LINC do blaszki jądrowej.

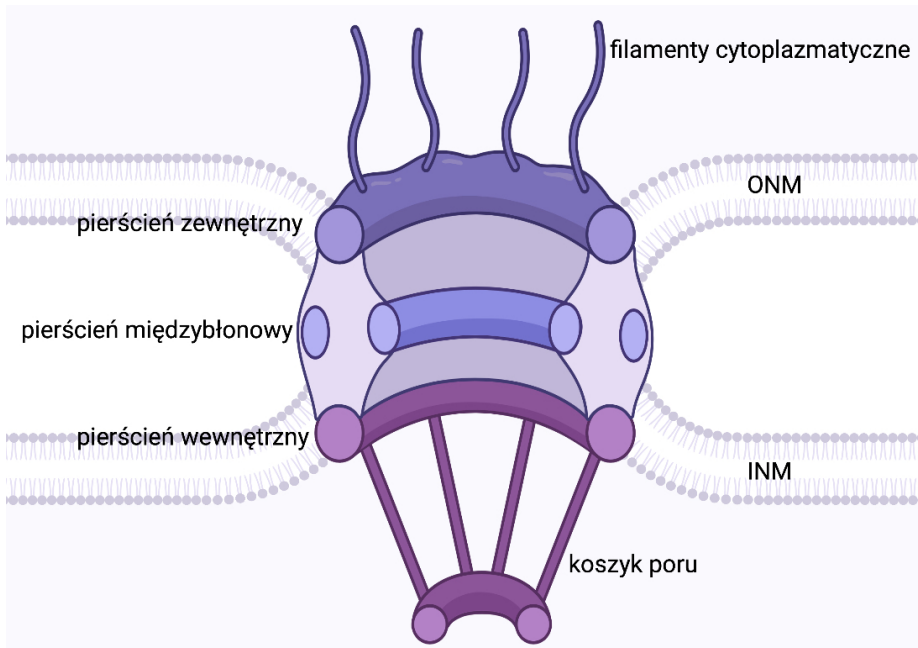
Siły mechaniczne wpływają również na integralność otoczki jądrowej, jak i na kształt jądra. W liniach komórkowych HeLa wyciszenie ekspresji genów kodujących białka z domeną SUN1 i SUN2, zwiększa przestrzeń perinuklearną (prze-strzeń między wewnętrzną błoną jądrową i zewnętrzną błoną jądrową) [13]. Wykazano, że obniżenie zawartości określonej izoformy nespryny (białka z domeną KASH) prowadzi do szeregu zmian kształtu jądra, od niewielkiego wybrzuszenia otoczki jądrowej do poważnie zniekształconych ogromnych jąder [31]. Podobnie u śluzowca *Dictyostelium discoideum* mutacja białka Sun-1, w wyniku której nie powstaje domena wiążąca chromatynę, dochodzi do poważnych deformacji jądra [72]. Ponadto w neutrofilach, u których jądro jest wielopłatowe, pokazano brak występowania lub niższe stężenie niektórych białek kompleksu LINC w porównaniu do makrofagów, których jądra wykazują owalny kształt. Sugeruje to, że poziom ekspresji genów białek tworzących kompleks LINC może być regulowany w celu kontrolowania kształtu i architektury jądra. Zatem kompleks LINC wraz z innymi białkami odgrywa znaczącą rolę w utrzymaniu prawidłowego kształtu jądra.

JĄDROWE KOMPLEKSY POROWE

Architektura wewnątrzjądrowa jest także regulowana przez aktywność NPC, które stanowią pierścieniowate, wodne kanały zapewniające kontakt pomiędzy nukleoplazmą a cytoplazmą, odgrywają znaczącą rolę w regulacji transkrypcji

[12, 27, 42], a także w regulacji transportu makromolekuł poprzez błonę jądrową. Każdy kompleks NPC złożony jest z ponad 30 różnych białek nazywanych nukleoporinami (ang. *nucleoporin*, Nup). Schemat budowy kompleksów porowych jest zachowany w ewolucji, mimo że u poszczególnych gatunków mogą występować znaczne różnice w ich rozmiarach. U ssaków masa NPC wynosi 60-125 MDa, u drożdży 40-60 MDa [17].

W badaniu nad żabą *Xenopus* wykazano, że zmniejszenie zawartości Nup188 doprowadziło do zwiększonego tempa transportu białek z cytoplazmy do wewnętrznej błony jądrowej, a następnie do zwiększenia rozmiaru jądra [57]. Warty uwagi jest fakt, że zmniejszenie zawartości Nup188 wpłynęło tylko na tempo transportu białek, a nie na rozmiar transportowanych białek, który jest ograniczony do 40 kDa [38], a także zachowana została zasada nieprzepuszczania białek zewnętrznej błony jądrowej czy też białek siateczki śródplazmatycznej [57]. Zatem Nup188 oraz inne białka NPC mogą kontrolować tempo przepływu białek z cytoplazmy do wewnętrznej błony jądrowej, uczestnicząc w utrzymaniu prawidłowego rozmiaru i kształtu jądra.



RYCINA 2. Schemat przedstawiający przekrój jądrowego kompleksu porowego, który składa się z trzech pierścieni: zewnętrznego, międzybłonowego i wewnętrznego, a także z koszyka poru. Każdy z elementów jądrowego kompleksu porowego zbudowany jest z kilku rodzajów białek. Pierścień zewnętrzny znajduje się w zewnętrznej błonie jądrowej (ONM), a pierścień wewnętrzny umiejscowiony jest w wewnętrznej błonie jądrowej (INM)

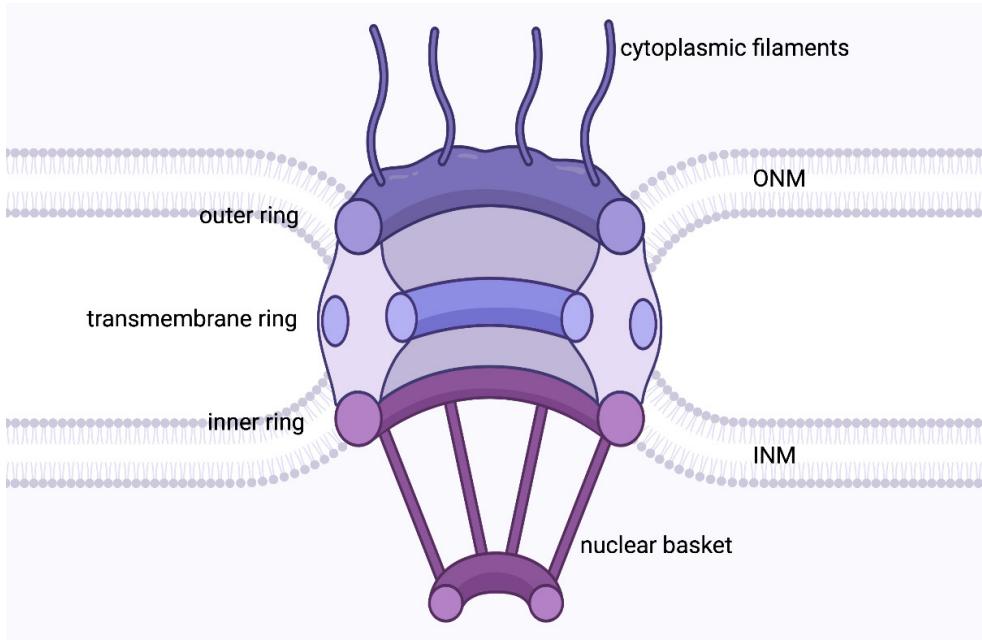


FIGURE 2. A cross section of a nuclear pore complex which is built of three rings: outer, transmembrane and inner, and also a nuclear basket. Every structure of the nuclear pore complex is built of various proteins. The outer ring is located in the outer nuclear membrane (ONM), and the inner ring is placed in the inner nuclear membrane (INM)

Wyeliminowanie Nup170 w szczepie drożdży pozbawionym transbłonowego białka Pom152 (ang. *pore membrane protein 153*) prowadzi do deformacji jądrowych [1]. Jednym z potencjalnych mechanizmów, który wpływa na kształt jądra na skutek zmian w białkowym składzie porów jądrowych może być oddziaływanie między białkami NE a wewnątrz jądra. Jeżeli zmienione pory jądrowe zaburzają łączenie NE z białkami strukturalnymi jądra komórkowego, NE może być bardziej podatna na siły ciągnące oddziałujące na jądro komórkowe poprzez cytoskielet, np. podczas migracji [69]. Zmiany w składzie białkowym porów jądrowych, mogą prowadzić do niekontrolowanego rozrostu otoczki jądrowej i zmiany kształtu jądra.

Wykazano, że w neuronalnych komórkach progenitorowych interakcje Nup153 z czynnikiem transkrypcyjnym Sox2 wpływają na architekturę wewnątrzjądrową. Interakcja Nup153 i Sox2 reguluje proces różnicowania się progenitorów, utrzymując stałą pulę niezróżnicowanych komórek. Stwierdzono występowanie korelacji pomiędzy interakcją Nup153 z promotorami genów lub miejscami transkrypcji a, odpowiednio, zwiększoną lub zmniejszoną ekspresją genów, natomiast hamowanie ekspresji Nup153 zmienia genomową lokalizację Sox2 i indukuje różnicowanie [58].

CHROMATYNA I EKSPRESJA GENÓW

Chromatyna lub białka związane z chromatyną wchodzi w interakcje z międybłonowymi białkami otoczki jądrowej, porami jądrowymi i laminami [33]. Biorąc pod uwagę związek między NE, blaszką jądrową i chromatyną, można przypuszczać, że zmiany kształtu jądra mogą wpływać na ekspresję genów i naprawę DNA, przyczyniając się w ten sposób do przyspieszenia starzenia się, wywołania procesu chorobowego czy też wystąpienia prawidłowego procesu fizjologicznego. Wykorzystując metodę do badania organizacji przestrzennej chromatyny, przy minimalnym zakłóceniu jej trójwymiarowej struktury, wykazano, że w jądrach ludzkich fibroblastów w spoczynku i w trakcie podziału, występuje ustalona kolejność prometafazowych chromosomów i terytoriów chromosomowych [6]. W tych komórkach, które mają płaskie elipsoidalne jądra, chromosomy były ułożone według wielkości, przy czym mniejsze chromosomy prawdopodobnie znajdowały się bliżej środka jądra, a większe chromosomy częściej znajdowały się w obwodowej części jądra. W przeciwieństwie do rozmieszczenia chromosomów w limfocytach i innych typach komórek ludzkich, które mają jądra kuliste i w których rozmieszczenie chromosomów nie jest związane z wielkością, ale z gęstością genów. Chromosomy z dużą gęstością genów występują zwykle bliżej środka jądra, podczas gdy chromosomy ubogie w geny znajdują się w części obwodowej jądra [7]. Te obserwacje nasuwają pytanie o to, jaki wpływ na rozmieszczenie terytoriów chromosomowych ma kształt jądra.

Topologicznie powiązane domeny (ang. *topologically associated domains*, TAD) w genomach zwierząt stanowią regiony chromosomalne, które zwykle znajdują się blisko siebie. W obrębie jednego TAD występują interakcje i tworzą się pętle chromatyny między regionami regulacyjnymi *cis*, takimi jak wzmacniacze, promotory i izolatory, które regulują ekspresję genów. Sąsiadujące ze sobą TAD są izolowane od siebie, w tym m.in. przez białko CTCF (ang. *CCCTC-binding factor*), geny porządkowe i retrotranspozony [2, 20, 34]. Znaczenie CTCF w organizacji chromosomów wykazano poprzez zmianę orientacji lub pozycji miejsc wiązania CTCF, które prowadzą do skrócenia pętli chromatyny i zmian architektury przestrzennej chromosomów [25, 32]. Podczas gdy niektóre aspekty organizacji TAD są takie same dla wielu różnych typów komórek [20], zmiany interakcji TAD zachodzą na skutek różnicowania i w odpowiedzi na zmiany środowiska zewnętrznego [5, 20, 47, 53, 67]. Wpływ rozmiaru i kształtu jądra na organizację TAD jeszcze nie został zbadany.

Domeny związane z laminą (ang. *lamina associated domains*, LAD) to transkrypcyjnie represyjne domeny chromatyny zlokalizowane w otoczce jądrowej. LAD są na ogół wzbogacone w represyjne modyfikacje histonów [59], a umiejscowienie aktywnych genów przy blaszce jądrowej może prowadzić do ich wycisze-

nia. Dla przykładu w ludzkich embrionalnych komórkach macierzystych i ciałkach zarodkowych aktywne geny cyklu okołodobowego są wyciszane po przeniesieniu do LAD przez polimerazę poli-ADP rybozy PARP1 (ang. *poly ADP ribose polymerase*) i uczestniczące w tym procesie CTCF [74]. Lamininy regulują organizację przestrzenną chromatyny poprzez interakcje z poszczególnymi domenami LAD. Dla przykładu u muszki *Drosophila* lamininy typu B wchodzi w interakcję z białkiem Wash (ang. *washout*), białko należące do rodziny białek WAS (ang. *Wiskott-Aldrich syndrome*), aby zachować prawidłową organizację LAD i chromosomów [63]. Wyeliminowanie lamininy B w mysich embrionalnych komórkach macierzystych zmniejszyło liczbę interakcji między poszczególnymi regionami chromatyny, które tworzyły LAD w mysich embrionalnych komórkach macierzystych z prawidłową zawartością lamininy B, a blaszką jądrową [75]. Wiadomo, że lamininy i inne białka znajdujące się w blaszce jądrowej wpływają na rozmiar i kształt jądra, można spekulować zatem, że wpływają także na organizację LAD.

Chromatyna może występować w postaci euchromatyny lub heterochromatyny, przy czym ta ostatnia często znajduje się na obrzeżach jądra. Zmiany w ilości heterochromatyny i euchromatyny są również powszechnie spotykane w nowotworach i innych chorobach [35]. Modyfikacje histonów, które znacznie zwiększają poziom euchromatyny powodują osłabienie sztywności jądra, jego nieprawidłową morfologię i pęknięcia [56]. Dla przykładu nadekspresja genu białka jądrowego HMGN5 (ang. *high mobility group N5*) rozrywa łącznik histonowy H1, co powoduje zmniejszenie zagęszczenia chromatyny, stabilności i sztywności jądra, a w konsekwencji prowadzi do jego pęcznienia [21]. Utrzymanie prawidłowego kształtu obserwowano po zwiększeniu zawartości heterochromatyny zarówno w przypadku zaburzeń związanych z modyfikacją histonów, ale również zaburzeń związanych z laminami, w tym w komórkach z nadmierną acetylacją histonów, zmniejszoną zawartością lamininy B1 lub nadekspresją progeryn, a także w komórkach pacjentów z zespołem Hutchinsona-Gilforda [55, 56]. Wykazano również, że utrata chromatyny na obrzeżach jądra, która następuje na skutek mutacji genu białka wiążącego heterochromatynę z laminą, PRR14 (ang. *proline rich protein 14*), przyczynia się do powstawania zaburzeń kształtu jądra [43]. Modyfikacje epigenetyczne, mogą również wpływać na odkształcanie jądra niezależnie od transkrypcji. Wykazano, że białko WDR5 (ang. *WD repeat domain 5*), które jest jednym z kluczowych podjednostek kompleksów metylotransferaz histonowych H3K4, moduluje zdolność do poruszania się komórki, jej morfologię a także zmiany w jądrze, które pojawiają się na skutek oddziaływania środowiska zewnętrznego. Utrata białka WDR5 powoduje zahamowanie metylacji H3K4 i uniemożliwia deformację kształtu jądra, która jest niezbędna do przeciskania się przez ciasne przestrzenie tkankowe [66].

NEUTROFILE JAKO NAJLEPIEJ POZNANY PRZYKŁAD ZDROWEJ KOMÓRKI Z JĄDREM KOMÓRKOWYM O ODMIENNYM KSZTAŁCIE

Jednymi z najlepiej poznanych typów komórek z nietypowym kształtem jądra są neutrofile. Neutrofile są komórkami układu odpornościowego, które migrują do ognisk infekcji. Ich cechą charakterystyczną jest posegmentowane jądro, zwykle składające się z dwóch do pięciu płatów, połączonych cienkimi włóknami nukleoplazmy, w których znajduje się niewielka ilość chromatyny [56]. Płatowa struktura jądra powstaje w procesie różnicowania zwanym granulopoezą. Prekursor mielocytów różnicując do dojrzałego neutrofilu stopniowo zwiększa liczbę płatów. Analiza przestrzenna chromatyny wykazała, że większość chromosomów jest losowo rozmieszczona [57].

Uważa się, że posegmentowanie jądra umożliwia neutrofilom przechodzenie przez małe szczeliny w śródbłonku i przestrzeni zewnątrzkomórkowej [56]. W przypadku anomalii Pelger-Hueta, która wywołana jest mutacją w genie receptora laminy B, granulocyty obojętnochłonne nie są w stanie uformować prawidłowo wielopłatowego jądra; występują u nich także zaburzenia migracji [58]. Płatowanie (lobulacja) jądra jest zależne nie tylko od receptora laminy B, ale wiąże się także ze zmniejszeniem ilości niektórych białek blaszki jądrowej i zależy od mikrotubul [59]. Neutrofile mają także większą różnorodność długości linkera DNA między nukleosomami niż limfocyty T, co wskazuje na zwiększoną elastyczność chromatyny [60]. Jednakże okazało się, że występowanie posegmentowanego jądra nie jest absolutnie konieczne do migracji neutrofilii chociaż zdecydowanie może ją wspomagać [61].

Granulocyty mają mniejszą ilość lamin w porównaniu do makrofagów i monocytów – głównie mniejsza jest ilość laminy A i C, większa – laminy B. Stosunek ilości laminy A do laminy B wpływa na elastyczność jądra [6]. Zaburzenia lamin związane z normalnym starzeniem się wpływają na kształt jądra wszystkich granulocytów, w wyniku zmian w sztywności i strukturze blaszki jądrowej [62, 63]. Te związane z wiekiem defekty w strukturze blaszki jądrowej są również widoczne w laminopatiach, takich jak zespół Hutchinsona-Gilforda [64].

Hipersegmentacja neutrofilii do sześciu lub więcej płatów jest związana z niedokrwistością megaloblastyczną wynikającą z niedoboru witaminy B12 i kwasu foliowego oraz niedokrwistością spowodowaną niedoborem żelaza [65]. Jest ona również związana z zespołem Bouchera-Neuhäusera – defektem metabolicznym lipidów [66]. U szczurów niedobór witaminy A spowodował hiposegmentację, związaną z koniecznością obecności retinoidów w różnicowaniu promielocytów do dojrzałych neutrofilii [67]. Występuje więc wiele ścieżek sygnałowych, które kontrolują powstanie płatowej morfologii jądra neutrofilii.

JĄDRA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH JAKO PRZYKŁAD ODMIENNEGO KSZTAŁTU JĄDRA W STANIE CHOROBYM

Nieprawidłowy kształt jądra jest cechą charakterystyczną komórek nowotworowych, jedną z cech diagnostycznych nowotworów jest pleomorfia, czyli zwiększona różnorodność kształtów i rozmiarów jąder. Pleomorfia nasila się w miarę rozwoju nowotworu. Związek między mutacjami występującymi w komórkach nowotworowych a morfologią ich jąder jest mało poznany. Pojawia się więc pytanie, czy zmiany w kształcie jądra przyczyniają się do powstawania mutacji w DNA tych komórek, czy są jedynie ich konsekwencją.

Potwierdzono zależność między nieprawidłowym kształtem jądra a niestabilnością chromosomów [23]. Niestabilne chromosomy zwykle prowadzą do powstania pęcherzyków jądrowych. Na przykład genomowe badanie RNAi w ludzkich komórkach zidentyfikowało wiele genów, których wyciszenie doprowadziło do odkształcenia jądra [36]. Geny te były również potrzebne do prawidłowej segregacji chromosomów, co pokazuje związek między organizacją przestrzenną chromosomów a kształtem jądra. Można spekulować, że zmiany kształtu jądra spowodowane nieprawidłową segregacją chromosomów mogą z kolei prowadzić do zmian w ekspresji genów, które dodatkowo zmieniają funkcję, potencjalnie przyczyniając się do mutacji DNA komórek.

Niedawno pokazano, że poddawanie komórek osteosarkomy działaniu nadtlenu wodoru (H_2O_2) indukowało zależne od stężenia zmiany kształtu jądra, które ustępowały pod wpływem działania przeciwutleniacza N-acetylo-L-cysteiny lub nadekspresji katalazy. Okazało się również, że bardziej podatne na działanie nadtlenu wodoru były komórki mitotyczne, co sugeruje, że H_2O_2 wpływa głównie na procesy rozpadu i ponownego składania otoczki jądrowej w trakcie podziału komórkowego. Zbadano wpływ H_2O_2 na aktywność fosfatazy białkowej 2A (ang. *protein phosphatase 2A*, PP2A), która bierze udział w ponownym składaniu otoczki jądrowej podczas mitozy, i wykazano, że H_2O_2 zmniejsza aktywność PP2A. Ponadto wykazano, że nadekspresja PP2A częściowo niweluje efekt wywołany działaniem H_2O_2 . W tym samym badaniu wykazano również, że H_2O_2 wpływa także na nieprawidłową lokalizację białek BAF (ang. *barrier-to-autointegration factor*), które są substratem PP2A w czasie telofazy. Ten efekt był związany ze zmianą lokalizacji lamin A/C, a nadekspresja PP2A zapobiegła tym zmianom [3].

Zmiany w morfologii jąder komórkowych w nowotworach powiązane są ze zmianami w składzie otoczki jądrowej. Zawartość lamin w otoczce jądrowej zmienia się w niektórych nowotworach, w szczególności zmniejsza się stężenie lamin A/C [8]. Dla komórek migrujących te zmiany mogą przyczyniać się do większej elastyczności otoczki jądrowej i ułatwić przemieszczanie się komórek w obrębie

przeźreni międzykomórkowej, co z kolei prowadzi do powstawania przerzutów [8]. Należy również zwrócić uwagę na to, że zmiany w składzie otoczki jądrowej mogą wpływać także na szlaki sygnałowe i doprowadzać do zmian w transkrypcji komórek nowotworowych.

Kolejną cechą morfologiczną odróżniającą komórki nowotworowe od zdrowych jest odmienny układ chromatyny, w związku z tym podejmowane są próby kliniczne opracowania terapii opartych na modyfikacjach epigenetycznych. Chaetocyna jest inhibitorem metylotransferazy histonowej (pośredniczącej w trimetylacji lizyny 9 histonu H3, markera konstytutywnej heterochromatyny). Poddawanie fibroblastów działaniu chaetocyny powoduje reorganizację ich chromatyny. W tych komórkach chromatyna o dużej gęstości genów jest ulokowana w obwodowych częściach terytoriów chromosomowych [29].

Poszczególne nowotwory mają swoje własne cechy wyróżniające – na przykład rak cewki moczowej można odróżnić od zdrowej tkanki za pomocą szczególnie dużych jąder [44]. Może to być cenne narzędzie do prognozowania przebiegu choroby, a także samej diagnozy. Cechy morfologiczne jąder, takie jak ich symetria i rozmiar, mogą wskazywać na reakcję pacjenta na chemioterapię [19, 37].

Podsumowując, istnieje wiele mechanizmów, które przyczyniają się do powstania nieprawidłowej morfologii jądra w komórkach nowotworowych, a ponadto dla danego typu nowotworu można odróżnić charakterystyczne jej cechy. Dlatego warto pracować nad rozwojem narzędzi przeznaczonych do diagnozy i przewidywania postępu choroby, które umożliwią rozróżnienie stadiów jej zaawansowania na podstawie oceny zmienności kształtu jądra, a także będą mogły być wykorzystane w badaniach nad oceną efektu terapeutycznego nowych metod leczenia.

PODSUMOWANIE

Regulacja kształtu jądra jest bardzo złożonym i wieloczynnikowym procesem. Wiele biologicznych czynników wpływających na kształt jądra zostało już dobrze poznanych i opisanych. Poznając te czynniki dostrzegamy, że kształt jądra jest niezwykle istotną cechą komórki, powiązaną z jej funkcjonowaniem. Wiele wskazuje na to, że ważną rolę w regulacji kształtu jądra odgrywiają mechanizmy biofizyczne zależne od interakcji chromatyny, lamin i cytoszkieletu. Nadal jednak pozostaje wiele pytań o to, jak te komponenty ze sobą wchodzą w interakcje, jakie mechanizmy molekularne stoją za tymi procesami, czy występują specyficzne modyfikacje histonów i czynniki modelujące chromatynę, które odpowiadają za kształt jądra. Nie jest znane to, w jaki sposób kształt jądra wpływa na organizację przestrzenną chromatyny – tu nadzieje wiąże się z wykorzystaniem metody Hi-C, która umożliwia szczegółowe zbadanie przestrzennej organizacji chromatyny. Po-

jawia się pytanie również o to, jak modyfikacje chromatyny, które regulują kształt jądra wpływają na transkrypcję. Odpowiedzi na te pytania pozwolą zrozumieć, jak organizacja przestrzenna chromatyny oraz kształt jądra wpływa na wiele ważnych procesów biologicznych takich jak cykl komórkowy, rozwój, homeostaza czy tworzenie się tkanek. Badania kształtu jądra mogą przyczynić się do rozwoju nowych rozwiązań diagnostycznych i terapeutycznych dotyczących nowotworów, dystrofii, progerii, a także pozwolić nam lepiej zrozumieć procesy starzenia się.

PODZIĘKOWANIA

Do przygotowania rycin użyto programu BioRender.

LITERATURA

- [1] AHN JH, CHO MG, SOHN S, LEE JH. Inhibition of PP2A activity by H₂O₂ during mitosis disrupts nuclear envelope reassembly and alters nuclear shape. *Exp Mol Med* 2019; **51**(6): 1-18. 70
- [2] AITCHISON JD, BLOBEL G, ROUT MP. Nup120p: a yeast nucleoporin required for NPC distribution and mRNA transport. *J Cell Biol* 1995; **131**(6 Pt 2): 1659-1675.
- [3] ALBER F, DOKUDOVSKAYA S, VEENHOFF LM, ZHANG W, KIPPER J, DEVOS D, SUPRAPTO A, KARNI-SCHMIDT O, WILLIAMS R, CHAIT BT, SALI A, ROUT MP. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 2007; **450**(7170): 695-701.
- [4] BANIGAN EJ, STEPHENS AD, MARKO JF. Mechanics and Buckling of Biopolymeric Shells and Cell Nuclei. *Biophys J* 2017; **113**(8): 1654-1663.
- [5] BELL AC, FELSENFELD G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 2000; **405**(6785): 482-485.
- [6] BOLZER A, KRETH G, SOLOVEI I, KOEHLER D, SARACOGLU K, FAUTH C, MULLER S, EILS R, CREMER C, SPEICHER MR, CREMER T. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 2005; **3**(5): e157. 36 VIDAK S, FOISNER R. Molecular insights into the premature aging disease progeria. *Histochem Cell Biol* 2016; **145**(4): 401-417.
- [7] BOYLE S, GILCHRIST S, BRIDGER JM, MAHY NL, ELLIS JA, BICKMORE WA. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* 2001; **10**(3): 211-219.
- [8] BELL ES, LAMMERDING J. Causes and consequences of nuclear envelope alterations in tumour progression. *Eur J Cell Biol* 2016; **95**(11): 449-464.
- [9] CAPELL BC, COLLINS FS. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet* 2006; **7**(12): 940-952.
- [10] CHALUT KJ, HOPFLER M, LAUTENSCHLAGER F, BOYDE L, CHAN CJ, EKPENYONG A, MARTINEZ-ARIAS A, GUCK J. Chromatin decondensation and nuclear softening accompany Nanog downregulation in embryonic stem cells. *Biophys J* 2012; **103**(10): 2060-2070.
- [11] CHAN YK, TSAI MH, HUANG DC, ZHENG ZH, HUNG KD. Leukocyte nucleus segmentation and nucleus lobe counting. *BMC Bioinformatics* 2010; **11**: 558.
- [12] CASOLARI JM, BROWN CR, KOMLI S, WEST J, HIERONYMUS H, SILVER PA. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* 2004; **117**(4): 427-439.

- [13] CAPELSON M, LIANG Y, SCHULTE R, MAIR W, WAGNER U, HETZER MW. Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes. *Cell* 2010; **140**(3): 372-383.
- [14] CRISP M, LIU Q, ROUX K, RATTNER JB, SHANAHAN C, BURKE B, STAHL PD, HODZIC D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 2006; **172**(1): 41-53.
- [15] DEKKER J, MIRNY L. The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication. *Cell* 2016; **164**(6): 1110-1121.
- [16] DAHL KN, ENGLER AJ, PAJEROWSKI JD, DISCHER DE. Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophys J* 2005; **89**(4): 2855-2864.
- [17] D'ANGELO MA, HETZER MW. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* 2008; **18**(10): 456-466.
- [18] DENAIS CM, GILBERT RM, ISERMANN P, MCGREGOR AL, TE LINDERT M, WEIGELIN B, DAVIDSON PM, FRIEDL P, WOLF K, LAMMERDING J. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science* 2016; **352**(6283): 353-358.
- [19] DIAMOND AJ. Beyond technology. Or computers are not enough. *Canadian Library Journal* 1982; **39**(4): 206-6209.
- [20] DIXON JR, SELVARAJ S, YUE F, KIM A, LI Y, SHEN Y, HU M, LIU JS, REN B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 2012; **485**(7398): 376-380.
- [21] FURUSAWA T, ROCHMAN M, TAHER L, DIMITRIADIS EK, NAGASHIMA K, ANDERSON S, BUSTIN M. Chromatin decompaction by the nucleosomal binding protein HMGN5 impairs nuclear sturdiness. *Nat Commun* 2015; **6**: 66138.
- [22] FRIDKIN A, PENKNER A, JANTSCH V, GRUENBAUM Y. SUN-domain and KASH-domain proteins during development, meiosis and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**(9): 1518-1533. 20 SCAFFIDI P, MISTELI T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 2006; **312**(5776): 1059-1063.
- [23] GISSELSOON D, BJORK J, HOGLUND M, MERTENS F, DAL CIN P, AKERMAN M, MANDAHN N. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am J Pathol* 2001; **158**(1): 199-206.
- [24] GUELEN L, PAGIE L, BRASSET E, MEULEMAN W, FAZA MB, TALHOUT W, EUSSSEN BH, DE KLEIN A, WESSELS L, DE LAAT W, VAN STEENSEL B. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 2008; **453**(7197): 948-951.
- [25] GUO Y, XU Q, CANZIO D, SHOU J, LI J, GORKIN DU, JUNG I, WU H, ZHAI Y, TANG Y, LU Y, WU Y, JIA Z, LI W, ZHANG MQ, REN B, KRAINER AR, MANIATIS T, WU Q. CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function. *Cell* 2015; **162**(4): 900-910.
- [26] HARADA T, SWIFT J, IRIANTO J, SHIN JW, SPINLER KR, ATHIRASALA A, DIEGMILLER R, DINGAL PC, IVANOVSKA IL, DISCHER DE. Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *J Cell Biol* 2014; **204**(5): 669-682.
- [27] HOFFMANN K, DREGER CK, OLINS AL, OLINS DE, SHULTZ LD, LUCKE B, KARL H, KAPS R, MULLER D, VAYA A, AZNAR J, WARE RE, SOTELO CRUZ N, LINDNER TH, HERRMANN H, REIS A, SPERLING K. Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly). *Nat Genet* 2002; **31**(4): 410-414.
- [28] HOFFMANN K, SPERLING K, OLINS AL, OLINS DE. The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid. *Chromosoma* 2007; **116**(3): 227-235.
- [29] ILLNER D, ZINNER R, HANDTKE V, ROUQUETTE J, STRICKFADEN H, LANCTOT C, CONRAD M, SEILER A, IMHOF A, CREMER T, CREMER M. Remodeling of nuclear architecture by the thiodioxopiperazine metabolite chaetocin. *Exp Cell Res* 2010; **316**(10): 1662-1680.
- [30] JAHED Z, VU UT, FADAVI D, KE H, RATHISH A, KIM SCJ, FENG W, MOFRAD MRK. A molecular model for LINC complex regulation: activation of SUN2 for KASH binding. *Mol Biol Cell* 2018; **29**(16): 2012-2023.
- [31] LUKE Y, ZAIM H, KARAKESISOGLOU I, JAEGER VM, SELLIN L, LU W, SCHNEIDER M, NEUMANN S, BEIJER A, MUNCK M, PADMAKUMAR VC, GLOY J, WALZ G, NOEGEL AA. Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J Cell Sci* 2008; **121**(11): 1887-1898.
- [32] LUPIANEZ DG, KRAFT K, HEINRICH V, KRAWITZ P, BRANCATI F, KLOPOCKI E, HORN D, KAYSERILI H, OPITZ JM, LAXOVA R, SANTOS-SIMARRO F, GILBERT-DUSSARDIER B, WITTLER L, BORSCHWER M,

- HAAS SA, OSTERWALDER M, FRANKE M, TIMMERMANN B, HECHT J, SPIELMANN M, VISEL A, MUNDLOS S. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 2015; **161**(5): 1012-1025.
- [33] MATTOU-DRUBEZKI A, GRUENBAUM Y. Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60**(10): 2053-2063. 35
- [34] MAUL GG, DEAVEN L. Quantitative determination of nuclear pore complexes in cycling cells with differing DNA content. *J Cell Biol* 1977; **73**(3): 748-760.
- [35] MORGAN MA, SHILATIFARD A. Chromatin signatures of cancer. *Genes Dev* 2015; **29**(3): 238-249.
- [36] NEUMANN B, WALTER T, HERICHE JK, BULKESCHER J, ERFLE H, CONRAD C, ROGERS P, POSER I, HELD M, LIEBEL U, CETIN C, SIECKMANN F, PAU G, KABBE R, WUNSCH A, SATAGOPAM V, SCHMITZ MH, CHAPUIS C, GERLICH DW, SCHNEIDER R, EILS R, HUBER W, PETERS JM, HYMAN AA, DURBIN R, PEPPERKOK R, ELLENBERG J. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* 2010; **464**(7289): 721-727.
- [37] OGURA M, YAMAMOTO Y, MIYASHITA H, KUMAMOTO H, FUKUMOTO M. Quantitative analysis of nuclear shape in oral squamous cell carcinoma is useful for predicting the chemotherapeutic response. *Med Mol Morphol* 2016; **49**(2): 76-82.
- [38] OHBA T, SCHIRMER EC, NISHIMOTO T, GERACE L. Energy- and temperature-dependent transport of integral proteins to the inner nuclear membrane via the nuclear pore. *J Cell Biol* 2004; **167**(6): 1051-1062.
- [39] OLINS AL, ZWARGER M, HERRMANN H, ZENTGRAF H, SIMON AJ, MONESTIER M, OLINS DE. The human granulocyte nucleus: Unusual nuclear envelope and heterochromatin composition. *Eur J Cell Biol* 2008; **87**(5): 279-290.
- [40] OU HD, PHAN S, DEERINCK TJ, THOR A, ELLISMAN MH, O'SHEA CC. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 2017; **357**(6349).
- [41] PAJEROWSKI JD, DAHL KN, ZHONG FL, SAMMAK PJ, DISCHER DE. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(40): 15619-15624.
- [42] PERIC-HUPKES D, MEULEMAN W, PAGIE L, BRUGGEMAN SW, SOLOVEI I, BRUGMAN W, GRAF S, FLICEK P, KERKHOVEN RM, VAN LOHUIZEN M, REINDERS M, WESSELS L, VAN STEENSEL B. Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol Cell* 2010; **38**(4): 603-613.
- [43] POLESHKO A, MANSFIELD KM, BURLINGAME CC, ANDRAKE MD, SHAH NR, KATZ RA. The human protein PRR14 tethers heterochromatin to the nuclear lamina during interphase and mitotic exit. *Cell Rep* 2013; **5**(2): 292-301.
- [44] POROPATICH K, YANG JC, GOYAL R, PARINI V, YANG XJ. Nuclear size measurement for distinguishing urothelial carcinomas from reactive urothelium on tissue sections. *Diagn Pathol* 2016; **11**(1): 57.
- [45] RAAB M, GENTILI M, DE BELLY H, THIAM HR, VARGAS P, JIMENEZ AJ, LAUTENSCHLAEGER F, VOTURIEZ R, LENNON-DUMENIL AM, MANEL N, PIEL M. ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* 2016; **352**(6283): 359-362.
- [46] RAZAFSKY D, HODZIC D. Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections. *J Cell Biol* 2009; **186**(4): 461-472.
- [47] ROBINSON R. Polyglutamine leads to altered chromatin architecture and neurodegeneration. *PLoS Biol* 2006; **4**(3): e70.
- [48] SCAFFIDI P, GORDON L, MISTELI T. The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises. *PLoS Biol* 2005; **3**(11): e395.
- [49] SCAFFIDI P, MISTELI T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 2006; **312**(5776): 1059-1063.
- [50] SHIMI T, KITTISOPIKUL M, TRAN J, GOLDMAN AE, ADAM SA, ZHENG Y, JAQAMAN K, GOLDMAN RD. Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Mol Biol Cell* 2015; **26**(22): 4075-4086.
- [51] SHIN JW, SPINLER KR, SWIFT J, CHASIS JA, MOHANDAS N, DISCHER DE. Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**(47): 18892-18897.

- [52] SHIN JW, TEWARI M, REHFELDT F, SPEICHER DW, DISCHER DE. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* 2013; **341**(6149): 1240104.
- [53] SWIFT J, IVANOVSKA IL, BUXBOIM A, HARADA T, DINGAL PC, PINTER J, PAJEROWSKI JD, SPINLER KR, SPLINTER E, HEATH H, KOOREN J, PALSTRA RJ, KLOUS P, GROSVELD F, GALJART N, DE LAAT W. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Dev* 2006; **20**(17): 2349-2354.
- [54] STEPHENS AD, BANIGAN EJ, ADAM SA, GOLDMAN RD, MARKO JF. Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus. *Mol Biol Cell* 2017; **28**(14): 1984-1996.
- [55] STEPHENS AD, BANIGAN EJ, MARKO JF. Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions. *Curr Opin Cell Biol* 2019; **58**76-84.
- [56] STEPHENS AD, LIU PZ, BANIGAN EJ, ALMASSALHA LM, BACKMAN V, ADAM SA, GOLDMAN RD, MARKO JF. Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins. *Mol Biol Cell* 2018; **29**(2): 220-233.
- [57] THEERTHAGIRI G, EISENHARDT N, SCHWARZ H, ANTONIN W. The nucleoporin Nup188 controls passage of membrane proteins across the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 2010; **189**(7): 1129-1142.
- [58] TODA T, HSU JY, LINKER SB, HU L, SCHAFER ST, MERTENS J, JACINTO FV, HETZER MW, GAGE FH. Nup153 Interacts with Sox2 to Enable Bimodal Gene Regulation and Maintenance of Neural Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 2017; **21**(5): 618-634 e617.
- [59] TOWBIN BD, GONZALEZ-AGUILERA C, SACK R, GAIDATZIS D, KALCK V, MEISTER P, ASKJAER P, GASSER SM. Step-wise methylation of histone H3K9 positions heterochromatin at the nuclear periphery. *Cell* 2012; **150**(5): 934-947.
- [60] TWINING SS, SCHULTE DP, WILSON PM, FISH BL, MOULDER JE. Retinol is sequestered in the bone marrow of vitamin A-deficient rats. *J Nutr* 1996; **126**(6): 1618-1626.
- [61] UMEHARA T, YAGUCHI H, SUZUKI M, ISOZAKI E, MOCHIO S. Are hypersegmented neutrophils a characteristic of Boucher-Neuhauser syndrome? *J Neurol Sci* 2010; **295**(1-2): 128-130.
- [62] VALOUEV A, JOHNSON SM, BOYD SD, SMITH CL, FIRE AZ, SIDOW A. Determinants of nucleosome organization in primary human cells. *Nature* 2011; **474**(7352): 516-520.
- [63] VERBOON JM, RINCON-ARANO H, WERWIE TR, DELROW JJ, SCALZO D, NANDAKUMAR V, GROUDINE M, PARKHURST SM. Wash interacts with lamin and affects global nuclear organization. *Curr Biol* 2015; **25**(6): 804-810.
- [64] VIDAK S, FOISNER R. Molecular insights into the premature aging disease progeria. *Histochem Cell Biol* 2016; **145**(4): 401-417.
- [65] VOISIN MB, WOODFIN A, NOURSHARGH S. Monocytes and neutrophils exhibit both distinct and common mechanisms in penetrating the vascular basement membrane in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**(8): 1193-1199.
- [66] WANG P, DREGER M, MADRAZO E, WILLIAMS CJ, SAMANIEGO R, HODSON NW, MONROY F, BAENA E, SANCHEZ-MATEOS P, HURLSTONE A, REDONDO-MUNOZ J. WDR5 modulates cell motility and morphology and controls nuclear changes induced by a 3D environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; **115**(34): 8581-8586.
- [67] WASZAK SM, DELANEAU O, GSCHWIND AR, KILPINEN H, RAGHAV SK, WITWICKI RM, ORIOLI A, WIEDERKEHR M, PANOUSIS NI, YUROVSKY A, ROMANO-PALUMBO L, PLANCHON A, BIELSER D, PADIOLEAU I, UDIN G, THURNHEER S, HACKER D, HERNANDEZ N, REYMOND A, DEPLANCKE B, DERMITZAKIS ET. Population Variation and Genetic Control of Modular Chromatin Architecture in Humans. *Cell* 2015; **162**(5): 1039-1050.
- [68] WESTERMAN DA, EVANS D, METZ J. Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case-control study. *Br J Haematol* 1999; **107**(3): 512-515.
- [69] WITKIN KL, FRIEDERICHS JM, COHEN-FIX O, JASPERSEN SL. Changes in the nuclear envelope environment affect spindle pole body duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2010; **186**(3): 867-883.

- [70] WORMAN HJ. Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol* 2012; **226**(2): 316-325.
- [71] WORMAN HJ. Components of the nuclear envelope and their role in human disease. *Novartis Found Symp* 2005; **264**35-42; discussion 42-50, 227-230.
- [72] XIONG H, RIVERO F, EUTENEUER U, MONDAL S, MANA-CAPELLI S, LAROCHELLE D, VOGEL A, GASSEN B, NOEGEL AA. Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability. *Traffic* 2008; **9**(5): 708-724.
- [73] YERLE-BOUSSOU M, MOMPART F, IANNUCELLI E, ROBELIN D, JAUNEAU A, LAHBIB-MANSAIS Y, DELCROS C, OSWALD IP, GELLIN J. Nuclear architecture of resting and LPS-stimulated porcine neutrophils by 3D FISH. *Chromosome Res* 2009; **17**(7): 847-862.
- [74] ZHAO H, SIFAKIS EG, SUMIDA N, MILLAN-ARINO L, SCHOLZ BA, SVENSSON JP, CHEN X, RONNEGREN AL, MALLET DE LIMA CD, VARNOOSFADERANI FS, SHI C, LOSEVA O, YAMMINE S, ISRAELSSON M, RATHJE LS, NEMETI B, FREDLUND E, HELLEDAY T, IMREH MP, GONDOR A. PARP1- and CTCF-Mediated Interactions between Active and Repressed Chromatin at the Lamina Promote Oscillating Transcription. *Mol Cell* 2015; **59**(6): 984-997.
- [75] ZHENG X, KIM Y, ZHENG Y. Identification of lamin B-regulated chromatin regions based on chromatin landscapes. *Mol Biol Cell* 2015; **26**(14): 2685-2697.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 24.05.2021

Przyjęto: 30.06.2021

Pracownia Behawioralno-Metaboliczna

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. M. Mossakowskiego PAN

ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

tel. +48 22 6086 607

e-mail: rfilipkowski@imdik.pan.pl

WPLYW PROMIENIOWANIA UV NA POWSTAWANIE NOWOTWORÓW SKÓRY U CHORYCH PO TRANSPLANTACJI NARZĄDÓW – PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

THE IMPACT OF UV RADIATION
ON THE ETIOPATHOGENESIS OF SKIN (MALIGNANT)
NEOPLASMS IN PATIENTS AFTER ORGAN
TRANSPLANTATION – A LITERATURE REVIEW

Beata IMKO-WALCZUK¹, Maria-Luiza PIESIAKÓW²,
Adriana MARQUARDT-FESZLER³, Karolina CEKAŁA³,
Damian KADYŁAK⁴, Alicja DĘBSKA-ŚLIZIEN²

¹Copernicus Podmiot Leczniczy Sp. z o.o.,
Poradnia Skórno-Wenerologiczna, Gdańsk

²Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych,
Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski

³Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski

⁴Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski

Streszczenie: Promieniowanie UV jest jednym z najważniejszych czynników ryzyka powstawania nowotworów skóry zarówno w populacji ogólnej, jak też w grupie chorych po przeszczepieniach narządowych. Objawy kliniczne oparzenia słonecznego mają znamienne skutki molekularne na powstawanie nowotworów skóry. Kancerogenny wpływ promieniowania UV polega głównie na mechanizmach bezpośredniego uszkodzenia komórkowego DNA, pośredniego uszkodzenia DNA przez reaktywne formy tlenu oraz immunosupresji. Osłabieniu ulega miejscowa odporność w skórze (hamowanie reakcji nadwrażliwości kontaktowej), występuje też zmiana w morfologii i funkcji komórek Langerhansa, zmniejszenie zdolności komórek Langerhansa do prezentowania antygeny, uwalniania IL-10, TNF, IL-1, cis-UCA, hamowania ogólnej odpowiedzi immunologicznej (hamowanie reakcji nadwrażliwości typu późnego), uwalniania IL-1 α , TNF i prostaglandyn E2, IL-10. UVB wykazuje działanie genotoksyczne, od powstawania substytucji pojedynczych zasad w miejscach zasad pirymidynowych, np. cytozyna (C) na tymina (T) czy też do mutacji tandemowych – CC

na TT, poprzez aberracje chromosomowe do mutacji genomowych – poprzez wytworzenie fotoproduktów – dimerycznych form z sąsiadujących zasad pirymidynowych, głównie cyklobutanowych dimerów pirymidynowych i w mniejszym stopniu fotoproduktów typu 6-4.

UVA uszkadza DNA głównie przez generowanie reaktywnych form tlenu, które indukują powstanie uszkodzeń oksydacyjnych w postaci modyfikacji zasad azotowych (8-oksoguanina), jednoniciowych pęknięć i rzadziej dwuniciowych pęknięć w łańcuchu DNA. Głównym mechanizmem odpowiedzialnym za naprawę uszkodzeń DNA jest NER (*Nucleotide Excision Repair*). Wyróżnia się dwie odrębne drogi działania NER: GG-NER oraz TC-NER. Innym mechanizmem zapobiegającym kumulacji mutacji jest MMR (*Mismatch Repair*). U chorych, u których komórki wykazują wadliwy MMR dochodzi do tolerancji inkorporowanej 6-TG w DNA, a przez dalszą replikację DNA z nienaprawionymi błędami dochodzi do kumulacji mutacji i jednocześnie zahamowania procesu apoptozy. Defekt MMR pozwala zatem na przeżycie i wzrost komórek z uszkodzonym DNA, powodując nowotworzenie.

Wiadomo, że podstawowe leki immunosupresyjne, takie jak cyklosporyna A, takrolimus oraz azatiopryna zaburzają mechanizm naprawy NER, przez co prowadzą do mutagenyzy indukowanej promieniowaniem UV w skórze i zwiększają ryzyko skórnej kancerogenezy, azatiopryna zaburza również MMR. Cyklosporyna A ma również działanie hamujące apoptozę, co może zwiększać mutagenezę indukowaną promieniowaniem UV i kancerogenezę. Natomiast nowa generacja leków – inhibitory mTOR (sirolimus, ewerolimus) przez hamowanie kinazy mTOR w szlaku AKT może zaburzać kontrolę cyklu komórkowego i indukować apoptozę, zwłaszcza w komórkach, w których supresorowano białko p53. Działanie to daje efekt przeciwnowotworowy, jednocześnie z działaniem immunosupresyjnym, co jest istotne u chorym po przeszczepieniu narządów.

Słowa kluczowe: UV, immunosupresja, rak skóry, czerniak, przeszczepienie narządów

Summary: UV irradiation is one of the main risk factors for the emergence of skin cancers in the general population as well as in the group of patients after organ transplants. Clinical symptoms of sunburn have significant molecular effects on the emergence of skin cancers. Carcinogenic effect of UV is mainly based on the mechanisms of direct DNA injury, indirect injury of DNA by reactive oxygen species and immunosuppression. Local resistance in skin is being weakened (suppressing of contact hypersensitivity response), changes in morphology and functions of Langerhans' cells, reducing the ability of Langerhans' cells to present the antigen, releasing IL-10, TNF, IL-1 cis-UCA, suppressing general immune answer (suppressing delayed type hypersensitivity), releasing IL-1 α , TNF and prostaglandins E2, IL-10.

UVB is unequivocally genotoxic, from the substitution of single nucleotid, for example cytosine (C) to thymine (T), chromosomal aberrations to genome mutations – through the formation of photoproduct – dimeric forms from pyridine bases, mainly cyclobutane pyrimidine dimers to a lesser degree in pyrimidine-(6-4)-pyrimidine photoproducts.

UVA injures DNA mostly through the generativity of reactive oxygen species, which induces the production of oxidative injuries in the shape of the modification of nucleotide bases (8-oxoguanine), single-strand breaks and in a lesser degree double-strand breaks in DNA.

The main mechanism responsible for the repairing of injured DNA is NER. There are two different ways of its acting: GG-NER and TC-NER. Another mechanism that prevents cumulation of mutations is MMR (*Mismatch Repair*). MMR-dependent processing is linked to apoptosis, and inactivation of repair provides an escape from thiopurine-induced cell death. Thus, MMR-deficient cells can tolerate 6-TG in their DNA, and their resistance to killing by 6-TG is well documented.

It's already known that basic immunosuppressive medicines, such as cyclosporine A, tacrolimus and azathioprine, harm the NER's repairing mechanism and they may lead to mutagenesis induced by UV in the skin or the increase of the risk of skin's carcinogenicity; azathioprine disturbs also MMR.

Cyclosporine A presents also acting that suppresses apoptosis, which may increase the mutagenesis induced by UV and carcinogenicity.

On the other hand, the new generation of medicines – mTOR inhibitors (sirolimus, everolimus), because of the effect of suppressing kinase mTOR in AKT pathway, may harm the control of cell cycle and induce apoptosis, especially in the cells where protein p53 has been suppressed. This acting causes anticancer effects simultaneously with immunosuppressive acting, which is important for patients after organ transplants.

Keywords: UV, immunosuppression, skin cancer, melanoma, organ transplantation

Wykaz stosowanych skrótów: **6-4PPs** – fotoprodukty typu 6-4 (ang. *pyrimidine-(6-4)-pyrimidine photoproducts*), **6-TG** – 6-tioguanina (ang. *6-thioguanine*), **8-oxoG** – 8-oksoguanina (ang. *8-oxoguanine*), **AKT** – serynowo-treoninowa kinaza białkowa (ang. *serine/threonine-specific protein kinase*), **ATF3** – aktywujący czynnik transkrypcyjny (ang. *Activating Transcription Factor 3*), **AZA** – azatiopryna (ang. *azathioprine*), **BCC** – rak podstawnkomórkowy (ang. *Basal Cell Carcinoma*), **C** – cytozyna (ang. *cytosine*), **CD4** – antygen różnicowania komórkowego 4 (ang. *Cluster of Differentiation 4*), **CHS** – reakcja nadwrażliwości kontaktowej (ang. *Contact Hypersensitivity Response*), **CNI** – inhibitory kalcyneuryny (ang. *Calcineurin Inhibitors*), **CPDs** – cyklobutanowe dimery pirymidynowych (ang. *Cyclobutane Pyrimidine Dimers*), **CsA** – cyklosporyna A (ang. *Cyclosporine A*), **DSBs** – dwuniciowe pęknięcia DNA (ang. *Double-Strand Breaks*), **DTH** – reakcja nadwrażliwości typu późnego (ang. *Delayed Type Hypersensitivity*), **EVERO** – ewerolimus (ang. *everolimus*), **G** – guanozyna (ang. *guanosine*), **GG-NER** – globalna naprawa NER genomu (ang. *Global Genome NER*), **GSO3** – sulfonian guaniny (ang. *guanine-6-sulfonate*), **HPV** – wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papilloma Virus*), **H-RAS oncogene** – onkogen H-RAS (ang. *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), **HR** – rekombinacja homologiczna (ang. *Homologous Recombination*), **HSV** – wirus opryszczki pospolitej (ang. *Herpes Simplex Virus*), **IL-1** – interleukina 1 (ang. *interleukin 1*), **IL-10** – interleukina 10 (ang. *interleukin 10*), **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*), **MK** – mięsak Kaposiego (ang. *Kaposi Sarcoma*), **MMF** – mykofenolan mofetylu (ang. *Mycophenolate Mofetil*), **MMR** – naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych (ang. *Mismatch Repair*), **MPS** – mykofenolan sodu (ang. *mycophenolate sodium*), **mTOR kinase** – kinaza białkowa treoninowo-serynowa (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*), **NER** – naprawa przez wycięcie nukleotydu (ang. *Nucleotide Excision Repair*), **NFAT** – czynnik jądrowy aktywowany komórek T (ang. *Negative calcineurin/nuclear Factor of Activated T cells*), **NHEJ** – scalanie niehomologicznych końców DNA (ang. *Non-Homologous End Joining*), **NMSC** – nieczerniakowe nowotwory skóry (ang. *Non-Melanoma Skin Cancers*), **OTRs** – biorcy narządów (ang. *Organ Transplant Recipients*), **PREX2** (ang. *Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate Dependent Rac Exchange Factor 2*), **PSI** – inhibitory sygnału proliferacji (ang. *Proliferation Signal Inhibitors*), **RAC1** – (ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), **RAPA** – rapamycyna (ang. *rapamycin*), **ROS** – reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*), **SCC** – rak kolczystokomórkowy (ang. *Squamous Cell Carcinoma*), **SCLE** – postać podostra skórna tocznia rumieniowatego (ang. *Subcutaneous Lupus Erythematoses*), **SIR** – sirolimus (ang. *sirolimus*), **SSBs** – jednoniciowe pęknięcia DNA (ang. *Single-Strand Breaks*), **T** – tymina (ang. *thymine*), **TAC** – takrolimus (ang. *tacrolimus*), **TC-NER** – naprawa NER sprzężona z transkrypcją (ang. *Transcription-Coupled NER*), **Th1** – limfocyty pomocnicze 1 (ang. *T helper 1 lymphocytes*), **Th2** – limfocyty pomocnicze 2 (ang. *T helper 2 lymphocytes*), **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor- α*), **TGF** – transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *Transforming Growth Factor beta*), **cis-UCA** – izomer cis kwasu urokanowego (ang. *cis isomer of Urocanic Acid*), **trans-UCA** – izomer trans kwasu urokanowego (ang. *trans isomer of Urocanic Acid*), **UCA**

– kwas urokanowy (ang. *Urocanic Acid*), **UV**- promieniowanie ultrafioletowe (ang. *Ultraviolet radiation*), **UVA** – promieniowanie ultrafioletowe typu A (ang. *Ultraviolet radiation type A*), **UVB** – promieniowanie ultrafioletowe typu B (ang. *Ultraviolet radiation type B*), **UVC** – promieniowanie ultrafioletowe typu C (ang. *Ultraviolet radiation type C*), **XP** – skóra pergaminowata i barwnikowa (ang. *Xeroderma Pigmentosum*), **XRCC2** – białko (ang. *X-ray Repair Cross-Complementing protein 2*), **XRCC3** – białko (ang. *X-ray Repair Cross-Complementing protein 3*).

WSTĘP

Nowotwory są jedną z głównych przyczyn zgonu chorych po przeszczepieniu narządów. Wśród wszystkich nowotworów powstających *de novo* po transplantacji najczęstsze są nowotwory skóry. Ryzyko rozwoju raka skóry u biorców przeszczepu – OTRs (ang. *Organ Transplant Recipients*), zależy od wielu czynników (**Tab. 1**). Jednym z czynników ryzyka mającym wpływ na kancerogenezę skórną jest promieniowanie słoneczne, zwłaszcza krótkofalowe promieniowanie ultrafioletowe. Związek między ekspozycją na promieniowanie słoneczne a występowaniem raków skóry, który jest dobrze poznany w populacji ogólnej istnieje również w populacji OTRs [42].

Ryzyko rozwoju nowotworów złośliwych skóry po transplantacji narządów jest znacznie wyższe wśród pacjentów zamieszkujących strefę podzwrotnikową i zwrotnikową. Obserwuje się to szczególnie wśród pacjentów z fototypem I-III według klasyfikacji Fitzpatricka, zamieszkujących wyżej wymienione strefy. Nowotwory te są rzadsze u Azjatów, np. w Japonii, gdzie ryzyko rozwoju raka skóry i mięsaka Kaposiego – MK (ang. *Kaposi Sarcoma*) jest bardzo niskie [44, 22]. Wiadomo, że u OTRs rasy kaukaskiej ze strefy podzwrotnikowej ryzyko raka kolczystokomórkowego – SCC (ang. *Squamous Cell Carcinoma*) wzrasta 65-250 razy, natomiast raka podstawnokomórkowego – BCC (ang. *Basal Cell Carcinoma*) około 10-krotnie [20, 31]. Natomiast w populacji zamieszkującej strefę umiarkowaną ryzyko tych nowotworów jest mniejsze (wzrasta około 34-krotnie) [31, 25, 6].

Stopień ryzyka występowania czerniaka u OTRs nie jest dokładnie znany i bywa opisywany jako identyczny jak w grupie chorych immunokompetentnych albo zwiększony nawet 12-krotnie [7]. Z badań wynika, że BCC i czerniak są związane z krótkimi, intensywnymi ekspozycjami na promieniowanie ultrafioletowe – UV (ang. *Ultraviolet radiation*) oraz epizodami ciężkich poparzeń słonecznych. Ryzyko SCC rośnie u chorych z wysoką kumulacyjną ekspozycją na promieniowanie UV. Obserwacje kliniczne wskazują, że nowotwory skóry indukowane przez przewlekłą ekspozycję słoneczną są znacznie bardziej immunogenne i podatne na reakcje odpowiedzi immunologicznej. W badaniach prowadzonych na myszach obserwowano regresję guzów o charakterze SCC wywołanych promieniowaniem UV, po przeniesieniu komórek nowotworowych z hodowli do gospodarza immunokom-

petentnego. Wzrost nowotworów skóry obserwowano jedynie u osobników poddanych immunosupresji oraz u zwierząt z prawidłowym układem immunologicznym w przypadku raków SCC wywołanych czynnikami chemicznymi.

TABELA 1. Czynniki ryzyka rozwoju nowotworów skóry u chorych po przeszczepieniu narządów
TABLE 1. Risk factors for developing a skin cancer among organ transplant recipients

Wspólne z populacją ogólną		Specyficzne dla populacji po przeszczepieniach narządów
Środowiskowe	Genetyczne	
Wiek	Fototyp skóry I i II, Niezdolność do opalania	Przetoka służąca do dializ
Przewlekłe blizny, owrzodzenia przetoki	Kolor oczu	Przyczyna niewydolności narządu (wielotorbielowatość nerek kłębuszkowe zapalenia nerek, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, nefropatia analgetyczna [24, 32])
Szerokość geograficzna	Kolor włosów	Czas trwania dializoterapii
Ekspozycja na promieniowanie UV, jonizujące	Pochodzenie etniczne	Przyjmowanie leków immunosupresyjnych w okresie przedtransplantacyjnym
Infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego – HPV Infekcje bakteryjne (przewlekła gruźlica skóry)	Płeć męska	Wystąpienie ogniska SCC w okresie przedtransplantacyjnym Rodzaj przeszczepionego narządu
Palenie tytoniu	HLA-A11	Rodzaj i czas trwania leczenia immunosupresyjnego po przeszczepieniu
Otyłość	Polimorfizm genu p53	
Stres oksydacyjny, wolne rodniki tlenowe – ROS	Polimorfizm genu promotorowego Il-10 Polimorfizm genu GST	

CHARAKTERYSTYKA PROMIENIOWANIA UV

W zależności od długości fali, promieniowanie UV można podzielić na promieniowanie ultrafioletowe typu A – UVA (ang. *Ultraviolet radiation type A*), pro-

mieniowanie ultrafioletowe typu B (ang. *Ultraviolet radiation type B*) i promieniowanie ultrafioletowe typu C (ang. *Ultraviolet radiation type C*). Promieniowanie UVC jest całkowicie pochłaniane przez atmosferę i nie dociera do powierzchni Ziemi. Mimo, że część promieniowania UVB jest pochłaniana przez warstwę ozonową w stratosferze, a ilość frakcji UVB docierająca do powierzchni Ziemi jest znacznie mniejsza w stosunku do UVA, to promieniowanie UVB jest jednak w największym stopniu odpowiedzialne za reakcje oparzenia słonecznego i najprawdopodobniej również za proces kancerogenezy skóry. Wiadomo, że powyżej 80% efektywnej dawki promieniowania UV pochodzi z pasma UVB. Efekt oparzenia słonecznego oraz wtórny proces kancerogenezy są skutkami pierwotnego uszkodzenia DNA indukowanego promieniowaniem UV, przede wszystkim UVB [15].

TABELA 2. Wpływ promieniowania UV na skórę (źródło [42])

TABLE 2. The impact of UV radiation on the skin (source [42])

skutki uv	mechanizmy molekularne
poparzenie słoneczne obrzęk skóry rumień pęcherze złuszczenie naskórka	<ul style="list-style-type: none"> • reakcja zapalna w skórze • apoptoza komórek • rozszerzenie naczyń krwionośnych • przenikanie leukocytów
powstanie reaktywnych form tlenu- ROS	<ul style="list-style-type: none"> • uszkodzenie DNA z wytworzeniem np. 8-oksoguaniny
lokalna immunosupresja	<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie reakcji nadwrażliwości kontaktowej – CHS • zmiany w morfologii i funkcji komórek Langerhansa • zmniejszenie zdolności komórek Langerhansa do prezentowania antygeny • uwolnienie IL-10, TNF-alfa, IL-1 kwasu <i>cis</i>-urokanowego
hamowanie ogólnej odpowiedzi immunologicznej	<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie reakcji nadwrażliwości typu późnego – DTH • uwolnienie IL-1 alfa, TNF alfa, prostaglandyn E2, IL-10

WPLYW PROMIENIOWANIA UV NA SKÓRĘ

Reakcją skóry na nadmierne działanie promieniowania UV jest oparzenie słoneczne, w którym początkowo dochodzi do silnej reakcji zapalnej, a następnie śmierci komórek naskórka w procesie apoptozy (**Tab. 2**). Następuje rozszerzenie naczyń krwionośnych, wynaczynianie, przenikanie leukocytów, uwalnianie prostaglandyn i innych mediatorów zapalnych z uszkodzonych keratynocytów, skutkiem tego jest powstanie rumienia i narastanie obrzęku. Po intensywnym oparzeniu słonecznym tworzą się pęcherze, a następnie złuszcza się powierzchnia naskórka. Fototypy I -III wg klasyfikacji Fitzpatricka są szczególnie narażone na reakcję oparzenia.

Skóra poddawana przewlekłemu narażeniu na promieniowanie UV stopniowo adaptuje się do czynnika uszkadzającego, jakim jest promieniowanie UV. Nadmierne reakcje zapalne w skórze są naturalnym czynnikiem obrony organizmu.

PROCESY MOLEKULARNE WYWOŁYWANE PRZEZ UV W SKÓRZE

Promieniowanie UV powodując utlenianie białek zaangażowanych w budowę cytoszkieletu, metabolizm i transdukcję sygnału (czego najczęstszą postacią jest karbonylacja) przyczynia się do uszkodzania proteomu. Akumulacja nadmiernie karbonylowanych protein może doprowadzić do kancerogenezy przez wytwarzanie ROS o aktywności genotoksycznej jak i przez bezpośrednie upośledzenie systemu detekcji uszkodzeń DNA, zwiększając ryzyko, że uszkodzone DNA ulegnie replikacji generując onkogenne mutacje [49].

Reaktywne formy tlenu – ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*), generowane przez komórki narażone na stres związany z promieniowaniem głównie UVA, ale też i UVB, mogą powodować pośrednie uszkodzenia zasad DNA i wytworzenie produktów, takich jak 8-oksoguanina-8-oxoG (*8-oxoguanine*). Mechanizmy obronne skóry angażują różne cząsteczki wyłapujące wolne rodniki, tworzące się w wyniku promieniowania UV. Tirole, melanina i antyoksydacyjne systemy enzymatyczne i nieenzymatyczne absorbują i eliminują prawie wszystkie potencjalnie kancerogenne elementy uszkadzające DNA. Promieniowanie UV może być absorbowane przez wiele chromoforów, izomery trans kwasu urokanowego -trans-UCA (ang. *trans isomer of Urocanic Acid*), lipidy błony komórkowej, pierścienie hemu w erytrocytach warstwy brodawkowej skóry właściwej, hemoglobinę oraz przez samo DNA.

System naprawiający DNA, który jest obecny we wszystkich komórkach i skutecznie niweluje uszkodzenia DNA, jest najbardziej skuteczny w keratynocytach naskórka. To właśnie keratynocyty jako pierwsze są narażone na ekspozycję

cję słoneczną i mają znacznie skuteczniejsze mechanizmy naprawcze DNA niż np. limfocyty T. Mechanizmy te z czasem trwania ekspozycji na UV oraz z wiekiem chorego mogą powodować gromadzenie błędów w kodzie genetycznym i doprowadzić do kancerogenezy. Niedobór lub nieprawidłowe działanie różnych elementów systemu naprawy uszkodzeń DNA prowadzi do różnych typów genofotodermatoz, np. skóry pergaminowej i barwnikowej -XP (Xeroderma Pigmentosum), w której pacjenci rozwijają wszystkie rodzaje nowotworów złośliwych skóry już we wczesnym okresie życia.

IMMUNOSUPRESYJNY WPŁYW PROMIENIOWANIA UV NA SKÓRĘ

Promieniowanie UV, oprócz bezpośredniego wpływu na procesy prowadzące do uszkodzenia DNA, wykazuje również znaczący wpływ na lokalną i ogólną odpowiedź immunologiczną (**Tab. 2**).

Indukowana szczególnie przez promieniowanie UVB lokalna immunosupresja, hamuje reakcję nadwrażliwości kontaktowej – CHS (ang. *Contact Hypersensitivity Response*), wywoływaną przez różne hapteny, świadczącą o aktywności komórek dendrytycznych w skórze. Za inhibicję tej reakcji odpowiadają wyindukowane przez promieniowanie UVB zmiany w morfologii i funkcji komórek Langerhansa w naskórku. Prowadzi to do unieruchomienia lub w przypadku wysokich dawek promieniowania UV śmierci tych komórek. Dochodzi do uwolnienia wielu rozpuszczalnych czynników immunosupresyjnych, takich jak interleukiny-10 (ang. *interleukin 10*, IL-10), czynnika martwicy nowotworu – TNF (ang. *Tumor Necrosis Factor*), interleukiny-1 (ang. *interleukin 1*, IL-1), czy izomeru cis kwasu urokanowego – cis-UCA (ang. *cis isomer of Urocanic Acid*).

Promieniowanie UVB również zmniejsza zdolność komórek Langerhansa do prezentowania antygenów, zależnych od głównego układu zgodności tkankowej -MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*).

Napromieniowanie komórek Langerhansa niską dawką promieniowania UVB powoduje także preferencyjną aktywację komórek CD4⁺ (ang. *Cluster of Differentiation 4*) w populacji limfocytów pomocniczych 2 – Th2 (ang. *T helper 2 lymphocytes*). Brak aktywacji komórek CD4⁺ i limfocytów pomocniczych 1 – Th1 (ang. *T helper 1 lymphocytes*) sprawia, że komórki Langerhansa zmieniają się z immunogennych na tolerogenne komórki prezentujące antygen [48]. IL-10 pochodząca z indukowanych promieniowaniem UV keratynocytów hamuje funkcje prezentowania antygeny przez komórki Langerhansa [3, 13].

Inny czynnik immunosupresyjny – czynnik martwicy nowotworu α – TNF- α (ang. *Tumor Necrosis Factor- α*), jest prawdopodobnie zaangażowany w migrację

komórek Langerhansa z ekspozycji na promieniowanie UV skóry do regionalnych węzłów chłonnych, gdzie komórki te prezentują antygeny limfocytom T. Przypuszcza się również, że geny TNF- α mogą determinować reakcje wrażliwości skóry na promieniowanie UVB [36].

Wyższe dawki promieniowania UVB u myszy (>2 kJ/m²) powodują zahamowanie zarówno nadwrażliwości kontaktowej CHS, jak i nadwrażliwości typu późnego -DTH (ang. *Delayed Type Hypersensitivity*), a to wpływa na ogólną odpowiedź immunologiczną [2, 4, 13, 51, 52]. Dochodzi do zaburzeń w sygnalizacji w wyniku powstawania mutacji fotoreceptora DNA. Pojawiają się zmiany strukturalne w receptorze kwasu urokanowego- UCA (ang. *Urocanic Acid*) i dochodzi do uwolnienia wielu mediatorów o właściwościach immunosupresyjnych, takich jak IL-1 α , TNF- α , prostaglandyn E2 i IL-10 [3, 5, 14, 38, 46, 50, 54].

Indukowana przez UVB immunosupresja jest odpowiedzialna za hamowanie odporności komórkowej i w związku z tym jest czynnikiem wyzwalającym i warunkującym rozwój i przebieg wielu chorób skóry. Przede wszystkim przyczynia się do wywołania zapalenia i śmierci komórek naskórka, przedwczesnego starzenia się skóry i zapoczątkowania kancerogenezy skórnej. Odgrywa również bardzo ważną rolę w rozwoju wielu fotodermatoz, takich jak wielopostaciowe osutki świetlne, pokrzywka słoneczna, reakcje fototoksyczne i fotoalergiczne, przewlekłe posłoneczne zapalenie skóry oraz fotodermatoz wtórnych, takich jak porfirie [11, 28, 29]. Doskonale poznana jest także zależność oparzenia słonecznego i zaostrzenia zmian skórnych w przebiegu tocznia rumieniowatego, szczególnie jego postaci obrzękowej (*lupus tumidus*) czy postaci podostrej skórnej tocznia rumieniowatego – SCLE (ang. *Subcutaneous Lupus Erythematoses*), jak i chorób infekcyjnych – aktywacja zakażenia wirusem opryszczki zwykłej – HSV (ang. *Herpes Simplex Virus*).

BEZPOŚREDNI WPLYW PROMIENIOWANIA UV NA DNA

Uszkodzenia DNA indukowane przez promieniowanie UV mogą spowodować zmiany w genomie, zaczynając od subtelnych mutacji punktowych (zmiana pojedynczej zasady) do ogromnych aberracji chromosomowych, a nawet tworzenia mikrojąder – małych satelit jąder głównych. Najbardziej krytyczną fazą cyklu komórkowego w nabywaniu mutacji genomowych jest faza S cyklu komórkowego (**Tab. 3**).

Promieniowanie UVB jest łatwo absorbowane przez DNA, ze względu na dużą liczbę pierścieni aromatycznych w jego budowie. Dochodzi do uszkodzenia DNA i wytwarzania dimerycznych form z sąsiadujących zasad pirymidynowych,

głównie cyklobutanowych dimerów pirymidynowych – CPDs (ang. *Cyclobutane Pyrimidine Dimers*) i w mniejszym stopniu fotoproduktów typu 6-4 – 6-4PPs (ang. *Pyrimidine-(6-4)-Pyrimidone Photoproducts*), w stosunku 4:1. Fotoprodukty te doprowadzają do powstawania mutacji punktowych, polegających na substytucji pojedynczych zasad w miejscach zasad pirymidynowych, np. C na T (około 70% wszystkich mutacji), czy też do mutacji tandemowych – CC na TT (około 10%). Uważa się, że mutacje te są charakterystyczne dla działania promieniowania UV – UVR fingerprint [15, 27, 37]. Nowo odkryte onkogeny, takie jak RAC1 (ang. *Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*) i PREX2 (ang. *Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate Dependent Rac Exchange Factor 2*) prawdopodobnie predysponują do rozwoju czerniaka skóry. Mutacja RAC1 jest znamienna dla promieniowania słonecznego, a mutacja PREX2 najczęściej potwierdzana jest w czerniakach z obszaru skóry nasłonecznianej [10, 17].

TABELA 3. Mechanizmy uszkodzenia DNA skóry przez UV, (źródło [42])

TABLE 3. Mechanisms of skin DNA damage by UV radiation (source [42])

rodzaj uszkodzenia	mechanizmy molekularne
uszkodzenie DNA przez UVB	<ul style="list-style-type: none"> • CPDs , 6-4PPs → DSBs → mutacje punktowe C na T → mutacje tandemowe CC-TT
uszkodzenie DNA przez UVA	<ul style="list-style-type: none"> • CPDs → DSBs → mutacje punktowe T na G → mutacje tandemowe TT-GG • ROS → SSBs, DSBs

Pośredni mechanizm uszkodzenia zasad DNA przez ROS jest dość ważny, jednak dominującym uszkodzeniem DNA w skórze indukowanym przez promieniowanie UVA jest tworzenie CPDs [37]. CPDs powodują wzrost częstości dwuniciowych pęknięć DNA- DSBs (ang. *Double-Strand Breaks*) podczas replikacji DNA

w fazie S cyklu komórkowego [12]. ROS generowane wskutek absorpcji promieniowania UVB, a głównie UVA przez chromofory komórkowe mogą powodować uszkodzenia DNA, które prowadzą do powstawania jednoniciowych pęknięć DNA – SSBs (ang. *Single-Strand Breaks*) i w mniejszym stopniu DSBs. Przyjmuje się, że pojedyncze nienaprawione DSB wystarcza do indukcji procesu apoptozy komórki.

Generowane ROS oraz CPDs powodują autofagię (samotrąwienie komórki). Dysregulacja tego szlaku przyczynia się do rozwoju chorób skóry, w tym kancerogenezy [45].

Polimorfizm genów, które kodują białka biorące udział w naprawie DSBs–XRCC2 (ang. *X-ray Repair Cross-Complementing Protein 2*), XRCC3 (ang. *X-ray Repair Cross-Complementing Protein 2*), ligaza IV, wpływają na zdolność naprawy DNA i warunkują wzrost ryzyka kancerogenezy indukowanej promieniowaniem UV. Pacjenci, u których wykryto nowotwór skóry, wykazują znacznie większą wrażliwość na powstawanie DSBs w leukocytach napromieniowanych UV [18, 53].

Uszkodzenia o charakterze DSBs są powodowane również przez wiele innych genotoksycznych cząsteczek, dlatego nie są one wyłącznie znamienne dla promieniowania UV.

MECHANIZMY NAPRAWCZE USZKODZEŃ WYWOŁANYCH PROMIENIOWANIEM UV W SKÓRZE

Głównym mechanizmem odpowiedzialnym za naprawę uszkodzeń DNA jest naprawa przez wycięcie nukleotydu – NER (ang. *Nucleotide Excision Repair*). Polega na mechanizmie „wytnij i wklej”, który angażuje wiele enzymów, umożliwiających rozpoznawanie i wycinanie oligomerów zawierających uszkodzenia oraz wypełnianie luk w nici DNA. Wyróżnia się dwa odrębne działania NER: globalna naprawa NER genomu –GG-NER (ang. *Global Genome NER*) oraz naprawa NER sprzężona z transkrypcją – TC-NER (ang. *Transcription-Coupled NER*). GG-NER zajmuje się uszkodzeniami DNA nie poddawanego transkrypcji, zawartego w większości genomu, natomiast TC-NER dotyczy transkrybowanej nici aktywnego genu i usuwa uszkodzenia hamujące polimerazę RNA podczas transkrypcji. GG-NER i TC-NER różnią się sposobem rozpoznawania uszkodzenia i biologicznymi skutkami działania [47]. GG-NER chroni przed mutacjami w genomie powstałymi na skutek replikacji nienaprawionych uszkodzeń, które mogłyby prowadzić do nowotworzenia, natomiast TC-NER zapewnia prawidłową i skuteczną transkrypcję genów, która odgrywa ważną rolę w ochronie przeciw starzeniu.

Wady w obrębie systemu TC-NER bardzo podnoszą wrażliwość na działanie promieniowania UV, powodując ostre poparzenia słoneczne, natomiast w przypadku GG-NER nie obserwuje się takiego wpływu. Nieprawidłowe działanie GG-NER może powodować znaczący wzrost mutagenezy i kancerogenezy, któ-

re obserwuje się np. u pacjentów z XP. Jeśli uszkodzenia DNA, CPDs i 6-PPs nie są usunięte z transkrybowanych nici DNA, komórka jest bardziej wrażliwa na zahamowanie cyklu komórkowego i apoptozę. Zatrzymanie cyklu pozwala na uzyskanie dłuższego czasu na naprawę, uruchomienie alternatywnych mechanizmów naprawy, takich jak rekombinacja homologiczna – HR (ang. *Homologous Recombination*) lub scalanie niehomologicznych końców DNA – NHEJ (ang. *Non-Homologous End Joining*).

Natomiast wyzwolona apoptoza powoduje śmierć komórki, która mogłaby być replikowana z nadmiernie uszkodzonym genomem i co mogłoby powoli spowodować wzrost liczby błędów w trakcie replikacji. Nieprawidłowość w obrębie GG-NER, jak to się dzieje w przypadku pacjentów XP typu C (najczęstszy typ XP w populacji rasy białej), nie wyzwala sygnałów alarmowych w celu zahamowania cyklu komórkowego, a apoptoza nie jest wzmożona. Wiąże się to z tym, że TC-NER jest wciąż sprawne i komórka z uszkodzeniem istniejącym w jej nie-transkrybowanym DNA może nadal replikować. Replikacja takiego uszkodzenia DNA jest jednak związana ze zwiększoną mutagenezą. U pacjentów z XP, z ciężkim defektem GG-NER, przy braku ścisłej ochrony przed promieniowaniem UV, powstaje wiele raków skóry już w wieku dziecięcym; pacjenci ci umierają przed osiągnięciem 20 roku życia.

ROLA LEKÓW IMMUNOSUPRESYJNYCH ORAZ ICH WSPÓLDZIAŁANIE Z UV W ETIOPATEGENIE NOWOTWORÓW SKÓRY

Istnieje wiele mechanizmów, którymi leki immunosupresyjne wpływają na mutagenezę indukowaną promieniowaniem UV w skórze i zwiększają ryzyko kancerogenezy. Do podstawowych leków stosowanych wśród chorych wymagających immunosupresji zalicza się cyklosporynę A – CsA (ang. *cyclosporine A*), takrolimus – TAC (ang. *tacrolimus*) oraz azatioprynę – AZA (ang. *azathioprine*) oraz leki nowej generacji jak mykofenolan mofetulu – MMF (ang. *mycophenolate mofetil*)/ mykofenolan sodu – MPS (ang. *mycophenolate sodium*) czy sirolimus – SIR(ang. *sirolimus*)/ ewerolimus – EVERO (ang. *everolimus*).

CsA wykazuje działanie hamujące apoptozę, co może zwiększać mutagenezę indukowaną promieniowaniem UV i kancerogenezę. Udowodniono, że CsA sprzyja wzrostowi guza i przerzutom przez wzrost ekspresji transformującego czynnika wzrostu beta – TGF β (ang. *Transforming Growth Factor beta*), niezależnie od jej działania immunosupresyjnego [21, 55]. Nowotwory promowane przez stosowanie CsA wytwarzają również więcej VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), co również przyspiesza przerzutowanie [19]. Ponadto wzrost odsetka tandemowych mutacji obserwowanych w mutacji białka p53 u chorych po

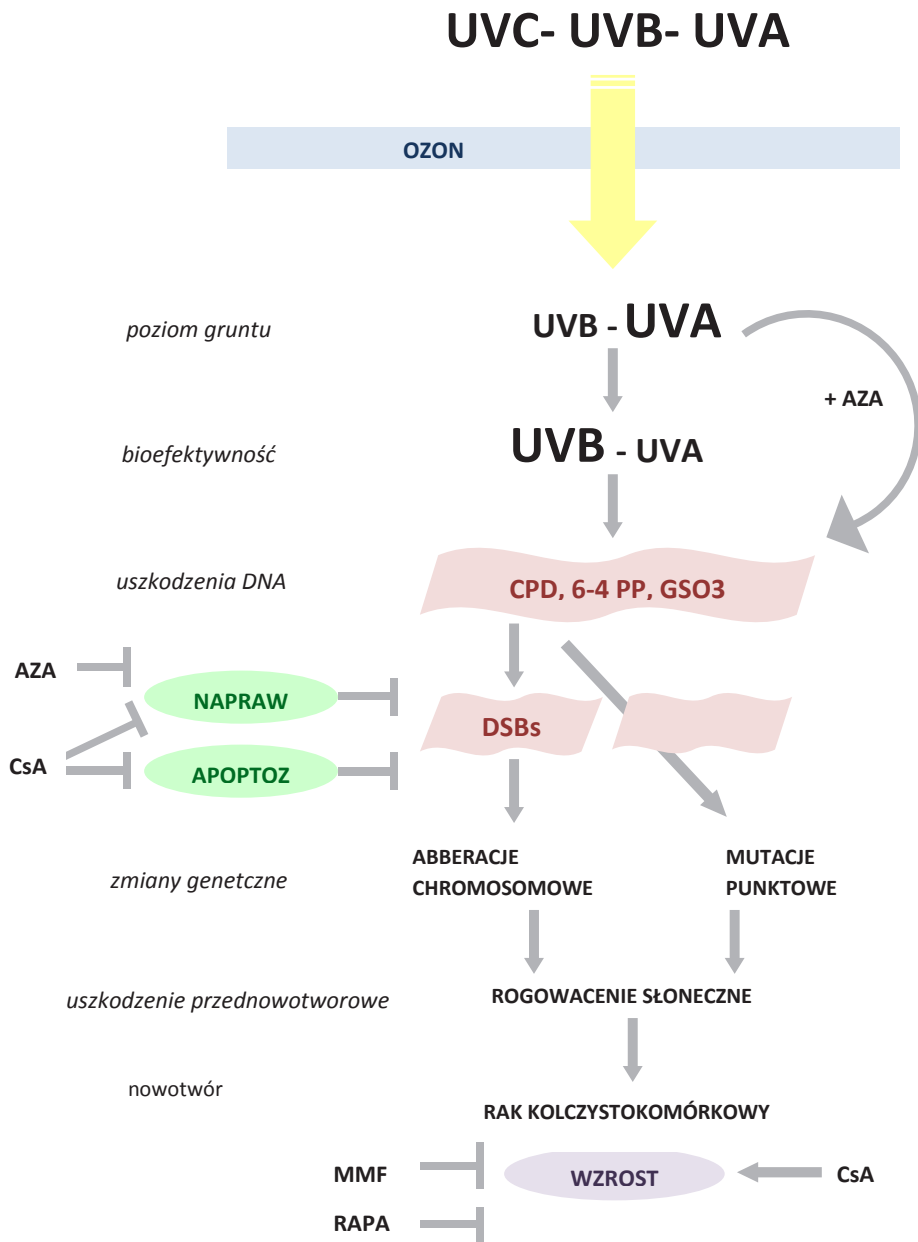
przeszczepieniu narządów może być związany ze spowalniającym naprawę DNA i hamującym apoptozę działaniem CsA, która jest częściej stosowana niż AZA. W przeciwieństwie do CsA wydaje się, że mutacja białka p53 nie powstaje po fotouwrażliwieniu przez AZA, jednak całkowita liczba przebadanych mutacji jest zbyt mała, by móc to potwierdzić [34, 43]. Dotychczas nie podjęto również próby znalezienia zależności między mutacją w genie p53 a poszczególnymi schematami immunosupresji lub też grupy badane były zbyt małe, by wyciągnąć takie wnioski.

CsA wchodzi również w interakcję z mechanizmami naprawy DNA promując powstawanie nowotworów. Poprzez inhibicje kalcyneuryny, która jest zaangażowana w NER, CsA zmniejsza zdolności NER. Przyczynia się do tego także działanie CsA na supresję białka p53, pośredniego inicjatora NER [30].

Badania wskazują na rolę aktywującego czynnika transkrypcyjnego ATF3 (ang. *Activating Transcription Factor 3*) w rozwoju SCC, będącego wynikiem terapii inhibitorami kalcyneuryny CNI (ang. *Calcineurin Inhibitors*). Wskazano, że ATF3, jako onkogen hamujący transkrypcję p53, jest promowany przez tę grupę leków, ponieważ jest pod kontrolą NFAT (ang. *Negative calcineurin/nuclear Factor of Activated T cells*). Dziunycz i wsp. analizowali wpływ promieniowania UV na ekspresję ATF3 i jego potencjalny wpływ na rozwój SCC. Okazuje się, że ekspresja ATF3 wzrasta znamienne przy zastosowaniu łącznym CsA z UVA [9].

Według badań TAC hamuje apoptozę keratynocytów, a to promuje przetrwanie i proliferację uszkodzonych przez UV komórek [35]. Mimo wspólnego mechanizmu działania z CsA oraz podobnego nowotworowego potencjału indukowanego przez wzrost TGF β [33], TAC wydaje się mniej indukować nieczerniakowe nowotwory skóry NMSC (ang. *Non-Melanoma Skin Cancers*) w porównaniu z CsA. Kasiske i wsp. zbadali zależność między leczeniem immunosupresyjnym a występowaniem NMSC. Stwierdzono mniej incydentów NMSC u chorych po przeszczepieniu nerki otrzymujących TAC, niż u chorych leczonych AZA [26].

Chociaż promieniowanie UVA ma mniejszy wpływ na uszkodzenia DNA w porównaniu z promieniowaniem UVB, to niektóre leki immunosupresyjne stosowane u chorych po przeszczepieniu narządów wzmacniają właśnie działanie UVA w uszkodzaniu DNA. Takim lekiem jest AZA, stosowana w tej grupie chorych, która w wyniku syntezy puryn, jako metabolit 6-tioguanina -6-TG (ang. *6-Thioguanine*) ulega inkorporacji w DNA jako pseudozasada. Tworzy się tioanalog powodujący uwrażliwienie komórek na promieniowanie UVA. Interakcja ta generuje ROS, które utleniają 6-TG do sulfonianu guaniny – GSO3 (ang. *Guanine-6-Sulfonate*). W ten sposób AZA indukuje uszkodzenia DNA i zwiększa wrażliwość skóry na poparzenia słoneczne spowodowane promieniowaniem UVA [39] (**Ryc. 1**). Te trzy produkty: CPDs, 6-4PPs i GSO3 blokują transkrypcję i replikację DNA. W związku z tym niezbędne są mechanizmy naprawcze tych uszkodzeń, które umożliwiają zachowanie funkcjonalności komórkom i pozwalają na dalsze podziały bez błędów.



RYCINA 1. UV-zależna kancerogeneza skórna z uwzględnieniem wpływu leków immunosupresyjnych, (źródło [42] na podstawie [15])

FIGURE 1. UV-dependent cutaneous carcinogenesis including the effect of immunosuppressive drugs (source [42] based on [15])

AZA również, jako tiopurynowy prolek, powoduje powstawanie tiopurynowych nukleotydów przez włączanie do DNA 6-TG. 6-TG jest prekursorem uszkodzeń DNA i substratem naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych – MMR (ang. *Mismatch Repair*), między dwoma komplementarnymi nićmi DNA. MMR jest powiązany z procesem apoptozy, a inaktywacja tego mechanizmu powoduje zahamowanie śmierci komórki. Komórki mające defekt MMR tolerują inkorporowaną 6-TG w ich DNA, a przez dalszą replikację z nienaprawionymi błędami dochodzi do kumulacji mutacji. Komórki te mają również znacznie większą wrażliwość na uszkodzenia DNA indukowane tiopurynami. Defekt MMR w skórze chorych po przeszczepieniu narządów przyjmujących przewlekłe AZA pozwala na przeżycie i wzrost komórek z uszkodzonym DNA, powodując nowotworzenie. AZA ma także znaczący wpływ na powstawanie klonów komórek z wadliwym MMR; zaburza jego pracę. Ponieważ proces MMR jednocześnie warunkuje naprawę uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie UV, u pacjentów leczonych AZA istnieje znamienne zwiększone ryzyko rozwoju raka skóry [39, 40]. AZA ponadto zmniejsza zdolność do naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez promieniowanie UV. Przyczyniając się do wytwarzania ROS, prowadzi ona do uszkodzania białek, przez co zmniejsza zdolność NER. Najprawdopodobniej AZA hamuje ostatni etap NER- resyntezę wyciętych fotoproduktów DNA zawierających oligonukleotydy. Natomiast, zdaje się, że AZA nie ma wpływu na zdolność nacinania uszkodzonych przez UV nukleotydów, przez co pęknięte nici mogą rekrutować alternatywne mechanizmy naprawcze. Mechanizm ten tłumaczy zmniejszone ryzyko nowotworów skóry u chorych leczonych AZA w porównaniu z CNI [16, 30]. AZA nie jest już stosowana de novo w transplantologii, jednak pacjenci leczeni tym lekiem od wielu lat wymagają ścisłego nadzoru dermatologicznego [42].

Wiadomo, że MMF wprawdzie nie prowadzi do inkorporacji pseudozasad w DNA, jednak jego hamujący wpływ na syntezę puryn może mieć następstwa w uzupełnianiu luk w DNA przez NER. Dworkin i wsp., w badaniu na modelu zwierzęcym jednoczesnego wpływu UV i różnych leków immunosupresyjnych (oprócz AZA), stwierdzili najmniej aberracji chromosomalnych w guzach u myszy leczonych MMF i SIR [8].

Hamowanie przez SIR, EVERO kinazy białkowej treoninowo -serynowej – mTOR (ang. *mammalian Target of Rapamycin kinase*) w szlaku serynowo-treoninowej kinazy białkowej – AKT (ang. *serine/threonine-specific protein kinase*) może zaburzać kontrolę cyklu komórkowego i indukować apoptozę, szczególnie w komórkach, w których supresorowano białko p53 [23]. Hamowanie mTOR sprawia, że działają antyproliferacyjnie, hamują angiogenezę i wzrost guzów. Inhibitory sygnału proliferacji – PSI (ang. *Proliferation Signal Inhibitors*) mają przez to unikalne, podwójne działanie- wykazują efekt przeciwnowotworowy, przy zachowanym efekcie immunosupresyjnym.

Ponadto wiadomo, że CsA oraz AZA zaburzają mechanizm naprawy NER, prowadząc do mutagenazy indukowanej promieniowaniem UV w skórze i zwiększając ryzyko skórnej kancerogenezy.

MUTACJE p53 WYWOŁANE PROMIENIOWANIEM UV

Nowotwory skóry wykazują znamienne dla promieniowania UV mutacje w genie kodującym białko p53, czynnika transkrypcyjnym o własnościach supresora nowotworowego. Mutacje p53 można stwierdzić w 90% SCC oraz 50% BCC. Zmiany przednowotworowe, takie jak rogowacenie słoneczne, które może być stanem poprzedzającym rozwój SCC, często charakteryzuje się mutacją w obrębie tego białka. Komórki wykazujące nadekspresję zmutowanego białka p53 można zidentyfikować mikroskopowo, już przed pojawieniem się zmiany widocznej klinicznie. Keratynocyty zawierające zmutowane białko p53, w przeciwieństwie do komórek SCC mogą nie wywoływać odpowiedzi układu immunologicznego czy mechanizmu eliminacji, zanim nie dojdzie do transformacji w inwazyjnego SCC. W badaniach wykazano, że zmutowane białko p53 występuje znacznie częściej u chorych po przeszczepieniu narządów w porównaniu z osobami immunokompetentnymi w skórze zdrowej graniczącej z SCC. Jest to prawdopodobnie wynikiem dodatkowego lokalnego wpływu leków immunosupresyjnych (AZA, CsA) na komórki skóry w tej grupie chorych.

Badania przeprowadzone u 20 chorych z przeszczepionym narządem, u których rozwinęło się 25 raków skóry, wykazały wysoki odsetek (35%) mutacji tandemowych CC na TT w białku p53. Podobne mutacje obserwuje się u pacjentów XP typu C, którzy mają defekt GG-NER.

SCC u osób immunokompetentnych charakteryzuje się również wieloma aberracjami chromosomowymi, w tym amplifikacją H-RAS (ang. *Harvey Rat Sarcoma*). W grupie chorych po przeszczepieniu narządów również została potwierdzona amplifikacja onkogenu H-RAS w ogniskach SCC [1, 41].

PODSUMOWANIE

Ekspozycja na promieniowanie UV doprowadza do uszkodzenia DNA, RNA, białek i błon komórkowych, a następnie do uszkodzenia naskórka, tkanki łącznej i naczyń krwionośnych. Promieniowanie UV nie tylko bezpośrednio i pośrednio uszkadza DNA komórek, ale również wywołuje zjawisko tolerancji immunologicznej, upośledza zdolności rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych.

Reakcje te mają szczególne znaczenie u chorych po przeszczepieniu narządów, poddawanych przewlekłemu leczeniu immunosupresyjnemu. Wykazano, że niektó-

re leki immunosupresyjne stosowane u tych chorych mają wpływ na uszkodzenie komórkowego DNA, wzmacniając efekt genotoksyczny promieniowania UV.

AZA stosowana u OTRs, w wyniku syntezy puryn, jako metabolit 6-TG ulega inkorporacji w DNA jako pseudozasada. Tworzy się tioanalog powodujący uwrażliwienie komórek na promieniowanie UVA. Interakcja taka generuje ROS, które utleniają 6-TG do GSO3. GSO3 natomiast blokuje transkrypcję i replikację DNA.

6-TG jest również substratem naprawy uszkodzeń DNA przez MMR. U chorych, u których komórki wykazują wadliwy MMR dochodzi do tolerancji inkorporowanej 6-TG w DNA, a przez dalszą replikację DNA z nienaprawionymi błędami dochodzi do kumulacji mutacji i jednocześnie zahamowania procesu apoptozy. AZA ma także znaczący wpływ na powstawanie klonów komórek z wadliwym MMR. W związku z tym, że mechanizm MMR warunkuje naprawę uszkodzeń indukowanych również przez promieniowanie UV, defekt MMR w skórze chorych po przeszczepieniu narządów przyjmujących przewlekle AZA może dodatkowo znamienne zwiększać ryzyko rozwoju raka skóry.

CNI (CsA oraz TAC) promują rozwój nowotworów u pacjentów po transplantacji głównie poprzez zaburzenie produkcji cytokin i wzrost TGF β , co wpływa na procesy promujące angiogenezę i wzrost guza. CsA powodując hamowanie apoptozy i wzrost VEGF, promuje nie tylko kancerogenezę, ale też przerzutowanie powstałych nowotworów. Zsumowane działanie CsA z UVA zwiększa ekspresję ATF3, co skutkuje większym ryzykiem powstania SCC. TAC wydaje się mniej indukować nieczerniakowe nowotwory skóry w porównaniu z CsA. CNI oraz AZA zaburzają mechanizm naprawy DNA- NER: AZA przez hamowanie ostatniego etapu procesu – resyntezy wyciętych fotoproduktów DNA zawierających oligonukleotydy, z kolei CsA przez supresję kalcyneuryny i białka p53 zaangażowanych w NER.

Nowa generacja leków jak MMF, SIR, EVERO, w przeciwieństwie do leków standardowych m.in. ze względu na właściwości antyproliferacyjne wydaje się wykazywać działanie przeciwnowotworowe. Korzystny efekt PSI to m.in. połączenie działania immunosupresyjnego z antyproliferacyjnym i hamowaniem włóknienia.

Na rozwój nowotworów wpływ ma długość leczenia immunosupresyjnego, w tym również ewentualne leczenie przed transplantacją. Dodatkowo, sumowanie się czynników ryzyka jak np. UV i leki immunosupresyjne, znamienne zwiększa częstość nowotworzenia.

LITERATURA

- [1] ASHTON KJ, WEINSTEIN SR, MAGUIRE DJ, GRIFFITHS LS. Chromosomal aberrations in squamous cell carcinoma and solar keratoses revealed by comparative genomic hybridization. *Arch Dermatol* 2003; **139**: 876-882.
- [2] BEISSERT S, GRANSTEIN RD. UV – induced cutaneous photobiology. *Crit. Rev Biochem Mol Biol* 1996; **31**: 381-404.

- [3] BEISSERT S, HOSOI J, GRABBE S, ASAHINA A, GRANSTEIN RD. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol* 1995; **154**: 1280-1286.
- [4] BEISSERT S, SCHWARZ T. Mechanisms involved in Uv-induced immunosuppression. *J Invest Dermatol Sym Proc* 1999; **4**: 61-64.
- [5] BEISSERT S, ULLRICH SE, HOSOI J, GRANSTEIN RD. Supernatants from UVB radiation- exposed keratinocytes inhibit Langerhans cell presentation of tumor-associated antigens via IL-10 content. *J Leukoc Biol* 1995; **58**: 234-240.
- [6] BIRKELAND SA, STORM HH, LAMM LU, BARLOW L, BLOHMÉ I, FORSBERG B, EKLUND B, FJELDBORG O, FRIEDBERG M, FRÖDIN L. Cancer risk after renal transplant in the Nordic countries. *Int J Cancer* 1995; **60**: 183-189.
- [7] BROWN VL, MATIN RN, CERIO R, LEEDHAM-GREEN ME, PROBY CM, HARWOOD CA. Melanomas in renal transplant recipients: the London experience, and invitation to participate in a European study: reply from authors. *Br J Dermatol* 2007; **156**: 167-169.
- [8] DWORKIN A, TOBER K, DUNCAN F, YU L, VANBUSKIRK A, OBERSZYNYN T, TOLAND A. Chromosomal Aberrations in UVB-induced Tumors of Immunosuppressed Mice. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; **48(6)**: 490-501.
- [9] DZIUNYCZ PJ, LEFORT K, WU X, ET AL. The Oncogene ATF3 Is Potentiated by Cyclosporine A and Ultraviolet Light A. *J Invest Dermatol* 2014; **134**:1998-2004.
- [10] LIU-SMITH F, JIA J, ZHENG Y. UV-Induced Molecular Signaling Differences in Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2017; **996**: 27-40.
- [11] FISHER GJ, WANG ZQ, DATTA SC, VARANI J, KANG S, VOORHEES JJ. Pathophysiology of premature skin aging by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997; **373**: 1419-1428.
- [12] GARINIS GA, MITCHELL JR, MOORHOUSE MJ, HANADA K, DE WAARD H, VANDEPUTTE D, JANS J, BRAND K, SMID M, VAN DER SPEK PJ, HOEIJMAKERS JH, KANAAR R, VAN DER HORST GT. Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *EMBO J* 2005; **24**: 3952-3962.
- [13] GRABBE S, BRUVERS S, LINDGREN AM, HOSOI J, TAN KC, GRANSTEIN RD. Tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells in the mouse: modulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor alpha, and ultraviolet irradiation. *J Leukoc Biol* 1992; **53**: 209-217.
- [14] GREWE M, TREFZER U, BALLHORN A, GYUFKO K, HENNINGER H, KRUTMANN J. Analysis of the mechanism of ultraviolet (UV) B radiation – induced prostaglandin E₂ synthesis by human epidermoid carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 1993; **101**: 528-531.
- [15] DE GRUIJL FR. Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer* 1999; **35**: 2003-2009.
- [16] GUVEN M, BREM R, MACPHERSON P, PEACOCK M, KARRAN P. Oxidative Damage to RPA Limits the Nucleotide Excision Repair Capacity of Human Cells. *J Invest Dermatol* 2015; **135**: 2834-2841.
- [17] HALABAN R. RAC1 and melanoma. *Clin Ther* 2015; **37(3)**:682-685.
- [18] HAN J, COLDITZ GA, SAMSON LD, HUNTER DJ. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and skin cancer risk. *Cancer Res* 2004; **64**: 3009-3013.
- [19] PEREZ HC, BENAVIDES X, PEREZ JS, PABON MA, TSCHEN J, MARADEI-ANAYA SJ, LOPEZ L, LOZANO E. Basic aspects of the pathogenesis and prevention of non-melanoma skin cancer in solid organ transplant recipients: a review. *International Journal of Dermatology* 2017; **56**: 370-378.
- [20] HEPBURN DJ, DIVAKAR D, BAILEY RR, MACDONALD KJ. Cutaneous manifestation of renal transplantation in New Zeland population. *N Z Med J* 1994; **107**: 497-499.
- [21] HOJO M, MORIMOTO T, MALUCCIO M, ASANO T, MORIMOTO K, LAGMAN M, SHIMBO T, SUTHANTHIRAN M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999; **397**: 530-534.
- [22] HOSHIDA Y, TSUKUMA H, YASUNAGA Y, XU N, FUJITA MQ, SATOH T, ICHIKAWA Y, KURIHARA K, IMANISHI M, MATSUNO T, AOZASA K. Cancer risk after renal transplantation in Japan. *Int J Cancer* 1997; **71**: 517-520.

- [23] HUANG S, LIU LN, HOSOI H, DILLING MB, SHIKATA T, HOUGHTON PJ. p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res* 2001; **61**: 3373-3381.
- [24] JANKOWSKA M, DĘBSKA-ŚLIZIEŃ A, IMKO-WALCZUK B, PIESIAKÓW ML, LIZAKOWSKI S, CZARNACKA K, RUTKOWSKI B. Skin cancer in kidney transplant recipients affected with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin Transplant* 2016; **30(4)**:339-43.
- [25] JENSEN P, HANSEN S, MOLLER B. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol* 1999; **40**: 177-186.
- [26] KASISKE BB, SNYDER JJ, GILBERTSON DT, WANG C. Cancer after Kidney Transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004; **4**: 905-913.
- [27] KIELBASSA C, ROZAL, EPE B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 811-816.
- [28] KOICHEVAR IE. Molecular and cellular effects of UV radiation relevant to chronic photoaging. *W: Photodamage, red.: Gilchrist B.A. Blackwell, Cambridge, MA* 1995, 51-67.
- [29] KRAEMER KH. Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 11-14.
- [30] KUSCHAL C, THOMS KM, SCHUBERT S, SCHÄFER A, BOECKMANN L, SCHÖN MP, EMMERT S. Skin cancer in organ transplant recipients: effects of immunosuppressive medications on DNA repair. *Exp Dermatol* 2012; **21**:2-6.
- [31] LINDELÖF B, SIGURGEIRSSON B, GÄBEL H, STERN RS: Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol* 2000; **143**: 513-519.
- [32] LIZAKOWSKI S, KOLONKO A, IMKO-WALCZUK B, KOMOROWSKA-JAGIELSKA K, RUTKOWSKI B, WIĘCEK A, DĘBSKA-ŚLIZIEŃ A. Solid Organ Cancer and Melanoma in Kidney Transplant Recipients: TumorTx Base Preliminary Results. *Transplant Proc* 2018; **50**:1881-1888.
- [33] MALUCCIO M, SHARMA V, LAGMAN M, VYAS S, YANG H, LI B, SUTHANTHIRAN M. Tacrolimus enhances transforming growth factor- β 1 expression and promotes tumor progression. *Transplantation* 2003; **76**:597-602.
- [34] MCGREGOR JM, BERKHOUT RJ, ROZYCKA M, TER SCHEGGET J, BOUWES BAVINCK JN, BROOKS L, CROOK T. p53 mutations implicate sunlight in post-transplant skin cancer irrespective of human papillomavirus status. *Oncogene* 1997; **15**: 1737-1740.
- [35] MING M, ZHAO B, QIANG L, HE YY. Effect of Immunosuppressants Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil on the Keratinocyte UVB Response. *Photochemistry and Photobiology* 2015; **91**: 242-247.
- [36] MOODYCLIFFE AM, KIMBER I, NORVAL M. Role of tumor necrosis factor – alpha in ultraviolet B light – induced migration of dendritic cells and suppression of contact hypersensitivity. *Immunology* 1994; **81**: 79-84.
- [37] MOURET S, BAUDOUIN C, CHARVERON M, FAVIER A, CADET J, DOUKI T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 13765-13770.
- [38] NIIZEKI H, STREILEIN JW. Hapten-specific tolerance induced by acute, low-dose ultraviolet B radiation of skin is mediated via interleukin-10. *J Invest Dermatol* 1997; **109**: 25-30.
- [39] O'DONOVAN P, PERRETT CM, ZHANG X, MONTANER B, XU YZ, HARWOOD CA, MCGREGOR JM, WALKER SL, HANAOKA F, KARRAN P. Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science* 2005; **309**: 1871-1874.
- [40] OFFMAN J, OPELZ G, DOEHLER B, CUMMINS D, HALIL O, BANNER NR, BURKE MM, SULLIVAN D, MACPHERSON P, KARRAN P. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. *Blood* 2004; **104**: 822-828.
- [41] PELISSON I, SOLER C, CHARDONNET Y, EUVRARD S, SCHMITT D. A possible role for human papillomaviruses and c-myc, c-Ha-ras, and p53 gene alterations in malignant cutaneous lesions from renal transplant recipients. *Cancer Detect Prev* 1996; **20**: 20-30.
- [42] PIESIAKÓW M, IMKO-WALCZUK B. Rola promieniowania UV w etiopatogenezie nowotworów skóry u chorych po przeszczepieniu narządów. In: *Problemy dermatologiczne chorych po przeszczepieniu*

- pieniu narządów. B Imko-Walczuk, A Dębska-Ślizień, J Szepletowski, B Rutkowski (eds). Cornetis. Wrocław 2014; 80-90.
- [43] QUEILLE S, LURON L, SPATZ A, AVRIL MF, RIBRAG V, DUVILLARD P, HIESSE C, SARASIN A, ARMAND JP, DAYA-GROSJEAN L. Analysis of skin cancer risk factors in immunosuppressed renal transplant patients shows high levels of UV- specific tandem CC to TT mutations of the p53 gene. *Carcinogenesis* 2007; **28**(3): 724-731.
- [44] RAMSAY HM, FRYER AA, HAWLEY CM, SMITH AG, NICOL DL, HARDEN PN. Factors associated with nonmelanoma skin cancer following renal transplantation in Queensland, Australia. *J Am Acad Dermatol* 2003; **49**: 397-406.
- [45] SAMPLE A, HE YY. Autophagy in UV Damage Response. *Photochem Photobiol* 2017; **93**: 943-955.
- [46] SCHWARZ A, GRABBE S, RIEMANN H, ARAGANE Y, SIMON M, MANON S, ANDRADE S, LUGER TA, ZLOTNIK A, SCHWARZ T. In vivo effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol* 1994; **103**: 211-216.
- [47] SHAH P, HE YY. Molecular regulation of UV-induced DNA repair. *Photochem Photobiol* 2005; **91**(2): 254-264.
- [48] SIMON JC, TIGELAAR RE, BERGSTRESSER PR, EDELBAUM D, CRUZ P. Ultraviolet B radiation converts Langerhans cells from immunogenic to tolerogenic antigen-presenting cells: Introduction of specific clonal anergy in CD4+ T helper 1 cells. *J Immunol* 1950; **146**: 485-489.
- [49] TRAMUTOLA A, FALCUCCI S, BROCCO U, TRIANI F, LANZILLOTTA C, DONATI M, PANNETTA C, LUZI F, IAVARONE F, VINCENZONI F, CASTAGNOLA M, PERLUIGI M, DI DOMENICO F, DE MARCO F. Protein oxidative damage in UV-related skin cancer and dysplastic lesions contributes to neoplastic promotion and progression. *Cancers* 2020; **12**(1).
- [50] ULLRICH SE. Mechanisms involved in the systemic suppression of antigen-presenting cell function by UV irradiation. Keratinocyte-derived IL-10 modulates antigen-presenting cell function of splenic adherent cells. *J Immunol* 1994; **152**: 3410-3416.
- [51] ULLRICH SE. Modulation of immunity by ultraviolet radiation: key effects on antigen presentation. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 30S-36S.
- [52] ULLRICH SE. The role of epidermal cytokines in the generation of cutaneous immune reactions and ultraviolet radiation – induced immune suppression. *Photochem Photobiol* 1995; **62**: 389-401.
- [53] WANG LE, XIONG P, STROM SS, GOLDBERG LH, LEE JE, ROSS MI, MANSFIELD PF, GERSHENWALD JE, PRIETO VG, CORMIER JN, DUVIC M, CLAYMAN GL, WEBER RS, LIPPMAN SM, AMOS CI, SPITZ MR, WEI Q. In vitro sensitivity to ultraviolet B light and skin cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; **97**: 1822-1831.
- [54] YAMAWAKI M, KATTIYAR SK, ANDERSON CY, TUBESING KA, MUKHTAR H, ELMETS CA. Genetic variation in low-dose UV-induced suppression of contact hypersensitivity and in the skin photocarcinogenesis response. *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 706-708.
- [55] YAROSH DB, PENA AV, NAY SL, CANNING MT, BROWN DA. Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human keratinocytes following ultraviolet B irradiation. *J Invest Dermatol* 2005; **125**: 1020-1025.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 22.02.2021

Przyjęto: 29.06.2021

Beata Imko-Walczuk

COPERNICUS Podmiot Leczniczy Sp. z o.o.

Nowe Ogrody 1-6, 80-803 Gdańsk

e-mail: bimko@wp.pl

INFORMACJE

INFORMACJA o dostępności pełnych artykułów publikowanych w PBK oraz publikacji elektronicznej

Pełne wersje artykułów opublikowanych w „Postęпах Biologii Komórki” po 2008 roku są dostępne bezpłatnie pod adresem: <http://www.pbkom.eu/pl/pbk-publicacje>.

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 2021 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Świącickiego 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. Świącickiego 6, 60-781 Poznań; BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

Cena prenumeraty rocznika wynosi na rok 2021

dla instytucji (bibliotek) 230 zł + 8% VAT

dla odbiorców indywidualnych 83 zł + 8% VAT

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2021

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 50 dollars USA or 30 euro

Cennik dla Autorów rycin i druku w 2021 r.

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

Do ceny należy doliczyć 8% VAT.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI (PBK) drukują artykuły przeglądowe w języku polskim lub angielskim w zakresie 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

Spisów 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 zestawzić 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.

Opłatność (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 Postępkach 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

DORNA Z., JAWORSKI M., SIBIAK R., JANKOWSKI M., STEFAŃSKA K., WAŚIATYCZ G., PIENKOWSKI W., DUDEK-MAKUCH M., LANGER D., DAWID-PAĆ R., CYKOWIAK M., KOWALÓWKA M., KEMPISTY B.:	5
Adipose-derived stem cells – origin, tissue and cellular specificity, and application in regenerative medicine	
Komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego – pochodzenie, charakterystyka oraz zastosowania w medycynie regeneracyjnej	
JAWORSKI M., DORNA Z., SIBIAK R., STEFAŃSKA K., PIENKOWSKI W., BUDZIŃSKA M., KWAŚNIEWSKI M., TUROWSKA N., SIMON M., CYBUŁKA B., KEMPISTY B.:	15
Overview of recent finding on the possible application of human stem cells in medical therapies	
Przegląd potencjalnych innowacyjnych terapii wykorzystujących komórki macierzyste	
SAMOJEDNY S., PAŃCZYSZYN-TRZEWIK P., SOWA-KUĆMA M.:	27
Optogenetyka jako narzędzie w badaniach nad chorobą Alzheimer'a	
Optogenetics as a tool in the study of Alzheimer's disease	
GRYMANOWSKA A.W., FILIPKOWSKI R.K.:	41
Kształt jądra w komórkach organizmów eukariotycznych i jego potencjalne znaczenie biologiczne	
Nuclear shape in eukaryotic cells and its potential biological significance	
IMKO-WALCZUK B., PIESIAKÓW M., MARQUARDT-FESZLER A., CEKAŁA K., KADYŁAK D., DĘBSKA-ŚLIZIEŃ A.:	59
Wpływ promieniowania UV na powstawanie nowotworów skóry u chorych po transplantacji narządów – przegląd piśmiennictwa	
The impact of UV radiation on the etiopathogenesis of skin (malignant) neoplasms in patients after organ transplantation – a literature review	
Informacje	79