PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 48, ISSUE 3/2021
(183–268)

www.pbkom.pl

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

Redaguje Kolegium – Editors:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Poznań, 2021-11-31

OCENA WPŁYWU DYSFUNKCJI ENDOMETRIUM NA ZABURZENIE PROCESU IMPLANTACJI U KOBIET Z NIEPŁODNOŚCIĄ I ENDOMETRIOZĄ

ASSESSMENT OF IMPACT OF ENDOMETRIAL DYSFUNCTION ON DISTURBANCE OF IMPLANTATION PROCESS IN WOMEN WITH INFERTILITY AND ENDOMETRIOSIS

Magdalena ADAMCZYK, Marcin RAJEWSKI, Małgorzata KĘDZIA, Ewa WENDER-OŻEGOWSKA

Klinika Rozrodczości, Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Streszczenie: Endometrioza to złożony zespół kliniczny, który powoduje ból i niepłodność. Patomechanizm trudności z zajściem w ciążę u niepłodnych kobiet z endometriozą w wielu przypadkach pozostaje niejasny.

Implantacja blastocysty jest możliwa w środkowej fazie lutealnej, w krótkim okresie czasu zwanym oknem implantacyjnym. Wadliwa implantacja jest głównym czynnikiem ograniczającym rozród u człowieka.

Wiele badań wykazało, że sukces implantacji zależy od funkcjonalności blastocysty, receptywności endometrium i zsynchronizowanej komunikacji między tkankami embrionalnymi i matczynymi.

W procesie implantacji zaangażowane są określone czynniki wzrostu, cytokiny, mediatory lipidowe, cząsteczki adhezyjne, białka macierzy zewnątrzkomórkowej i czynniki transkrypcyjne. Jednymi z najlepiej scharakteryzowanych biomarkerów receptywności endometrium są integryny, należące do białek adhezyjnych. Produkty białkowe genów HOXA są jednymi z najważniejszych czynników transkrypcyjnych, które regulują szereg molekularnych i morfologicznych zmian endometrium w czasie okna implantacyjnego.

Odmienność w budowie i funkcji endometrium u kobiet z endometriozą może przyczyniać się u nich do obniżenia potencjału rozrodczego.

Badania wykazały, że prawidłowa funkcja eutopowego endometrium u pacjentek z endometriozą jest upośledzona na skutek zaburzonej dystrybucji receptorów steroidowych w tkance eutopowej oraz na lokalnej dominacji estrogenu i oporności na progesteron. Wskazano wiele białek, których ekspresja w eutopowym endometrium u kobiet z endometriozą istotnie różni się w stosunku do pacjentek bez

endometriozy. Są to substancje pełniące funkcję w proliferacji komórkowej, receptywności endometrium, przemianie doczesnowej, angiogenezie, szlakach sygnałowych i in.
Wykazano zaburzenia mechanizmów epigenetycznych w endometrium pacjentek z endometriozą warunkujących wadliwą ekspresję genów odpowiedzialnych za uzyskanie odpowiedniej receptywności endometrium w tej grupie kobiet.
Istnieje potrzeba dalszych badań nad epigenetycznym podłożem wadliwej receptywności endometrium u pacjentek z endometriozą celem zaproponowania celowanych metod terapeutycznych niepłodności u kobiet z tym schorzeniem.

Słowa kluczowe: receptywność endometrium, endometrioza, epigenetyka, eutopowe endometrium, implantacja, niepłodność

Summary: Endometriosis is a compound clinical syndrome resulting in pain and infertility. The pathomechanism of infertility in women with endometriosis remains unclear.
Blastocyst implantation is possible in the middle luteal phase over a short period of time known as the implantation window. Faulty implantation is the main limiting factor in human reproduction.
Many studies have shown that implantation success depends on blastocyst functionality, endometrial receptivity and synchronized communication between embryonic and maternal tissue.
Specific growth factors, cytokines, lipid mediators, adhesive molecules, extracellular matrix proteins, and transcription factors are involved in the implantation process. Integrins belonging to the adhesive proteins are one of the best-characterized biomarkers of endometrial receptivity. The protein products of the HOXA genes are one of the most important transcription factors responsible for morphological and molecular changes in the endometrium during the implantation window.
The differences in the structure and function of the endometrium in women with endometriosis may contribute to a reduction in their reproductive potential.
Studies have shown that the normal function of the eutopic endometrium in women with endometriosis is impaired due to abnormal distribution of steroid receptors in the eutopic tissue and local estrogen dominance and progesterone resistance. Many proteins have been indicated, the expression of which in eutopic endometrium in women with endometriosis is significantly different compared to patients without endometriosis. These are substances that play a role in cell proliferation, endometrial receptivity, decidual changes, angiogenesis, signaling pathways, etc.
It has been shown that the epigenetic mechanisms in the endometrium of women with endometriosis are disturbed, which condition the defective expression of genes responsible for obtaining appropriate endometrial receptivity.
There is a need for further research on the epigenetic background of the endometrial receptivity in women with endometriosis in order to propose targeted therapeutic methods of infertility in women with this disease.

Keywords: endometrial receptivity, endometriosis, epigenetics, eutopic endometrium, implantation, infertility

WPROWADZENIE

Endometriozą nazywano wcześniej występowanie tkanki podobnej do endometrium poza jamą macicy. W nowym ujęciu endometrioza to złożony zespół kliniczny, charakteryzujący się estrogenozależnym, przewlekłym procesem za-

palnym, który atakuje głównie tkanki miednicy [6]. Klasyfikacja morfologiczna schorzenia obejmuje: powierzchowną endometriozę otrzewnową (ang. *superficial peritoneal endometriosis*, SUP), torbiele endometrialne jajników (ang. *ovarian endometriom*, OMA) i endometriozę głęboko naciekającą (ang. *deeply infiltrating endometriosis*, DIE).

Endometrioza powoduje niepłodność i jest najczęstszą przyczyną przewlekłego bólu miednicy u kobiet w wieku reprodukcyjnym. Częstość występowania endometriozy oszacowano na 0,8%-6,0% [1, 36]. U grupie niepłodnych kobiet odsetek ten wzrasta do 20-50% [16]. Standardem w rozpoznawaniu endometriozy według ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists) jest stwierdzenie zmian patologicznych, typowych dla endometriozy, podczas laparoskopii.

Etiopatogeneza endometriozy pozostaje niejasna. Hipoteza wstecznego miesiączkowania, zaproponowana przez Sampsona, pozwala upatrywać w endometrium eutopowym kluczowej tkanki w badaniach nad patofizjologią endometriozy [44]. Uważa się, że odmienność w budowie i funkcji w endometrium kobiet z endometriozą predysponuje do zaburzenia jego receptywności. Wykazano korelację niepowodzeń implantacji z współwystępowaniem endometriozy [12 ,42].

Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO), definiuje niepłodność jako niemożność uzyskania ciąży przez okres 12. miesięcy, mimo regularnych stosunków płciowych (2-4 razy w tygodniu), bez stosowania metod antykoncepcyjnych. Problem niemożności zajścia w ciążę dotyczy 8-12% par w wieku rozrodczym [35].

Niezależna niepłodność żeńska i niepłodność męska odpowiadają odpowiednio za 30% i 20-30% wszystkich przyczyn niemożności zajścia w ciążę [32]. U około 15% par nie udaje się wskazać powodu niepłodności [41].

Ciąża jest skomplikowanym procesem, który obejmuje następujące po sobie etapy: implantację, przemianę doczesnową, placentację i poród [11].

Uważa się, że u człowieka nawet 75% utraconych, niepotwierdzonych klinicznie ciąż, związana jest z wadliwą implantacją zarodka [40, 52]. Nieudana implantacja jest głównym czynnikiem ograniczającym efekty rozrodu wspomaganego [12].

Sukces implantacji zależy od funkcjonalności blastocysty, receptywności endometrium i zsynchronizowanej komunikacji między tkankami embrionalnymi i matczynymi [47].

Implantacja zarodka stanowi kluczowy moment procesu reprodukcji i jest unikalnym zjawiskiem biologicznym. Składa się z trzech etapów: apozycji, adhezji i penetracji. Apozycja jest etapem niestabilnego wiązania blastocysty do powierzchni endometrium. Adhezja to proces trwałego kontaktu trofoblastu z nabłonkiem gruczołowym macicy [46]. Penetracja, będąca ostatnim etapem implantacji, polega na inwazji zarodka w głąb zrębu przez światło gruczołów endometrium.

RECEPTYWNOŚĆ ENDOMETRIUM

Macica składa się z trzech głównych przedziałów tkankowych: nabłonka, podścieliska i mięśniówki. Indywidualny bądź zbiorowy udział poszczególnych typów komórek w uzyskaniu optymalnej receptywności endometrium jest jeszcze słabo poznany. Wydaje się, że wiążący blastocystę nabłonek, pełni rolę głównego mediatora receptywności macicy i przekazuje informację dalej do pozostałych jej przedziałów. Jednocześnie wykazano, że elementy podścieliska kierują funkcjami nabłonka [10]. Dwukierunkowa komunikacja między komórkami nabłonka i zrębu, angażująca ewolucyjnie konserwatywne szlaki patofizjologiczne, jest konieczna dla prawidłowego przebiegu procesu implantacji zarodka.

Endometrium to dynamiczna tkanka wrażliwa na stymulację hormonalną. Około 14 dnia cyklu gwałtowne zwiększenie poziomu FSH i LH indukuje owulację. Pęknięty pęcherzyk jajnikowy przekształca się w ciałko żółte i rozpoczyna produkcję progesteronu. We wczesnej fazie wydzielniczej następują dalsze przemiany endometrium. Gruczoły podlegają przemianie sekrecyjnej, komórki podścieliska różnicują się przed przemianą doczesnową, a miejscowy obrzęk błony śluzowej przygotowuje endometrium do implantacji zarodka.

Wzrastający poziom estrogenu zbiega się ze wzmożoną sekrecją progesteronu w środkowej fazie lutealnej (20-24 dzień cyklu). W tym bardzo krótkim okresie czasu, zwanym oknem implantacyjnym tj. 7-9 dni po owulacji jest możliwa implantacja blastocysty [48].

Sukces implantacji zależy od receptywności endometrium, funkcjonalności blastocysty i zsynchronizowanej komunikacji między tkankami matczynymi i embrionalnymi [47]. Implantacja zarodka stanowi kluczowy moment procesu reprodukcji i jest unikalnym zjawiskiem biologicznym. Składa się z trzech etapów: apozycji, adhezji i penetracji. Apozycja jest etapem niestabilnego wiązania blastocysty do powierzchni endometrium. Adhezja to proces trwałego kontaktu trofoblastu z nabłonkiem gruczołowym macicy. Etapom tym towarzyszy wzrost przepuszczalności naczyń podścieliska, zwłaszcza w miejscu wiązania blastocysty [46]. Penetracja, będąca ostatnim etapem implantacji, polega na inwazji zarodka w głąb zrębu przez światło gruczołów endometrium. Inwazja blastocysty w krążenie matczyne jest konieczna dla rozwoju ciąży. Zapewnia rosnącemu zarodkowi składniki odżywcze, tlen i możliwość gospodarowania odpadami komórkowymi. Etap ten jest kontrolowany głównie przez trofoblast, jednak możliwości ograniczenia zasięgu inwazji posiada również doczesna [47].

W macicy ekspresji podlegają wszystkie rodzaje receptorów dla wymienionych wyżej hormonów: receptory progesteronowe PR-A i PR-B oraz estrogenowe ERα i ERβ. W badaniach na modelach mysich wykazano, że kluczowe znaczenie dla receptywności endometrium i prawidłowej implantacji mają receptory PR-A oraz ERα [33, 34]. Uważa się, że receptory estrogenowe ERα i ERβ działają

jako czynniki transkrypcyjne i regulują wzrost endometrium. Dodatkowo w ostatnich badaniach zidentyfikowano inne czynniki transkrypcyjne, zaangażowane w uzyskanie odpowiedniej receptywności i implantację, których ekspresja nie jest modulowana przez estrogeny i progesteron [10].

Badania ekspresji genów w ludzkim endometrium i badania na genetycznie zmodyfikowanych modelach myszy dostarczyły cennych informacji na temat udziału w procesie implantacji określonych czynników wzrostu, cytokin, mediatorów lipidowych, cząsteczek adhezyjnych i czynników transkrypcyjnych. W ostatnim czasie dokonano przeglądu wybranych cząsteczek adhezji komórkowej, czynników wzrostu, białek macierzy zewnątrzkomórkowej i zaproponowano kilka biomarkerów oceny receptywności endometrium [14].

Wykazano, że integryny są najlepiej scharakteryzowanymi markerami receptywnego endometrium. Białka te należą do cząsteczek adhezyjnych. Trzy z nich ulegają koekspresji w środkowej fazie sekrecyjnej [29]. Integryna αVβ3 jest obecna na wierzchołkowym biegunie nabłonka endometrium w czasie okna implantacyjnego. Jej ekspresja jest regulowana przez naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) oraz przez gen homeobox HOXA10.

Jednymi z dobrze poznanych czynników transkrypcyjnych biorących udział w procesie implantacji zarodka są produkty białkowe genów z podklasy homeobox. Ekspresja genów HOXA jest niezbędna do proliferacji, różnicowania i uzyskania optymalnej receptywności endometrium [50]. Transkrypty genów HOXA10 i HOXA11 stwierdza się w komórkach nabłonkowych i komórkach podścieliska endometrium. Zwiększona ekspresja tych genów w środkowej i późnej fazie sekrecyjnej koreluje z wysokim poziomem estradiolu i progesteronu w czasie okna implantacyjnego. Estradiol i progesteron zwiększają ekspresję genów HOXA w endometrium, wskutek wiązania się z pokrewnymi receptorami ich regionów regulatorowych. Produkty białkowe genów HOXA regulują szereg molekularnych i morfologicznych zmian endometrium, w tym ekspresję integryny αVβ3 i białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGFBP-1) [15]. Nie opisano mutacji genów HOXA10 i HOXA11 u ludzi, prawdopodobnie ze względu na powszechną funkcję tych genów w rozwoju i reprodukcji.

Badacze zajmujący się implantacją poszukują od dawna kluczowej cząsteczki – receptora dla zarodka, która pośredniczy w przyłączeniu blastocysty do endometrium [9]. Wykazano, że niektóre molekuły adhezyjne takie jak integryny, selektyny, ligandy dla L-selektyny są zaangażowane w wiązanie blastocysty do nabłonka endometrium i późniejszą placentację u ludzi [20, 31]. Ostatnie dowody wskazują, że krytyczne znaczenie dla wczesnej interakcji zarodek a endometrium ma L-selektyna. Niepłodność lub utrata ciąży może być wynikiem braku pokrewnego ligandu dla tej cząsteczki.

Uważa się, że proces implantacji posiada cechy charakterystyczne dla reakcji prozapalnej. W jego wczesnym stadium dochodzi do wzrostu przepuszczalności

naczyń w miejscu przyłączenia blastocysty. W przemianach tych pośredniczą prostaglandyny wytwarzane przez cyklooksygenazę. Czynnik hamujący białaczkę (ang. *leukaemia inhibitory factor*, LIF) jest wielofunkcyjną cytokiną, wpływającą na różnicowanie i proliferację wielu typów komórek. Wykazano, że jest konieczny do uzyskania odpowiedniej receptywności endometrium, a jego brak u myszy odpowiada za wadliwą implantację. LIF jest głównym mediatorem czynności estrogenu na poziomie endometrium. Poprzez wiązanie z koreceptorem przekazuje sygnał w kierunku podścieliska i aktywuje transkrypcję innych genów. Wykazano, że ekspresja LIF w czasie okna implantacyjnego u płodnych kobiet jest wyższa niż w grupie pacjentek z niepłodnością [28, 37]. Prawidłowa receptywność endometrium, będąca wynikiem prawidłowego współdziałania sieci szlaków sygnalizacyjnych jest koniecznym elementem skutecznej implantacji.

NIEPŁODNOŚĆ I ENDOMETRIOZA

Patomechanizm trudności z zajściem w ciążę u niepłodnych kobiet z endometriozą w wielu przypadkach pozostaje niejasny. Prawdopodobnie stanowi sumę nieprawidłowości różnych etapów procesu zapłodnienia: od zaburzeń owulacji, niskiej jakości oocytów, nieefektywnego transportu jajowodowego do wadliwego przebiegu implantacji. Ostatnie badania potwierdziły istotne zaburzenia receptywności endometrium u pacjentek z endometriozą [17].

RECEPTYWNOŚĆ ENDOMETRIUM U KOBIET Z ENDOMETRIOZĄ

Badania oparte na analizie wyników nowoczesnych metod molekularnych, wskazały wiele białek, których ekspresja w eutopowym endometrium u kobiet z endometriozą istotnie różni się w stosunku do pacjentek bez endometriozy. Są to substancje pełniące funkcję w proliferacji komórkowej, receptywności endometrium, przemianie doczesnowej, angiogenezie, szlakach sygnałowych i in. [22, 31].

Prawidłowa funkcja eutopowego endometrium u pacjentek z endometriozą jest upośledzona, na skutek lokalnej dominacji estrogenu i oporności na progesteron [23]. Dokładna przyczyna tej oporności nie jest do końca znana. Wysoka ekspresja ERβ i niższe stężenie ERα mogą być odpowiedzialne za supresję receptorów progesteronowych [4]. Zmniejszona ekspresja receptorów progesteronowych (PR) w endometrium oraz nieprawidłowy stosunek ilości receptora progesteronowego A i B (PR-A: PR-B) mogą odpowiadać za oporność na progesteron [5, 27]. Sytuacja ta sprzyja zwiększonej bioaktywności estrogenów w endometrium wskutek braku zależnej od progesteronu ekspresji enzymu konwertującego estra-

diol do słabszych biologicznie estrogenów (dehydrogenazy 17β-hydroksysteroidowej typu 2; HSD17β2) [31]. Badania potwierdzają, że nieosiągnięcie optymalnego, stymulowanego estrogenem, endometrium w fazie proliferacyjnej, może potencjalnie prowadzić do nieprawidłowej dystrybucji receptorów steroidowych i przyczyniać się do oporności na progesteron w endometriozie.

W endometrium pacjentek z endometriozą wykazano zwiększoną aktywność aromatazy P450, która metabolizuje androgeny do estrogenów [39]. W prawidłowej błonie śluzowej macicy progesteron działa jak czynnik przeciwzapalny. Oporność na progesteron u pacjentek z endometriozą prowadzi do indukcji patologicznej reakcji zapalnej, produkcji prostaglandyny E2, jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB regulującego odpowiedź immunologiczną, cyklooksygenazy 2 (COX-2), IL-8 i IL-17. Wykazano, że wymienione czynniki immunologiczne wtórnie aktywują ekspresję aromatazy P450 [3].

W endometrium kobiet z endometriozą wykazano obecność przeciwciał IgG i IgA, limfocytów oraz autoprzeciwciał do antygenów komórek błony śluzowej macicy. Obecność tych immunologicznych molekuł w endometrium eutopowym może zaburzać właściwą receptywność endometrium i implantację zarodka [26]. W surowicy pacjentek z endometriozą wykryto obecność przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom endometrium, co może dodatkowo przyczynić się do niepowodzeń implantacji [45].

U kobiet z endometriozą stwierdzono zaburzenie ekspresji wielu markerów implantacyjnych w endometrium eutopowym, które może przyczyniać się u nich do obniżenia potencjału rozrodczego. Wykazano, że kobiety z endometriozą osiągają istotnie niższe wskaźniki implantacji w wyniku zmniejszonej ekspresji jednego lub obu genów HOXA podczas fazy sekrecyjnej [49, 51]. W prospektywnym, podwójnie ślepym badaniu wykazano, że pacjentki z endometriozą I i II st. prezentują zmniejszoną ekspresję komórkowej molekuły adhezyjnej integryny αvβ3 w czasie okna implantacyjnego [30]. Udowodniono niską ekspresję czynnika hamującego białaczkę (ang. *leukemia inhibitory factor*, LIF), interleukiny 11 (IL-11), receptora dla interleukiny 11 (IL-11R) oraz obniżony poziom enzymu zaangażowanego w syntezę endometrialnego ligandu dla L-selektyny w eutopowym endometrium w grupie niepłodnych kobiet z endometriozą w porównaniu do płodnej grupy kontrolnej [7, 8 ,13 ,18 ,21].

CZYNNIKI EPIGENETYCZNE W ENDOMETRIUM KOBIET Z ENDOMETRIOZĄ

Przyczyną różnic między endometrium kobiet zdrowych a chorujących na endometriozę jest odmienna ekspresja genów, regulacja potranskrypcyjna i poziom produktów translacji. Odkrycie to skłoniło naukowców do badań epigenomicznych w endometriozie.

Metylacja DNA stanowi jedną z najważniejszych modyfikacji epigenetycznych w biologii endometrium. Liczne badania wykazały bezpośrednią korelację stopnia metylacji DNA z ekspresją genów związanych z implantacją [19, 24]. Ekspresja genów związanych z płodnością u kobiet z endometriozą jest zmieniona przez zmianę wzoru metylacji ich regionów promotorowych [53].

Wyniki ostatnich badań wskazują na istotny udział wzoru histonowego w modulowaniu ekspresji genów w tkance eutopowego endometrium u pacjentek z endometriozą. Nieprawidłowe wzorce modyfikacji histonowych odgrywają prawdopodobną rolę w etiopatogenezie choroby i związanej z nią niepłodności [38, 43].

U pacjentek z endometriozą zidentyfikowano stałe wzorce ekspresji miRNA w porównaniu do pacjentek bez endometriozy [25].

Obecnie wydaje się, że wyjaśnienie roli mechanizmów epigenetycznych, roli komórek macierzystych endometrium oraz wzajemnej ich interakcji jest kluczem do wyjaśnienia patofizjologii endometriozy i związanej z nią niepłodności.

PODSUMOWANIE

Endometrioza wśród innych łagodnych zaburzeń ginekologicznych takich jak wodniaki jajowodów, mięśniaki macicy czy PCOS jest chorobą, w której zmniejszony potencjał rozrodczy jest wynikiem nieodpowiedniej receptywności endometrium [14]. Potwierdzają to obserwacje efektywności metod zapłodnienia pozaustrojowego (IVF). Aktualne techniki wspomaganego rozrodu (ang. *assisted reproductive technology*, ART) umożliwiają selekcję wysokiej jakości zarodków. Mimo tych możliwości, wskaźniki implantacji są nadal stosunkowo niskie i nie wzrosły istotnie w ostatniej dekadzie [2]. Receptywność endometrium jest zatem kluczowa dla udanej implantacji, a jej zaburzenia ograniczają sukces ART.

Odmienność w budowie i funkcji endometrium u kobiet z endometriozą może przyczyniać się u nich do obniżenia potencjału rozrodczego.

U kobiet z endometriozą stwierdzono zaburzenie ekspresji wielu markerów implantacyjnych w endometrium eutopowym co predysponuje do zaburzenia jego receptywności.

Zaburzone mechanizmy epigenetyczne w endometrium u pacjentek z endometriozą mogą być przyczyną niepłodności w tej grupie kobiet.

Istnieje potrzeba dalszych badań nad epigenetycznym podłożem wadliwej receptywności endometrium u pacjentek z endometriozą celem zaproponowania celowanych metod terapeutycznych niepłodności u kobiet z tym schorzeniem.

PODZIĘKOWANIA

Praca została sfinansowana z projektu Statutory Research Fund For Division of Reproduction.

LITERATURA

[1] ABBAS S, IHLE P, KőSTER I, SCHUBERT I. Prevalence and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patients with endometriosis-related symptoms: findings from a statutory health insurance-based cohort in Germany. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012 Jan; **160(1)**: 79-83.

[2] ANDERSEN AN, GIANAROLI L, FELBERBAUM R, DE MOUZON J, NYGREN KG; European IVF monitoring programme (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2005 May; **20**: 1158-76.

[3] ATTAR E, TOKUNAGA H, IMIR G, YILMAZ MB, REDWINE D, PUTMAN M, et al. Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 623- 31.

[4] BERGMAN MD, SCHACHTER BS, KARELUS K, COMBATSIARIS EP, GARCIA T, NELSON JF. UP regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol. *Endocrinology.* 1992 Apr; **130**: 1923-30.

[5] BULUN SE, CHENG Y-H, YIN P, IMIR G, UTSUNOMIYA H, ATTAR E, et al. Progesterone resistance in endometriosis: Link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 2006 Mar 27; **248**: 94-103.

[6] BULUN SE, YILMAZ BD, SISON C, MIYAZAKI K, BERNARDI L, LIU S, et al. Endometriosis. *Endocr Rev* 2019 Aug 1; **40(4)**: 1048-79.

[7] BURNEY RO, TALBI S, HAMILTON AE, KIM CV, NYEGAARD M, NEZHAT CR, et al. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 2007; **148**: 3814-26.

[8] CAKMAK H, TAYLOR H. Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis: the role of progesterone–hox gene interactions. *Reprod Med* 2010 Jan; **28**: 69-74.

[9] CARSON DD, BAGCHI I, DEY SK, ENDERS AC, FAZLEBAS AT, LESSEY BA, et al. Embryo implantation. *Dev Biol* 2000 Jul 15; **223**: 217-37.

[10] DAIKOKU T, CHA J, SUN X, TRANGUCH S, XIE H, FUJITA T, et al. Conditional deletion of MSX homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Dev Cell* 2011; **21**: 1014-25.

[11] DEY SK, LIM H, DAS SK, REESE J, PARIA BC, DAIKOKU T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004; **25**: 341-73.

[12] DIAZ I, NAVARRO J, BLASCO L, SIMON C, PELLICER A, et al. Impact of stage III–IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril* 2000; **74**: 31-4.

[13] DIMITRIADIS E, STOIKOS C, STAFFORD-BELL M, CLARK I, PAIVA P, KOVACS G, et al. Interleukin-11, {IL}-11 receptorα and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol* 2006 Feb; **69**: 53-64.

[14] DONAGHAY M, LESSEY B. Uterine Receptivity: Alterations associated with benign gynecological disease. *Semin Reprod Med* 2007 Nov; **25**: 461-75. 111
[15] FOUCHER I, VOLOVITCH M, FRAIN M, KIM JJ, SOUBERBIELLE J-C, GAN L, et al. Hoxa5 overexpression correlates with IGFBP 1 upregulation and postnatal dwarfism: evidence for an interaction between Hoxa5 and Forkhead box transcription factors. *Development* 2002 Sep; **129**: 4065-74.
[16] FULDEORE MJ, SOLIMAN AM. Prevalence and symptomatic burden of diagnosed endometriosis in the United States: national estimates from a cross-sectional survey of 59,411 women. *Gynecol Obstet Invest* 2017; **82**: 453-61.
[17] GARRIDO N, NAVARRO J, GARCIA-VELASCO J, REMOHI J, PELLICER A, SIMON C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update* 110 2002; **8**: 95-103.
[18] GENBACEV OD, PRAKOBPHOL A, FOULK RA, KRTOLICA AR, ILIC D, SINGER MS, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003 Jan 17; **299**: 405-8.
[19] GUO S-W. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update* 2009; **15**: 441-61.
[20] HAMBARTSOUMIAN E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 1998 Feb; **39**: 137-43.
[21] KAO LC, GERMEYER A, TULAC S, LOBO S, YANG JP, TAYLOR RN, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease. Based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; **144**: 2870-81.
[22] KAO LC, TULAC S, LOBO S, IMANI B, YANG JP, GERMEYER A, et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002; **143**: 2119- 38.
[23] KIM JJ, KURITA T, BULUN SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev* 2013 Feb 1; **34**: 130-62.
[24] KOUKOURA O, SIFAKIS S, SPANDIDOS DA. DNA methylation in endometriosis (Review). *Mol Med Rep* 2016; **13**: 2939-48.
[25] LA FERLITA A, BATTAGLIA R, ANDRONICO F, CARUSO S, CIANCI A, PURRELLO M, et al. Non-coding RNAs in endometrial physiopathology. *Int J Mol Sci* 2018; **19**: 1-25.
[26] LEBOVIC DI, MUELLER MD, TAYLOR RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001 Jan;**75**: 1-10.
[27] LEE B, DU H, TAYLOR HS. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol Reprod* 2009; **80**: 79-85.
[28] LESSEY BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011 Sep; **96**: 522-9.
[29] LESSEY BA, CASTELBAUM AJ, BUCK CA, LEI Y, YOWELL CW, SUN J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994 Sep; **62**: 497-506.
[30] LESSEY BA, CASTELBAUM AJ, SAWIN SW, BUCK CA, SCHINNAR R, BILKER W, et al. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Aug; **79**: 643-9.
[31] LESSEY BA, LEBOVIC DI, TAYLOR RN. Eutopic endometrium in women with endometriosis: Ground zero for the study of implantation defects. *Semin Reprod Med* 2013; **31**: 109-24.
[32] LINDSAY TJ, VITRIKAS KR. Evaluation and treatment of infertility. *Am Fam Physician* 2015 Mar 1; **91**: 308-14.
[33] LUBAHN DB, MOYER JS, GOLDING TS, COUSE JF, KORACH KS, SMITHIES O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11162-6.

[34] LYDON JP, DEMAYO FJ, FUNK CR, MANI SK, HUGHES AR, MONTGOMERY CA, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995; **9**: 2266-78.

[35] MASCARENHAS MN, FLAXMAN SR, BOERMA T, VANDERPOEL S, STEVENS GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012; **9**: 1-12.

[36] MEULEMAN C, VANDENABEELE B, FIEUWS S, SPIESSENS C, TIMMERMAN D, D'HOOGHE T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertil Steril* 2009 Jul; **92**: 68-74.

[37] MIKOŁAJCZYK M, SKRZYPCZAK J, SZYMANOWSKI K, WITSTLEIN P. The assessment of LIF in uterine flushing--a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility. *Reprod Biol* 2003 Nov; **3**: 259-70.

[38] MONTEIRO JB, COLON-DIAZ M, GARCIA M, GUTIERREZ S, COLON M, SETO E, et al. Endometriosis is characterized by a distinct pattern of histone 3 and histone 4 lysine modifications. *Reprod Sci* 2014; **21**: 305-18.

[39] NOBLE LS, SIMPSON ER, JOHNS A, BULUN SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 Jan; **81**: 174-9.

[40] NORWITZ ER, SCHUST DJ, FISHER SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001 Nov 8; **345**: 1400-8.

[41] PRACTISE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 2006 Nov; **86**: S111-4.

[42] PRAPAS Y, GOUDAKOU M, MATALLIOTAKIS I, KALOGERAKI A, MATALLIOTAKI C, PANAGIOTIDIS Y, et al. History of endometriosis may adversely affect the outcome in menopausal recipients of sibling oocytes. *Reprod Biomed Online* 2012; **25**: 543-8.

[43] SAMARTZIS EP, NOSKE A, SAMARTZIS N, FINK D, IMESCH P. The expression of histone deacetylase 1, but not other class I histone deacetylases, is significantly increased in endometriosis. *Reprod Sci* 2013; **20**: 1416-22.

[44] SAMPSON JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *AJOG* 1927; **14**: 422-69.

[45] SARAPIK A, HALLER-KIKKATALO K, UTT M, TEESALU K, SALUMETS A, UIBO R. Serum anti endometrial antibodies in infertile women – potential risk factor for implantation failure. *Am J Reprod Immunol* 2010 May; **63**: 349-57.

[46] SHARKEY AM, SMITH SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003 Apr; **17**: 289-307.

[47] SIMON C, MARTIN JC, PELICER A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000 Oct; **14**: 815-26.

[48] STROWITZKI T, GERMEYER A, POPOVICI R, VON WOLFF M. The human endometrium as a fertility determining factor. *Hum Reprod Update* 2006; **12**: 617-30.

[49] SZCZEPAŃSKA M, WIRSTLEIN P, LUCZAK M, JAGODZINSKI PP, SKRZYPCZAK J. Expression of HOXA-10 and HOXA-11 in the endometria of women with idiopathic infertility. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; **49**: 111-8.

[50] TAYLOR HS, ARICI A, OLIVE D, IGARASHI P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1379-84.

[51] TAYLOR HS, BAGOT C, KARDANA A, OLIVE D, ARICI A. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1999; **14**: 1328-31.

[52] WILCOX AJ, WEINBERG CR, O'CONNR JF, BAIRD DD, SCHLATTERER JP, CANFIELD RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988 Jul 28; **319**: 189-94.

[53] WU Y, HALVERSON G, BASIR Z, STRAWN E, YAN P, Guo S-W. Aberrant methylation at HOXA 10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **193**: 371-80.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 18.11.2021
Przyjęto: 06.12.2021
Marcin Rajewski
Klinika Rozrodczości, Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel.: +48 61 8419302; fax:+48 61 8419625
e- mail: rajewskim@wp.pl

RÓŻNE OBLICZA UBIKWITYNACJI

THE MANY FACES OF UBIQUITINATION

Natalia ŁAZAREWICZ[1,2], Ewa BŁASZCZAK[1]

[1]Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski
[2]Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institute of Genetics and Development of Rennes), Rennes, Francja

Streszczenie: Ubikwitynacja jest post-translacyjną modyfikacją białek, która odgrywa istotną rolę w regulacji licznych procesów komórkowych. Zaburzenia w tym mechanizmie kontrolnym są związane z wieloma chorobami, w tym nowotworowymi, neurodegeneracyjnymi, metabolicznymi, atrofiami mięśniowymi, czy infekcjami wirusowymi. W procesie tym jedno z kluczowych białek regulatorowych – ubikwityna (Ub) pełni rolę markera znakującego białka o nieprawidłowej strukturze lub nieprawidłowo funkcjonujące, ukierunkowując je na proces degradacji w proteasomie. Co więcej, przyłączenie ubikwityny do substratów białkowych umożliwia także pełnienie innych ważnych funkcji w komórce. Dziś wiadomo, że ubikwitynacja określonego białka może wpływać na jego lokalizację w strukturach wewnątrzkomórkowych oraz na oddziaływania tego białka z innymi białkami lub regulację jego aktywności. W celu kontroli aktywności danego białka, jego interakcji z innymi białkami, lokalizacji, czy degradacji ubikwityna koduje złożone sygnały molekularne. Pomaga jej w tym rozbudowana sieć strukturalnie powiązanych ze sobą enzymów aktywujących ubikwitynę (E1), koniugujących ubikwitynę (E2) oraz ligaz ubikwityny (E3). Enzymy te mają zdolność do regulacji aktywności i funkcji innych białek poprzez wzajemne oddziaływania. Badania nad procesem ubikwitynacji są istotne, nie tylko w celu lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych i komórkowych, ale z punktu widzenia powstawania nowych leków celowanych w poszczególne komponenty systemu ubikwityna-proteasom. Niniejszy artykuł przedstawia aktualny stan wiedzy na temat procesu ubikwitynacji, ze szczególnym uwzględnieniem różnorodnych funkcji, jakie proces ten może pełnić w komórce.

Słowa kluczowe: ubikwitynacja, system ubikwityna-proteasom, monoubikwitynacja, poliubikwitynacja, łańcuchy ubikwityny

Summary: Ubiquitination is a post-translational modification of proteins that plays an essential role in regulating many cellular processes. Defects in this control mechanism are associated with various

diseases, including cancer, neurodegenerative and metabolic disorders, muscular atrophies, or viral infections. In this process, one of the key regulatory proteins – ubiquitin (Ub) marks improperly structured, or non-functioning proteins. These are then degraded by the proteasome. The attachment of ubiquitin to the substrate proteins can also have other important functional consequences for the cell. It is now known that ubiquitination of a particular substrate protein may affect its localization in subcellular compartments, influence its interactions with other proteins or regulate its activity. To control protein activity, interactions, localization and degradation, ubiquitin encodes complex molecular signals. It is aided by an extensive network of structurally-related enzymes, namely ubiquitin activating enzymes (E1), ubiquitin conjugating enzymes (E2) and ubiquitin ligases (E3). These enzymes work in concert to regulate the activity and function of other proteins. The studies of the ubiquitination process are important not only to better understand molecular and cellular mechanisms but also for the development of new drugs targeting particular ubiquitin-proteasome system components. This work presents the recent advancements in the field of protein ubiquitination with an emphasis put on various functions that this process may have in the cell.

Keywords: ubiquitination, the ubiquitin-proteasome system, monoubiquitination, polyubiquitination, ubiquitin chains

WPROWADZENIE

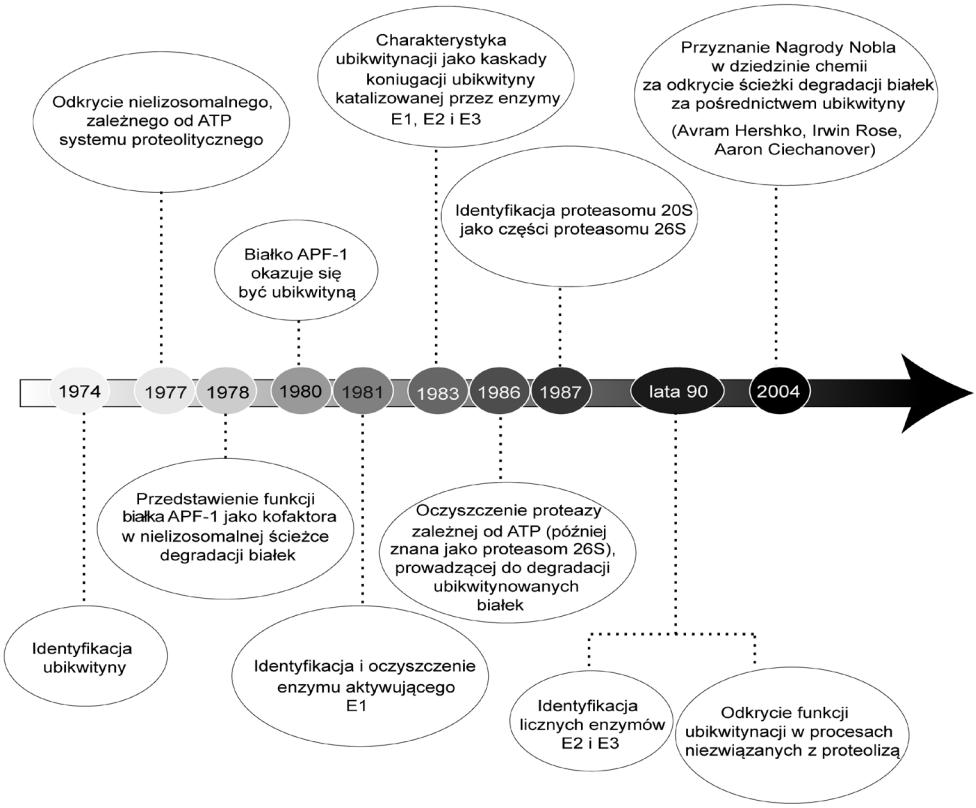
Ubikwitynacja jest post-translacyjną modyfikacją białek, która odgrywa istotną rolę w regulacji licznych procesów komórkowych. Należą do nich proteolityczne systemy kontroli jakości białek przez ich degradację (degradacja proteasomalna) [1], ale także nieproteolityczne procesy, takie jak: replikacja i naprawa DNA [2-4], kontrola cyklu komórkowego [5], podział komórki, transdukcja sygnałów komórkowych [6], transkrypcja [7], czy translokacja białek błonowych do kompartmentów endosomalnych [8]. Nieprawidłowości w procesie ubikwitynacji (na choćby jednym z jego etapów) mogą powodować zaburzenia homeostazy w komórce i są związane z patogenezą wielu chorób u człowieka (**Tab. 1**), między innymi chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, metabolicznych oraz chorób o podłożu genetycznym (np. atrofie mięśniowe), czy immunologicznym, a także niektórych infekcji wirusowych [9, 10]. Dla przykładu, mutacje w domenie RING, charakterystycznej dla części ligaz ubikwityny lub inne zmiany aktywności ligaz z domeną RING zostały skorelowane z ludzkimi nowotworami lub zaburzeniami stabilności genomu. Jednym z genów, którego mutacje odpowiadają za dziedzicznego raka piersi i jajnika jest *BRCA1* [11]. Z kolei, mutacja w genie *FA* prowadzi do zaburzonej monoubikwitynacji substratu FANCD2 (białko mogące tworzyć heterodimer z białkiem FANCI), co skutkuje niedokrwistością Fanconiego (ang. *Fanconi anemia*) [12]. Kolejnym przykładem są mutacje w genie kodującym białko Parkin, składnik kompleksu wielobiałkowej ligazy ubikwityny, które powodują autosomalny recesywny parkinsonizm młodzieńczy (ang. *autosomal recessive juvenile parkinsonism,* AR-JP) [13].

TABELA 1. Przykłady chorób związanych z zaburzeniami w procesie ubikwitynacji białek
TABLE 1. The examples of diseases associated with aberrations in protein ubiquitination

Choroby/ Zespoły chorobowe	Wybrane enzymy szlaku ubikwitynacji	Przykładowy defekt w procesie ubikwitynacji	Jedne z głównych efektów zaburzenia	Główne objawy choroby	Źródło
Genetyczne					
Choroba Andersen/ Amylopektynoza	E3: LUBAC	Mutacja i obniżenie stabilności ligazy	Zaburzenia szlaku NF –κB	Niewydolność wątroby, hipotonia mięśniowa, hepatomegalia i splenomegalia	[69]
Niedokrwistość Fanconiego	E2: UBE2T E3: FANCL	Utrata funkcji białka UBE2T. Zaburzona monoubikwitynacja substratu FANCD2	Niestabilność genomowa i nadwrażliwość komórkowa	Niedokrwistość aplastyczna, predyspozycje do rozwoju nowotworów	[70]
Zespół Angelmana	E3: UBE3A	Mutacje domeny AZUL białka UBE3A	Zaburzenia sygnalizacji Wnt/β-kateniny	Niepełnosprawność intelektualna, ataksja, padaczka	[71]
Zespół Riddle	E3: RNF168	Mutacja białka RNF168, brak możliwości rekrutacji białek naprawczych 53BP1 oraz BRCA1 do miejsc DSB (ang. *double-strand break*)	Zaburzenia szlaku naprawy DNA	Niedobór odporności, trudności w nauce, wrażliwość na promieniowanie, cechy dysmorficzne twarzy	[72]
Immunologiczne					
Choroba limfoproliferacyjna	E3: XIAP	Mutacja ligazy	Obniżony poziom komórek NK, zwiększona apoptoza	Cytopenia, niski poziom immunoglobuliny, powiększenie śledziony	[73]
Zespół Sjögrena	E2: UBE2G2 UBE2J1 E3: TRIM21	Podwyższony poziom ekspresji komponentów systemu ERAD	Lokalny stres ER	Uszkodzenie ślinianek i gruczołów łzowych	[74,75]
Neurodegeneracyjne					
Choroba Alzheimera	E3: CHIP TRAF6 BRCA1	Zaburzenia funkcji proteasomu	Agregacja białek amyloidu-β i nagromadzeniem białka TAU	Postępująca utrata pamięci i innych umiejętności poznawczych, demencja	[76,77]
Choroba Parkinsona	E3: Parkin	Mutacja białka Parkin	Obecność inkluzji cytoplazmatycznych zawierających m.in. ubikwitynę	Utrata neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej, drżenie i sztywność kończyn i tułowia, spowolnienie ruchów, zaburzenia równowagi, trudności z chodzeniem	[78]
Choroba Huntingtona	E3: Parkin	Zaburzenia procesu ubikwitynacji, inhibicja proteasomu	Nagromadzenie agregatów białkowych, zaburzenie komórkowej homeostazy i funkcjonowania neuronów	Niekontrolowane ruchy, drżenie rąk i nóg, postępujące zaburzenia pamięci, drażliwość i zmiany osobowości	[79]

Choroby/ Zespoły chorobowe	Wybrane enzymy szlaku ubikwitynacji	Przykładowy defekt w procesie ubikwitynacji	Jedne z głównych efektów zaburzenia	Główne objawy choroby	Źródło
Nowotwory					
Rak nerki	E3: RNF20	Obniżona ekspresja białka RNF20	Niekontrolowana proliferacja	Guzki, utrata masy ciała, krew w moczu, problemy ze wzrokiem	[80]
Rak okrężnicy	E3: FBXW7	Zaostrzenie ubikwitynacji za pośrednictwem ligazy SCF. Mutacja ligazy FBXW7 i jej substratów	Niekontrolowana proliferacja	Krwawienia i bóle	[81]
Rak piersi	E3: BRCA1/ BCA2	Mutacje ligaz	Zaburzenia szlaków naprawy DNA, indukcja proliferacji	Guzki, obrzęki piersi, bóle miednicze/brzucha, objawy ze strony dróg moczowych	[81,82]
Rak prostaty	E3: E6AP RNF20 TRIM25	Nadekspresja wymienionych ligaz	Zaburzenia w szlakach kontroli stabilności i aktywności białek t.j. receptor androgenu i jego kofaktory	Objawy ze strony dróg moczowych i nasienia, problemy przy oddawaniu moczu	[83,84]
Szpiczak mnogi	E3: cIAP1 cIAP2	Delecja ligaz	Aktywacja szlaku NF-κB	Bóle kości, nudności, zmęczenie, częste infekcje, utrata masy ciała	[85]
Infekcje wirusowe					
Zakażenie ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV)	E3: TRIM5α	Obniżenie aktywności lub inhibicja działania proteasomu	Zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_2	Gorączka, bóle mięśni, wysypka, pleśniawki, obrzęk węzłów chłonnych	[86]
Zapalenie wątroby typu B (HBV)	E3: SCF	Nadekspresja ligazy	Akumulacja poliubikwitynowanego SHIP2	Zapalenia wątroby, nowotwór	[87]

W 2004 roku trzej badacze Aaron Ciechanover, Avram Hershko oraz Irwin Rose otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za badania nad procesem kontrolowanej degradacji uszkodzonych lub niepotrzebnych komórce białek z udziałem niewielkiego białka – ubikwityny (ang. *Ubiquitin*, Ub; wybrane odkrycia związane z procesem ubikwitynacji do 2004 r. przedstawiono na **rycinie 1**). Odkrytej w 1974 r. przez Gideona Goldstein'a ubikwityny, której pełną sekwencję aminokwasową opublikowano rok później, nie kojarzono jeszcze z procesem degradacji białek [14, 15]. Nie wiedziano bowiem o istnieniu białkowych agregatów enzymatycznych w postaci proteasomów, a lizosom uważano za główne organellum, w którym dochodzi do wewnątrzkomórkowej degradacji białek. Jednak w 1977 r. Etlinger i Goldberg potwierdzili istnienie nielizosomalnego i zależnego od ATP



RYCINA 1. Oś czasu przedstawiająca wybrane odkrycia związane z procesem ubikwitynacji. Perspektywa historyczna systemu ubikwityna-proteasom. Opracowano na podstawie Ciechanover i wsp., (2005); z modyfikacjami

FIGURE 1. The timeline chart of the selected discoveries in the ubiquitin field. Historical perspective of the ubiquitin-proteasome system. Adapted from: Ciechanover et al., (2005); with modifications

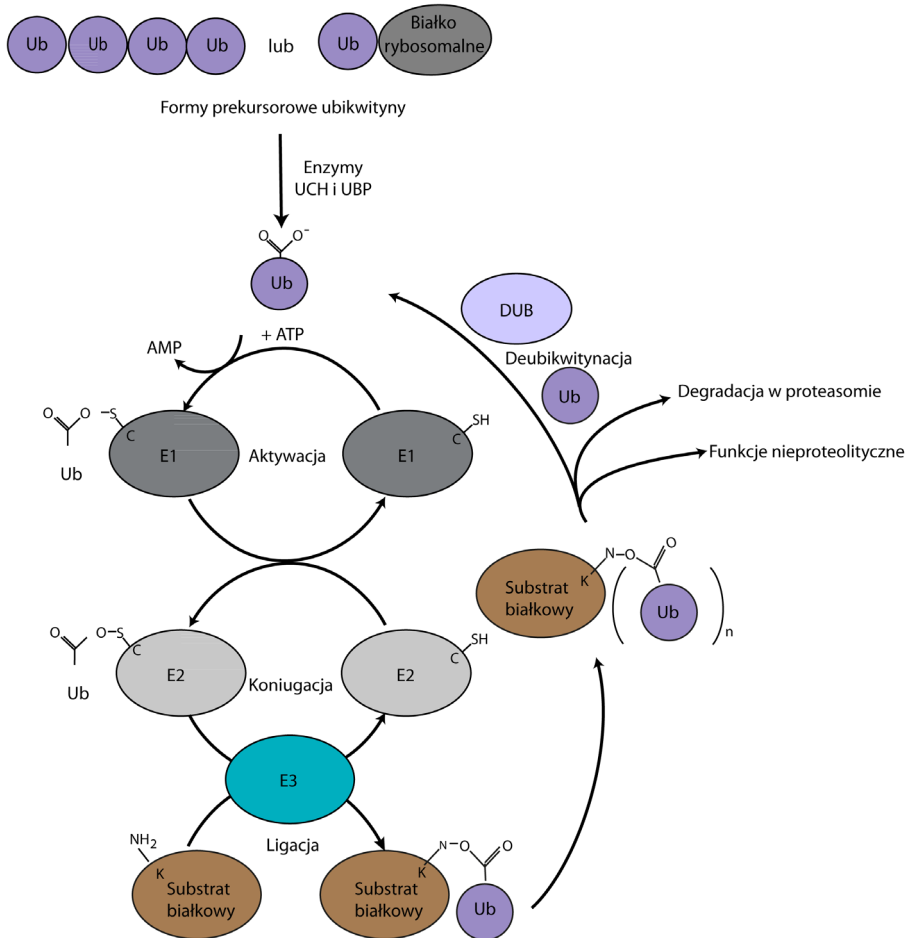
układu proteolitycznego odpowiedzialnego za degradację nieprawidłowo sfałdowanych białek [16]. Wszystko to stało się podstawą do pionierskich prac nad systemem ubikwityna-proteasom, sięgających lat 1978-1983, kiedy to właśnie w laboratorium Avrama Herszko zidentyfikowano komponenty tego systemu, mianowicie enzymy aktywujące ubikwitynę (ang. *ubiquitin activating enzymes,* E1), enzymy koniugujące ubikwitynę (ang. *ubiquitin conjugating enzymes,* E2) i ligazy ubikwityny (ang. *ubiquitin ligases*, E3). Avram Herszko wraz ze swoim uczniem Aaronem Ciechanoverem i współpracownikiem Irwinem Rose, korzystając z frakcjonowania biochemicznego i enzymologii, odkryli, że niektóre białka są kowalencyjnie związane z ubikwityną (początkowo nazwaną przez nich jako zależny od ATP czynnik proteolityczny 1, APF-1, który okazał się być właśnie ubikwityną; co potwierdzili w 1980 r. Wilkinson i współpracownicy [17]). Wykazali również, że ubikwitynowane białka są niszczone przez proteazę zależną od ATP w ekstrakcie pochodzącym z retikulocytów królika [18]. Obecnie wiadomo, że modyfikacja białek z udziałem ubikwityny koduje różne sygnały molekularne, które mogą mieć odmienne konsekwencje dla funkcjonowania komórki.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego różnorodnych funkcji, jakie proces ubikwitynacji może pełnić w komórce. W przeciwieństwie do ogromnego postępu badań nad samym przebiegiem procesu ubikwitynacji, jego mechanizm molekularny, w tym przybieranie różnorodnych konformacji przez łańcuchy ubikwityny oraz funkcje, jakie pełnią one w komórce, pozostają słabo poznane.

UBIKWITYNA

Ubikwityna to jedno z kluczowych, silnie konserwatywnych białek regulatorowych biorących udział w większości procesów zachodzących w komórkach. Jest to niewielkie białko złożone z 76 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 8,5 kDa. Ubikwityna jest białkiem stabilnym (zarówno na działanie wysokich temperatur jak i szeroki zakres pH), o wyjątkowo zwartej strukturze z odsłoniętym końcem karboksylowym, tzw. C-końcem, dzięki czemu może tworzyć kowalencyjne połączenia z innymi białkami [19]. Jest ona obecna u organizmów eukariotycznych we wszystkich typach komórek i tkanek; do 108 kopii na komórkę [20], a jej stężenia w komórkach sięgają ~ 85 μM [21]. Jest to zarówno białko cytoplazmatyczne, jak i jądrowe [22].

Ubikwityna jest syntetyzowana w postaci białek prekursorowych. Te z kolei muszą ulec hydrolizie dzięki enzymom deubikwitynującym (DUB, ang. *deubiquitylating enzymes*), C-końcowym hydrolazom UBP lub UCH, aby uwolnić funkcjonalną cząsteczkę ubikwityny [22] (**Ryc. 2**). Białka prekursorowe są biał-



RYCINA 2. Schemat przedstawiający proces ubikwitynacji. Ubikwityna syntetyzowana jest jako białko prekursorowe składające się z kilku cząsteczek ubikwityny (fuzja liniowa – ubikwityna tandemowa) lub cząsteczki ubikwityny połączonej z białkami rybosomalnymi. Generowanie „wolnej" ubikwityny (Ub) możliwe jest dzięki działaniu enzymów deubikwitynujących (DUB), w tym UCH i UBP. Ubikwityna jest aktywowana przez enzym aktywujący ubikwitynę (E1), w sposób zależny od ATP, a następnie przeniesiona na enzym koniugujący ubikwitynę (E2). Enzym E2 oddziałuje z odpowiednią ligazą ubikwityny (E3), co umożliwia kowalencyjne przyłączenie ubikwityny do substratu białkowego. Proces jest odwracalny dzięki działaniu enzymów DUB

FIGURE 2. The schematic representation of the ubiquitination process. Ubiquitin is synthesized as a precursor protein, consisting of multiple copies of ubiquitin (tandem ubiquitin in a linear fusion) or ubiquitin fused with ribosomal proteins. The generation of free ubiquitin (Ub) is possible thanks to the action of deubiquitinating enzymes (DUB), including UCH and UBP. Free ubiquitin can be activated by the ubiquitin activating enzyme (E1) in an ATP-dependent manner, and then transferred into a ubiquitin conjugating enzyme (E2). Next, E2 interacts with a ubiquitin ligase (E3), which enables ubiquitin to be covalently attached to the substrate protein. The process can be reversible due to the action of DUBs

kami fuzyjnymi składającymi się z czterech lub więcej pojedynczych cząsteczek ubikwityny lub cząsteczki ubikwityny i białek rybosomalnych (białko L40 – białko małej podjednostki rybosomu 40S i białko S27 – białko dużej podjednostki 60S) [23, 24]. Szacuje się, że w komórkach ssaków ok. 25% cząsteczek ubikwityny stanowi jej „wolna", nieskoniugowana forma, natomiast pozostała frakcja ubikwityny w komórce jest kowalencyjnie połączona z innymi białkami (w tym z samą ubikwityną) [21]. U ssaków ubikwityna kodowana jest przez cztery geny: *UBC*, *UBB*, *UBA52* i *UBA80*. U niższych organizmów eukariotycznych, np. u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* również występują cztery geny kodujące ubikwitynę: *UBI1*, *UBI2*, *UBI3* i *UBI4*. Co ciekawe, u drożdży pojedynczy gen *UBI4* nie jest niezbędny do życia. Jednak komórki drożdży pozbawione genu *UBI4* są wrażliwe na wysokie temperatury, źle znoszą niedobór niezbędnych aminokwasów w podłożu tzw. „głód aminokwasowy" lub inne czynniki generujące stres, m.in. indukowane analogami aminokwasów (np. kanawaniną), a także wykazują zaburzenia w procesie sporulacji [25].

MECHANIZM PROCESU UBIKWITYNACJI

Przyłączenie ubikwityny do określonego substratu w procesie ubikwitynacji katalizowane jest przez kaskadę reakcji enzymatycznych (**Ryc. 2**). W pierwszym etapie tego procesu reszta glicyny (Gly76) na C-końcu ubikwityny aktywowana jest przez enzym E1 w sposób zależny od ATP. W wyniku reakcji transestryfikacji powstaje wysokoenergetyczne wiązanie pomiędzy Gly76 Ub, a grupą -SH reszty cysteinowej w centrum enzymu E1 (utworzenie produktu pośredniego E1~Ub). U człowieka występują dwa enzymy aktywujące ubikwitynę, UBE1 (u drożdży Uba1) oraz UBA6 (inna nazwa u człowieka to UBE1L2) [26]. Tak aktywowana ubikwityna przenoszona jest z enzymu E1 na reszty cysteiny (Cys) w miejscu aktywnym enzymu koniugującego ubikwitynę. Powstaje produkt pośredni E2~Ub. Następnie enzym E2 wchodzi w interakcję z odpowiednią ligazą ubikwityny E3, która rozpoznaje zarówno enzym E2, jak i określony substrat, umożliwiając kowalencyjne przyłączenie ubikwityny do białka docelowego. U człowieka zidentyfikowano ok. 600 ligaz ubikwityny, które podzielono i sklasyfikowano względem wysoce konserwatywnych domen katalitycznych oraz mechanizmu transferu ubikwityny, który wykorzystują [27]. Pierwszą najliczniejszą klasę stanowią ligazy z domeną RING (ang. *really interesting new gene*), drugą, nieco mniej liczną ligazy z domeną HECT (ang. *homologous with E6-associated protein C-terminus*), natomiast trzecią tzw. ligazy RBR (ang. *RING Between RING fingers*). Ligazy z domeną RING przenoszą ubikwitynę bezpośrednio z enzymu E2 na białko docelowe poprzez jednoczesne wiązanie się zarówno z E2~Ub jak i z substratem białkowym. Z kolei, ligazy HECT wykorzystują dwuetapową reakcję transferu ubikwityny na substrat. W pierwszym etapie reakcji tioester E2~Ub umożliwia

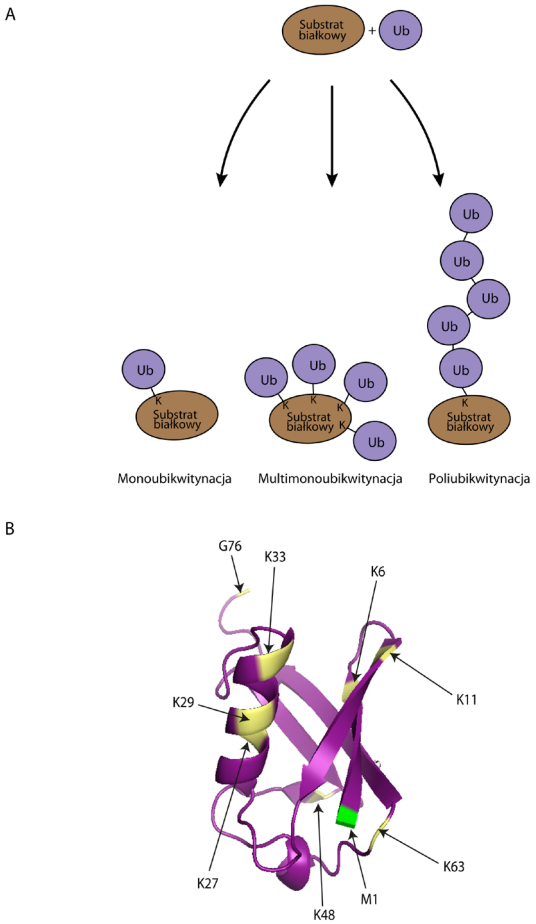
transfer ubikwityny do cysteinowego miejsca aktywnego w obrębie tej klasy ligaz (reakcja transestryfikacji), zachowując przy tym wysokoenergetyczne wiązanie tioestrowe (E3~Ub). W drugim etapie reakcji ubikwityna jest bezpośrednio przekazywana z miejsca aktywnego ligazy HECT na lizynę w substracie białkowym. Trzecia klasa ligaz ubikwityny to tzw. ligazy RBR. Białka te wykorzystują kombinację mechanizmów ligaz RING i HECT, aby przenieść cząsteczkę ubikwityny na cząsteczkę substratową [28].

Podczas ostatnich etapów reakcji w procesie ubikwitynacji grupa karboksylowa (-COOH) na C-końcu ubikwityny i grupa aminowa (-NH_2) reszty lizyny (Lys) w białku substratowym połączona jest wiązaniem izopeptydowym. Proces może powtarzać się kilkakrotnie, a klasa enzymów E3, zaangażowana w wydłużanie łańcucha ubikwityny, często nazywana jest klasą enzymów E4 (czynnik elongacji łańcucha E4) [29]. Mechanizm procesu ubikwitynacji jest odwracalny w wyniku działania enzymów DUB. Genom drożdży koduje 22 enzymy DUB, natomiast w genomie człowieka zidentyfikowano ponad 100 genów kodujących te izopeptydazy [30].

Oprócz typowego połączenia ubikwityny do Lys substratu wykazano, że ubikwityna może być również przyłączona do seryny (Ser), treoniny (Thr), np. wirusowa ligaza mK3 może pośredniczyć w ubikwitynacji poprzez przyłączenie się do reszty Ser i Thr substratu [31, 32] i cysteiny (Cys), np. ubikwitynacja peroksysomalnego receptora importu Pex5 u drożdży [33], poprzez tworzenie wiązań oksyestrowych lub tioestrowych. Dodatkowo, ubikwityna może wiązać się przez wolną grupę aminową na końcu N białek substratowych wiązaniem peptydowym [34].

GŁÓWNE FUNKCJE UBIKWITYNACJI BIAŁEK W KOMÓRCE

Pierwotnie uważano, że ubikwityna dołącza się do zbędnego komórce białka i naznacza go jedynie do zniszczenia. Dziś wiadomo, że przyłączenie się ubikwityny do lizyny danego białka, w procesie ubikwitynacji może wpływać na regulację wielu procesów komórkowych. Ubikwityna kontroluje szereg sygnałów molekularnych mających wpływ na aktywność białka, jego oddziaływania z innymi białkami, lokalizację, czy degradację. Pomaga jej w tym rozbudowana sieć strukturalnie powiązanych ze sobą enzymów. Enzymy E2 i E3 (będące w centrum kaskady reakcji enzymatycznej) wchodzą w fizyczne interakcje, co umożliwia ubikwitynowanie właściwych dla nich substratów. Tworzy to złożoną sieć oddziaływań (u człowieka opisano ok. 40 enzymów E2 oraz ponad 600 ligaz E3), a wybrane enzymy koniugujące ubikwitynę mogą oddziaływać z więcej niż jedną ligazą i odwrotnie. Ponadto rodzaje modyfikacji, jakie ubikwityna tworzy po przyłączeniu się do białka substratowego, są niezwykle różnorodne [35, 36] i stanowią one swego rodzaju „kod ubikwityny” [35].



RYCINA 3. Schemat przedstawiający typy ubikwitynacji **(A)** oraz trzeciorzędową strukturę ubikwityny **(B)**. **(A)** Wyróżnia się: monoubikwitynację, czyli przyłączenie pojedynczej cząsteczki ubikwityny do substratu białkowego lub jej odmianę multimonoubikwitynację, gdy kilka pojedynczych cząsteczek ubikwityny przyłączonych jest do kilku lizyn substratu oraz poliubikwitynację, gdy kilka cząsteczek ubikwityny dołączonych jest do lizyny substratu białkowego tworząc tzw. łańcuchy ubikwityny. **(B)** Struktura ubikwityny (PDB ID: 1UBQ) z zaznaczonymi resztami lizyny (K6, K11, K27, K29, K33, K48 i K63) i metioniną (M1) na końcu *N*, które to reszty zaangażowane w tworzenie łańcuchów ubikwityny, a także glicyną (G76) na końcu *C*. Wygenerowano z wykorzystaniem narzędzia PyMOL (http://www.pymol.org/)

FIGURE 3. The scheme showing different types of ubiquitination **(A)** and a tertiary structure of ubiquitin **(B)**. **(A)** The following types of ubiquitination can be distinguished: monoubiquitination when a single ubiquitin is attached to a substrate protein and is form multi-monoubiquitination, which occurs when several single ubiquitin moieties are attached to different lysines on a substrate. The attachment of a series of ubiquitin molecules to a substrate protein is known as polyubiquitination, where the so-called ubiquitin chains are made. **(B)** The ubiquitin structure (PDB ID: 1UBQ) with its seven lysine residues (K6, K11, K27, K29, K33, K48 and K63) and N-terminal methionine (M1), which are involved in the formation of ubiquitin chains as well as C-terminal glycine (G76); generated with the PyMOL software (http://www.pymol.org/)

FUNKCJE PROTEOLITYCZNE – DEGRADACJA BIAŁEK

Ważną funkcją systemu ubikwityna-proteasom jest kontrola jakości białek, poprzez selektywne rozpoznanie i kierowanie nieprawidłowo sfałdowanych lub uszkodzonych białek do degradacji. Jest to kluczowa rola, ponieważ niewłaściwie sfałdowane białka mogą mieć negatywne skutki w kontekście funkcjonowania komórek i powodować, m.in. utratę fenotypów funkcyjnych, wytwarzanie toksycznych agregatów białkowych lub niefunkcjonalnych produktów białkowych [37, 38]. W różnych przedziałach komórkowych istnieje kilka ścieżek prowadzących nieprawidłowo sfałdowane lub uszkodzone białka do degradacji proteasomalnej. Najbardziej zbadanym szlakiem jest degradacja związana z retikulum endoplazmatycznym (ang. *endoplasmic reticulum-associated protein degradation,* ERAD), która jest procesem wysoce konserwatywnym wśród organizmów eukariotycznych [39]. Szlak ERAD składa się z czterech etapów: wyboru białkowego substratu docelowego, przemieszczenia się tego substratu w poprzek błony retikulum endoplazmatycznego, dodanie i późniejsze usunięcie koniugatów ubikwityna-białko oraz degradacja przez proteasom 26S. Guerriero i Brodsky przedstawili szczegółowo związek między szlakiem degradacji ERAD, a chorobami u człowieka [40]. Poza ścieżką ERAD występuje również mechanizm kontroli jakości białek w cytoplazmie, w który to zaangażowane są, np. ligaza ubikwityny Ubr1 [41] i Hul5 u drożdży [42]. Cytoplazmatyczny system kontroli jakości białek reguluje stan sfałdowania białek oraz ich prawidłowe funkcjonowanie w wyniku współdziałania białek opiekuńczych i proteaz w cytoplazmie, poprzez ograniczenie akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych, bądź uszkodzonych białek. Gardner i współpracownicy wskazali również na istnienie mechanizmu kontroli jakości białek w jądrze komórkowym [43]. W tym kompartmencie komórkowym nieprawidłowo sfałdowane białka są rozpoznawane, m.in. przez ligazę ubikwityny San1 u drożdży, która oddziałuje z enzymami koniugującymi ubikwitynę Cdc34 i Ubc1 [44]. Odkryto również system kontroli jakości białek w wewnętrznej błonie jądrowej (ang. *inner nuclear membrane-associated degradation* INMAD) [45-47] przez ligazy Asi1 i Asi3, które wraz z białkiem Asi2 tworzą tzw. kompleks Asi zlokalizowany w wewnętrznej błonie jądrowej. Kompleks Asi jest jednym z istotnych elementów szlaku detekcji obecności aminokwasów w środowisku przez drożdże, tzw. szlaku SPS (ang. *amino acid sensing pathway,* Ssy1-Ptr3-Ssy5), gdzie jest on zaangażowany w degradację niektórych czynników transkrypcyjnych [48]. Wykazano, że kompleks Asi jest ligazą ubikwityny i wchodzi w interakcje z enzymami koniugującymi Ubc6 i Ubc7 [45]. Ubikwitynuje on czynnik transkrypcyjny Stp2, jak również prowadzi do degradacji innych substratów nieprawidłowo zlokalizowanych w wewnętrznej błonie jądrowej, które są potencjalnie szkodliwe dla komórki [45, 46].

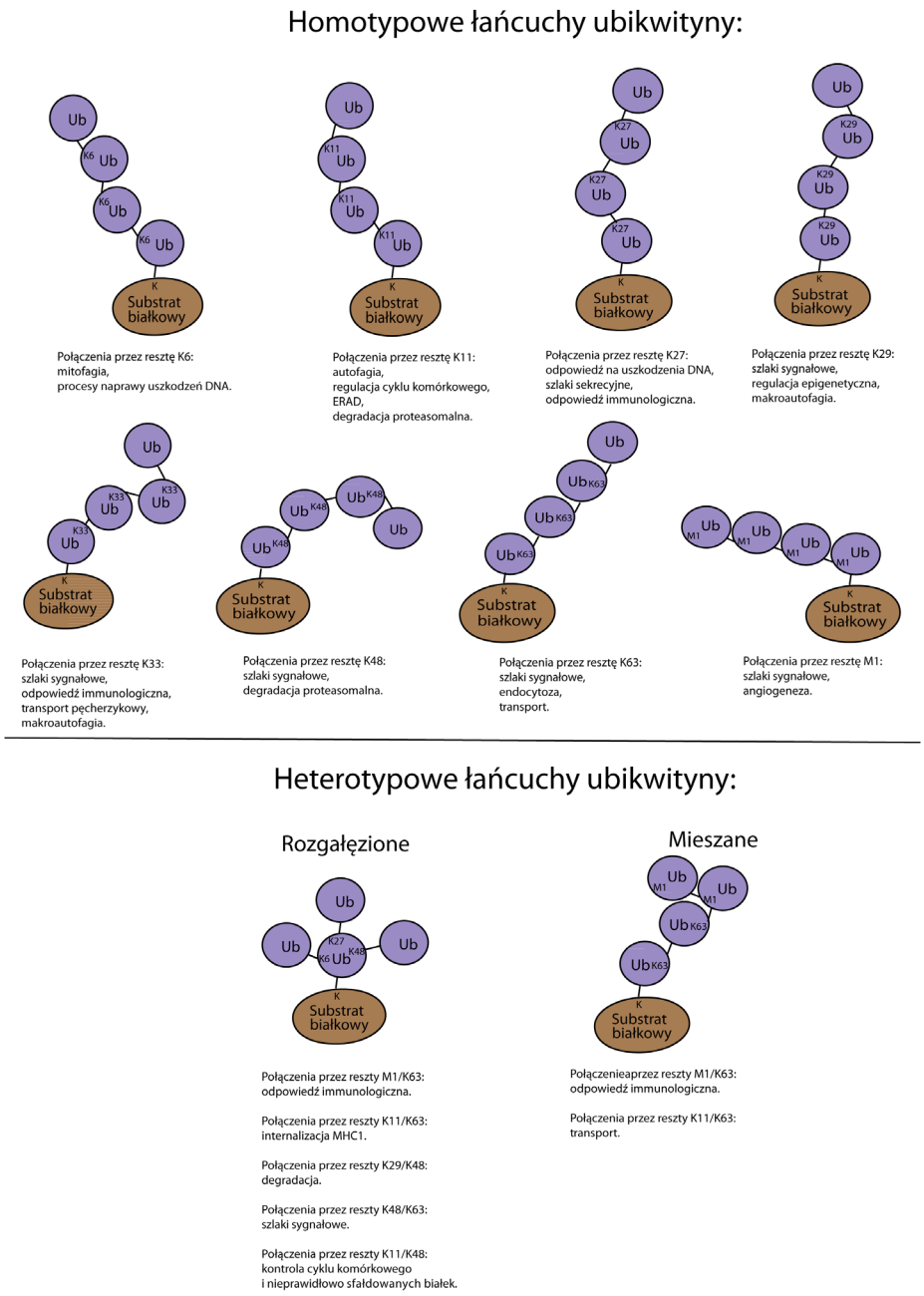
FUNKCJE W INNYCH PROCESACH KOMÓRKOWYCH (NIEZWIĄZANE Z PROTEOLIZĄ)

Oprócz kontroli jakości białek i ich degradacji ubikwitynacja pełni rolę regulacyjną w niezliczonych procesach komórkowych. Najlepszym przykładem jest cykl komórkowy, w którym sekwencyjna aktywacja kinaz zależnych od cyklin

(ang. *cyclin-dependent kinases*, CDK) precyzyjnie reguluje jego progresję. Aktywność kinaz CDK jest modulowana przez liczne cykliny wchodzące w interakcje z białkami CDK oraz inhibitory CDK (ang. *cyclin kinase inhibitors,* CKI). W czasie progresji cyklu komórkowego, ligazy ubikwityny odgrywają istotną rolę, nie tylko w kontroli degradacji białek w czasie trwania cyklu komórkowego, ale także w regulacji inhibitorów CKI. Pośród ligaz zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego wyróżnić można kompleks promujący anafazę (ang. *anaphase promoting complex/cyclosome* APC/C) oraz tzw. wieloskładnikowy kompleks ligazy ubikwityny SCF, (ang. *Skp1/Cullin/F-box*), inaczej CRL1 [49] oraz kompleksy CRL3 i CRL4. Dla przykładu substratem ligazy CRL3 jest białko Aurora, które uczestniczy w kontroli mitozy poprzez proteolityczne i nieproteolityczne mechanizmy. Kompleks CRL4, oprócz regulacji cyklu komórkowego jest zaangażowany w komórkową odpowiedź na uszkodzenia DNA oraz replikację DNA [50]. Funkcje ubikwitynacji niezwiązane z degradacją zostały również szeroko opisane w odniesieniu do procesu transkrypcji. Niezależną od proteolizy rolę ubikwityny w transkrypcji po raz pierwszy przedstawili Salghetti i współpracownicy. Wykazali oni, że ubikwitynacja domeny aktywującej transkrypcję (ang. *transcription activation domain*, TAD) białka VP-16 przez ligazę ubikwityny Met30 jest niezbędna do aktywacji transkrypcji u drożdży *S. cerevisiae* [51]. Później wykazano, że wiele czynników transkrypcyjnych jest pozytywnie regulowanych przez ubikwitynację, np. monoubikwitynacja czynnika transkrypcyjnego p53 podczas stresu komórkowego katalizowana przez ligazę ubikwityny Mdm2, skutkuje jego zwiększoną stabilnością [52].

TYPY UBIKWITYNACJI I RÓŻNORODNOŚĆ ŁAŃCUCHÓW UBIKWITYNY

Przyłączenie ubikwityny do lizyny danego białka substratowego może być monomeryczne, co określa się mianem monoubikwitynacji (przyłączenie jednej cząsteczki, ang. *monoubiquitination*) (**Ryc. 3a**). Jeśli natomiast cząsteczka ubikwityny, także w formie monomerycznej, dołączy się do kilku reszt lizyny na tym samym białku, mamy do czynienia z multi-monoubikwitynacją (ang. *multi-monoubiquitination*). Polimeryczne przyłączenie ubikwityny do reszty lizyny białka substratowego określa się jako poliubikwitynacja (ang. *polyubiquitination*), a tak powstałe łańcuchy ubikwityn na substracie białkowym mogą tworzyć różne topologie. Co więcej, wszystkie siedem reszt lizyny: Lys6 (K6), Lys11 (K11), Lys27 (K27), Lys29 (K29), Lys33 (K33), Lys48 (K48) i Lys63 (K63) w cząsteczce ubikwityny (końcowa Gly76 ubikwityny połączona jest z jedną z siedmiu lizyn kolejnych cząsteczek Ub wiązaniem izopeptydowym), jak również N-końcowa reszta metioniny – Met1 (M1) (połączenie poprzez wiązanie peptydowe) (**Ryc. 3b**) są zaangażowane w tworzenie łańcuchów o różnorodnych strukturach [53, 54]. Różne topologie łańcuchów ubikwityny na substracie białkowym związane są z pełnieniem określonych funkcji w komórce (**Ryc. 4**).



RYCINA 4. Różne topologie tworzenia łańcuchów poliubikwityny oraz główne funkcje, jakie poszczególne typy łańcuchów pełnią w komórce

FIGURE 4. The different topologies of polyubiquitin chains' formation and their main cellular functions

MONOUBIKWITYNACJA

Przyłączenie pojedynczej cząsteczki ubikwityny do białka reguluje jego aktywność lub wpływa na jego lokalizację w kompartmentach komórkowych. Początkowo rola monoubikwitynacji była przypisana wyłącznie do nieproteolitycznych procesów. Monoubikwitynacji nie wiązano z procesem degradacji białek, gdyż badania wykazały, że aby białko było skierowane do proteasomu musi mieć dołączone co najmniej cztery cząsteczki ubikwityny (łańcuch poliubikwityny złożony z teraubikwityny) [55]. W przypadku niektórych białek wykazano jednak, że monoubikwitynacja lub multi-monoubikwitynacja mogą być również sygnałem prowadzącym do ich degradacji. Dotyczy to białek mniejszych niż 150 aminokwasów o dobrze uporządkowanej strukturze. Wśród takich substratów znajdują się, m.in. białka związane z transportem węglowodanów oraz szlakami odpowiedzi na stres oksydacyjny [56] lub niewielkie białka regulatorowe, bądź te związane z procesem transkrypcji. Monoubikwitynacja odpowiada na przykład za przetwarzanie prekursora p105 jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells signaling pathway*) do jego aktywnej podjednostki p50 przez proteasom. Proteasom rozpoznaje monokwitynowany prekursor p105, nie degradując go jednak całkowicie [57]. Inne badania wykazały, że degradacja proteasomalna białka Pax3, kluczowego regulatora różnicowania mięśni, zachodzi również przez monoukwitynację [58].

Ważną rolę monoubikwitynacji w regulacji białek wchodzących w skład chromatyny – histonów opisano po raz pierwszy u drożdży *S. cerevisiae*. Wykazano, że komórki drożdży niosące zmutowany gen kodujący histon H2B – substytucja lizyny w pozycji 123 na argininę (mutacja K123R), rosną wolniej niż komórki typu dzikiego i nie mogą sporulować, a za normalny wzrost i mejozę odpowiedzialna jest monoubikwitynacja histonu H2B [59]. Warto zwrócić uwagę również na rolę monoubikwitynacji w procesie naprawy uszkodzeń DNA i replikacji DNA. Chociaż stwierdzono, że poliubikwitynowane (K63) formy histonów H2A i H2AX zapewniają „rusztowanie sygnalizacyjne" (ang. *signaling scaffold*), ligazy ubikwityny RING1B i RNF20/RNF40 katalizują monoubikwitynację histonów H2A/H2AX i H2B w pobliżu miejsca uszkodzeń DNA [60]. Ponadto monoubikwityncja reguluje aktywność licznych białek błony cytoplazmatycznej, kierując je na szlak endocytozy, które to białka przeznaczone są do degradacji w lizosomach [61].

POLIUBIKWITYNACJA I TOPOLOGIE ŁAŃCUCHÓW UBIKWITYNY ORAZ ICH GŁÓWNE FUNKCJE

Poliubikwitynacja jest procesem, w którym cząsteczki ubikwityny łączą się ze sobą tworząc łańcuchy ubikwityn na białku docelowym, a złożoność łańcuchów zapewnia zarówno różnorodność strukturalną, jak i funkcjonalną. W tworzenie łańcuchów zaangażowane może być osiem reszt aminokwasowych ubikwityny: K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 oraz M1 [62]. U drożdży *S. cerevisiae*, a tak-

że u ssaków najczęściej pojawiają się połączenia przez reszty K63 (typowa funkcja nieproteolityczna – udział w szlakach sygnalizacyjnych) oraz K48 (funkcja proteolityczna – proteasomalna degradacja). Dla przykładu, w komórkach ssaków HEK293 procentowa ilość wiązań poliubikwityny (poli-Ub) wynosi odpowiednio 52% (K48), 38% (K63), 8% (K29), 2% (K11) i 0,5% lub mniej dla połączeń przez reszty K6, K27 oraz K33 [63].

W zależności od połączenia łańcuchy poli-Ub przyjmują alternatywne topologie (**Ryc. 4**). Połączenie przez tę samą resztę lizyny (np. K48) lub metioninę (M1) prowadzi do powstania tzw. łańcuchów homotypowych. Drugi rodzaj łańcuchów stanowią tzw. łańcuchy heterotypowe, które zawierają różne rodzaje połączeń (np. K48 wraz z K11) i są klasyfikowane jako mieszane, bądź rozgałęzione. W łańcuchach mieszanych do kolejnych elementów łańcucha dołączana jest tylko jedna ubikwityna, ale kolejne ubikwityny w łańcuchu są połączone ze sobą tylko przez jedną resztę aminokwasową (modyfikacja tylko w jednym miejscu akceptorowym). W przypadku łańcuchów rozgałęzionych kolejne cząsteczki ubikwityny mogą łączyć się przez dwie lub więcej reszt aminokwasowych (jednoczesna modyfikacja w wielu miejscach akceptorowych) [27, 64]. Tu przykładem jest kompleks APC/C, który posiada zdolność tworzenia połączeń przez K11 na wcześniej powstałym łańcuchu K48 lub odwrotnie w przypadku ligazy UBR5, która zaangażowana jest w tworzenie połączeń K48 na wcześniej powstałym łańcuchu K11 [65]. Różne połączenia prowadzą do określonych konformacji łańcucha poli-Ub. Łańcuchy mogą być „zwarte", gdzie sąsiadujące cząsteczki oddziałują ze sobą, np. łańcuchy połączone przez reszty K48, K11 i K6 lub przyjmować konformacje „otwarte", gdzie nie ma bezpośrednich interakcji między cząsteczkami ubikwityny, np. łańcuchy połączone przez resztę M1. Istotnym jest jednak fakt, że określone konformacje łańcucha poli-Ub obserwowane w kompleksach białkowych oddziałujących z Ub często różnią się od tych występujących poza kompleksami. Może to świadczyć o znacznej elastyczności łańcuchów lub możliwości ich przebudowy [66].

Jak wcześniej wspomniano przykładowe funkcje procesu ubikwitynacji w zależności od połączeń (łańcuchów), jakie ubikwityna może tworzyć na substracie białkowym przedstawiono na **rycinie 4**. Warto jednak podkreślić istotną rolę heterotypowych wiązań mieszanych lub rozgałęzionych. Dla przykładu, ligaza ubikwityny Ufd4 wraz z czynnikiem elongacji łańcucha Ufd2 biorą udział w powstawaniu łańcuchów rozgałęzionych K29/K48 na substratach tzw. szlaku degradacji UFD (ang. *ubiquitin-fusion degradation*) u drożdży. Z kolei, rozgałęzione łańcuchy K48/K63 syntetyzowane przez ligazy ubikwityny TRAF6 i HUWE1, rozpoznawane przez białko TAB2, odgrywają rolę w regulacji komórkowego szlaku sygnalizacyjnego zależnego od jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB [67]. Formowanie połączeń K48/K63 z udziałem ligaz ubikwityny ITCH i UBR5 związane jest natomiast z procesem apoptozy [68]. Ogólny mechanizm powstawania łańcuchów rozgałęzionych wraz z szeregiem innych funkcji, jakie mogą pełnić one w komórce został ostatnio opisany przez French i współpracowników [27].

PODSUMOWANIE

Złożoność i różnorodność procesu ubikwitynacji sprawia, że modyfikacja ta pełni wiele istotnych funkcji w komórce. Niektóre z nich zostały dobrze poznane i opisane. Jednak szczegółowa wiedza na temat topologii i długości tworzonych na białku substratowym łańcuchów ubikwityny oraz sygnałów przez nie kodowanych, wraz z dynamiką procesu ubikwitynacji *in vivo*, jest nadal bardzo ograniczona. Znaczącą rolę odgrywa więc ciągły rozwój nowych technik i metodologii do badania tej post-translacyjnej modyfikacji białek. W ostatnich latach proces ubikwitynacji stał się szczególnie istotny w kontekście nowych potencjalnych celów dla terapii molekularnej. Wiedza na temat specyficzności określonych ligaz ubikwityny oraz topologii i funkcji tworzonych na substracie białkowym łańcuchów, a także lepsze zrozumienie mechanizmów kontrolnych oraz funkcji, jakie proces ten pełni w komórce, może znaleźć zastosowanie w terapii wielu chorób. Odszyfrowanie, w jaki sposób „kod ubikwityny" jest pisany przez enzymy E2 i E3 oraz interpretowany przez maszynerię komórkową, jest zatem głównym pytaniem w tej dziedzinie.

PODZIĘKOWANIA

Artykuł sfinansowano z grantu Narodowego Centrum Nauki (NCN, Polska) nr 2016/21/D/NZ1/00285. Ewa Błaszczak otrzymała stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej oraz wsparcie rządu francuskiego i Ambasady Francji w Polsce. Natalia Łazarewicz otrzymała stypendium rządu francuskiego (BGF) na realizację pracy doktorskiej w systemie *co-tutelle* (Szkoła Doktorska *l'École doctorale Biologie-santé (BS)* w Rennes i Szkoła Doktorska UWr, Kolegium Doktorskie Nauk Biologicznych) oraz stypendium mobilnościowe finansowane przez *Région Bretagne i Ecole des Docteurs* (Francja).

LITERATURA

[1] Dikic I. Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annu Rev Biochem*. 2017; **86**: 193-224.

[2] Abbas T, Dutta A. Regulation of mammalian DNA replication via the ubiquitin-proteasome system. *Adv Exp Med Biol*. 2017; **1042**: 421-454.

[3] Tripathi V, Agarwal H, Priya S i wsp. MRN complex-dependent recruitment of ubiquitylated BLM helicase to DSBs negatively regulates DNA repair pathways. *Nature Commun*. 2018; **9**(1): 1016.

[4] Borsos BN, Majoros H, Pankotai T. Ubiquitylation-mediated fine-tuning of DNA double-strand break repair. *Cancers.* 2020; **12**(6): 1617.

[5] Dang F, Nie L, Wei W. Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2021; **28**(2): 427-438.

[6] Zhao M, Song K, Hao W i wsp. Non-proteolytic ubiquitination of OTULIN regulates NF-κB signaling pathway. *J Mol Cell Biol*. 2020; **12**(3): 163-175.

[7] Li Y, Dammer EB, Gao Y i wsp. Proteomics links ubiquitin chain topology change to transcription factor activation. *Mol Cell*. 2019; **76**(1): 126-137.
[8] Foot N, Henshall T, Kumar S. Ubiquitination and the regulation of membrane proteins. *Physiol Rev*. 2017; **97**(1): 253-281.
[9] Petroski MD. The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem*. 2008; **9**: S7.
[10] Rape M. Ubiquitylation at the crossroads of development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; **19**(1): 59-70.
[11] Densham RM, Morris JR. The BRCA1 ubiquitin ligase function sets a new trend for remodelling in DNA repair. *Nucleus*. 2017; **8**(2): 116-125.
[12] Alcón P, Shakeel S, Chen ZA, Rappsilber J, Patel KJ, Passmore LA. FANCD2-FANCI is a clamp stabilized on DNA by monoubiquitination of FANCD2 during DNA repair. *Nature Struct & Mol Biol*. 2020; **27**(3): 240-248.
[13] Sassone J, Serratto G, Valtorta F, Silani V, Passafaro M, Ciammola A. The synaptic function of parkin. *Brain*. 2017; **140**(9): 2265-2272.
[14] Goldstein G. Isolation of bovine thymin: a polypeptide hormone of the thymus. *Nature*. 1974; **247**(5435): 11-14.
[15] Schlesinger DH, Goldstein G, Niall HD. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry*. 1975; **14**(10): 2214-2218.
[16] Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; **74**(1): 54-58.
[17] Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*. 1980; **255**(16): 7529-7532.
[18] Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, Hershko A. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem*. 1980; **255**(16): 7525-7528.
[19] Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 1987; **194**(3): 531-544.
[20] Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol*. 2001; **11**(7): 294-297.
[21] Kaiser SE, Riley BE, Shaler TA i wsp. Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat Methods*. 2011; **8**(8): 691-696.
[22] Lund PK, Moats-Staats BM, Simmons JG i wsp. Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding human ubiquitin reveals that ubiquitin is synthesized as a precursor. *J Biol Chem*. 1985; **260**(12): 7609-7613.
[23] Finley D, Bartel B, Varshavsky A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*. 1989; **338**(6214): 394-401.
[24] Redman KL, Rechsteiner M. Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature*. 1989; **338**(6214): 438-440.
[25] Ozkaynak E, Finley D, Solomon MJ, Varshavsky A. The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J*. 1987; **6**(5): 1429-1439.
[26] Pelzer C, Kassner I, Matentzoglu K i wsp. UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J Biol Chem*. 2007; **282**(32): 23010-23014.
[27] French ME, Koehler CF, Hunter T. Emerging functions of branched ubiquitin chains. *Cell Discov*. 2021; **7**(1):6.
[28] Wenzel DM, Klevit RE. Following Ariadne's thread: a new perspective on RBR ubiquitin ligases. *BMC Biol*. 2012; **10**: 24.
[29] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2004; **1695**(1-3): 55-72.
[30] Suresh HG, Pascoe N, Andrews B. The structure and function of deubiquitinases: lessons from budding yeast. *Open Biol*. 2020; **10**(10): 200279.

[31] Wang X, Herr RA, Chua W-J, Lybarger L, Wiertz EJHJ, Hansen TH. Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol*. 2007; **177**(4): 613-624.
[32] Wang X, Herr RA, Rabelink M, Hoeben RC, Wiertz EJHJ, Hansen TH. Ube2j2 ubiquitinates hydroxylated amino acids on ER-associated degradation substrates. *J Cell Biol*. 2009; **187**(5): 655-668.
[33] Williams C, van den Berg M, Sprenger RR, Distel B. A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *J Biol Chem*. 2007; **282**(31): 22534-22543.
[34] McClellan AJ, Laugesen SH, Ellgaard L. Cellular functions and molecular mechanisms of non-lysine ubiquitination. *Open Biol*. 2019; **9**(9): 190147.
[35] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*. 2012; **81**: 203-229.
[36] Yau R, Rape M. The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat Cell Biol*. 2016; **18**(6): 579-586.
[37] Geiler-Samerotte KA, Dion MF, Budnik BA, Wang SM, Hartl DL, Drummond DA. Misfolded proteins impose a dosage-dependent fitness cost and trigger a cytosolic unfolded protein response in yeast. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; **108**(2): 680-685.
[38] Lázaro DF, Bellucci A, Brundin P, Outeiro TF. Editorial: Protein misfolding and spreading pathology in neurodegenerative diseases. *Front Mol Neurosci*. 2020; **12**: 312.
[39] Lemberg MK, Strisovsky K. Maintenance of organellar protein homeostasis by ER-associated degradation and related mechanisms. *Mol Cell*. 2021; **81**(12): 2507-2519.
[40] Guerriero CJ, Brodsky JL. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol Rev*. 2012; **92**(2): 537-576.
[41] Heck JW, Cheung SK, Hampton RY. Cytoplasmic protein quality control degradation mediated by parallel actions of the E3 ubiquitin ligases Ubr1 and San1. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; **107**(3): 1106-1111.
[42] Fang NN, Ng AHM, Measday V, Mayor T. Hul5 HECT ubiquitin ligase plays a major role in the ubiquitylation and turnover of cytosolic misfolded proteins. *Nat Cell Biol*. 2011; **13**(11): 1344-1352.
[43] Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling DE. Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. *Cell*. 2005; **120**(6): 803-815.
[44] Sandoval D, Fredrickson EK, Gardner RG. The San1 ubiquitin ligase functions preferentially with ubiquitin-conjugating enzyme Ubc1 during protein quality control. *J Biol Chem*. 2016; **291**(36): 18778-18790.
[45] Khmelinskii A, Blaszczak E, Pantazopoulou M i wsp. Protein quality control at the inner nuclear membrane. *Nature*. 2014; **516**(7531): 410-413.
[46] Foresti O, Rodriguez-Vaello V, Funaya C, Carvalho P. Quality control of inner nuclear membrane proteins by the Asi complex. *Science*. 2014; **346**(6210): 751-755.
[47] Blaszczak E, Lazarewicz N, Sudevan A, Wysocki R, Rabut G. Protein-fragment complementation assays for large-scale analysis of protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans*. 2021; **49**(3): 1337-1348.
[48] Omnus DJ, Ljungdahl PO. Latency of transcription factor Stp1 depends on a modular regulatory motif that functions as cytoplasmic retention determinant and nuclear degron. *Mol Biol Cell*. 2014; **25**(23): 3823-3833.
[49] Jang S-M, Redon CE, Thakur BL, Bahta MK, Aladjem MI. Regulation of cell cycle drivers by Cullin-RING ubiquitin ligases. *Exp Mol Med*. 2020; **52**(10): 1637-1651.
[50] Bassermann F, Eichner R, Pagano M. The ubiquitin proteasome system—implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014; **1843**(1): 150-162.
[51] Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science*. 2001; **293**(5535): 1651-1653.
[52] Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM. Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J*. 2007; **26**(4): 923-934.

[53] Dittmar G, Selbach M. Deciphering the ubiquitin code. *Mol Cell*. 2017; **65**(5): 779-780.
[54] Stolz A, Dikic I. Heterotypic ubiquitin chains: seeing is believing. *Trends Cell Biol*. 2018; **28**(1): 1-3.
[55] Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*. 2000; **19**(1): 94-102.
[56] Braten O, Livneh I, Ziv T i wsp. Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci*. 2016; **113**(32): 4639-4647.
[57] Kravtsova-Ivantsiv Y, Cohen S, Ciechanover A. Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-κB precursor. *Mol Cell*. 2009; **33**(4): 496-504.
[58] Boutet SC, Biressi S, Iori K, Natu V, Rando TA. Taf1 regulates Pax3 protein by monoubiquitination in skeletal muscle progenitors. *Mol Cell*. 2010; **40**(5): 749-761.
[59] Robzyk K, Recht J, Osley MA. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*. 2000; **287**(5452): 501-504.
[60] Nakagawa T, Nakayama K. Protein monoubiquitylation: targets and diverse functions. *Genes Cells*. 2015; **20**(7): 543-562.
[61] Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; **2**(3): 195-201.
[62] Peng J, Schwartz D, Elias JE i wsp. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*. 2003; **21**(8): 921-926.
[63] Dammer EB, Na CH, Xu P i wsp. Polyubiquitin linkage profiles in three models of proteolytic stress suggest the etiology of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2011; **286**(12): 10457-10465.
[64] Haakonsen DL, Rape M. Branching out: improved signaling by heterotypic ubiquitin chains. *Trends Cell Biol*. 2019; **29**(9): 704-716.
[65] Yau RG, Doerner K, Castellanos ER i wsp. Assembly and function of heterotypic ubiquitin chains in cell cycle and protein quality control. *Cell*. 2017; **171**(4): 918-933.
[66] Ye Y, Blaser G, Horrocks MH i wsp. Ubiquitin chain conformation regulates recognition and activity of interacting proteins. *Nature*. 2012; **492**(7428): 266-270.
[67] Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K. The K48-K63 branched ubiquitin chain regulates NF-κB signaling. *Mol Cell*. 2016; **64**(2): 251-266.
[68] Ohtake F, Tsuchiya H, Saeki Y, Tanaka K. K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci*. 2018; **115**(7): 1401-1408.
[69] Steiner A, Harapas CR, Masters SL, Davidson S. An update on autoinflammatory diseases: relopathies. *Curr Rheumatol Rep.* 2018; **20**(7): 39.
[70] Cornwell MJ, Thomson GJ, Coates J i wsp. Small-molecule inhibition of UBE2T/FANCL-mediated ubiquitylation in the Fanconi anemia pathway. *ACS Chem Biol.* 2019; **14**(10): 2148-2154.
[71] Kühnle S, Martínez-Noël G, Leclere F, Hayes SD, Harper JW, Howley PM. Angelman syndrome-associated point mutations in the Zn2+-binding N-terminal (AZUL) domain of UBE3A ubiquitin ligase inhibit binding to the proteasome. *J Biol Chem.* 2018; **293**(47): 18387-18399.
[72] Kelliher J, Ghosal G, Leung JWC. New answers to the old RIDDLE: RNF168 and the DNA damage response pathway. *FEBS J.* 2021; **15857**: 1-14.
[73] Jost PJ, Vucic D. Regulation of Cell Death and Immunity by XIAP. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020; **12**(8): 36426.
[74] Barrera M-J, Aguilera S, Castro I i wsp. Pro-inflammatory cytokines enhance ERAD and ATF6α pathway activity in salivary glands of Sjögren's syndrome patients. *J Autoimmun.* 2016; **75**: 68-81.
[75] Kunishita Y, Yoshimi R, Kamiyama R i wsp. TRIM21 dysfunction enhances aberrant B-cell differentiation in autoimmune athogenesis. *Front Immunol.* 2020; **11**: 98.
[76] Zhang S, Hu Z-W, Mao C-Y, Shi C-H, Xu Y-M. CHIP as a therapeutic target for neurological diseases. *Cell Death Dis.* 2020; **11**(9): 1-12.
[77] Wezyk M, Zekanowski C. Role of BRCA1 in neuronal death in Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci.* 2018; **9**(5): 870-872.

[78] Torii S, Kasai S, Yoshida T, Yasumoto K-I, Shimizu S. Mitochondrial E3 ubiquitin ligase parkin: relationships with other causal proteins in familial Parkinson's disease and its substrate-involved mouse experimental models. *Int J Mol Sci.* 2020; **21**(4): 1202.
[79] Quinn PMJ, Moreira PI, Ambrósio AF, Alves CH. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta Neuropathol Commun.* 2020; **8**(1): 189.
[80] Sethi G, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP. Role of RNF20 in cancer development and progression – a comprehensive review. *Biosci Rep.* 2018; **38**(4): 1287.
[81] Senft D, Qi J, Ronai ZA. Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2018; **18**(2): 69-88.
[82] Zhang R, Liu W, Sun J, Kong Y, Chen C. Roles of RNF126 and BCA2 E3 ubiquitin ligases in DNA damage repair signaling and targeted cancer therapy. *Pharmacol Res.* 2020; **155**: 104748.
[83] Paul PJ, Raghu D, Chan A-L i wsp. Restoration of tumor suppression in prostate cancer by targeting the E3 ligase E6AP. *Oncogene.* 2016; **35**(48): 6235-6245.
[84] Takayama K-I, Suzuki T, Tanaka T i wsp. TRIM25 enhances cell growth and cell survival by modulating p53 signals via interaction with G3BP2 in prostate cancer. *Oncogene.* 2018; **37**(16): 2165-2180.
[85] Chesi M, Mirza NN, Garbitt VM i wsp. IAP antagonists induce anti-tumor immunity in multiple myeloma. *Nat Med.* 2016; **22**(12): 1411-1420.
[86] Boswell MT, Rowland-Jones SL. Delayed disease progression in HIV-2: the importance of TRIM5α and the retroviral capsid. *Clin Exp Immunol*. 2019; **196**(3): 305-317.
[87] Su K-J, Yu Y-L. Downregulation of SHIP2 by hepatitis B virus X promotes the metastasis and chemoresistance of hepatocellular carcinoma through SKP2. *Cancers.* 2019; **11**(8): 1065.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 04.10.2021
Przyjęto: 24.10.2021
Ewa Błaszczak
Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski
ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław
tel. +48 71 375 41 02, fax. +48 71 375 41 18
e-mail: ewa.blaszczak@uwr.edu.pl

EGZOSOMY JAKO JEDEN Z ELEMENTÓW MIKROŚRODOWISKA

EXOSOMES AS ONE OF THE ELEMENTS OF THE MICROENVIRONMENT

Paulina BORZDZIŁOWSKA, Ilona BEDNAREK

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie: Pośród wielu zmian jakie zachodzą wewnątrz komórek, jak i między komórkami istotną rolę odgrywa mikrośrodowisko. Zdefiniowanie tego pojęcia nie jest jednak proste, gdyż wymaga uwzględnienia wielu procesów i zmian jakie zachodzą zarówno na poziomie fizycznym, biochemicznym, jak i molekularnym. Mikrośrodowisko tworzone jest przez macierz pozakomórkową oraz komórki, głównie fibroblasty i komórki układu immunologicznego. Niemniej jednak, jego cechy i charakter są zmienne w zależności od miejsca pochodzenia. Ocena wpływu mikrośrodowiska w warunkach fizjologicznych jest ważna do poznania funkcjonowania naszego organizmu. Równie istotne jest zbadanie mechanizmów jakie zachodzą wokół komórek nowotworowych. Poznanie roli fibroblastów i komórek układu immunologicznego w rozwoju tkanki nowotworowej pomoże z czasem lepiej zrozumieć mechanizmy rozwoju nowotworu, a w konsekwencji dobranie odpowiednich terapii leczenia. Stosunkowo niedawno odkrytym i nowym elementem mikrośrodowiska są egzosomy. Odkrycie tych niewielkich cząstek o budowie pęcherzykowej stanowi istotny element w poznaniu rozwoju nowotworów. Egzosomy są odpowiedzialne za przenoszenie i dostarczanie informacji biologicznej do komórek. Tę funkcję zawdzięczają między innymi znajdującym się w ich wnętrzu elementom takim jak DNA, RNA, czy białka niosące informację genetyczną. Z egzosomami wiąże się obecnie wiele nadziei w kwestii wykorzystania ich w terapii przeciwnowotworowej. Dokładne poznanie całego mechanizmu ich powstawania oraz przenoszenia informacji genetycznej jest niezbędne do zrozumienia ich działania i oddziaływania na inne komórki, co istotne może stać się podstawą do opracowania nowych strategii prognozowania, diagnozowania i leczenia wielu schorzeń.

Słowa kluczowe: egzosomy, mikrośrodowisko

Summary: Microenvironment plays an important role among the multiple changes inside and between cells. Defining this word is not easy. It requires any processes and changes going on the physical, biochemical and molecular levels. Microenvironment is created by the extracellular matrix and cells, mainly fibroblasts and immune system cells. Nevertheless, its characteristics is chan-

geable and depends on the place of origin. Investigating the influence of the microenvironment under physiological conditions is necessary to understand the functioning of our body. It is important to understand the mechanisms that take place around cancer cells, too. Knowledge of the role of fibroblasts and immune system cells in the development of neoplastic tissue will help to better understand the mechanisms of cancer development and, consequently, the selection of appropriate therapies. Exosomes were discovered as a new element of the microenvironment. The discovery of these small, vesicular particles is an important element of understanding the development of cancer. Exosomes are responsible for carrying and delivering biological information to cells. The inside elements, such as DNA, RNA or proteins carrying genetic information, fulfill this function. There are now high hopes considering exosomes in terms of their usage in cancer therapy. Understand the mechanism of exomes formation and transmission of genetic information is necessary to understand the exome's operation and impact on other cells, importantly, it can become the basis for the development of new strategies for prognosis, diagnosis and treatment of many diseases.

Keywords: exosomes, microenvironment

CHARAKTERYSTYKA MIKROŚRODOWISKA KOMÓREK

Z uwagi na organizację budowy organella tworzą komórki, komórki tkanki. Różne tkanki budują narządy, a narządy cały organizm. Ten z pozoru podstawowy i prosty model jest w rzeczywistości bardziej skomplikowany. Na każdym etapie organizacji jest wiele elementów warunkujących zmienność organizmów. Zachodzące zmiany w pojedynczej komórce mogą zależeć od czynników fizycznych (jak temperatura, ciśnienie, wilgotność), chemicznych (hormony, enzymy, leki), czy mechanicznych (przyłączenie przeciwciała, aktywacja komórek układu immunologicznego, obecność bakterii). Jednym z wielu aspektów mającym wpływ na komórki, a będącym w ostatnich czasach przedmiotem dużego zainteresowania, jest mikrośrodowisko komórek. To proste pojęcie wbrew pozorom nie jest takie łatwe do zdefiniowania. Mikrośrodowisko komórek jest tworzone przez czynniki, które bezpośrednio wpływają na warunki wokół komórek zmieniając ich cechy poprzez fizyczne, biochemiczne, molekularne lub inne drogi.

Dla pojedynczej komórki pojęcie mikrośrodowiska obejmuje:

- macierz pozakomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM);
- komórki tego samego lub innego rodzaju otaczające daną komórkę;
- hormony, cytokiny oraz inne bioaktywne cząsteczki uwalniane na drodze autokrynnej, endokrynnej lub parakrynnej;
- zmiany w nanostrukturach ECM oraz
- mechaniczne zmiany powodowane przez ruch organizmu lub płynów ustrojowych [4].

Wszystkie te czynniki mają ogromny wpływ na pojedynczą komórkę i to one w dużym stopniu promują lub hamują jej wzrost i rozwój. W najprostszy sposób można stwierdzić, iż mikrośrodowisko tworzą komórki zrębu, do których zalicza się

fibroblasty, komórki glejowe, epitelialne i tłuszczowe, komórki odpornościowe oraz komórki mięśni gładkich. Pomiędzy nimi natomiast rozciąga się macierz zewnątrzkomórkowa, która stanowi drugi niezbędny element każdego mikrośrodowiska [20].

Sama macierz pozakomórkowa jest strukturą dynamiczną i bardzo złożoną. ECM tworzą glikoproteiny oraz białka kolagenowe, jak i niekolagenowe. Wśród występujących w ECM białek znajdują się m.in. elastyna, fibronektyna, fibulina, fibrylina, laminina, czy trombospondyna [15]. Podstawowe właściwości fizyczne jak sztywność, porowatość, czy brak rozpuszczalności wpływają na funkcjonowanie ECM i są powiązane z adhezją komórek, ich podziałem, czy migracją. Z kolei cechy biochemiczne ECM warunkują między innymi przekaźnictwo sygnału między komórkami.

Spośród komórek zrębu, o najważniejszej roli w mikrośrodowisku, wyróżnić można fibroblasty oraz komórki układu immunologicznego. W prawidłowych tkankach fibroblasty oddziałują ze zrębem tkanki, produkcją niekomórkowe elementy ECM, biorą udział w tworzeniu błon podstawnych oraz podtrzymują równowagę między tkanką, a ECM. W procesie gojenia rola fibroblastów staje się wyjątkowo istotna. Niejako nadzorują cały proces naprawy tkanek. Pod wpływem transformującego czynnika wzrostu beta (ang. *transforming growth factor β*, TGF-β) prawidłowe fibroblasty stają się miofibroblastami odpowiedzialnymi za kurczenie się rany. Ich aktywacja prowadzi do wzmożenia procesu proliferacji oraz zmian właściwości wydzielniczych i fenotypowych. Promują migrację komórek do uszkodzonych miejsc poprzez syntezę α-aktyny mięśni gładkich (ang. *alpha-smooth muscle actin*, α-SMA). Pośrednia rola fibroblastów w procesie naprawy polega również na pobudzeniu białek ECM do produkcji czynników wzrostu, czynników chemotaktycznych oraz napływu komórek zapalnych, co prowadzi do aktywacji wzrostu i proliferacji komórek [20].

Mikrośrodowisko komórek tworzone przez ECM czasami nazywane jest niszą komórkową. Jest to dynamiczne, wyspecjalizowane mikrośrodowisko, które zapewnia odpowiednie warunki do rozwoju komórek. Zadaniem niszy jest utrzymanie stałej równowagi między komórkami proliferującymi, a różnicującymi się. Odpowiednie warunki w niszy chronią lub sprzyjają różnym transformacjom komórkowym [9].

Specyficzną niszę komórkową stanowi mikrośrodowisko wokół komórek nowotworowych. Fibroblasty pochodzące z nowotworów (ang. *cancer-associated fibroblast*, CAFs), o cechach zbliżonych do miofibroblastów są jednym z ważniejszych elementów wokół komórek nowotworowych. Cechy CAF są zbliżone do aktywnych fibroblastów, z tą różnicą, iż w tkance nowotworowej fibroblasty te pozostają stale aktywne. Aktywność ta polega na stałym pobudzeniu metabolizmu komórki, w tym produkcji kolagenu i elastyny oraz wydzielaniu enzymów, a cechą charakterystyczną jest obecność retikulum endoplazmatyznego. [20]. Sam proces aktywacji może nastąpić pod wpływem różnych bodźców, tj. czynni-

ki wzrostu, bezpośredni kontakt komórka-komórka, czy stres oksydacyjny. Ciągły wzbudzony stan fibroblastów w tkance nowotworowej sprzyja dodatkowej proliferacji i wzrostowi komórek nowotworowych. Ponadto, stan aktywacji wpływa na inne ścieżki molekularne, które przyczyniają się do wzrostu nowotworu [36]. CAF, które stanowią najważniejszy element mikrośrodowiska zmiany nowotworowej charakteryzuje się na podstawie trzech cech. Po pierwsze poziom ekspresji markerów fibroblastów: wimentyny, białka 1 specyficznego dla fibroblastów (ang. f*ibroblast-specific protein 1*, FSP1) i białka aktywującego fibroblasty (ang. *fibroblast activation protein*, FAP). Po drugie poziom ekspresji markera aktywacyjnego α-SMA i innych inwazyjnych markerów, w tym Ti1, trombospondynę-1 (ang. *thrombospondin 1*, Tsp-1), receptor czynnika wzrostu pochodzącego z płytek (ang. *platelet-derived growth factor receptors*, PDGFR α/β), tenascynę-C i metaloproteinazy macierzy 3 (ang. *matrix metalloproteinase-3*, MMP-3). Po trzecie na podstawie zwiększonej ekspresji cytokin i czynników wzrostu, w tym czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), TGF-β, czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*, HGF), naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor,* EGF) i czynnika wzrostu fibroblastów-2 (ang. *fibroblast growth factor*, FGF-2) [34].

Komórki układu immunologicznego w mikrośrodowisku nowotworów odgrywają podwójną rolę. Te same komórki z jednej strony mogą wzmagać proliferację nowotworów, z drugiej hamować jego rozwój. Układ immunologiczny wpływa na mikrośrodowisko poprzez wzrost ekspresji antygenów nowotworowych na powierzchni komórek, czy poprzez wzrost ekspresji nieprawidłowych białek. Jednocześnie wiele komórek, w tym CAF, wytworzyły mechanizmy, które chronią je przed atakiem limfocytów T pomocniczych oraz komórek NK. Rola każdej komórki immunologicznej w rozwoju nowotworu jest inna [38].

Makrofagi, których rola w pierwotnej odpowiedzi immunologicznej jest nieoceniona, dodatkowo zdolne są do wykazywania cech przeciwnowotworowych w ramach cyrkulacji w krwioobiegu. Niestety, w odpowiedzi na hipoksję, zapalenie i inne niesprzyjające czynniki działające w mikrośrodowisku, makrofagi przejmują rolę komórek promujących fenotyp nowotworowy (makrofagi towarzyszące nowotworom, ang. *tumor-associated macrophage*, TAM). Ich rola wiąże się z aktywacją ścieżek waskularyzacji, inwazyjności, wzrostu i przeżycia komórek nowotworowych [29].

Zmiana warunków mikrośrodowiska powoduje, iż wyjściowa pula neutrofili prawidłowych zdolna jest do przekształcenia w pulę pro lub anty-nowotworową. Neutrofile stanowią 50-70% wszystkich leukocytów i odgrywają kluczową rolę w układzie immunologicznym. Odpowiadają za obronę w infekcjach oraz zapaleniach. Jednak zmiana warunków środowiskowych powoduje, że neutrofile przechodzą w tzw. pulę neutrofili towarzyszących nowotworom (ang. *tumor-associated neutrophils*, TAN) [29]. TAN stymulują m.in. angiogenezę poprzez uwalnianie VEGF, HGF, MMP2, czy IL-8 (interleukina-8) [20]. Neutrofile towarzyszące

nowotworom charakteryzuje ekspresja cytokin aktywujących i pobudzających układ odpornościowy oraz produkcję TNF-α (ang. *tumor necrosis factor*), który z kolei pobudza pronowotworowy fenotyp komórki przez aktywację czynników angiogenezy, karcynogenezy oraz układu immunologicznego [29].

Niezmiernie ważną grupę komórek układu immunologicznego stanowią limfocyty T, a wśród nich komórki CD4+ i CD8+. Ich rola w nowotworach jest istotna, biorą udział w indukcji odpowiedzi cytotoksycznej, a także w hamowaniu i zabijaniu komórek nowotworowych. Uczestniczą w obwodowej tolerancji immunologicznej hamując aktywność limfocytów T cytotoksycznych. Jednak nie wszystkie limfocyty T pełnią rolę antynowotworową, ich rola pronowotworowa polega m.in. na aktywacji wydzielania IL-17, która promuje angiogenezę oraz progresję nowotworu. Subpopulacja komórek T, CD4+ CD25+ Foxp3+, tzw. Treg odgrywają rolę w promowaniu wzrostu tkanki nowotworowej oraz hamują odpowiedź immunologiczną przeciw komórkom nowotworowym [38].

Trzecim najważniejszym elementem zrębu mikrośrodowiska komórek, poza fibroblastami i komórkami układu immunologicznego, są komórki naczyń i ich udział w procesie angiogenezy. Układ krążenia jest niezmiernie istotny dla funkcjonowania całego organizmu. Proces powstawania pierwszych naczyń z komórek progenitorowych nosi nazwę waskularyzacji. Dalsze tworzenie nowych kapilar, z już istniejących naczyń, w postaci naczyń krwionośnych nazywane jest procesem angiogenezy. W najprostszym modelu proces angiogenezy można podzielić na dwa etapy. Pierwszy to tworzenie rurki, w której komórki śródbłonka reagują na napływ czynników angiogennych i pobudzane są do proliferacji oraz migracji w miejsca o wzmożonym przepływie krwi. Etap drugi obejmuje dojrzewanie naczyń. Proces, w którym perycyty są pobudzane do proliferacji śródbłonka i stabilizują nowo powstałą strukturę naczynia włosowatego. Fizjologicznie angiogeneza odgrywa kluczową rolę w regulacji żeńskiego układu rozrodczego oraz podczas gojenia się ran. Jest procesem zależnym od czynników pro- i antyangiogennych oraz ich wzajemnej równowagi w organizmie [3]. Niestety angiogeneza zachodzi również w procesach patologicznych. Jednym z istotniejszych elementów pobudzających jest niedobór tlenu. Komórki zmiany nowotworowej nie mogą swobodnie rosnąć bez dostępu substancji odżywczych i tlenu. Muszą znajdować się w bliskim sąsiedztwie naczyń krwionośnych. Stąd, gdy średnica nowotworu przekracza kilka milimetrów, komórki nowotworowe aktywują poszczególne elementy do rozpoczęcia procesu angiogenezy. Cały proces rozpoczyna się od oddzielenia komórek śródbłonka (ang. *normal epithelial cells*, NEC) od perycytów, komórek błony podstawnej stabilizujących naczynie krwionośne. Następnie dochodzi do zmian w obrębie ECM oraz migracji i inwazji komórek przez błonę. Wszystkie te zmiany w końcowym efekcie prowadzą do powstania nowych rurek kapilarnych pomiędzy nowotworowymi komórkami tkanki [24]. Nie jest to jedyny mechanizm powstawania nowych naczyń w chorobach nowo-

tworowych, jednak niewątpliwie odgrywa znaczącą rolę. Pierwszoplanowym elementem powstawania naczyń jest równowaga między endogennymi aktywatorami i inhibitorami angiogenezy. W chorobach nowotworowych same komórki, ale także elementy mikrośrodowiska odgrywają istotną rolę. Poprzez wydzielanie endogennych cząsteczek wpływających na równowagę angiogenną stymulują cały proces powstawania nowych naczyń krwionośnych [24].

Do najważniejszych stymulatorów procesu angiogenezy zalicza się stany niedotlenienia, w których aktywny udział bierze czynnik indukowany niedotlenieniem (ang. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*, HIF-1α), bezpośrednio odpowiedzialny za regulację ekspresji białek zaangażowanych w angiogenezę. Do białek o charakterze proangiogennym zalicza się także czynniki wzrost, tj.: VEGF, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*, bFGF), czynnik wzrostu pochodzący z płytek (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF), a także białka tj.: interleukina-8, łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *placental growth factor*, PIGF) i TGF-β [24].

Cechą charakterystyczną powstających naczyń nowotworowych jest ich chaotyczne rozgałęzienie i brak zorganizowanej struktury. Ściana naczyń nowotworowych często jest cienka i bardzo krucha, co sprawia, że nie jest do końca szczelna [14]. Znaczącą rolę odgrywają nowotworowe komórki śródbłonka (ang. *tumor endothelial cells*, TEC), które nie tylko stymulują wydzielanie i ekspresję cząsteczek proangiogennych, ale również pobudzają komórki nowotworowe do przerzutowania [22]. TEC wykazują pewną zmienność w zależności od pochodzenia. Wykazano, iż różnią się od NEC stopniem odpowiedzi m.in. na EGF, adrenomodulinę oraz VEGF, czyli cząsteczki o charakterze proangiogennym. Zauważono, iż wydzielany autokrynnie VEGF przez TEC dodatkowo zwiększa przeżycie TEC i stymuluje ich migracje. Drugą ważną cechą nowotworowych komórek endotelialnych jest ich oporność na leki [14, 22].

Niestabilność komórek TEC jest jednym z ważniejszych elementów, który prowadzi do pobudzenia całego procesu angiogenezy. Przyczyny nieprawidłowości komórek TEC nie są do końca znane. Naukowcy opisali jednak kilka prawdopodobnych mechanizmów ich powstawania [13]. Jednym z nich jest niestabilność genetyczna, która powstaje w odpowiedzi na zmiany w mikrośrodowisku nowotworu. W komórkach nowotworowych ligandy dla VEGF, bFGF, czy receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) ulegają ekspresji, co prowadzi do aktywacji ekspresji onkogenów i w konsekwencji do niestabilności genetycznej komórek TEC. Pobudzane są w podobny sposób proangiogenne chemokiny CXCL1 i CXCL8, poprzez wzrost ekspresji *BCL-2*. Już sam stan niedotlenienia pobudza procesy proangiogenne i aktywację komórek TEC. Innym mechanizmem powstawania komórek TEC jest odróżnicowywanie lub transróżnicowanie komórek nowotworowych lub macierzystych komórek

nowotworowych. Złośliwe komórki nowotworowe potrafią również ulegać fuzji z prawidłowymi progenitorowymi komórkami śródbłonka (ang. *vascular progenitor cells*, VPC). Zmiany w prawidłowych komórkach endotelialnych mogą zachodzić w wyniku pobierania onkogenów lub transferu genów. Proces ten zachodzi w wyniku fagocytozy ciałek apoptotycznych lub mikropęcherzyków pochodzących od zmiany nowotworowej przez komórki NEC. W tworzeniu komórek TEC obserwuje się ponad to zjawisko zwane mimikrą naczyniową nowotworu, polegające na aktywacji markerów śródbłonka przez komórki nowotworowe. Prowadzi to do powstania innego rodzaju kanału naczyniowego [13].

Proces angiogenezy oraz zmiany jakie zachodzą w mikrośrodowisku komórek nowotworowych prowadzące do powstawania nowych naczyń krwionośnych są niezmiernie ważnym elementem przyczyniającym się do powstawania przerzutów nowotworowych [24].

Bardzo dokładne poznanie mikrośrodowiska jest jednym z kluczowych elementów, aby poznać mechanizmy rozwoju nowotworów. Obecnie mamy coraz więcej możliwości, aby dokładnie scharakteryzować każdą niszę komórkową i dokładnie poznać jej mechanizmy działania. Dużo mówi się i prowadzi wiele analiz na temat wpływu mikrośrodowiska na komórki i ich interakcje między sobą. W ostatnich latach intensywnie prowadzi się badania nad egzosomami, które są niewielkimi pęcherzykowymi strukturami, będącymi ważnym elementem mikrośrodowiska. Ich rola, choć w dużej mierze nie jest jeszcze do końca poznana, jest ogromna w przenoszeniu sygnałów międzykomórkowych.

HISTORIA ODKRYCIA EGZOSOMÓW

Analiza i chęć poznania cząsteczek wydzielanych przez komórki doprowadziła do poznania egzosomów, niewielkich cząsteczek o średnicy do 150 nm. Historia odkrycia tych wyjątkowych cząsteczek sięga roku ok. 1917, a potem 1974, kiedy to Christian de Duve został uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii za odkrycia dotyczące strukturalnej i funkcjonalnej organizacji komórek, a dokładnie za odkrycie i opisanie cząsteczki liposomu.

Kolejnym ważnym wydarzeniem w historii prowadzącym do odkrycia egzosomu były publikacje, które ukazały się w 1983 roku. Opisywały one proces dojrzewania retikulocytów i utratę receptora transferryny na powierzchni komórki w tym procesie [11, 25, 26].

Te dwa, z pozoru nie związane ze sobą odkrycia, przyczyniły się do rozwoju dalszych badań nad mikrocząsteczkami. Naukowcy postawili sobie pytanie. Skoro podczas procesu dojrzewania retikulocyty tracą receptor transferryny, to czy może w ten proces są zaangażowane lizosomy?

Dwie niezależne grupy naukowców wykazały, że niewielkie pęcherzyki są formowane poprzez wpuklenie wewnętrznej błony do światła endosomów. Powstające struktury nazywane zostały ciałkami wielopęcherzykowymi (ang. *multivesicular body*, MVB) [19]. Po raz pierwszy terminu „egzosom" użył i zaproponował Rose M. Johnstone w 1987 roku. Definiując egzosom jako pęcherzykową cząsteczkę wydzielaną przez ciałko wielopęcherzykowe MVB [18].

W dalszych latach powstało szereg badań dotyczących pochodzenia i budowy egzosomów. W pierwszej kolejności naukowcy skupili się na antygenowej charakterystyce egzosomów i określeniu ich pochodzenia. W drugim rzucie na poznaniu ich szczegółowej budowy, w tym ładunku genetycznego jaki ze sobą niosą. Ponadto poszukuje się i bada funkcje jakie egzosomy pełnią w organizmie.

Wiele pytań o egzosomy pozostaje wciąż bez odpowiedzi, zaś prowadzone liczne badania dają szanse na znalezienie nowych informacji.

DEFINICJA EGZOSOMU

Różne komórki wydzielają różne cząsteczki do mikrośrodowiska, aby dokładnie zdefiniować egzosomy konieczne było ustalenie konkretnych kryteriów. Początkowo definicja odnosiła się do cząsteczek wydzielanych z MVB, i tak definiował egzosomy Johnstone i wsp. obserwując egzosomy wydzielane podczas formowania erytrocytów [18]. Nieco inną definicję przyjęli Cocucci i wsp., którzy opisali proces tzw. rozsiewania mikropęcherzyków (ang. *shedding microvesicles*). Opisali oni proces bezpośredniego wydzielania zawartości cytoplazmatycznej, w tym mikropęcherzyków, z błony komórkowej. W drodze do sformułowania dokładnej definicji egzosomu istotną rolę odegrały również badania nad podobieństwami między mikropęcherzykami, a lizosomami. Naukowcy, Simonsa i wsp. zwrócili uwagę na istotną rolę ceramidu sfingolipidowego w powstawaniu struktur pęcherzykowych i ich rozróżnieniu [7].

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*, EVs), to cząsteczki związane z lipidami, wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Trzy najważniejsze podtypy EV to mikropęcherzyki (ang. *Microvesicles*, MVs) , ciałka apoptotyczne (ang. *apoptotic bodies*) oraz egzosomy (ang. *exosomes*). Wszystkie rodzaje EV różnią się między sobą biogenezą, drogą uwalniania, wielkością oraz ładunkiem biologicznym i funkcją [8]. W **tabeli 1**, na podstawie zestawienia Zhang i wsp. wyszczególniono najważniejsze różnice między różnymi ciałami pęcherzykowymi [39].

Średnica egzosomu jest zależna w dużej mierze od jego pochodzenia. Minimalny rozmiar zależy od dwuwarstwy lipidowej, której grubość ocenia się na około 5nm. Błona zapewnia egzosomom sztywność, stąd najmniejszy możliwy pęcherzyk musi mieć co najmniej 30nm. Policzono, iż całkowity ładunek egzosomów prawdopodobnie nie może być większy niż 100 białek oraz 10 000 nukleotydów kwasu nukleinowego [35].

TABELA 1. Zestawienie różnic między ciałami pęcherzykowymi [36]
TABLE 1. List of differences between follicular bodies [36]

	Egzosomy	**Ektosomy**	**Ciałka apoptotyczne**
Pochodzenie	MVB	Błona komórkowa	
Rozmiar	30-150nm	100-1000 nm	50-5000 nm
Kształt	różny	różny	różny
Sedymentacja	~100,000 g	~10,000 g	~1200 g lub ~2000g
Najważniejsze białka	PDCD6IP, TSG101, CD9, CD63, CD81	MMP2, CK18	histony
Najważniejsze lipidy	cholesterol, ceramidy	cholesterol, fosfatydyloseryna	fosfatydyloseryna
Najważniejsze kwasy nukleinowe	Długie niekodujące RNA, mRNA, miRNA, DNA	mRNA, miRNA, DNA	mRNA, miRNA, DNA

Do pełnej definicji egzosomu nie wystarczy wziąć pod uwagę jedynie jego rozmiaru. Ważnym elementem jest również unikatowy skład białek i lipidów, niezbędny do identyfikacji. Pomimo różnic pomiędzy samymi egzosomami pochodzącymi z różnych źródeł ich cechą wspólną są charakterystyczne białka transportowe i fuzyjne (GTPazy, aneksyny, flotylina), tetraspaniny (CD9, CD63, CD81, CD82), białka szoku cieplnego (Hsc70, Hsp90), białka biorące udział w tworzeniu MVB (Alix (ang. ALG-2-interacting protein X), TSG101 (ang. *tumor susceptibility gene 101*), a także białka i fosfolipazy związane z lipidami. Najczęstsze markery wykorzystywane do identyfikacji egzosomów to: tetraspanniny, Alix, flotylina, TSG101 i Rab5b [35].

BUDOWA I SKŁAD EGZOSOMÓW

Jedną z ważniejszych funkcji egzosomów jest przenoszenie i dostarczanie informacji biologicznej do komórek. Tę funkcję zawdzięczają między innymi swojej pęcherzykowej strukturze, wewnątrz której znajdują się liczne elementy jak DNA, RNA, czy białka niosące informację genetyczną. Egzosomy komunikują się głównie dwoma drogami. Po pierwsze przez scalenie błony komórkowej egzosomów z komórką biorcy, co umożliwia przeniesienie informacji do komórki docelowej. Po drugie poprzez aktywację receptorów błonowych w komórce biorcy, a w dalszej kolejności aktywację szlaku wewnątrzkomórkowego. Egzosomy składają się głównie z trzech elementów lipidów, białek i kwasów nukleinowych.

LIPIDY

Skład lipidowy egzosomów jest bardzo płynny i zależny od wielu czynników. Niemniej jednak główną grupą lipidów, które znajdują się w egzosomach, są lipidy błonowe. Drugą grupę stanowią lipidy wychwytywane do cytozolu podczas tworzenia ILV (ang. *intraluminal vesicles*). W egzosomach, podobnie jak w komórkach, lipidy są rozmieszczone asymetrycznie po dwóch stronach błony komórkowej [31].

Skład lipidowy egzosomu zależy m.in. od rodzaju komórki z której pochodzi, niemniej jednak na podstawie obecnie dostępnych badań i przeprowadzonych analiz zbiorczych można stwierdzić, iż skład lipidowy egzosomów jest do siebie dość zbliżony [10]. W egzosomach znajdują się głównie fosfatydyloseryna, kwas fosfatydowy, cholesterol, sfingomielina, kwas arachidonowy i inne kwasy tłuszczowe, prostaglandyny i leukotrieny [39]. Fakt, iż błona egzosomu bogata jest w cholesterol i sfingomielinę sugeruje, iż mogą się w niej tworzyć wysoce dynamiczne domeny cholesterol-sfingolipid, na kształt domen tratwowych. Budowa błony lipidowej jest, podobnie jak w komórkach, dwuwarstwową strukturą o różnym składzie lipidowym. W zewnętrznej błonie znajdują się głównie sfingolipidy i fosfatydylocholina, natomiast pozostałe klasy lipidów lokują się głównie po wewnętrznej stronie błony [31]. Wysoka zawartość sfingolipidów i cholesterolu zapewnia egzosomom sztywność i podwyższoną odporność na zmiany fizykochemiczne. Początkowo lipidy są włączane do egzosomów losowo, dopiero w procesie formowania i dojrzewania ulegają sortowaniu [37]. Ogólnie można przyjąć, iż molowy procent fosfatydyloetanolaminy w komórkach i egzosomach jest podobny, natomiast molowy procent fosfatydylocholiny i fosfatydyloinozytolu jest niższy w egzosomach, niż komórkach z których pochodzą [30]. Na przykładzie retikulocytów w badaniach pokazano, iż skład lipidowy egzosomów uwalnianych na różnym etapie dojrzewania komórki macierzystej również może być nieznacznie odmienny [6]. Unikatowy skład dwuwarstwy lipidowej egzosomów prawdopodobnie przyczynia się do ich stabilności w różnych środowiskach pozakomórkowych. Wiedza na temat dokładnej budowy tej dwuwarstwy mogłaby być wykorzystana na przykład do poprawy liposomalnych systemów dostarczania leków [37].

Lipidy tworzące egzosomy pełnią różne funkcje, na przykład: zapalną, immunosupresyjną, wyzwalają migrację leukocytów, zwiększają produkcję egzosomów, biorą udział w sortowaniu ładunku na MVB, regulują wydzielanie egzosomów, wyzwalają napływ wapnia i wiele innych. Ponadto egzosomy w swoim wnętrzu zawierają funkcjonalne enzymy lipolityczne, które mogą wytwarzać jednostki różnych bioaktywnych lipidów [39]. Lipidy egzosomalne mogą oddziaływać z różnymi białkami przenoszącymi lipidy w cytoplazmie biorcy, tj. receptory czy białka wiążące kwasy tłuszczowe. Uwalniane egzosomy i wychwytywane przez komórki docelowe mogą uczestniczyć w modulowaniu metabolizmu lipidów komórkowych biorąc tym samym udział w patogenezie chorób jak miażdżyca tętnic. Dowiedziono, iż egzosomy wywodzące się z aktywowanych limfocytów T, które

na swojej zewnętrznej powierzchni mają cholesterol oraz fosfatydylocholinę (PC) za pośrednictwem receptora PC na monocycie ułatwią gromadzenie się cholesterolu w kroplach lipidów. Równolegle z akumulacją cholesterolu w monocytach zwiększa się produkcja prozapalnej cytokiny TNF-α, co potwierdza rolę egzosomów w rozwoju miażdżycy [21].

Osobne zagadnienie stanowią lipidy w egzosomach zewnątrzkomórkowych, izolowane z płynów biologicznych. Jak dotąd bardzo mało jest dostępnych badań na ten temat. Najlepiej opisane pod tym względem są egzosomy z nasienia oraz moczu [30].

BIAŁKA

Wiele badań pokazuje, że ładunek białkowy egzosomów jest zależny od różnego typu komórek, z których pochodzą. Czasami zdarza się również, że jeden rodzaj komórek wydziela dwa różne rodzaje egzosomów lub pod wpływem działania czynników zewnętrznych ładunek białkowy egzosomów ulega zmianie [37].

Niemniej jednak w egzosomach można wyróżnić kilka grup białek. Jedną z dużych grup stanowią białka zaangażowane w biogenezę egzosomów, są to między innymi elementy układu ESCRT (endosomalnego kompleksu sortującego), białka odpowiedzialne za tworzenie i uwalnianie ILV, w tym rodzina białek Rab. Dużą grupę białek stanowią tetraspanny, w tym główne: CD63, CD81, CD82 i CD9. Inne białka odgrywające istotną rolę to białka zaangażowane w przekazywanie sygnału, jak EGFR, oraz prezentujące antygeny, MHC I i MHC II [1]. Jeszcze inną grupę białek stanowi grupa białek szoku cieplnego Hsp [39]. W egzosomach nie zidentyfikowano obecności białek związanych z siateczką endoplazmatyczną, aparatem Golgiego i jądrem komórkowym [33]. Natomiast potwierdzono obecność czynników transkrypcyjnych, które zwykle znajdują się wewnątrz jądra komórkowego, np. Wnt, Notch [1].

Spośród tak wielu białek niektóre z nich uważa się za białka markerowe egzosomów, należą do nich głównie TSG101, Hsp70, CD81 i CD63 [39].

TETRASPANINY

Egzosomy pochodzą z różnych tkanek i w zależności od pochodzenia pełnią różne funkcje. Ponadto do przestrzeni wydzielane są nie tylko egzosomy, ale także inne cząsteczki o budowie pęcherzyka. Tetraspaniny pełnią jedną z ważnych funkcji między innymi jako markery egzosomów. Egzosomy w pewnym stopniu mają dokładnie zdefiniowaną, konserwatywną, strukturę białkową. Jako tetraspaniny pełniące rolę markerów egzosomalnych w literaturze wyróżnia się: CD9, CD63, CD37, CD81 lub CD82. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, iż nie są to markery idealne i wiele badań pokazuje, że za pomocą tylko i wyłącznie tych markerów nie można w pełni zidentyfikować egzosomów. Warto również zwrócić uwagę, iż ekspresja głównych tetraspanin egzosomalnych: CD9, CD63 oraz CD81 jest różna w zależności od pochodzenia egzosomów i może być zmienna [2].

RNA

Kwasy nukleinowe stanowią jeden z ważniejszych składników egzosomów. „Zapakowane w strukturę egzosomów" RNA może przenosić informację pomiędzy komórkami. Informacja ta może dotyczyć zarówno procesów fizjologicznych, jak i patologicznych, w tym rozwoju nowotworu [39]. Informacja jaką niesie dana cząsteczka egzosomalnego RNA jest jednak procesem selektywnym i nie zawsze musi odzwierciedlać profil komórki-matki. Egzosomy zawierają różne rodzaje RNA. Badania pokazują, że najwięcej znajduje się w nich cząsteczek mikro RNA (microRNA, miRNA). Istotne jest to, iż „zamknięcie" miRNA w strukturze egzosomu stanowi równocześnie pewną formę ochrony kwasu rybonukleinowego dostającego się do płynów ustrojowych/osocza przez nukleolityczną aktywnością RN-az [17]. Inne rodzaje RNA występujące w egzosomach to: rybosomalne RNA, małe niekodujące RNA (ang. *piwi-interacting RNA*, piRNA; ang. *small nuclear RNA*, snRNA; ang. *small nucleolar RNA*, snoRNA; ang. *small Cajal body-specific RNAs*, scaRNA; ang. *Ro-associated Y*, YRNA), tRNA (ang. *transfer RNA*) i jego fragmenty oraz długie niekodujące RNA [16].

Wiele badań wskazuje na znaczenie RNA egzosomalnego jako elementu diagnostycznego. Naukowcy próbują zidentyfikować cząsteczki egzosomalnego miRNA pochodzące z konkretnej zmiany nowotworowej (np. rak jajnika, rak prostaty, rak sutka, rak płuca, czy glejak), wykorzystując je następnie jako krążący biomarker diagnostyczny [5, 12, 16, 23, 32] Badania wskazują również, iż krążące miRNA może być używane jako marker uszkodzenia wątroby lub zapalenia. Nie ma jednej uniwersalnej cząsteczki egzosomalnego RNA, która mogłaby być wykorzystywana do diagnostyki stąd liczne prowadzone badania nad rolą egzosomalnego RNA w rozwoju nowotworu [16, 27, 28].

PODSUMOWANIE

Mikrośrodowisko stanowiąc niszę do rozwoju komórek i komunikacji pomiędzy nimi jest obiektem zainteresowań wielu zespołów badawczych. Zainteresowanie to dodatkowo wzrosło wraz z poznaniem szeregu aspektów powstawania, uwalniania i znaczenia egzosomów mających wpływ na komórki, zarówno prawidłowe, jak i te powiązane ze stanami patologicznymi organizmu. Biorąc pod uwagę udział egzosomów w dwukierunkowej komunikacji z komórkami czy tkankami dystalnymi dalsze poznanie roli egzosomów w funkcjonowaniu mikrośrodowiska jest nadal wysoce pożądane.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków projektu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, grant nr: PCN-1-174/N/0/I.

LITERATURA

[1] ABELS E, BREAKEFIELD X. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. Cell Mol Neurobiol 2016; **36**: 301-312.

[2] ANDREU Z, YÁÑEZ-MÓ M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. Front. Immunol 2014; **5:** 1-12.

[3] BANFI A, VON DEGENFELD G, BLAU HM. Critical role of microenvironmental factors in angiogenesis. Curr. Atheroscler. Rep. 2005; **7**: 227-234.

[4] BARTHES J, OZCELIK H, HINDIE M, HASAN A, ENGIN N, CELL V, ÖZÇELIK H, HINDIÉ M., NDREU-HALILI A, VRANA NE. Cell Microenvironment Engineering and Monitoring for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. The Recent Advances. Biomed Res. Int. 2014; **2014**: 0-18.

[5] BHOME R, DEL VECCHIO F, LEE GH, BULLOCK MD, PRIMROSE JN, SAYAN AE, MIRNEZAMI AH. Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. Cancer Lett. 2018; **420**: 228-235.

[6] CARAYON K, CHAOUI K, RONZIER E, LAZAR I, BERTRAND-MICHEL J, ROQUES V, BALOR S, TERCE F, LOPEZ A, SALOMÉ L, JOLY E. Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. J. Biol. Chem. 2011; **286**: 34426-34439.

[7] COCUCCI E, RACCHETTI G, MELDOLESI J. Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol. 2009; **19**: 43-51.

[8] DOYLE LM, WANG MZ: Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. Chromosom. Proteins, 2019; 41-68.

[9] GATTAZZO F, URCIUOLO A, BONALDO P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj. 2014; **1840**: 2506-2519.

[10] HARASZTI RA, DIDIOT MC, SAPP E, LESZYK J, SHAFFER SA, ROCKWELL HE, GAO F, NARAIN NR, DIFIGLIA M, KIEBISH MA, ARONIN N, KHVOROVA A. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. J Extracell Vesicles 2016; **5**: 32570.

[11] HARDING C, HEUSER J, STAHL P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. J. Cell Biol. 1983; **97**: 329-339.

[12] HE B, ZHAO Z, CAI Q, ZHANG Y, ZHANG P, SHI S, XIE H, PENG X, YIN W, TAO Y, WANG X. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. Int J Biol Sci. 2020; 16(14): 2628-2647.

[13] HIDA K, KAWAMOTO T, OHGA N, AKIYAMA K, HIDA Y, SHINDOH M. Altered angiogenesis in the tumor microenvironment. Pathol. Int. 2011; **61**(11): 630-637.

[14] HIDA K, OHGA N, AKIYAMA K, MAISHI N, HIDA Y. Heterogeneity of tumor endothelial cells. Cancer Sci. 2013; **104**(11):1391-5.

[15] HUANG G., GREENSPAN D.S. ECM roles in the function of metabolic tissues. Trends Endocrinol. Metab. 2011; **23**: 16-22.

[16] JANAS T, JANAS MM, SAPOŃ K, JANAS T. Mechanisms of RNA loading into exosomes. FEBS Lett. 2015; **589**(13):1391-8.

[17] JAVEED N, MUKHOPADHYAY D. Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: a comprehensive review. J Biomed Res. 2017; **31**(5): 386-394.

[18] JOHNSTONE RM, ADAM M, HAMMOND JR, ORR L, TURBIDE C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J. Biol. Chem. 1987; **262**: 9412-9420.

[19] KOWAL J, TKACH M, THÉ RY C. Biogenesis and secretion of exosomes Introduction: the discovery of exosomes. Curr. Opin. Cell Biol. 2014; **29**: 116-125.

[20] LI H, FAN X, HOUGHTON J. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. J. Cell. Biochem. 2007; **101**: 805-815.

[21] LIUDMILA ZAKHAROVA, MARIA SVETLOVA A.A.F.F.: T Cell Exosomes Induce Cholesterol Accumulation in Human Monocytes Via Phosphatidylserine Receptor. J. Cell. Physiol., 2006; 211(3): 736-747.

[22] MAISHI N, HIDA K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. Cancer Sci. 2017; **108**(10): 1921-1926.

[23] MANTEROLA L, GURUCEAGA E, PÉREZ-LARRAYA JG, GONZÁLEZ-HUARRIZ M, JAUREGUI P, TEJADA S, DIEZ-VALLE R, SEGURA V, SAMPRÓN N, BARRENA C, RUIZ I, AGIRRE A, AYUSO Á, RODRÍGUEZ J, GONZÁLEZ Á. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. Neuro. Oncol. 2014; **16**: 520-527.
[24] NYBERG P, SALO T, KALLURI R. Tumor microenvironment and angiogenesis. Front. Biosci. 2008; **13**: 6537-6553.
[25] PAN BT, BLOSTEIN R, JOHNSTONE RM. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. Biochem. J. 1983; **210**: 37-47.
[26] PAN BT, JOHNSTONE RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. Cell 1983; **33**: 967-978.
[27] RAHBARGHAZI R, JABBARI N, SANI N A, ASGHARI R, SALIMI L, KALASHANI S A, FEGHHI M, ETEMADI T, AKBARIAZAR E, MAHMOUDI M, REZAIE J. Tumor-derived extracellular vesicles: reliable tools for Cancer diagnosis and clinical applications. Cell Commun Signal 2019; **17**(1):73.
[28] SALEHI M, SHARIFI M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. J Cell Physiol 2018; **233**(9): 6370-6380.
[29] SEAGER RJ, HAJAL C, SPILL F, KAMM RD, ZAMAN M. Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression. Converg. Sci. Phys. Oncol 2017; **3**: 034002.
[30] SKOTLAND T, HESSVIK NP, SANDVIG K, LLORENTE A. J. Lipid Res. 2019; **60**: 9-18.
[31] SKOTLAND T, SANDVIG K, LLORENTE A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. Prog Lipid Res 2017; **66**: 30-41.
[32] TAYLOR DD, GERCEL-TAYLOR C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 2008; **110**: 13-21.
[33] THÉRY C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. Biol. Reports 2011; **33410**: 15-3.
[34] VEIRMAN K, RAO L, BRUYNE E, MENU E, VALCKENBORGH E, RIET I, FRASSANITO MA, MARZO L, VACCA A, VANDERKERKEN K. Cancer Associated Fibroblasts and Tumor Growth: Focus on Multiple Myeloma. Cancers (Basel). 2014; **6**: 1363-1381.
[35] VLASSOV AV, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, CONRAD R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj. 2012; **1820**: 940-948.
[36] WANG M, ZHAO J, ZHANG L, WEI F, LIAN Y, WU Y, GONG Z, ZHANG S, ZHOU J, CAO K, LI X., XIONG W, LI G, ZENG Z, GUO C. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. J. Cancer 2017; **8**: 761-773.
[37] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER PRM, ANDREU Z, ZAVEC AB, BORRÀS FE, BUZAS EI, BUZAS K, CASAL E, CAPPELLO F, CARVALHO J, COLÁS E, CORDEIRO-DA SILVA A, FAIS S, FALCON-PEREZ JM, GHOBRIAL IM. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J. Extracell. Vesicles 2015; **4**: 1-60.
[38] ZAMARRON BF, CHEN W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. Int. J. Biol. Sci 2011; 7: 651-8.
[39] ZHANG Y, LIU Y, LIU H, TANG WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. Cell Biosci 2019; **15**(9): 19.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 18.10.2021
Przyjęto: 04.11.2021
Paulina Borzdziłowska
Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec
tel.: (32) 364-12-74
fax: (32) 364-12-76
e-mail: paulina.borzdzilowska@med.sum.edu.pl

ROLA WYBRANYCH CZYNNIKÓW REGULUJĄCYCH ANGIOGENEZĘ W ROZWOJU I PRZEBIEGU RDZENIAKA ZARODKOWEGO

THE ROLE OF SELECTED PROANGIOGENIC FACTORS IN GROWTH AND DEVELOPMENT OF MEDULLOBLASTOMA

Adrianna KLIMCZAK, Mikołaj PATELSKI, Przemysław TRELA, Tomasz FLUR, Barbara PIETRZAK, Maciej CZAPLA, Szymon BLIDA

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Medulloblastoma jest nowotworem ośrodkowego układu nerwowego najczęściej występującym u dzieci. Obecnie głównymi metodami w walce z rdzeniakiem zarodkowym są chemioterapia, radioterapia oraz chirurgiczne resekcje guza. Wiek młodych pacjentów jest szczególnie istotny, ponieważ ogranicza możliwości pomocy. Typowe leczenie niesie ze sobą szereg powikłań oraz skutków ubocznych. Nadzieje na opracowanie swoistej terapii dają badania nad angiogenezą rdzeniaka zarodkowego. Angiogeneza jest procesem złożonym z wielu etapów prowadzących do powstania nowych naczyń krwionośnych. Zapoczątkować ją może czynnik proangiogenny, hipoksja, natężona produkcja tlenku azotu przez komórki endotelium, bądź naprężenie ścinające przepływającej przez naczynie krwi oddziałujące na komórki śródbłonka. Najistotniejszym czynnikiem indukującym angiogenezę jest VEGF. Proces tworzenia nowych naczyń jest zahamowany, gdy czynniki proangiogenne zostaną zdominowane przez czynniki antyangiogenne.

Angiogeneza jest procesem fizjologicznym, jednakże może warunkować wzrost i rozwój guza, ponieważ komórki nowotworowe potrzebują dostępności tlenu i składników odżywczych. W początkowej fazie rozwoju guza, gdy ilość obecnych naczyń krwionośnych nie jest w stanie sprostać zapotrzebowaniu na tlen występuje hipoksja. Drugą możliwą drogą indukcji angiogenezy jest produkcja czynników proangiogennych przez komórki nowotworowe lub inne komórki otaczające nowotwór.

Cechą naczyń powstałych w procesie nowotworzenia jest dezorganizacja. Odmiennie od naczyń rozwiniętych w sposób fizjologiczny, te mają ograniczone możliwości podaży krwi i tym samym stan hipoksji się utrzymuje stymulując dalszą angiogenezę. Nowe naczynia warunkują przetrwanie nowotworu oraz przerzutowanie, które determinuje rozwój choroby i ogranicza skuteczność leczenia.

Niestety przebieg angiogenezy w przypadku rdzeniaka zarodkowego nie jest dobrze zbadany. Dotychczasowe badania wskazują, że jest to guz naczyniozależny co warunkuje jego złośliwość i zdolność przerzutowania. Dalsze badania i pogłębienie wiedzy na temat tego procesu u medulloblastoma dają nadzieję na opracowanie terapii celowanej uboższej w efekty uboczne oraz szansę na dłuższe przeżycie młodych pacjentów.

Słowa kluczowe: medulloblastoma, angiogeneza, VEGF

Summary: Medulloblastoma is a central nervous system tumor that usually occurs in children. Currently the treatments to fight medulloblastoma are chemotherapy, radiotherapy and surgical resection of the tumor. Due to the young age of patients the possibilities of help are limited. Typical treatment involves a number of complications and side effects.
The research on angiogenesis of medulloblastoma may provide hope for patients. Angiogenesis is a complex, multistep process that leads to the formation of new blood vessels. It may be initiated by a proangiogenic factor, hypoxia, increased production of nitric oxide by endothelial cells, or the shear stress of blood flowing through the vessel. VEGF is the most essential inducer of angiogenesis. The process is inhibited when the proangiogenic factors are in excess comparing to antiangiogenic factors. Angiogenesis is a physiological process. However, it can lead to tumor's growth and development. To survive cancer cells need supply of oxygen and nutrients. In the initial stage of tumor development, when the number of present blood vessels is not able to meet the oxygen demand, hypoxia occurs. The second possible way of inducing angiogenesis is the production of proangiogenic factors by tumor cells or other cells surrounding the tumor.
Disorganization is a feature of the vessels formed in the neoplastic process. Contrary to physiologically developed vessels, these have a limited ability to supply blood and thus remain hypoxic. The hypoxia stimulates further angiogenesis. New vessels determine tumor survival and metastasis what makes the treatment less effective.
Unfortunately, the angiogenesis in medulloblastoma is not well studied. The available research indicates that it is a vascular-dependent tumor, which determines its malignancy and metastasis. Further research and deepening the knowledge of this process offer hope for the development of targeted therapy with less side effects and a chance for longer survival of young patients.

Keywords: medulloblastoma, angiogenesis, VEGF

MEDULLABLASTOMA – RDZENIAK ZARODKOWY CHARAKTERYSTYKA, EPIDEMIOLOGIA ORAZ LECZENIE

Rdzeniak zarodkowy jest najczęstszym nowotworem ośrodkowego układu nerwowego o pochodzeniu zarodkowym, dotykającym w znacznej większości populację wieku dziecięcego. Według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia WHO, należy do nowotworów o najwyższym – IV stopniu złośliwości. Szacuje się, iż stanowi około 20% wszystkich guzów mózgu występujących u dzieci [39]. Najczęściej rozwija się w obrębie tylnego dołu czaszki, w okolicach robaka móżdżku albo komory IV. Dzięki temu wykazuje skłonności do rozsiewania przerzutów drogą płynu mózgowo-rdzeniowego i tym sposobem w wielu przypadkach nacieka na sąsiadujące struktury anatomiczne [56]. Tak jak inne nowotwory embrionalne, tworzą go komórki niezróżnicowane lub o niskim stopniu zróżnicowania. W związku z tym nie wykazują one zarówno morfologicznych, jak i immunohistochemicznych cech dojrzałych komórek [12].

Rdzeniak przynależy do grupy nowotworów drobnookrągłoniebieskokomórkowych, charakteryzującej się specyficznym rysem budowy histologicznej. Tworzą go ciasno ułożone, niewielkie komórki z małą ilością cytoplazmy i hi-

perchromatycznym jądrem. W barwieniu hematoksyliną i eozyną przyjmują kolor granatowy. Często posiadają skąpo wykształcone wypustki cytoplazmatyczne. Na tę chwilę, WHO w obowiązującej klasyfikacji nowotworów wyróżnia 5 histologicznych podtypów medulloblastoma: klasyczny (*classic medulloblastoma*), desmoplastyczny/guzkowy (*desmoplastic/nodular medulloblastoma*), z silnie wyrażoną guzkowością (*medulloblastoma with extensive nodularity*), anaplastyczny (*anaplastic medulloblastoma*) i wielkokomórkowy (*large cell medulloblastoma*). Każdy z nich może skutkować odmiennym, specyficznym dla siebie przebiegiem klinicznym choroby. obecnie trwają intensywne badania nad ich podłożem molekularnym [56]. Na ich podstawie rozróżniono co najmniej cztery odrębne podtypy guza: Wnt, SHH (SonicHedghog), grupa 3 i grupa 4. Grupy Wnt oraz SHH zostały nazwane zgodnie ze ścieżkami molekularnymi, których mechanizmy zostały zachwiane (na skutek mutacji odpowiednich genów białek uczestniczących w szlakach), a które odgrywają istotną rolę w procesach embriogenezy. Grupy 3 i 4 (określane często wspólnie jako*: Non-Wnt/ShhTumors* z ang.) nie zostały dotychczas wystarczająco dokładnie scharakteryzowane pod względem procesów, odpowiadających za rozwój patologii. Zadecydowano więc, że dopóki nie zostanie poznana bardziej szczegółowo biologia napędzająca wykształcenie zmian nowotworowych w tych przypadkach, nazwy pozostaną bardziej ogólne. Wiele trudności przysparza fakt, że są to jednostki do siebie podobne, często wykazujące zbieżne elementy patologii. Istotnym genem, którego ekspresja często ulega amplifikacji w grupie 3 jest mi.in gen MYC, natomiast w grupie 4 onkogen *OTX2.* Najwyraźniej niekorzystne rokowanie pacjentów z grupy 3 wskazuje na konieczność poświęcenia jej szczególnej uwagi w aspekcie poszukiwań praktycznych biomarkerów[48].

Rdzeniak zarodkowy po raz pierwszy został opisany przez Harveya Cushinga i Percivala Baileya w 1925 roku, którzy tym samym odróżnili go od scharakteryzowanego w owym czasie guza glejowego, określanego współcześnie spongioblastoma. Badacze chcieli w ten sposób podkreślić jego odmienne niż wcześniej sądzono, pochodzenie. Zaprzeczyli oni ówczesnym przekonaniom o źródle rozwoju rdzeniaka z jednej z pięciu pluripotencjalnych komórek macierzystych, zasiedlających cewę nerwową. Do tej pory jednak, nie udało się zidentyfikować żadnej komórki embrionalnej, którą można by utożsamiać z Medulloblastoma[31]. Na początku lat osiemdziesiątych XX wieku, bazując na podobieństwu histologicznym pomiędzy rdzeniakami a innymi drobnymi guzami niebieskoomórkowymi, które rozwijają się poza tylnym dołem czaszki, zawnioskowano, aby sklasyfikować je wspólnie w ramach grupy prymitywnych guzów neuroektodermalnych (ang. *Peripheral primitive neuroectodermal tumour*, PNET). Jednak, ze względu na odmienność molekularną drobnoniebieskokomórkowych guzów tylnego dołu od tych występujących na obszarach szyszynki czy też w korze mózgu, zadecydowano o odgraniczeniu rdzeniaka zarodkowego od pozostałych PNET. Światowa

Organizacja Zdrowia (WHO) (Kleihues et al., 1993) zatwierdziła tę klasyfikację, co wzbudziło wiele kontrowersji. Wielu uczonych wciąż spiera się w tej kwestii, twierdząc, iż dotychczas nie przedstawiono wystarczających dowodów, pozwalających na rozróżnienie wyżej wymienionych nowotworów [12].

Leczenie rdzeniaka opiera się na terapii wielodyscyplinarnej, obejmuje chemioterapię i radioterapię oraz w przypadkach, które na to pozwalają, interwencje chirurgiczne w postaci resekcji guza. Metody dostosowuje się przede wszystkim do wieku dziecka. Leczenie dobierane jest również na podstawie stratyfikacji ryzyka, wielkości i rozległości guza, obecności przerzutów oraz, coraz częściej, histologii komórek nowotworu i molekularnych mechanizmach towarzyszących danym podtypom. Obecnie, szczególne obawy budzi poddawanie radioterapii bardzo małych pacjentów (poniżej 3 roku życia). Należy również wspomnieć o niepokojących powikłaniach wtórnych długoterminowego leczenia. Badania nad jakością postkuracyjnego życia, stanowią obecnie obiekt szczególnego zainteresowania. Powikłania obejmują degenerację funkcji neurokognitywnych, endokrynologicznych, upośledzenie wzrostu i, utratę słuchu oraz wtórne nowotwory [14]. Nadzieję niosą badania prowadzone nad molekularnymi patomechanizmami rozwoju i funkcjonowania rdzeniaków. Coraz bardziej rozległa wiedza i rozwój technologii pozwalają wierzyć w opracowanie skuteczniejszych form leczenia w niedalekiej przyszłości. Lekarze skłaniają się częściej ku stosowaniu bardziej swoistych metod terapeutycznych, co tym samym umożliwi zminimalizowanie stopnia nasilenia, tak często towarzyszących skutków ubocznych [1].

ANGIOGENEZA – CHARAKTERYSTYKA

Odpowiednie zaopatrzenie tkanki w tlen i składniki odżywcze możliwe jest dzięki obecności naczyń krwionośnych. Rozwinięcie ich gęstej sieci umożliwia sprostanie wzmożonemu zapotrzebowaniu na substraty w momencie natężonej aktywności metabolicznej. Jednocześnie, wraz z krwią usuwane są zbędne produkty przemiany materii i tym samym stan homeostazy zostaje utrzymany. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych w warunkach fizjologicznych przebiega na drodze trzech odmiennych mechanizmów: waskulogenezy, angiogenezy oraz arteriogenezy[52].

Waskulogeneza jest procesem powstawania naczyń krwionośnych *de novo* z prekursorów komórek śródbłonka (angioblastów) w okresie embrionalnym. W odróżnieniu od niej angiogeneza polega na tworzeniu, ekspansji oraz wzroście nowych kapilar na bazie już istniejących w wyniku proliferacji komórek śródbłonka [25, 43]. Istotnym jest fakt, iż stanem podstawowym komórek śródbłonka organizmów dorosłych jest stan spoczynku. Proliferują one jedynie w ściśle określonych sytuacjach takich jak odnowa endometrium, rozwój łożyska, owulacja

czy potrzeba poprawy perfuzji organu. Ponadto w przypadku uszkodzenia tkanki angiogeneza warunkuje proces gojenia, jest więc naturalnym i pożądanym zjawiskiem fizjologicznym [28, 42, 52].

Arteriogeneza z kolei jest procesem polegającym na przekształceniu naczyń kolateralnych w przewodzące krew tętnice. W odróżnieniu od wcześniej wspomnianej waskulogenezy czy angiogenezy, arteriogeneza pozostaje niezależna od hipoksji. Jest ona indukowana mechanicznie poprzez wzrost napięcia ścinającego. W sytuacji okluzji arteriogeneza jest więc wrodzonym mechanizmem pozwalającym na wznowienie perfuzji w obszarach o upośledzonym ukrwieniu. Jest to istotny klinicznie proces w przypadku choroby niedokrwiennej serca czy udarze mózgu [10, 23].

Angiogeneza jest skomplikowanym procesem przebiegającym wieloetapowo. Do jej zapoczątkowania niezbędne jest zadziałanie czynnika proangiogennego. Największe znaczenie mają czynniki chemiczne, takie jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), angiopoetyny, płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), transformujący czynnik wzrostu alfa oraz beta (TGF- α; TGF- β), czynnik martwicy nowotworów (TNF) czy interleukina 8 (IL-8) [42, 52]. Innymi czynnikami indukującymi angiogenezę są hipoksja i zwiększona produkcja tlenku azotu przez komórki śródbłonka naczyń. Ponadto działające na powierzchnię śródbłonka naprężenie ścinające przepływającej krwi jest czynnikiem mechanicznym prowadzącym do rozwoju krążenia obocznego [33].

Po zadziałaniu czynnika proangiogennego komórki śródbłonka znajdujące się w stanie spoczynku ulegają aktywacji powodując wzrost przepuszczalności ściany naczyń. Następnie maleje siła połączeń otaczających od zewnątrz śródbłonek perycytów, powodując oddalanie się od siebie obu warstw [7]. Komórki śródbłonka tworzą i uwalniają enzymy proteolityczne, które degradują macierz zewnątrzkomórkową oraz błonę podstawną. W procesie tym w naczyniu powstaje szczelina, która zostaje otoczona migrującymi i proliferującymi komórkami endotelialnymi, co zapoczątkowuje tworzenie nowych struktur będących przedłużeniem pierwotnego naczynia. Proces formowania takiego odgałęzienia nosi nazwę „kiełkowania" (*sprouting*). Kolejnym etapem jest synteza błony podstawnej i dojrzewanie komórek śródbłonka, które przechodzą w stan spoczynku. Stabilizacja nowopowstałego naczynia możliwa jest dzięki powtórnemu przyleganiu perycytów. Rosnąca sieć naczyń ulega fuzji, a tym samym wzrasta przepływ krwi [7, 42].

Angiogeneza poprzez „kiełkowanie" uznawana jest za dominujący mechanizm rozwoju nowych naczyń w życiu pozapłodowym. Istnieją także inne typy angiogenezy, które przyczyniają się do rozrostu sieci naczyń krwionośnych u organizmów dorosłych [32]. Jednym z nich jest angiogeneza wgłębna, inaczej zwana angiogenezą rozszczepiającą, polegającą na podzieleniu pierwotnego naczynia na dwa potomne. W przypadku angiogenezy wgłębnej połączenia komórek

śródbłonka ulegają osłabieniu. Następnie warstwa perycytów oddala się od endotelium, a uwolnione czynniki proangiogenne mobilizują fibroblasty, które migrują w kierunku rozwarstwienia śródbłonka. Fibroblasty zaczynają odkładać włókna kolagenowe i powstaje wewnątrznaczyniowy filar. Wnikająca poprzez wgłębienie macierz zewnątrzkomórkowa umożliwia tworzenie błony podstawnej, a finalnie separację dwóch nowych naczyń [7].

Prawidłowy przebieg angiogenezy determinowany jest równowagą pomiędzy czynnikami proangiogennymi, o których wspomniano powyżej, a czynnikami antyangiogennymi, do których zalicza się m.in. trombospondynę-1, endostatynę, angiostatynę, tumstatynę, wazostatynę czy interferon-γ Tworzenie nowych naczyń krwionośnych zachodzi, gdy produkcja czynników stymulujących angiogenezę przeważa nad produkcją czynników antyangiogennych. W przypadku sytuacji odwrotnej angiogeneza ustaje. (IF-γ) [32].

Tworzenie nowych naczyń krwionośnych nie zawsze przebiega prawidłowo. Zachwianie równowagi i nadprodukcja czynników proangiogennych może powodować rozrastanie się naczyń w sposób niekontrolowany. Naczynia krwionośne powstające w przebiegu patologicznej angiogenezy są nadmiernie przepuszczalne dla osocza i jego białek, kiełkują w sposób nieregularny, a ich dystrybucja jest nierównomierna. Konsekwencją patologicznej angiogenezy jest wiele stanów chorobowych m.in. stany zapalne, czy neowaskularyzacja oczna polegająca na tworzeniu naczyń w obrębie oka w miejscach, gdzie nie występują w stanie fizjologicznym. Angiogeneza wykazuje także szczególne znaczenie w przypadku nowotworzenia, gdzie przyczynia się w sposób znaczący do wzrostu i rozwoju guza [28].

WYBRANE CZYNNIKI PROANGIOGENNE

Angiogeneza jest procesem, którego inicjacja oraz przebieg, wymagają współdziałania dużej grupy czynników. Wydaje się jednak, że część z nich pełni kluczową rolę w tym procesie. Należy do nich m.in.: naczyniowo – śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGF.

Naczyniowo nabłonkowy czynnik wzrostu – VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) jest to główny, bezpośredni czynnik wpływający na angiogenezę i to zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Należy on do płytkowych czynników wzrostu i wpływa na każdy etap rozwoju naczyń [3].

Dzieje się to głównie na skutek odziaływania VEGF na komórki śródbłonka naczyń. Bierze on udział w angiogenezie poprzez następujące mechanizmy:

- zwiększenie przepuszczalności naczyń i to w sposób znacznie silniejszy niż czynią to inne czynniki proangiogenne na przykład Ang-2 [39], czy

histamina (działa aż 50 razy silniej), co powoduje gromadzenie się płynu i białek w przestrzeni pozanaczyniowej [61].
- działanie mitogenne na komórki śródbłonka, pobudzenie ich proliferacji oraz migracji komórek co skutkuje tworzeniem się prymitywnych naczyń [51].
- niszczenie przestrzeni pozakomórkowej poprzez aktywację enzymów proteolitycznych doprowadzając do wytworzenia przestrzeni, w których mogą tworzyć się nowe naczynia [61].
- zapewnienie utrzymania przy życiu nowych naczyń poprzez ich ochronę przed apoptozą wywołaną przez interferon oraz poprzez bezpośrednią produkcję białka antyapoptycznego Bcl-2 [61]. Z tego powodu VEGF nazywany jest czynnikiem przetrwania (ang. *survival factor*) i działa on w ten sposób zarówno na komórki nowotworowe, jak i prawidłowe komórki śródbłonka [51].

U osób zdrowych VEGF również występuje i odpowiada za utrzymanie homeostazy, działa neuroprotekcyjnie w siatkówce i OUN, jest także konieczny do rozwoju embrionalnego czy gojenia się ran [61]. Czynniki regulujące syntezę i ekspresję VEGF dzieli się na zewnętrzne i wewnętrzne. Najważniejszym czynnikiem egzogennym, środowiskowym jest hipoksja. Niedotlenienie, na drodze zwiększenia ilości czynnika indukowanego hipoksją – HIF-1, bezpośrednio zwiększa produkcję VEGF, ale wpływa również na ekspresję jego receptorów [61]. Wpływ na tworzenie czynnika VEGF mają również czynniki wzrostu i cytokiny (interleukina 1 oraz 6) oraz hormony, czy takie związki chemiczne jak trombina czy czynnik tkankowy TF [39]. Czynniki wewnętrzne wpływające na ekspresję VEGF to mutacje genów supresorowych i aktywacja genów [39]. Potwierdzono, że mutacja genów Ras i p53 zwiększa ekspresję VEGF [19].

Istnieją cztery izoformy tego czynnika, które różnią się ilością tworzących je aminokwasów – odpowiednio 121, 165, 189 oraz 206 a także właściwościami fizykochemicznymi. Najczęściej występująca izoforma to VEGF 165 [39]. Aby wywołać efekt biologiczny VEGF musi połączyć się ze swoimi receptorami, które znajdują się w większości w błonie komórek śródbłonka naczyń. Najważniejsze z nich to VEGFR-1 oraz VEGFR-2. Receptory VEGFR-1 wykazują 10-krotnie większe powinowactwo do czynnika wzrostu, jednakże na powierzchni błon komórkowych jest ich znacznie mniej niż VEGFR-2. VEGFR-1 nazywane są też receptorami przynętowymi, gdyż wychwytując VEGF doprowadzają do zmniejszenia aktywności czynnika i w konsekwencji zapobiegają proliferacji śródbłonka [39]. Poprzez połączenie z receptorem VEGFR-2 dochodzi do pobudzenia rozrostu komórek śródbłonka, zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz inicjacji angiogenezy. Po połączeniu z receptorem VEGFR-1 czynnik może działać pobudzająco, ale i hamująco na naczyniotworzenie [39].

ANGIOGENEZA I WYBRANE CZYNNIKI PROANGIOGENNE W NOWOTWORZENIU

Komórki nowotworowe, tak jak każde inne, potrzebują do prawidłowego funkcjonowania dopływu tlenu oraz związków odżywczych, dostarczanych im przez naczynia krwionośne. Naczynia te są też drogą odpływu powstających w komórkach zbędnych produktów przemiany materii. Szacuje się, że podczas początkowej fazy wzrostu zmiany nowotworowej, kiedy korzysta ona jedynie z dostępności naczyń zaopatrujących otaczające ją tkanki, jej wielkość nie przekracza zazwyczaj 2-3 mm3. Po osiągnięciu tej wielkości, procesy apoptozy i proliferacji komórek nowotworowych równoważą się [60].

Aby tkanka nowotworowa mogła kontynuować swój wzrost, musi dojść do procesu neowaskularyzacji, dzięki któremu znacząco poprawia się jej ukrwienie. Najlepiej poznanym mechanizmem prowadzącym do rozbudowy sieci naczyniowej guza jest angiogeneza pączkująca, prowadząca do powstania nowych naczyń krwionośnych z wcześniej już istniejących dzięki ich wzrostowi i rozgałęzianiu w kierunku strefy awaskularnej [45, 60].

Stymulacja angiogenezy jest procesem niezwykle złożonym i zależnym od równowagi między czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi, regulującymi homeostazę naczyniową. W warunkach fizjologicznych równowaga ta jest zwykle przesunięta w kierunku czynników antyangiogennych i angiogeneza jest wstrzymana [60].

Podczas rozwoju guza czynniki kontrolujące angiogenezę są wydzielane nie tylko przez komórki nowotworowe, ale także przez komórki tworzące mikrośrodowisko guza, do których należą fibroblasty o fenotypie CAF, komórki endotelialne, pericyty, adipocyty oraz komórki układu immunologicznego, głównie monocyty, makrofagi, limfocyty i komórki dendrytyczne. Ważnymi elementami mikrośrodowiska nowotworu są również naczynia krwionośne i lifmatyczne, komórki nerwowe oraz macierz pozakomórkowa ECM [47].

Przewaga czynników promujących angiogenezę może zostać w mikrośrodowisku nowotworowym uzyskana dwoma drogami. Pierwszą z nich jest nabycie przez część komórek guza tzw. fenotypu angiogennego. Dochodzi do tego w skutek spontanicznych mutacji lub zmian epigenetycznych w obrębie onkogenów, genów supresorowych lub też genów kodujących czynniki proangiogenne [49, 57, 60]. Drugą możliwością jest stymulacja szlaków uwalniających czynniki proangiogenne w wyniku przedłużającej się hipoksji. Hipoksja jest niezwykle często obserwowana w obrębie rosnących nowotworów i jest oczywistym skutkiem niedostatecznego ukrwienia komórek. Odpowiedź komórek na te niesprzyjające warunki jest regulowana głównie poprzez stymulację syntezy rodziny czynników regulowanych hipoksją (HIF) [4]. Jest to grupa czynników transkrypcyjnych mająca zdolność wpływania na wiele genów komórek nowotworowych zaangażowanych

w takie procesy jak proliferacja, apoptoza, regulacja pH mikrośrodowiska czy też indukcja angiogenezy [4]. Do tych ostatnich należy gen kodujący czynnik VEGF – główny czynnik proangiogenny produkowany przez komórki guza w warunkach hipoksji [4, 49]. Hipoksja odgrywa istotną rolę również w wielu innych procesach – może na przykład stymulować rekrutację komórek prekursowych ze szpiku kostnego i ich różnicowanie do komórek endotelialnych [44, 60], pobudzać komórki endotelialne do proliferacji [44] czy też, wpływając na równowagę cytokin w mikrośrodowisku guza, tłumić odpowiedź immunologiczną organizmu [60].

Najbardziej istotnym czynnikiem kontrolującym proces angiogenezy jest czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF). Choć w mikrośrodowisku guza to komórki nowotworowe są głównymi komórkami produkującymi ten czynnik, to wydzielany może być on również przez inne komórki, takie jak fibroblasty o fenotypie CAF lub też przez płytki krwi [60]. VEGF nie tylko indukuje angiogenezę, ale także chroni nowopowstałe naczynia guza przed apoptozą, za pomocą czynników antyapoptycznych, głównie Bcl-2 [5]. Ponadto bierze on udział w szlakach prowadzących do zmniejszenia liczby połączeń między komórkami endotelialnymi, a w konsekwencji zwiększenia przepuszczalności naczyń w obrębie guza [36].

Innym czynnikiem proangiogennym, mogącym mieć duże znaczenie w trakcie rozwoju guza, jest SDF-1 (nazywany też białkiem CXCL12). Poza wpływem na indukcję angiogenezy, stymuluje on komórki wielu rodzajów nowotworów to proliferacji, migracji czy inwazji naczyniowej [26]. Udowodniono również pozytywny wpływ SDF-1 na możliwość przetrwania komórek guza w niekorzystnych warunkach oraz zdolność tego czynnika do lokalnej supresji odpowiedzi immunologicznej [2].

Z kolei czynnikiem mającym ogromne znaczenie w komunikacji między komórkami nowotworowymi a innymi komórkami mikrośrodowiska guza jest płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF). Poza właściwościami proangiogennymi, ma on duże znaczenie w stabilizacji uformowanych naczyń poprzez wywieranie wpływu na pericyty [15, 22]. Wykazano, że PDGF może odgrywać rolę w unikaniu przez komórki nowotworowe odpowiedzi immunologicznej organizmu poprzez interakcję z makrofagami [15].

Naczynia krwionośne powstające w procesie angiogenezy w obrębie zmiany nowotworowej różnią się znacząco od tych występujących fizjologicznie. Cechuje je duży stopień dezorganizacji, brak wyraźnego zróżnicowania na naczynia włosowate, żylne i tętnicze, duży stopień przepuszczalności oraz powolny przepływ krwi. Te anormalne cechy prowadzą do mało efektywnego odżywienia zaopatrywanej przez nie tkanki, co skutkuje przewlekłą hipoksją komórek nowotworowych i ciągłą indukcją powstawania kolejnych naczyń [57].

W przypadku części nowotworów proces angiogenezy może być istotny nie tylko ze względu na umożliwienie przetrwania i wzrostu guza, ale również daje sposobność dla rozpoczęcia procesu jego przerzutowania. Przerzutowanie jest główną

przyczyną zgonów związanych z chorobą nowotworową [27]. W procesie tym komórki nowotworowe przedostają się do naczyń i wraz z krwią docierają do odległych tkanek, w których opuszczają naczynie i rozpoczynają proliferację w nowym środowisku. Ich zdolność przedostania się do krążenia zależy ściśle od interakcji z pozostałymi komórkami mikrośrodowiska. Pericyty otaczające naczynia w tkance nowotworowej cechują się mniejszym przyleganiem do komórek endotelialnych, co skutkuje powiększeniem przestrzeni, przez które mogą przenikać komórki nowotworowe [60]. Również same komórki endotelialne mogą w mikrośrodowisku guza przyjmować charakterystyczne fenotypy i wydzielając czynniki angiokrynne wpływać na progresję komórek nowotworowych [27, 60]. Ogromne znaczenie dla procesu intrawazacji ma pojawienie się w mikrośrodowisku nowotworu czynników takich jak VEGF, MMP czy ANGPTL4, których sekrecja przez wiele komórek jest napędzana głównie przewlekłą hipoksją w tymże środowisku [27, 60].

ANGIOGENEZA W RDZENIAKU ZARODKOWYM

Proces angiogenezy w rdzeniaku zarodkowym nie jest dobrze poznany, jednakże istnieją nieliczne badania, których wyniki sugerują, iż jest to guz naczyniozależny. Rdzeniak zarodkowy jest najczęstszym guzem embrionalnym wśród populacji pediatrycznej. Spośród 4 podgrup molekularnych Wnt, SHH, grupa 3 i grupa 4, najwyższym poziomem angiogenezy wykazuje się grupa 3, która cechuje także się najgorszymi rokowaniami. Proces angiogenezy jest cechą charakterystyczną rozwoju tego guza, a utkanie ich tworzy charakterystyczne struktury glomuroidalne co również stanowi o jego złośliwości [53, 54].

Badania wykonane na trzech niezależnych grupach pacjentów wykazały podwyższony poziom mRNA VEGF-A wśród pacjentów grupy 3 oraz różnicę w przeżywalności pacjentów spośród wszystkich grup na korzyść pacjentów z niską ekspresją. [53] W trakcie badań wykonano ksenoprzeszczepy trzech różnych typów rdzeniarka zarodkowego trzem grupom myszy laboratoryjnych, a następnie określano z wykorzystaniem DSC MRI unaczynienie rozwijających się guzów oraz przeżywalność osobników z danym typem guza, zaś wyniki DSC MRI potwierdzono badaniami histologicznymi *post mortem*. Wykazano, że najniższą przeżywalnością cechowały się zwierzęta z przeszczepionym guzem o najwyższej ekspresji mRNA VEGF-A i zwiększała się ona wśród grup z przeszczepionymi guzami o mniejszym unaczynieniu. Opisano również trzy wzorce unaczynienia guza: zorganizowane, mikronaczynia rozproszone „DM" (ang. *diffuse microvascular*) oraz heterogenne. Wzorzec zorganizowany cechuje się równomiernym rozłożeniem naczyń krwionośnych o podobnej średnicy w obrębie całego guza, w przypadku „DM" dochodzi do rozwoju małych naczyń krwionośnych rozmieszczonych w obrębie całego guza bez lub z minimalną ilością większych naczyń, natomiast unaczynienie heterogeniczne jest połączeniem cech unaczynienia zorganizowanego i „DM". Pod względem przeżycia, najlepsze

wyniki uzyskała grupa myszy z guzem o unaczynieniu zorganizowanym, a najgorsze – z mikrounaczynieniem rozproszonym „DM", co sugeruje wpływ typu unaczynienia na złośliwość rdzeniaka zarodkowego. Badanie wykazało, że ekspresja mRNA VEGF-A w przeszczepianym guzie odpowiada ekspresji w mózgu, wydaje się zatem, że egzogenny VEGF-A indukuje wydzielanie tego czynnika przez komórki gospodarza.

Badania Huber i wsp. wykazało obecność wielu czynników proangiogennych wśród 93% badanych pacjentów z rdzeniakiem zarodkowym z czego najważniejszymi były VEGF165, VEGF-A i VEGF-B. W niniejszych badaniach VEGF165 był jednym z najpowszechniejszych czynników proangioennych w liniach komórkowych PNET i pierwotnych PNET/MB oraz poziom jego ekspresji był zbliżony do poziomu obserwowanego u dzieci z guzami glejowymi. Dodatkowo badania wykazały, iż ekspresje VEGF, VEGF-B oraz Ang-2 były ze sobą skorelowane, co sugeruje jednoczesny udział kilku czynników proangiogennych w regulacji neowaskularyzacji w PNET/MB [17].

Z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych zidentyfikowano wzmożoną angiogenezę oraz ekspresję VEGFA, FLT1 oraz HBEGF w mysim modelu guza grupy SHH pozbawionym Pten, który jest jednym z głównych inhibitorów przekazywania sygnału przez kinazę PI-3. Przeprowadzone badania wykazały, iż niedobór ten wpływa na zmianę histologii rdzeniaka zarodkowego z klasycznej na ekstensywnie guzowatą (MBEN). Buzy MBEN charakteryzują się niższym indeksem proliferacyjnym i zróżnicowaniem neurocytowym, jednakże żadne badania nie wykazały niższej przeżywalności osobników z tym typem guza [6].

Receptory VEGF występują naturalnie w komórkach śródbłonka naczyniowego w małym ilościach, jednakże ulegają one nadekspresji w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych rdzeniaka zarodkowego. Istnieje wiele dowodów wskazujących na wpływ czynników angiogennych na tempo wzrostu guzów oraz na ich potencjał w tworzeniu przerzutów [29].

Mimo, iż badania poświęcone neowaskularyzacji w rdzeniaku zarodkowym są nieliczne, to wydaje się, że istnieje zależność pomiędzy tym procesem a wzrostem i rozwojem nowotworu, a także korelacja z przeżywalnością pacjentów. Szczególnie dotyczy to pacjentów, których guzy wykazują cechy typowe dla grupy 3. W związku z powyższym wydaje się, że angiogeneza może być nowym celem terapii medulloblastoma.

TERAPIA ANTYANGIOGENNA W RDZENIAKU ZARODKOWYM

Metody leczenia rdzeniaka zarodkowego uzależnione są przede wszystkim od stopnia rozwoju nowotworu oraz od wieku chorego. Podstawowym schematem leczenia jest operacja neurochirurgiczna oraz wdrożona pooperacyjnie radioterapia[8, 31, 37]**.** W niektórych przypadkach, m.in. u dzieci poniżej 3 roku życia,

rezygnuje się z radioterapii i wdrażane jest zastępcze leczenie często wykorzystywanymi chemioterapeutykami [20, 21, 38]. Takie postępowanie wiąże się jednak często z poważnymi skutkami ubocznymi, w związku z czym coraz więcej zespołów badawczych opracowuje nowoczesne podejście do leczenia rdzeniaka zarodkowego, wykorzystujące wiedzę na temat czynników wzrostu mających kluczowe znaczenie w rozwoju guza [30]. Badania kliniczne nad takimi formami terapii wykazują, że są one mniej obciążające dla organizmu i charakteryzują się występowaniem łagodniejszych form niepożądanych efektów leczenia.

Obecnie jednym z głównych celów dla naukowców jest dokładne poznanie mechanizmu działania czynników, które indukują nie tylko rozrost samego nowotworu, ale także przyczyniają się do angiogenezy w jego obrębie. Wiedza ta umożliwiłaby opracowanie terapii wycelowanych w konkretne szlaki transdukcji sygnału odpowiedzialne za proliferację komórek oraz angiogenezę. Zablokowanie bądź wzmocnienie niektórych z nich może okazać się przełomem w walce z wieloma nowotworami, w tym z rdzeniakiem zarodkowym. Aktualnie wiele leków przechodzi kolejne fazy badań klinicznych i przynosi obiecujące rezultaty. Należą do nich m.in.: mebendazol oraz forenitib.

Mebendazol jest lekiem dość powszechnie stosowanym przy zarażeniach pasożytami. Jednak ostatnie badania wskazują, iż może on znaleźć zastosowanie także w terapiach niektórych nowotworów układu nerwowego, także rdzeniaka zarodkowego, zastępując powszechnie stosowaną winkrystynę[1, 9]. Lek ten charakteryzuje się możliwością oddziaływania na liczne szlaki wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowe oraz zdolnością do łączenia się ze strukturami wewnątrzkomórkowymi, w tym z tubuliną. Oddziaływanie to blokuje podziały komórkowe, jak również utrudnia sygnalizację międzykomórkową.

Inną ważną właściwością mebendazolu jest zdolność do inhibicji receptora naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGFR2), przez co blokowany jest szlak sygnałowy odpowiadający za angiogenezę[35]. Co więcej, badania kliniczne nad skutecznością mebendazolu w terapii glejaka przeprowadzane na ludziach wskazują na jego duże bezpieczeństwo nawet przy stosowaniu wysokich dawek leku. Stąd też w leku tym pokłada się duże nadzieje w kontekście nowej terapii antyangiogennej rdzeniaka zarodkowego [1].

Foretinib jest eksperymentalnym lekiem, którego działanie testowane jest pod kątem leczenia licznych nowotworów. Podobnie jak Mebendazol, Foretinib jest inhibitorem dla receptora czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGFR2), dzięki czemu może wpływać na ograniczenie angiogenezy w polu zmiany nowotworowej. Hamuje także szlak wątrobowego czynnika wzrostu (HGFR), będącego ważnym punktem w trakcie rozwoju móżdżku [18]. Zapobiega w ten sposób nadmiernej proliferacji komórek oraz indukuje wejście komórek nowotworowych w szlak apoptozy w rdzeniaku zarodkowym typu SHH. Co istotne, zauważono, że Foretinib ma zdolność przekraczania bariery krew-mózg oraz jest

dobrze metabolizowany. Badania na myszach pokazały, iż Foretinib wpływał hamująco na rozwój pierwotnej zmiany nowotworowej, jej unaczynienia, ale także ogranicza częstość występowania przerzutów [48].

Duże nadzieje związane z terapią w rdzeniaku zarodkowym pokłada się także w badaniach nad nowotworowymi komórkami macierzystymi. Badania te dotyczą w dużej mierze szlaków transdukcji sygnału oraz genów odpowiedzialnych m.in. za angiogenezę. Wycelowanie leczenia właśnie w te komórki może być o tyle istotne, iż stanowią one populację komórek odpowiadających nie tylko za rozrost zmiany, ale także za jej zapoczątkowanie, utrzymanie, za występowanie przerzutów, ale również za nawroty choroby. Co więcej, wykazują odporność na tradycyjne leczenie takie jak chemioterapia oraz radioterapia [16]. Zatem opracowanie metody terapeutycznej, która pozwoliłaby na niszczenie tych komórek, znacznie ułatwiłaby proces leczenia.

Pomimo tego, że większość prób przynosiła niezadowalające rezultaty, pojawiają się bardziej obiecujące metody, takie jak stosowanie GDC-0941 w celu inhibicji szlaku 3-kinaz fosfatydyloinozytolu PI3K/Akt, które wyraźnie zmniejsza ilość komórek CD133+ mających właściwości komórek macierzystych nowotworu [12]. Szlak PI3K/Akt ma istotne znaczenie w metabolizmie komórkowym, w trakcie podziałów komórek, ale również w procesie angiogenezy. Poprzez wpływ zewnętrznych czynników wzrostu, w tym VEGF, oddziałuje na szlak sygnałowy związany z tlenkiem azotu(II) NO. Obydwa szlaki wywołują kaskadę reakcji doprowadzających do formowania naczyń krwionośnych zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych[46]. Zatem jego zahamowanie mogłoby potencjalnie prowadzić do ograniczenia unaczynienia w obrębie zmiany nowotworowej.

Oprócz szlaku PI3K/Akt analizie poddawany jest również szlak STAT3, którego inhibicja przez cucurbitacynę I czy celekoksyb pozwala na znaczne zmniejszenie właściwości proliferacyjnych komórek CD133+[58]. Szlak STAT3, podobnie jak PI3K/Akt, pełni znaczącą rolę w przebiegu angiogenezy w chorobach nowotworowych. Jak pokazują badania, białko STAT3 może przyłączać się do miejsca promotorowego w genie kodującym VEGF i w ten sposób indukować jego wzmożoną ekspresję. Skutkiem tego jest wzmożona proliferacja komórek nowotworowych oraz tworzenie naczyń krwionośnych w obrębie zmiany[34]. Z tego względu opracowywane są terapie mające na celu zablokowanie aktywności STAT3, a tym samym zmniejszenie ekspresji VEGF oraz zahamowanie angiogenezy. Oprócz cucurbitacyny I oraz celekoksybu działanie hamujące względem STAT3 wykazują także dasatinib w terapii łączonej z cisplatyną, ruxolitinib oraz tofacitinib, które w modelach przedklinicznych wykazują dużą skuteczność. W związku z powyższym planowane jest rozpoczęcie badań klinicznych, które potwierdziłyby ich skuteczność oraz bezpieczeństwo stosowania w przyszłych terapiach antyangiogennych [55].

PODSUMOWANIE

Rdzeniak zarodkowy jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym o pochodzeniu embrionalnym ośrodkowego układu nerwowego u dzieci. Jego anatomiczne położenie skutkuje możliwością wystąpienia przerzutów drogą płynu mózgowo-rdzeniowego, co czyni go jeszcze bardziej śmiertelnym.

Spośród wielu mechanizmów, które sprzyjają powstaniu, wzrostowi i przerzutowaniu rdzeniaka zarodkowego, istotnym procesem nań oddziaływującym jest angiogeneza, która zapewnia prawidłowe ukrwienie guza, a tym samym jego odżywienie i dotlenienie, jak również umożliwia powstawanie wtórnych ognisk nowotworowych w miejscach odległych. Angiogeneza ma skomplikowany przebieg i jest kontrolowana przez szereg czynników proagniogennych i antyangiogennych. Równowaga między nimi reguluje zachodzenie angiogenezy. W trakcie powstawania i rozwoju nowotworów, w tym także rdzeniaka, dochodzi do zaburzenia procesu naczyniotworzenia, z reguły na skutek zwiększonej ekspresji czynników stymulujących angiogenezę.

Rdzeniak zarodkowy jest nowotworem, dla rozwoju którego duże znaczenie ma proces angiogenezy. Charakteryzuje się on nadekspresją czynników proangiogennych. Badania udowodniły, że występuje korelacja między przeżywalnością, a stopniem wydzielania czynników proangiogennych, głównie VEGF, przez rdzeniaka zarodkowego. Inną zauważoną prawidłowością jest zwiększenie się ilości swoistych receptorów dla VEGF w śródbłonku naczyń krwionośnych tego guza. Ponadto, układ nowotworzących się naczyń krwionośnych w obrębie guza może mieć znaczenie prognostyczne.

Badania dotyczące procesu angiogenezy w rdzeniaku zarodkowym mają duże znaczenie dla optymalizacji jego leczenia. Zablokowanie tworzenia nowych naczyń lub zahamowanie tego procesu jest istotnym etapem leczenia. Wciąż podstawową procedurą leczenia rdzeniaka zarodkowego jest operacja chirurgiczna i radioterapia. Radioterapia nie może być jednak stosowana u dzieci poniżej 3 roku życia, dlatego rozwój terapii chemioterapeutykami jest kluczowy w walce z tym często występującym nowotworem. Lekiem blokującym szlak angiogenezy jest mebendazol, który doprowadza do inhibicji VEGF 2. Jednocześnie lek jest bezpieczny w stosowaniu. Podobnie działającym lekiem jest foretinib, który oprócz blokowania VEGF 2, hamuje szlak wątrobowego czynnika wzrostu (HGFR), skutkiem tego jest indukowanie apoptozy komórek guza.

Przeprowadzone dotychczas badania wskazują na istotną rolę procesu angiogenezy w rozwoju rdzeniaka zarodkowego. Tym samym stosowanie leków o charakterze antyangiogennym u pacjentów z medulloblastoma, u których konwencjonalne leczenie nie jest możliwe lub nie przynosi oczekiwanych rezultatów, daje duże nadzieje na opracowanie skutecznych form terapii. Jednak zagadnienie to wymaga przeprowadzenia dalszych badań, w tym na poziomie klinicznym.

LITERATURA

[1] ARCHER TC, MAHONEY EL, POMEROY SL. Medulloblastoma: Molecular Classification-Based Personal Therapeutics. *Neurotherapeutics*2017; **14**: 265-273. doi: 10.1007/s13311-017-0526-y.

[2] BAI R-Y, STAEDTKE V, RUDIN CM, BUNZ F, RIGGINS GJ. Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. *Neuro Oncol*2015; **17**: 545-554. doi: 10.1093/neuonc/nou234.

[3] BALKWILL F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *SeminCancerBiol*2004; **14**: 171-179. doi: 10.1016/j.semcancer.2003.10.003.

[4] BANYŚ A, BUŁAŚ L, DŁUGOSZ E, SZULC-MUSIAŁ B, JANKOWSKI A (2009) Angiogeneza w chorobie nowotworowej. **64**: 247-250.

[5] CAMUZI D, DE AMORIM ÍSS, RIBEIRO PINTO LF, OLIVEIRA TRIVILIN L, MENCALHA AL, SOARES LIMA SC (2019) Regulation Is in the Air: The Relationship between Hypoxia and Epigenetics in Cancer. Cells 8. doi: 10.3390/cells8040300.

[6] CARMELIET P (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl **3**: 4-10. doi: 10.1159/000088478.

[7] CASTELLINO RC, BARWICK BG, SCHNIEDERJAN M, BUSS MC, BECHER O, HAMBARDZUMYAN D, MACDONALD TJ, BRAT DJ, DURDEN DL (2010) Heterozygosity for Pten promotes tumorigenesis in a mouse model of medulloblastoma. *PLoS One* **5**: e10849. doi: 10.1371/journal.pone.0010849.

[8] DARWEESH RS, AYOUB NM, NAZZAL S (2019) Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications. *Int J Nanomedicine* **14**: 7643-7663. doi: 10.2147/IJN.S223941.

[9] DE BRAGANCA KC, PACKER RJ (2013) TREATMENT OPTIONS FOR MEDULLOBLASTOMA AND CNS PRIMITIVE NEUROECTODERMAL TUMOR (PNET). CURR TREAT OPTIONS *Neurology* **15**: 593-606. doi: 10.1007/s11940-013-0255-4.

[10] DE WITT M, GAMBLE A, HANSON D, MARKOWITZ D, POWELL C, AL DIMASSI S, ATLAS M, BOOCKVAR J, RUGGIERI R, SYMONS M (2017) Repurposing Mebendazole as a Replacement for Vincristine for the Treatment of Brain Tumors. *Mol Med* **23**: 50-56. doi: 10.2119/molmed.2017.00011.

[11] DEINDL E, QUAX PHA (2020) Arteriogenesis and Therapeutic Angiogenesis in Its Multiple Aspects. *Cells* 9. doi: 10.3390/cells9061439.

[12] DOMAGAŁA W (2007) Molekularne podstawy karcynogenezy i ścieżki sygnałowe niektórych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. *Polski Przegląd Neurologiczny* **3**: 127-141.

[13] EHRHARDT M, CRAVEIRO RB, HOLST MI, PIETSCH T, DILLOO D (2014) The PI3K inhibitor GDC-0941 displayspromising in vitro and in vivo efficacy for targetedmedulloblastomatherapy. *Onco arget* **6**: 802-813.

[14] GERBER NU, MYNAREK M, VON HOFF K, FRIEDRICH C, RESCH A, RUTKOWSKI S (2014) Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev* **40**:356-365. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.11.010.

[15] HUANG F, WANG D, YAO Y, WANG M (2017) PDGF signaling in cancer progression. 12.

[16] HUANG G-H, XU Q-F, CUI Y-H, LI N, BIAN X-W, LV S-Q (2016) Medulloblastoma stem cells: Promising targets in medulloblastoma therapy. *Cancer Sci* **107**: 583-589. doi: 10.1111/cas.12925.

[17] HUBER H, EGGERT A, JANSS AJ, WIEWRODT R, ZHAO H, SUTTON LN, RORKE LB, PHILLIPS PC, GROTZER MA (2001) Angiogenic profile of childhood primitive neuroectodermal brain tumours/medulloblastomas. *European Journal of Cancer* **9**.

[18] IERACI A, FORNI PE, PONZETTO C (2002) Viable hypomorphic signaling mutant of the Met receptor reveals a role for hepatocyte growth factor in postnatal cerebellar development. *Proc Natl Acad Sci* U S A **99**: 15200-15205. doi: 10.1073/pnas.222362099.

[19] KAJDANIUK D, MAREK B, FOŁTYN W, KOS-KUDŁA B (2011) Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) w endokrynologii i onkologii. *Endokrynologia Polska* **62**: 456-464.

[20] KANN BH, LESTER-COLL NH, PARK HS, YEBOA DN, KELLY JR, BAEHRING JM, BECKER KP, YU JB, BINDRA RS, ROBERTS KB (2017) Adjuvantchemotherapy and overallsurvival in adultmedulloblastoma. *Neuro Oncology* **19**: 259-269. doi: 10.1093/neuonc/now150.

[21] KHATUA S, SONG A, SRIDHAR DC, MACK SC (2018) Childhood Medulloblastoma: Current Therapies, Emerging Molecular Landscape and Newer Therapeutic Insights. *Curr Neuropharmacol* **16**: 1045-1058. doi: 10.2174/1570159X15666171129111324.

[22] KILVAER TK, RAKAEE M, HELLEVIK T, VIK J, PETRIS LD, DONNEM T, STRELL C, OSTMAN A, BUSUND L-TR, MARTINEZ-ZUBIAURRE I (2019) Differential prognostic impact of platelet-derived growth factor receptor expression in NSCLC. *Scientific Reports* **9**: 10163. doi: 10.1038/s41598-019-46510-3.

[23] KLUEVER A-K, BRAUMANDL A, FISCHER S, PREISSNER KT, DEINDL E (2019) The Extraordinary Role of Extracellular RNA in Arteriogenesis, the Growth of Collateral Arteries. *Int J Mol Sci* **20**. doi: 10.3390/ijms20246177.

[24] KOWALEWSKA-CELEJEWSKA M, SKRZYPKOWSKA M, MYŚLIWSKA J, SIEBERT J (2012) Angiogenina i czynniki proangiogenne jako marker i cel terapii nowotworowych. *Forum Medycyny Rodzinnej* **6**: 68-73.

[25] LUGANO R, RAMACHANDRAN M, DIMBERG A (2020) Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* **77**: 1745-1770. doi: 10.1007/s00018-019-03351-7.

[26] MA D-M, LUO D-X, ZHANG J (2016) SDF-1/CXCR7 axis regulates the proliferation, invasion, adhesion, and angiogenesis of gastric cancer cells. *World J Surg Oncol* **14**. doi: 10.1186/s12957-016-1009-z.

[27] MAISHI N, HIDA K (2017) Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Sci* **108**: 1921-1926. doi: 10.1111/cas.13336.

[28] MARKIEWSKI MM, DAUGHERITY E, REESE B, KARBOWNICZEK M (2020) The Role of Complement in Angiogenesis. *Antibodies (Basel)* **9**. doi: 10.3390/antib9040067.

[29] MARMÉ D (1996) Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol* **14**: 166-174. doi: 10.1007/BF00186896.

[30] MENYHÁRT O, GYŐRFFY B (2020) Molecular stratifications, biomarker candidates and new therapeutic options in current medulloblastoma treatment approaches. *Cancer Metastasis Rev* **39**: 211-233. doi: 10.1007/s10555-020-09854-1.

[31] MILLARD NE, DE BRAGANCA KC (2016) Medulloblastoma. *J Child Neurology* **31**:1341-1353. doi: 10.1177/0883073815600866.

[32] MOCCIA F, NEGRI S, SHEKHA M, FARIS P, GUERRA G (2019) Endothelial Ca2+ Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: Just What It Takes to Make a Blood Vessel. *Int J MolSci* **20**. doi: 10.3390/ijms20163962.

[33] MORAGA A, LAO KH, ZENG L (2017) Angiogenesis and Cardiovascular Diseases: The Emerging Role of HDACs. In: Simionescu D, Simionescu A (eds) Physiologic and Pathologic Angiogenesis – Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. *In Tech.*

[34] NIU G, WRIGHT KL, HUANG M, SONG L, HAURA E, TURKSON J, ZHANG S, WANG T, SINIBALDI D, COPPOLA D, HELLER R, ELLIS LM, KARRAS J, BROMBERG J, PARDOLL D, JOVE R, YU H (2002) Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* **21**: 2000-2008. doi: 10.1038/sj.onc.1205260.

[35] NYGREN P, FRYKNÄS M, AGERUP B, LARSSON R (2013) Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **139**: 2133-2140. doi: 10.1007/s00432-013-1539-5.

[36] OKAMOTO T, USUDA H, TANAKA T, WADA K, SHIMAOKA M (2019) The Functional Implications of Endothelial Gap Junctions and Cellular Mechanics in Vascular Angiogenesis. *Cancers (Basel)* **11**. doi: 10.3390/cancers11020237.

[37] PACKER RJ, GAJJAR A, VEZINA G, RORKE-ADAMS L, BURGER PC, ROBERTSON PL, BAYER L, LAFOND D, DONAHUE BR, MARYMONT MH, MURASZKO K, LANGSTON J,

SPOSTO R (2006) Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *J Clin Oncol* **24**: 4202-4208. doi: 10.1200/JCO.2006.06.4980.

[38] PAULINA JAROSZ P, BARTOSZ WOŹNIAK B (2012) Angiogeneza w chorobach nowotworowych. *Medical Review.*

[39] PURVIS IJ, AVILALA J, GUDA MR, VENKATARAMAN S, VIBHAKAR R, TSUNG AJ, VELPULA KK, ASUTHKAR S (2019) Role of MYC-miR-29-B7-H3 in Medulloblastoma Growth and Angiogenesis. *J Clin Med* **8**. doi: 10.3390/jcm8081158.

[40] RAJABI M, MOUSA SA (2017) The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines* **5**. doi: 10.3390/biomedicines5020034.

[41] RIZOV M, ANDREEVA P, DIMOVA I (2017) Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* **56**: 127-132. doi: 10.1016/j.tjog.2016.06.019.

[42] RONCA R, BENKHEIL M, MITOLA S, STRUYF S, LIEKENS S (2017) Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. *Med Res Rev* **37**: 1231-1274. doi: 10.1002/med.21452.

[43] SACEWICZ I, WIKTORSKA M, WYSOCKI T, NIEWIAROWSKA J Mechanizmy angiogenezy nowotworowej. *Postępy Higieny i Medycny Doświadczalnej* **10**.

[44] SAMAKOVA A, GAZOVA A, SABOVA N, VALASKOVA S, JURIKOVA M, KYSELOVIC J (2019) The PI3k/Akt Pathway Is Associated With Angiogenesis, Oxidative Stress and Survival of Mesenchymal Stem Cells in Pathophysiologic Condition in Ischemia. *Physiol Res* S131-S138. doi: 10.33549/physiolres.934345.

[45] SAMPLES J, WILLIS M, KLAUBER-DEMORE N (2013) Targeting angiogenesis and the tumor microenvironment. *Surg Oncol Clin* N Am **22**: 629-639. doi: 10.1016/j.soc.2013.06.002.

[46] SMITH C, FARIA CC, DUBUC AM, REMKE M, GOLBOURN BJ, DIAZ RJ, AGNIHOTRI S, LUCK A, SABHA N, OLSEN S, WU X, GARZIA L, RAMASWAMY V, MACK SC, WANG X, LEADLEY M, REYNAUD D, ERMINI L, POST M, NORTHCOTT PA, PFISTER SM, CROUL SE, KOOL M, KORSHUNOV A, TAYLOR MD, RUTKA JT (2014) FORETINIB IS EFFECTIVE THERAPY FOR METASTATIC SONIC HEDGEHOG MEDULLOBLASTOMA. *Neuro Oncol* **16**: 35. doi: 10.1093/neuonc/nou208.47.

[47] SOBCZYŃSKA-RAK A, SILMANOWICZ P, POLKOWSKA I (2016) Tumor Angiogenesis – factors influencing the development of a tumor vascular network and assessment of neoangiogenesis in histopathological samples. *Medycyna Weterynaryjna* **72**: 542-548. doi: 10.21521/mw.5563.

[48] TAYLOR MD, NORTHCOTT PA, KORSHUNOV A, REMKE M, CHO Y-J, CLIFFORD SC, EBERHART CG, PARSONS DW, RUTKOWSKI S, GAJJAR A, ELLISON DW, LICHTER P, GILBERTSON RJ, POMEROY SL, KOOL M, PFISTER SM (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* **123**: 465-472. doi: 10.1007/s00401-011-0922-z.

[49] TCHORZEWSKA M, KOWALIK M, KULIŚ A, OLEJARZ W (2019) MECHANISMS LEADING TO ANGIOGEGNESIS IN CANCERS. **60-65.**

[50] TELEANU RI, CHIRCOV C, GRUMEZESCU AM, TELEANU DM (2019) Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment. *J Clin Med* **9**. doi: 10.3390/jcm9010084.

[51] THOMPSON EM, KEIR ST, VENKATRAMAN T, LASCOLA C, YEOM KW, NIXON AB, LIU Y, PICARD D, REMKE M, BIGNER DD, RAMASWAMY V, TAYLOR MD (2017) The role of angiogenesis in Group 3 medulloblastoma pathogenesis and survival. *Neuro Oncol* **19**: 1217-1227. doi: 10.1093/neuonc/nox033.

[52] VIRÁG J, KENESSEY I, HABERLER C, PIURKÓ V, BÁLINT K, DÖME B, TÍMÁR J, GARAMI M, HEGEDŰS B (2014) Angiogenesis and angiogenic tyrosine kinase receptor expression in pediatric brain tumors. *Pathol Oncol Res* **20**: 417-426. doi: 10.1007/s12253-013-9711-4.

[53] WEI J, MA L, LI C, PIERSON CR, FINLAY JL, LIN J (2019) Targeting Upstream Kinases of STAT3 in Human Medulloblastoma Cells. *Curr Cancer Drug Targets* **19**: 571-582. doi: 10.2174/1568009618666181016165604.

[54] Y C (2009) Tumor angiogenesis and molecular targets for therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 3962-3973. doi: 10.2741/3504.
[55] YANG M-Y, LEE H-T, CHEN C-M, SHEN C-C, MA H-I (2014) Celecoxib suppresses the phosphorylation of STAT3 protein and can enhance the radiosensitivity of medulloblastoma-derived cancer stem-like cells. *Int J Mol Sci* **15**: 11013-11029. doi: 10.3390/ijms150611013.
[56] ZAKRZEWSKA M, LIBERSKI PP (2011) Podłoże molekularne rdzeniaka wieku dziecięcego. *Aktualności Neurologiczne* **11**: 85-90.
[57] ZUAZO-GAZTELU I, CASANOVAS O (2018) Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. *Front Oncol* **8**. doi: 10.3389/fonc.2018.00248.
[58] ZYGOŃ J (2014) Wpływ naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu i jego receptora Flt-1 na angiogenezę oraz rokowanie w operacyjnym raku jelita grubego. **85**.

Redaktor prowadzący - Michał Nowicki

Otrzymano: 02.09.2021
Przyjęto: 24.09.2021
Adrianna Klimczak
ul. Dąbrowskiego 130b/22, 60-576 Poznań
tel.: 791 729 175
e-mail: klimczakadrianna@gmail.com

OGRANICZENIE KALORYCZNE A PROCES STARZENIA SIĘ ORGANIZMU

CALORIC RESTRICTION AND AIGING PROCESS

Katarzyna ZGUTKA, Katarzyna PIOTROWSKA

Katedra i Zakład Fizjologii Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Streszczenie: Zmniejszenie liczby spożywanych kalorii opóźnia procesy starzenia i znacznie redukuje ryzyko występowania chorób związanych z wiekiem. Liczne badania przeprowadzone na przestrzeni ostatnich lat wykazały, że restrykcja kaloryczna od 25 do 60 procent zapotrzebowania energetycznego przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowego poziomu koniecznych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu składników mineralnych i witamin znacznie zwiększyła długość jak i poprawiała jakość życia wielu gatunków zwierząt. W niniejszej pracy omówiono restrykcję kaloryczną w aspekcie mechanizmów molekularnych związanych ze starzeniem się organizmu.

Słowa kluczowe: restrykcja kaloryczna, starzenie się, teorie i mechanizmy starzenia się organizmu

Summery: Reducing the number of calories inhibits premature aging and significantly reduces the risk of age-related diseases. Numerous studies conducted over many years have shown that caloric restriction, from 25 to 60 percent of energy demands while maintaining the proper level of minerals and vitamins necessary for the proper functioning of the body, significantly increased length and improved the quality of life of many animal species. In this paper, we focused on caloric restriction in terms of the molecular mechanisms related to aging of the organism.

Keywords: caloric restriction, aging, theories and mechanisms of aging

WSTĘP

Proces starzenia jest zjawiskiem plastycznym [27]. Wpływa na niego wiele czynników m.in. niestabilność genomu, zmiany epigenetyczne, dysfunkcja mitochondriów, starzenie komórek, wyczerpanie puli komórek macierzystych, czy chociażby zmiany w sygnalizacji międzykomórkowej [10, 21, 52]. Uważa się,

również, że wiele tzw. nutraceutyków, czyli składników pożywienia pochodzenia naturalnego, poprzez swoje działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne może modyfikować proces starzenia a tym samym opóźniać rozwój chorób wieku podeszłego [1]. Liczne doniesienia literaturowe poświadczają także, że ograniczenie kalorii (CR) jest obecnie jedyną niegenetyczną interwencją mającą na celu opóźnienie postępu starzenia i rozwój chorób przewlekłych związanych z wiekiem [35].

Zgodnie z definicją restrykcję kaloryczną (ang. *caloric restriction*, CR/ ang. *dietary restrictin*, DR) rozumiemy jako dietę, w której znacząco zmniejsza się wartość energetyczną pożywienia (od 30 do 60% dziennego zalecanego spożycia) ale dostarczane są wszystkie niezbędne mikro- i makroelementy, witaminy oraz inne składniki odżywcze [7]. Niektórzy badacze wykorzystując do badań modele zwierzęce stosują tzw. łagodną restrykcję kaloryczną ok. 10-15%, która również przynosi znaczne efekty [3, 26, 50]. Pierwsze doniesienia poświadczające znaczący wpływ ograniczenia kalorycznego na długość i jakość życia pochodzą już z 1935 roku, kiedy to McCay wraz ze współpracownikami zaobserwowali, że szczury poddane restrykcji kalorycznej żyją dłużej niż zwierzęta otrzymujące zalecaną dzienną dawkę pożywienia [54]. Wyniki tego doświadczenia miały przełomowe znaczenie w gerontologii i wyznaczyły nowy kierunek badań nad procesami starzenia. Od tego czasu podobne obserwacje poczyniono w stosunku do wielu różnych gatunków m.in. drożdży, robaków, ryb, myszy, szczurów i małp [9, 22, 26, 27, 30]. Zaobserwowano, że organizmy te nie tylko żyją dłużej, ale dłużej zachowują pełną aktywność.

U ludzi ocena wpływu ograniczenia kalorycznego jest dość trudna głównie z technicznego punktu widzenia. Dotyczy to przede wszystkim długoterminowości tego typu eksperymentów, przesłanek bioetycznych i kosztów. Pozostają zatem historyczne obserwacje, które poczyniono na przestrzeni lat. Wśród tych rozlicznych doniesień na plan pierwszy wysuwa się przykład mieszkańców japońskiej wyspy Okinawy, który od wielu lat fascynuje naukowców. Na podstawie obszernej analizy sporządzonej w latach 70 Kagawa odnotował, że na wyspie tej żyło najwięcej na świecie stulatków, na każde 100 tys. przypadało ich ok. 50 podczas gdy w krajach wysoko uprzemysłowionych było ich 10-20 [59]. W 2006 roku wśród 1,3 mln. mieszkańców żyło 740 stulatków w tym 90% stanowiły kobiety. Mieszkańcy Okinawy oprócz tego, że żyli dłużej to dodatkowo wykazywali zwiększoną jak na swój wiek sprawność fizyczną [59, 60]. Liczba zgonów na skutek udarów, nowotworów i chorób serca była w tej populacji o 35% niższa, a liczba zgonów osób w wieku 60-64 lat o połowę mniejsza niż na innych wyspach Japonii. Kagawa powiązał obserwowany stan rzeczy z ograniczeniem kalorycznym jakiemu poddawani są mieszkańcy Okinawy już od wczesnych lat swojego życia. Ilość kalorii jaką przyjmowały dzieci w wieku szkolnym to 62% dziennej, zalecanej dawki. Dorośli natomiast spożywali o 40% mniej kalorii w stosunku do mieszkańców USA [22, 59]. W badaniach trwających ponad 25 lat, w które zaangażował się

również rząd Japonii, przebadano ludzi powyżej 70 roku życia w tym ponad 900 stulatków. Stwierdzono brak wyraźnych zaburzeń sprawności fizycznej, osoby poddane badaniu odznaczały się szczupłą sylwetką, miały drożne tętnice a tylko w nielicznych przypadkach odnotowano choroby serca czy nowotwory. Dodatkowa analiza uwzględniająca aspekt genetyczny i klimatyczny przeprowadzona przez grupę prof. Suzuki nie wykazała żadnego nietypowego genu występującego tylko w populacji żyjącej na Okinawie, ani niezwykłego składnika mikroklimatu [60]. Przedstawione powyżej dane dotyczyły osób starszych należących do tak zwanego pokolenia powojennego. Niestety, ostatnimi czasy pojawiły się doniesienia świadczące o tym, że Okinawa traci swój wysoki wskaźnik długowieczności. Zadaniem naukowców jest to głównie wynikiem „westernizacji" diety obecnego pokolenia [19].

Kontrolowane badania wpływu restrykcji kalorycznej z udziałem ludzi są nowością a czas ich przeprowadzania jest znacznie ograniczony (maksymalnie 2 lata) [28]. Trudno na ich podstawie określić wpływ restrykcji na długowieczność czy przeżywalność ludzi.

W 1991 roku przeprowadzono eksperyment ekologicznego pod nazwą Biosfera, który jako pierwszy pokazał wpływ restrykcji kalorycznej na niektóre parametry fizjologiczne człowieka. Biosfera była zamkniętym, odizolowanym obszarem, w którym umieszczono 8 osób (cztery kobiety i czterech mężczyzn) na okres 2 lat. W wyniku nieoczekiwanych problemów, które pojawiły się w pierwszej części eksperymentu, uczestnicy poddani zostali przymusowemu ograniczeniu kalorycznemu. Dzienne spożycie kalorii wynosiło 1750-2100 kcal [57]. Dane uzyskane po zakończeniu projektu pokazały, że obniżeniu uległy: wskaźnik masy ciała o 19% dla mężczyzn i 13% dla kobiet; ciśnienie krwi skurczowe o 25% i rozkurczowe o 22%), hormony (np. insulina, obniżona o 42%; T3, obniżona o 19%), parametry biochemiczne (np. poziom cukru we krwi obniżony o 21%; cholesterol obniżony o 30%). Szereg dodatkowych zmian , w tym wartości rT3, kortyzolu, hemoglobiny glikowanej i innych, przypominały wartości u gryzoni lub małp utrzymywanych w reżimie niskokalorycznym [57].

W 2007 roku rozpoczęto kompleksowe badanie w ramach programu CALERIE (Comprehensive Assessment of the Long-term Effects of Reducing Energy Intake). Było to pierwsze, zaprojektowane badanie mające na celu ocenę skutków długotrwałego (6, 12 i 24 miesiące) ograniczenia kalorycznego nieotyłych ludzi. W programie uczestniczyło 3 ośrodki badawcze ze Stanów Zjednoczonych łącznie w badaniu wzięło udział 220 osób (kobiet i mężczyzn) w wieku 21-50 lat [49]. Wykazano, że 2 lata umiarkowanego ograniczenia kalorii (25%) znacznie zmniejszyły wartości kardiometabolicznych czynników ryzyka u młodych, nieotyłych dorosłych. Znacznie poprawił się profil lipidowy surowicy krwi (obniżeniu uległy: wartości LDL, stosunku cholesterolu całkowitego do HDL) i funkcja rozkurczowa serca. Badania te dowodzą, że praktykowanie umiarkowanego ogranicze-

nia kalorii u młodych i zdrowych osób w średnim wieku może przynieść znaczne korzyści dla zdrowia układu sercowo-naczyniowego [28].

Pomimo, że istnieją solidne dane sugerujące, iż restrykcja kaloryczna poprawia zdrowie i może wydłużyć żywotność, trudno jednoznacznie stwierdzić, że jej efekty są uniwersalne. Wykazano, że bardzo duże znaczenie ma min.: tło genetyczne, płeć, rodzaj ograniczenia oraz czas jego rozpoczęcia [14, 38, 43].

JAK RESTRYKCJA KALORYCZNA WPŁYWA NA MECHANIZMY ZWIĄZANE ZE STARZENIEM SIĘ ORGANIZMU?

Obecnie szeroko akceptowaną teorią na temat ograniczenia spożycia kalorii i jego wpływu na długowieczność jest hipoteza hormezy [31, 54]. Termin ten został sformułowany przez Suothama i Ehrlicha w 1943 roku i oznacza zjawisko polegające na tym, że pewne substancje – które podawane są w nadmiarze wywierają szkodliwy efekt, w małych ilościach mogą przynosić korzystne rezultaty [5, 6, 48]. I tak hipoteza hormezy w kontekście restrykcji kalorycznej, zakłada, że obniżenie ilości spożywanych kalorii jest łagodnym czynnikiem stresowym, który wywołuje w organizmie pozytywną odpowiedź obronną. W efekcie zmianie ulega metabolizm – rośnie odporność na stres, co w konsekwencji powoduje zwiększenie długości życia krytycznych dla organizmu komórek. Hipoteza hormezy dotycząca ograniczenia kalorii w diecie wysuwa cztery główne przypuszczenia. Po pierwsze, łagodny czynnik stresowy jakim jest ograniczenie kalorii indukuje sygnalizacyjne szlaki wewnątrzkomórkowe. Szlaki te zaangażowane są w mechanizm obrony komórek i tkanek przed skutkami procesu starzenia (osłabienie procesu apoptozy). Po drugie, regulują metabolizm glukozy, tłuszczów i białek w taki sposób, który zwiększa szanse na przeżycie organizmu w warunkach stresu. Całość mechanizmów zaś podlega kontroli układu hormonalnego i autonomicznego zapewniającym utrzymanie równowagi wewnętrznej organizmu [54].

Badania z ostatnich dwóch dekad dostarczyły wielu szczegółów na temat mechanizmów restrykcji kalorycznej. Ostatnie postępy w technikach bioinformatycznych, analizy zaburzeń genetycznych na poziomie organizmu, znacznie poszerzyły naszą wiedzę na temat mechanizmów molekularnych, które pośredniczą w wydłużeniu długości życia przez interwencje kaloryczne. Ze względu na fakt, że wiele genów i szlaków związanych z procesem starzenia jest w dużej mierze konserwatywne ewolucyjnie, organizmy modelowe takie jak drożdże, nicienie, *D. melanogaster* były kluczowe dla odkryć tych mechanizmów. Obecnie wiadomo, że CR działa poprzez kluczowe metaboliczne szlaki sygnałowe reagujące na składniki odżywcze i stres, w tym sirtuiny, IIS/FOXO, TOR, AMPK, i mitofagię [7, 8, 32, 58] (**Ryc. 1**).

RYCINA 1. Zmiany na poziomie molekularnym i metabolicznym zachodzące w organizmie pod wpływem ograniczenia kalorycznego. mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin kinase*; IIS- ang. *insulin/IGF-1 signaling pathway*; JNK – ang. *c-Jun N-terminal kinase pathway*; ROS – ang. *reactive oxygen species*; TNFα – ang. *tumor necrosis factor α*; AMPK – ang. *AMP-activated protein kinase*; FoxO – ang. *Forkhead box protein O*

FIGURE 1. Changes on the molecular and metabolic level occurring in the body due to caloric restriction. mTOR – mammalian target of rapamycin kinase; IIS- insulin/IGF-1 signaling pathway; JNK – c-Jun N-terminal kinase pathway; ROS – reactive oxygen species; TNFα – tumor necrosis factor α; AMPK – AMP-activated protein kinase; FoxO – Forkhead box protein O

SIRTUINY A RESTRYKCJA KALORYCZNA

Ostatnie odkrycia dowodzą, że mechanizm związany z wpływem ograniczenia kalorycznego na proces starzenia jest efektem działania sirtuin (ang. *silent information regulator,* Sir). Zainteresowanie tymi białkami wzrosło po 1999 roku kiedy to zaobserwowano, że jedno z nich Sir 2 przedłuża życie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o ok. 30% [17]. Wiadomo, że sirtuiny należą do enzymów z rodziny NAD^+ – zależnych deacylaz histonowych (HDAC), co sugeruje, że ich aktywność zależy od stanu metabolicznego komórki [20]. Przypisuje się im udział w takich procesach jak: wyciszanie transkrypcyjne genów, regulacja apoptozy i homeostazy gospodarki lipidowej czy wspomniana powyżej ingerencja w proces starzenia

[29]. U ssaków zidentyfikowano siedem genów *SIRT1-7*, będących homologami odkrytego u drożdży genu *Sir2*. Geny te kodują białka o masie cząsteczkowej od 33,9kDa (SIRT5) do 81,7kDa (SIRT1) [53]. Wszystkie formy charakteryzują się występowaniem domeny wiążącej NAD, umożliwiającą aktywność enzymatyczną. Stanowią element konserwatywnego ewolucyjnie aparatu genetycznej kontroli starzenia, uruchamianego i promującego przeżycie organizmu w niekorzystnych warunkach środowiska. Poszczególne sirtuiny różnią się między sobą rodzajem aktywności, kierunkiem działania i lokalizacją w obrębie komórki (**Tab. 1**). SIRT1 występują w jądrze komórkowym i cytoplazmie, SIRT2 w cytoplazmie, SIRT3, 4, 5 w mitochondriach a SIRT6, 7 występują w jądrze komórkowym [17, 29, 32]. Funkcja enzymatyczna tych białek nie została jeszcze całkowicie zgłębiona. Wiadomo, że substratami dla tych enzymów są m.in.: związane z DNA białka histonowe, odpowiadające za strukturę chromatyny; białko p53, hamujący rozwój nowotworów, określany często mianem strażnika genomu; budujące mikrotubule białko α- tubuliny; syntetaza acetylo-CoA [17, 53]. Odkrycie sirtuin odpowiadających za przebudowę struktury chromatyny i regulację transkrypcji umożliwiło nowe spojrzenie na rozumienie mechanizmu jaki łączy ograniczenie kalorii z wydłużeniem życia. Kolejne doniesienia stanowiły potwierdzenie wcześniejszych obserwacji, ponadto wykazano, że efekt wydłużenia czasu życia w odpowiedzi na restrykcję kaloryczną nie występuje gdy uszkodzone są geny kodujące sirtuiny [4]. Zwiększenie ekspresji tych genów powoduje z kolei wzmocnienie obserwowanego efektu. Ograniczenie kaloryczne powoduje wzrost aktywności sirtuin. Zmniejszenie szybkości metabolizmu i zmiana stanu oksydoredukcyjnego komórek, która wiąże się ze zmianą stosunku NAD^+ /NADH zwiększa pulę wolnych koenzymów NAD^+ i tym samym ich dostępność dla białek SIRT [17, 53]. W 2003 roku Sinclair i współpracownicy wykazali, że na wydłużenie życia u drożdży poza sirtuinami ogromne znaczenie ma również funkcjonalność genu *PNC1*- [2]. Produktem aktywności tego genu jest białko nikotynamidaza PNC1, katalizująca reakcję deaminacji nikotynamidu do kwasu nikotynowego. Nikotynamid poza tym, że jest produktem, to stanowi dodatkowo substancję hamującą deacylację przeprowadzaną przez sirtuiny [2]. Co ciekawe nie zaobserwowano, by podobny efekt wywoływał kwas nikotynowy. Reasumując, obniżenie stężenia nikotynamidu przez PNC1 prowadzi do wzrostu aktywności sirtuin. Teoria ta wydaje się być całkowicie zgodna z przytoczoną powyżej hipotezą hormezy- ograniczenie kaloryczne jako łagodny czynnik stresowy powoduje aktywację białek SIRT przez obniżenie stężenia inhibitorów lub zwiększenie ilości substancji aktywujących te białka [36]. Dodatkowo wiele badań wskazuje sirtuiny jako represory genów biorących udział w adipogenezie i magazynowaniu tłuszczów w komórkach [55]. Według jednej z proponowanych hipotez obserwowany efekt w przypadku restrykcji kalorycznej związany jest bezpośrednio z redukcją ilości tkanki tłuszczowej [44, 53]. Ponadto w proces aktywacji sirtuin zaangażowane są rów-

TABELA 1. Rodzaj, klasa, lokalizacja wewnątrzkomórkowa i funkcja ssaczych sirtuin (opracowano na podstawie [17])
TABLE 1. Type, class, intracellular localization, and function of mammalian sirtuins (based on [17])

	SIRTUINY						
Rodzaj Klasa	**SIRT1** **I**	**SIRT2** **I**	**SIRT3** **I**	**SIRT4** **II**	**SIRT5** **III**	**SIRT6** **IV**	**SIRT7** **IV**
Lokalizacja komórkowa	**jądro komórkowe, cytoplazma**	**cytoplazma**	**mitochondrium**	**mitochondrium**	**mitochondrium**	**jądro komórkowe**	**jądro komórkowe**
Funkcja	- reguluje glukoneogenezę poprzez deacetylację FOXO1 oraz PGC-1α; - reguluje glikolizę poprzez deacetylację HIF-1 (negatywna regulacja); - wpływa na wydzielanie insuliny; - hamuje ekspresję genów związanych z lipogenezą poprzez deacetylację czynnika transkrypcyjnego SREBP-1 i adipogenezą poprzez obniżenie aktywności receptora PPARγ; - bierze udział w naprawie DNA poprzez poliADP-rybozylację;	- nasila glukoneogenezę poprzez deacetylację i aktywację karboksykinazy fosfoenolopiro-gronianowej w warunkach ↓ stężenia glukozy; - hamuje adipogenezę;	- promuje włączenie aminokwasów; - hamuje glikolizę; - jest niezbędna do prawidłowego działania trzustki;	- ogranicza wydzielanie insuliny poprzez zahamowanie działania dehydro genazy glutaminiano-wej (GDH);	- wzmaga glikolizę dzięki aktywności demalonylazy;	- w przebiegu glukoneogenezy działanie przeciwstawne do SIRT1; - regulacja glikolizy poprzez deacetylację HIF-1 (negatywna regulacja); - hamuje adipogenezę; - niezbędna do prawidłowej naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA;	- uczestniczy w procesie naprawy DNA; - w komórkach nowotworowych stabilizuje transformacje poprzez katalizowanie deacetylacji histonu 3; - jest niezbędna do regulacji epigenetycznej i odporności na stres;

nież: insulina i insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGF-1) a dokładnie ich niskie stężenie we krwi. Warto wspomnieć, że istnieje również pogląd, że sirtuiny w szczególności SIRT1 reguluje przetrwanie komórek poprzez wpływ na czynniki indukujące zaprogramowaną śmierć komórki – apoptozę. Do takich zaliczamy czynnik transkrypcyjny O z rodziny forkhead- FoxO uczestniczący w regulacji proliferacji, różnicowania czy apoptozy komórek. SIRT1 katalizuje deacylację FoxO, w wyniku czego przyczynia się do nasilenia procesów związanych z naprawą DNA, poprzez zwiększenie ilości białka GADD45, czy wzmocnienie obrony antyoksydacyjnej [29]. Istnieją przypuszczenia sugerujące, że SIRT1 może korzystnie wpływać na związany z rodziną białek Bcl-2 szlak apoptotyczny. Białka te regulują m.in. przepuszczalność błony mitochondrialnej, jedne wykazują działanie antyapoptotyczne inne zaś promują proces apoptozy. Do drugiej grupy zaliczane jest białko Bax. Białko to podlega regulacji przy udziale czynnika Ku70. SIRT1 deacyluje dwie kluczowe reszty lizyny Ku70 przez co hamuje ten szlak apoptozy [12]. Sirtuiny to enzymy o wielu funkcjach. Biorą udział w licznych procesach komórkowych, regulując metabolizm wielu modelowych organizmów. Substratami dla sirtuin są nie tylko enzymy szlaków metabolicznych, ale również czynniki transkrypcyjne oraz histony. Biorąc zatem pod uwagę ich dużą specyficzność substratową jak i związaną z nimi ingerencję w procesy metaboliczne istnieje przypuszczenie, iż substancje te mogą stać się w niedługiej przyszłości obiecującym, molekularnym celem w terapii wielu chorób wieku podeszłego.

ŚCIEŻKA SYGNAŁOWANIA INSULINA /IGF-1

Według rozlicznych doniesień literaturowych istnieje związek między hormonami a długowiecznością [18]. Najprawdopodobniej dzieje się tak na skutek wzrostu ekspresji niektórych genów związanych m.in. ze szlakiem sygnałowania insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu (IIS). Do genów tych zaliczamy geny kodujące białka IRS 1 i/lub IRS 2 (substrat receptora insulinowego 1 i 2). Białka te ulegają fosforylacji po wcześniejszym związaniu się insuliny ze swoim receptorem zlokalizowanym na powierzchni komórki [37]. Masternak i współpracownicy odnotowali, że zarówno u myszy o fenotypie Ames, które nie wydzielają hormonu wzrostu i wskutek tego mają niski poziom IGF-1 w surowicy, jak i tych o fenotypie dzikim, restrykcja kaloryczna powoduje wzrost ekspresji wspomnianych genów [37].

U gryzoni, u których zastosowano tzw. łagodną 15% lub 40-60% restrykcję kaloryczną zaobserwowano m.in. spadek poziomu hormonu wzrostu (GH), czynnika insulinopodobnego (IGF-1) i insuliny [50]. Substancje te określane są w literaturze mianem biomarkerów restrykcji kalorycznej [22]. Zarówno insulina, insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGF-1) i typu 2 (IGF-2) to m.in. stymulatory podziałów komórkowych, dotyczy to nie tylko komórek fizjologicznych ale również nowotworowych. Poziom wspomnianych czynników we krwi powiązany

jest ściśle z ilością przyjmowanych kalorii. Insulina wydzielana jest przez komórki beta wysp trzustkowych po dostarczeniu pokarmu do organizmu, IGF-1 natomiast jest uwalniany z komórek wątroby pod wpływem hormonu wzrostu. Szlaki sygnałowe uruchamiane przez te czynniki są wysoce konserwatywne i zbieżne. Obniżenie poziomu insuliny we krwi powoduje, że z tkanki tłuszczowej zwiększa się uwalnianie tłuszczu i wydzielanie adiponektyny będącej m.in. czynnikiem uwrażliwiającym komórki na insulinę. Co z kolei skutkuje dalszym obniżaniem poziomu insuliny we krwi [11]. Z molekularnego punktu widzenia wiadomym jest fakt, że na skutek aktywacji szlaku IIS przez hormon wzrostu, czynnik transkrypcyjny FoxO ulega fosforylacji i translokacji z jądra do cytoplazmy, co skutkuje jego unieczynnieniem. W okresie zmniejszonej podaży pożywienia obniża się sygnałowanie szlaku IIS w wyniku czego, czynnik transkrypcyjny FoxO ulega aktywacji przez deacylację w obecności sirtuin, przemieszcza się do jądra gdzie promuje ekspresję genów związanych z długowiecznością [24].

mTOR A OGRANICZENIE KALORYCZNE

Kinaza serynowo – treoninowa (ang. *mammalian target of rapamycin,* mTOR) jest białkiem regulującym tempo wielu istotnych procesów wewnątrzkomórkowych. Występuje w postaci dwóch funkcjonalnie odrębnych kompleksów białkowych: mTORCl (ang. *mammalian target of rapamycin complex 1*) i mTORC2 (ang. *mammalian target of rapamycin complex 2*). W warunkach fizjologicznych mTOR jest głównym regulatorem wzrostu i podziału komórek eukariotycznych w odpowiedzi na czynniki odżywcze (glukozę i aminokwasy), insuinę i czynniki wzrostowe. Poczynając od drożdży a na ssakach kończąc białka TOR są kolejnymi wysoce konserwatywnymi czynnikami. Kompleks mTORCl poprzez fosforylację dwóch najlepiej scharakteryzowanych substratów – kinazy rybosomalnej S6 (ang. *ribosomal protein S6 kinase 1*, S6K1) oraz białka wiążącego eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (ang. *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1,* 4E-BP1) – kontroluje syntezę białek kluczowych dla cyklu komórkowego. Kompleks ten stymuluje również biosyntezę lipidów, hamuje degradację na drodze autofagii i reguluje metabolizm glukozy [41]. Podstawową funkcją kompleksu TORC2 jest organizacja cytoszkieletu [46], jak również udział w aktywacji kinazy Akt – głównego stymulatora kompleksu TORC1 [56]. Pierwsze doniesienia pokazujące, że mTOR może regulować procesy starzenia, pochodzą z badań przeprowadzonych na drożdżach, u których wykazano, że delecja pojedynczego genu kodującego SCH9 (drożdżowy ontolog S6K,) powoduje wydłużenie życie tych organizmów o 50% [15, 34]. Ponadto farmakologiczne zablokowanie szlaku rapamycyną lub sulfaksyminą metioniny znacznie wydłuża chronologiczną długość życia (CLS) czyli czas przeżywalności komórek drożdży w fazie stacjonarnej. Zmniejszone sygnałwanie sprzyja również zwiększeniu odporności na stres organizmów modelowych. U drożdży, nicieni i ssaków mTOR

uznawany jest za negatywny regulator procesu autofagii [23]. W nawiązaniu do badań przeprowadzonych z udziałem myszy stwierdzono, że stosowanie restrykcji kalorycznej znacznie obniża sygnałowanie szlaku mTOR i korzystnie wpływa na wydłużenie długość życia. Warto wspomnieć, że oprócz aminokwasów szlak mTOR jest również regulowany przez stan energetyczny komórki w sposób zależny od kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK).

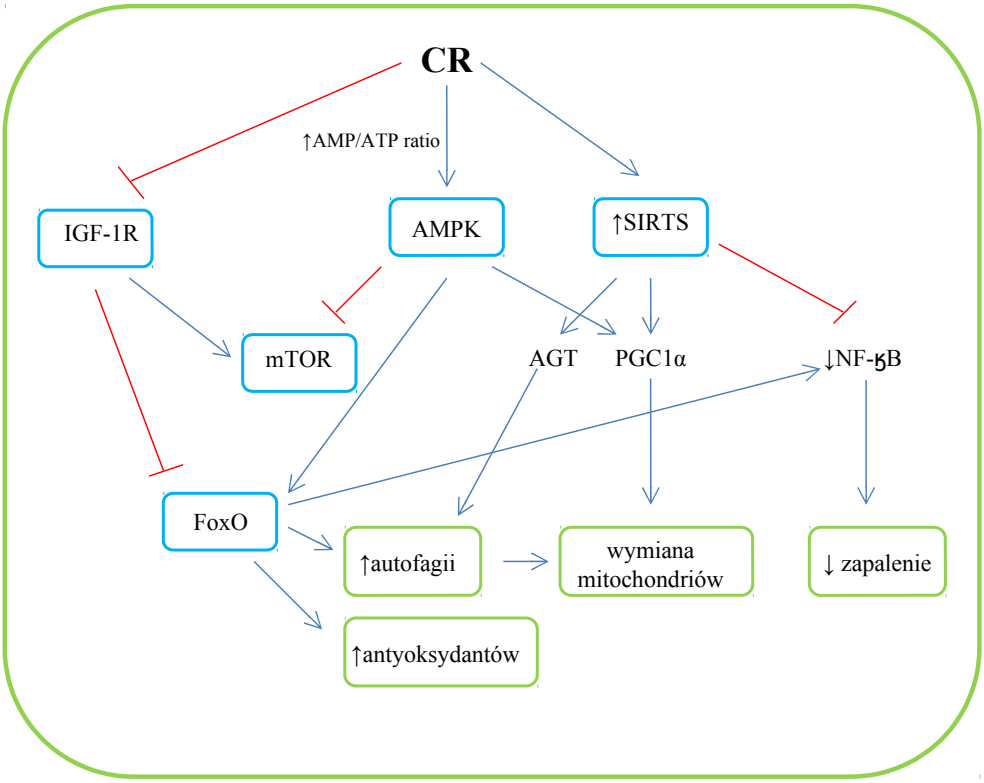
AMPK A RESTRYKCJA KALORYCZNA

AMPK kinaza białkowa aktywowana przez AMP (ang. *AMP-activated protein kinase*) to enzym biorący udział w procesach odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy energetycznej zarówno na poziomie komórkowym jak i całego organizmu u eukariotów. AMPK działa jak czujnik wewnętrznego poziomu fosforanów adenozyny. Jeśli w komórce nie ma niedoboru ATP, stosunek ATP/ADP pozostaje wysoki, a reakcja przebiega z wytworzeniem ADP i obniżeniem poziomu AMP. W takim przypadku wysokie stężenie ATP zapobiega aktywacji AMPK. W przypadku restrykcji kalorycznej stosunek AMP/ATP zmienia się znacznie szybciej niż stosunek ADP/ATP, stąd AMP staje się głównym czynnikiem aktywacji AMPK [33]. U *C.elegans* znaczne ograniczenie podaży glukozy powoduje wydłużenie życia tego organizmu poprzez indukcję oddychania tlenowego w mitochondriach. Co ciekawe wykazano, że zastosowanie restrykcji kalorycznej u nicienia z mutacją w genie *aaak-2*, homologu AMPK, nie wydłuża życia organizmu. Fakt ten świadczy o niezaprzeczalnej roli AMPK w zastosowaniu ograniczenia kalorycznego u *C. elegans*.

U ssaków wykazano, że poprzez ograniczenie spożycia kalorii aktywacji ulega wątrobowa AMPK w wyniku czego znacznie spowalnia glukoneogeneza, natomiast w mięśniach dochodzi do stymulacji wychwytu glukozy poprzez wzrost syntezy jednego z jej transporterów GLUT4 [39].

Jak wspomniano powyżej, kinaza ta jest również znana jako czynnik negatywnie regulujący kompleks mTORC1. Przypuszcza się, że regulacja ta odbywa się na zasadzie co najmniej dwóch odrębnych mechanizmów. Jeden z nich związany jest z pośrednim udziałem AMPK, która aktywuje białko TSC2 (ang. *Tuberous Sclerosis Complex 2*) przez fosforylację jego reszt serynowych. W konsekwencji tego procesu dochodzi do zahamowania szlaku sygnałowania mTOR. Drugi rodzaj reakcji odbywa się na zasadzie bezpośredniego wpływu kinazy na fosforylację składnika kompleksu mTORC1- białka Raptor, co w konsekwencji upośledza przekazywanie sygnały w obrębie szlaku [62] (**Ryc. 2**).

Warto również nadmienić, że indukcja aktywności AMPK pośredniczy w syntezie cytokin przeciwzapalnych. Nadmierna podaż energii promuje przewlekły stan zapalny, który przyczynia się do przyspieszenia procesów związanych ze starzeniem się organizmu, czy też do wystąpienia chorób związanych z wiekiem podeszłym: otyłości, insulinooporności, cukrzycy typu II, miażdżycy [45].



RYCINA 2. Wpływ restrykcji kalorycznej na szlaki sygnałowania komórkowego i czynniki z nimi związane. Niebieskimi strzałkami zaznaczono działanie aktywujące, czerwonymi regulację negatywną. CR – ang. *calorie restriction*; IGF-1R – ang. *insulin-like growth factor 1 receptor*; AMPK – ang. *AMP-activated protein kinase*; SIRTS – ang. *sirtuins*; mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin kinase*; AGT – ang. *autophagy-related proteins*; PGC1α – ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α*; NF-ϰB – ang. *nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells*, FoxO – ang. *Forkhead box protein O*

FIGURE 2. Effect of caloric restriction on cell signaling pathways and factors associated with them. Activating action is marked with blue arrows, negative adjustment with red. CR – calorie restriction; IGF-1R – insulin-like growth factor 1 receptor; AMPK – AMP-activated protein kinase; SIRTS – sirtuins; mTOR – ang. mammalian target of rapamycin kinase; AGT – autophagy-related proteins; PGC1α- peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α; NF-ϰB – nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells, FoxO – Forkhead box protein O

W licznych badaniach dowiedziono, że AMPK jest istotnym, choć pośrednim, regulatorem ścieżki sygnałowej NF-kβ zaangażowanej w odpowiedź immunologiczną organizmu [51].W komórkach mięśni szkieletowych wykazano, że na skutek wzrostu ilości glukozy dochodzi do wzrostu wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS), które z klei promują sygnałowanie szlaku NF-kβ. Dowiedziono tym

samym, że NF-kβ upośledza homeostazę mitochondrialną. Podjednostki budujące ten czynnik transkrypcyjny są regulowane przez m.in.: SIRT1, PGC-1α, p53 czy FoxO czyli białka regulowane przez AMPK [41] (**Ryc. 2**). Co ciekawe, wiadomo, że kinaza ta ma kluczowe znaczenie dla mitofagii – procesu niezbędnego do utrzymania prawidłowej homeostazy energetycznej na poziomie komórkowym. Dzięki mitofagii możliwe jest systematyczne i wydajne usuwanie niesprawnych bądź uszkodzonych mitochondriów. Wiele badań wskazuje, że szybkość usuwania wadliwych mitochondriów obniża szybkość procesów prowadzących do starzenia się komórek [16]. W warunkach stresu energetycznego AMPK reguluje kształt sieci mitochondrialnej. Dzięki AMPK, białko MFF (ang. *mitochondrial fission factor*) będące składnikiem zewnętrznej błony mitochondrialnej, rekrutuje białko DRP1 (ang. *dynamin related protein 1*) pośredniczące we fragmentacji mitochondriów i peroksysomów [25, 42]. Ponadto wykazano, że u ssaków brak AMPK powoduje nadmierną akumulację białka adaptorowego p62/SQSTM1 i wadliwą mitofagię [13]. AMPK jest również niezbędna do rekrutacji kinazy ULK1 do mitochondriów, gdzie dochodzi do fosforylacji białka FUNDC1 będącego receptorem mitofagicznym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dzięki temu procesowi możliwa jest interakcja FUNDC1 i LC3 (białko związane z mikrotubulami (ang. *microtubule-associated protein light chain 3*), prowadząca do mitofagii [61]. Ponadto, AMPK jest niezbędna do aktywacji kompleksu kinazy 3-fosfatydyloinozytolu- PIK3 i kaskady białek ATG, które odgrywają istotną rolę w wydłużaniu i dojrzewaniu autofagosomu. Jednakże, mimo tych wszystkich doniesień, nasza wiedza dotycząca efektu restrykcji kalorycznych na sam proces mitofagii jest ograniczona. Priece i współ. zaobserwowali, że po zastosowaniu restrykcji kalorycznych u myszy, czas połowicznego rozpadu białek mitochondrialnych hepatocytów uległ znacznemu wydłużeniu [47]. Cui odnotował, że ekspresja PINK1 (kinaza indukowana przez fosfatazę PTEN ang. *PTEN induced putative kinase*) w nerkach u szczurów poddanych restrykcji kalorycznej była znacząco obniżona, co może wskazywać na to, że restrykcja łagodzi uszkodzenia mitochondriów. Ponadto, w tym samym badaniu zaobserwowano wzrost ekspresji białka BNIP3 (ang. *Bcl-2/adenovirus E1B-19kDa interacting protein 3*, wcześniej Nip3) inicjującego pierwsze etapy autofagii [40]. Zhao stwierdził, u 8 tygodniowych myszy poddanych restrykcji kalorycznych, znaczny wzrost mitofagii w obszarze serca na skutek wzrostu ekspresji białka DRP1 [63]. Na podstawie nielicznych doniesień można wysunąć jednak wniosek, że interwencje związane z ograniczeniem kalorycznym wpływają na autofagię mitochondriów poprzez wzrost ekspresji markerów tego procesu. Jak widać, powyższe przykłady wskazują, że AMPK jest istotnym czynnikiem związanym z mechanizmami uruchamianymi podczas restrykcji kalorycznych. Wydaje się, że AMPK stanowi kluczowe ogniwo łączące ze sobą szlaki sygnałowania ściśle powiązane z ograniczeniem kalorycznym i długowiecznością.

PODSUMOWANIE

Starzenie, czyli utrata fizjologicznej integralności organizmu prowadząca do upośledzenia funkcji życiowych i znacznej zapadalności na różnego rodzaju schorzenia, jest obecnie jednym z najistotniejszych wyzwań dla świata nauk biologicznych i medycznych. Przytoczone powyżej przykłady po raz kolejny przedstawiają restrykcję kaloryczną jako działanie sprzyjające poprawie zdrowia. Jednakże należy pamiętać, że kolejne badania są niezbędne aby opracować model najbardziej efektywny i w miarę możliwości uniwersalny. Obecne doniesienia pokazują, jak duże znaczenie ma czas, rodzaj interwencji jak również populacja poddana ograniczeniu kalorycznemu. **Rycina 2** przedstawia zbiorcze zestawienie omówionych powyżej czynników, które modulowane są przez ograniczenie kalorii. Wnikliwsze poznanie ich mechanizmów molekularnych, jak również interakcji jakim ulegają wzajemnie mogłoby okazać się przełomem w medycynie, gerontologii i istotnie wpłynąć na poprawę jakości i długości życia.

PODZIĘKOWANIA

Pracę sfinansowano z tematu statutowego Katedry i Zakładu Fizjologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego

LITERATURA

[1] AKHTAR N, HAQQI TM. Current nutraceuticals in the management of osteoarthritis: a review. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012; **4:** 181-207.

[2] ANDERSON RM, BITTERMAN KJ, WOOD JG, MEDVEDIK O, SINCLAIR DA. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. *Nature* 2003; **423**: 181-5.

[3] BARTKE A, MASTERNAK MM, AL-REGAIEY KA, BONKOWSKI MS. Effects of dietary restriction on the expression of insulin-signaling-related genes in long-lived mutant mice. *Interdiscip Top Gerontol* 2007; **35**: 69-82.

[4] BLANDER G, GUARENTE L. The Sir2 family of protein deacylases. *Annu. Rev. Biochem* 2004; **73**: 417-435.

[5] CALABRESE EJ, MATTSON MP. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging Mech Dis* 2017; **3** :13.

[6] CALABRESE EJ. Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; **197**: 125-36.

[7] CANTÓ C, AUWERX J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology* 2011; **26**: 214-24.

[8] CARMONA JJ, MICHAN S. Biology of Healthy Aging and Longevity. *Rev Invest Clin* 2016; **68**: 7-16.

[9] CEFALU WT, WAGNER JD, BELL-FARROW AD, EDWARDS IJ, TERRY JG, WEINDRUCH R, KEMNITZ JW. Influence of caloric restriction on the development of atherosclerosis in nonhuman primates: progress to date. *Toxicol Sci* 1999; **52**: 49-55.
[10] CHAPMAN J, FIELDER E, PASSOS JF. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett* 2019; **593**: 1566-1579.
[11] CHO Y, HONG N, KIM KW, CHO SJ, LEE M, LEE YH, KANG ES, CHA BS, LEE BW.The Effectiveness of Intermittent Fasting to Reduce Body Mass Index and Glucose Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med* 2019; **8**: 1645.
[12] COHEN HY, MILLER C, BITTERMAN KJ, WALL NR, HEKKING B, KESSLER B, HOWITZ KT, GOROSPE M, DE CABO R, SINCLAIR DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; **305**: 390-2.
[13] EGAN DF, SHACKELFORD DB, MIHAYLOVA MM ET AL. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011; **331**: 456-461.
[14] ESCRIVA F, GAVETE ML, FERMIN Y, PEREZ C, GALLARDO N, ALVAREZ C, ANDRES A, ROS M, CARRASCOS JM. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol* 2007; **194**: 131-141.
[15] FABRIZIO P, POZZA F, PLETCHER SD, GENDRON CM, LONGO VD. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 2001; **292**: 288-90.
[16] FIVERSON EM, LAUTRUP S, SUN N, SCHEIBYE- KNUDSEN M, STEVNSNER T, NILSEN H, BOHR VA FANG EF. Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem Int* 2017; **109**: 202-209.
[17] FRYDZIŃSKA Z, OWCZAREK A, WINIARSKA K. Sirtuiny i ich rola w regulacji metabolizmu. *Post Bioch* 2019; **65**: 31-40.
[18] GABEL K, KROEGER CM, TREPANOWSKI JF, HODDY KK, CIENFUEGOS S, KALAM F, VARADY KA.Differential Effects of Alternate-Day Fasting Versus Daily Calorie Restriction on Insulin Resistance. *Obesity*. 2019; **27**: 1443-1450.
[19] GAVRILOVA NS, GAVRILOV LA. Comments on Dietary Restriction, Okinawa Diet and Longevity. *Gerontology* 2012; **58**: 221-223.
[20] GAWECKA A, STACHOWSKA E. Molekularny mechanizm działania restrykcji kalorycznych. *Ann Acad Med Stetin* 2014; **60**: 25-8.
[21] GOODELL MA, RANDO TA. Stem cells and healthy aging. *Science* 2015; **4**: 1199-204.
[22] HEILBRONN LK, RAVUSSIN E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 2003; **78**: 361-9.
[23] HOSOKAWA N, HARA T, KAIZUKA T, KISHI C, TAKAMURA A, MIURA Y, IEMURA S, NATSUME T, TAKEHANA K, YAMADA N, GUAN JL, OSHIRO N, MIZUSHIM N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 1981-91.
[24] HWANGBO DS, LEE HY, ABOZAID LS, MIN KJ. Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. *Nutrients* 2020; **12**: 1194.
[25] JANKIEWICZ J, SZYMAŃSKI J, MICHALSKA D, PATALAS-KRAWCZYK P, MICHALSKA B, DUSZYŃSKI J, GIORGI C, BONORA M, DOBRZYN A, WIECKOWSKI MR. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 332.
[26] KEMNITZ JW. Calorie restriction and aging in nonhuman primates. *ILAR J* 2011; **52** :66-77.
[27] KENYON C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 2005; **25**: 449-60.
[28] KRAUS WE, BHAPKAR M, HUFFMAN KM, PIEPER CF, KRUPA DAS S, REDMAN LM, VILLAREAL DT, ROCHON J, ROBERTS SB, RAVUSSIN E, HOLLOSZY JO, FONTANA L.CALERIE Investigators. 2 years of calorie restriction and cardiometabolic risk (CALERIE): exploratory outcomes of a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019; **7**: 673-683.
[29] KUCIŃSKA M, PIOTROWSKA H, MURIAS M. Sirtuiny- modulacja aktywności jako nowy cel terapeutyczny. *Pol Merk. Lek* 2010; **165**: 231-235.
[30] LANE MA, BLACK A, HANDY A, TILMONT EM, INGRAM DK, ROTH GS. Caloric restriction in primates. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **928**: 287-95.

[31] LE BOURG E. Hormesis, aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**: 1030-9.
[32] LEE SH, LEE JH, LEEHY, MIN KJ. Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Rep* 2019; **52**: 24-34.
[33] LIN SC, HARDIE DG. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab* 2018; **27**: 299-313.
[34] LONGO VD, FABRIZIO P. Chronological aging in Saccharomyces cerevisiae. *Subcell Biochem* 2012; **57**: 101-21.
[35] LÓPEZ-LLUCH G, NAVAS P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol* 2016; **594**: 2043-60.
[36] MASORO EJ. Role of sirtuin proteins in life extention y caloric restriction. *Mech. Agening Dev*. 2004; **125**: 591-594.
[37] MASTERNAK MM, PANICI JA, BONKOWSKI MS, HUGHES LF, BARTKE A. Insulin sensitivity as a key mediator of growth hormone actions on longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; **64**: 516-21.
[38] MATTISON JA, COLMAN RJ, BEASLEY TM, ALLISON DB, KEMNITZ JW, ROTH GS, INGRAM DK, WEINDRUCH R DE CABO R, ANDERSON RM. Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun* 2017; **8**: 14063.
[39] McCARTY MF. Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging. *Med Hypotheses* 2004; **63**: 334-9.
[40] MEHRABANI S, BAGHERNIYA M, ASKARI G, READ MI, SAHEBKAR A.The effect of fasting or calorie restriction on mitophagy induction: a literature review. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2020; **11**: 1447-1458.
[41] MICHALAK A, JARZYNA R. The role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in aging process. *Post Bioch* 2016; **62**: 459-470.
[42] MICHALSKA B, DUSZYŃSKI J, SZYMAŃSKI J. Mechanism of mitochondrial fission – structure and function of Drp1 protein. *Post Bioch* 2016; **62**: 127-137.
[43] MITCHELL SJ, MADRIGAL- MATUTE J, SCHEIBYE-KNUDSEN M, FANG E, AON M, GONZALEZ-REYES JA, CORTASSA S, KAUSHK S, GOZALEZ-FREIRE M, PATEL B, WAHL D, ALI A, CALVO-RUBIO M, BURÓN MI, GUITERREZ V, WARD MT, PALACIOS HH, CAI H, FREDERICK DW, HINE C, ET AL. Effects of sex, strain, and energy intake on hallmarks of aging in mice. *Cell Metab* 2016; **23**: 1093-1112.
[44] NAKAGAWA T, GUARENTE L. SnapShot: sirtuins, NAD, and aging. *Cell Metab*. 2014; **20**: 192-192.
[45] NISR RB, SHAH DS, GANLEY IG, HUNDAL HS. Proinflammatory NFkB signalling promotes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle in response to cellular fuel overloading. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**: 4887-4904.
[46] PAN D, MATSUURA Y.Structures of the pleckstrin homology domain of Saccharomyces cerevisiae Avo1 and its human orthologue Sin1, an essential subunit of TOR complex 2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2012; **68**: 386-92.
[47] PRICE JC, KHAMBATTA CF, LI KW, BRUSS MD, SHANKARAN M, DALIDD M, FLOREANI NA, ROBERTS LS, TURNER SM, HOLMES WE, HELLERSTEIN MK. The effect of long term calorie restriction on in vivo hepatic proteostatis: a novel combination of dynamic and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2012; **11**: 1801-1814.
[48] RATTAN SI. Biogerontology: research status, challenges and opportunities. *Acta Biomed* 2018; **89**: 291-301.
[49] RICKMAN AD, WILLIAMSON DA, MARTIN CK, GILHOOLY CH, STEIN RI, BALES CW, ROBERTS S, DAS SK. The CALERIE Study: design and methods of an innovative 25% caloric restriction intervention. *Contemp Clin Trials* 2011; **32**: 874-81.
[50] ROCHA JS, BONKOWSKI MS, DE FRANCA LR, BARTKE A. Effects of mild calorie restriction on reproduction, plasma parameters and hepatic gene expression in mice with altered GH/IGF-I axis. *Mech Ageing Dev* 2007; **128** :317-31.
[51] SALMINEN A, HYTTINEN JM, KAARNIRANTA K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-κB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med* 2011; **89**: 667-676.

[52] SCHMEER C, KRETZ A, WENGERODT D, STOJILJKOVIC M, WITTE OW. Dissecting Aging and Senescence-Current Concepts and Open Lessons. *Cells* 2019; **8**: 1446.
[53] SIEDLECKA K, BOGUSŁAWSKI W. Sirtuiny- enzymy długowieczności? *Gerontologia Polska* 2005; **13**: 147-152.
[54] SINCLAIR DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**: 987-1002.
[55] SONG J, LI J, YANG F, NING G, ZHEN L, WU L, ZHENG Y, ZHANG Q, LIN D, XIE C, PENG L. Nicotinamide mononucleotide promotes osteogenesis and reduces adipogenesis by regulating mesenchymal stromal cells via the SIRT1 pathway in aged bone marrow. *Cell Death Dis* 2019; **10**: 336.
[56] SWIECH L, PERYCZ M, MILIK A, JAWORSKI J.Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1784**: 116-32.
[57] WALFORD RL, HARRIS SB, GUNION MW.The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 11533-7.
[58] WEICHHART T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology* 2018; **64**: 127-134.
[59] WILLCOX DC, WILLCOX BJ, TODORIKI H, CURB JD, SUZUKI M. Caloric restriction and human longevity: what can we learn from the Okinawans? *Biogerontology* 2006; **7**: 173-7.
[60] WILLCOX DC, WILLCOX BJ, TODOROKI H, SUZUKI M. The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. *J Am Coll Nutr* 2009; **28**: 500-516.
[61] WU W, TIAN W, HU Z, CHEN G, HUANG L, LI W, ZHANG X, XUE P, ZHOU CH, LIU L, ZHU Y, ZHANG X, LI LONGXUAN, ZHANG L, SUI S, ZHAO B, FENG D. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy. *EMBO Rep* 2014; **15**: 566-575.
[62] XU J, JI J, YAN XH. Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012; **52**: 373-81.
[63] ZHAO Y, ZHU Q, SONG W, GAO B. Exercise training and dietary restriction affect PINK1/Parkin and Bnip3/Nix-mediated cardiac mitophagy in mice. *Gen Physiol Biophys* 2018; **37**: 657-666.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 04.10.2021
Przyjęto: 26.10.2021
Katarzyna Zgutka
Katedra i Zakład Fizjologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin
tel.: 091-466-16-24
e-mail: katgrymula@tlen.pl

INFORMACJE

INFORMACJA o dostępności pełnych artykułów publikowanych w PBK oraz publikacji elektronicznej

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

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

Cena prenumeraty rocznika wynosi	na rok 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) 1 str.
Cena zł	1500,00	50,00

Do ceny należy doliczyć 8% VAT.

ERRATA

MAMMALIAN OVIDUCTAL EPITHELIAL CELL CULTURE – FUNCTIONAL AND METHODOLOGICAL ASPECTS
Wiesława Kranc, Adrian Chachuła, Sylwia Ciesiółka, Sylwia Borys, Dominika Kaźmierczak, Maciej Jankowski, Małgorzata Bruska, Bartosz Kempisty
Postępy Biologii Komórki 2016, tom 43 nr 2 str. 181-188

Jest:

ACKNOWLEDGEMENTS

Publication of this article was made possible by grant number 2014/13/D/ NZ9/ 04798 "SONATA" from Polish National Centre of Science

Powinno być:

ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable

WYBRANE ASPEKTY WZROSTU I RÓŻNICOWANIA SIĘ KOMÓREK BŁONY ŚLUZOWEJ MACICY SSAKÓW W WARUNKACH HODOWLI PIERWOTNEJ IN VITRO
Katarzyna WojtanowiczMarkiewicz, Bartosz Kempisty, Wiesława Kranc, Marta Dyszkiewicz-Konwińska, Joanna Budna, Sylwia Ciesiółka, Małgorzata Bruska, Michał Nowicki, Paweł Antosik
Postępy Biologii Komórki 2016, tom 43 nr 3 str. 441-452

Jest:

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana w ramach grantu „Sonata" z Narodowego Centrum Nauki (2014/13/D/NZ9/04798)

Powinno być:

PODZIĘKOWANIA

Nie dotyczy

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

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

Sposób przygotowania artykułów:

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

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

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

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

Odpłatność (kwoty brutto)

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

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

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

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

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

TREŚĆ – CONTENTS

ADAMCZYK M., RAJEWSKI M., KĘDZIA M., WENDER-OŻEGOWSKA E.: 185
Ocena wpływu dysfunkcji endometrium na zaburzenie procesu implantacji u kobiet z niepłodnością i endometriozą
Assessment of impact of endometrial dysfunction on disturbance of implantation process in women with infertility and endometriosis

ŁAZAREWICZ N., BŁASZCZAK E.: 197
Różne oblicza ubikwitynacji
The many faces of ubiquitination

BORZDZIŁOWSKA P., BEDNAREK I.: 217
Egzosomy jako jeden z elementów mikrośrodowiska
Exosomes as one of the elements of the microenvironment

KLIMCZAK A., PATELSKI M., TRELA P., FLUR T., PIETRZAK B., CZAPLA M., BLIDA SZ.: 231
Rola wybranych czynników regulujących angiogenezę w rozwoju i przebiegu rdzeniaka zarodkowego
The role of selected proangiogenic factors in growth and development of medulloblastoma

ZGUTKA K., PIOTROWSKA K.: 249
Ograniczenie kaloryczne a proces starzenia się organizmu
Caloric restriction and aiging process

Informacje 265

Errata 267

Indeks 369705