

Postępy w Badaniach Biomedycznych
– wybrane zagadnienia

Postępy w Badaniach Biomedycznych **– wybrane zagadnienia**

Redakcja:
Izabela Młynarczuk-Biały
Łukasz Biały

Lublin 2018

Recenzenci:

- prof. dr hab. n. farm. Jolanta Rzymowska
- dr hab. Małgorzata Krzystek-Korpacka
- dr hab. Anna Sierosławska
- dr n. med. Patrycja Chylińska-Wrzos
- dr Monika Jach
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr n. med. Paweł Kiciński

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie
Monika Maciąg

Projekt okładki
Marcin Szklarczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-65932-56-3

Wydawca
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Wstęp	7
Markery nowotworowe i wybrane metody ich oznaczeń	9
Wybrane składniki błony podstawnej i ich związek z procesem nowotworzenia	23
Rola aktywacji receptorów estrogenowych i szlaków Erk/Akt w etiologii glejaków	35
Analiza porównawcza ekspresji genów <i>MMP2</i> i <i>TIMP3</i> w niedrobnokomórkowym raku płuca	43
Aktywność ścieżki sygnałowej NF- κ B pod wpływem LPS i TNF wybranych ludzkich liniach komórkowych	56
Rola egzosomów wydzielanych przez mezenchymalne komórki macierzyste w interakcjach międzykomórkowych	78
Lipotoksyczność oraz przewlekłe zapalenie jako powód dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i zaburzenia procesu angiogenezy w zespole metabolicznym	88
Zróżnicowanie w budowie i funkcji naczyń limfatycznych; odniesienie do zespołu metabolicznego i chorób sercowo-naczyniowych	100
Rola śródbłonna hemogennego w hematopoezie zarodkowej i płodowej	121
Melatonina i jej rola w procesie różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych	139
Zastosowanie komórek macierzystych miazgi zęba w regeneracji tkanki nerwowej	150
Rola kalprotektyny w diagnostyce zakażeń układu pokarmowego	164
Fenotypowa i genetyczna ocena oporności na antybiotyki aminoglikozydowe klinicznych szczepów <i>Staphylococcus epidermidis</i>	172
Biologia spor <i>Clostridium</i> spp.	185
Indeks autorów	197

Wstęp

Monografia, która trzymacie Państwo w ręce, jest owocem spotkań i wyteżonej pracy młodych naukowców z różnych szkół wyższych i instytutów w Polsce. Spotkania te odbywają się w Warszawie już od 9 lat pod auspicjami Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego a od 2 lat także Oddziału Warszawskiego Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików.

W monografii przedstawiamy najważniejsze tematy w badaniach biomedycznych z 2017 roku. Wszystkie prezentowane prace przeszły pozytywnie proces peer-review. Prace te pochodzą z różnych dziedzin biomedycyny od biologii medycznej przez biofizykę aż po nauki kliniczne.

Życząc miłej i owocnej lektury

Izabela Młynarczuk-Biały
Łukasz Biały

Markery nowotworowe i wybrane metody ich oznaczeń

Beata Szymańska¹, Ewa Gorodkiewicz²

¹Zakład Elektrochemii, Instytutu Chemii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym, Uniwersytet w Białymstoku.

²Zakład Elektrochemii, Instytutu Chemii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Ciołkowskiego 1K 15-245 Białystok, ewka@uwb.edu.pl

Streszczenie

W XXI wieku choroby nowotworowe nadal są zaliczane do grupy najczęściej nieuleczalnych schorzeń u człowieka. Aby poprawić rokowania badanych pacjentów coraz większa grupa naukowców skupia się na analizowaniu coraz szerszej liczby substancji aktywnych, które zaliczane są później do tzw. biomarkerów.

Biomarkery to wskaźniki procesów fizjologicznych lub chorobowych, których stężenie rośnie wraz z rozwojem nowotworu lub innego schorzenia. Często używane są także do oceny stopnia odpowiedzi organizmu na zastosowane leczenie farmakologiczne.

Markery nowotworowe to związki, których wzrost stężenia w organizmie człowieka świadczy o rozwoju choroby. Do markerów nowotworowych możemy zaliczyć nie tylko substancje produkowane przez komórki nowotworowe np. białka, hormony czy enzymy ale również te wytwarzane przez zdrowe komórki. Podczas regularnego oznaczania poziomu stężenia podstawowych markerów nowotworowych u chorego możemy ocenić radykalność jego leczenia chirurgicznego ale także możliwości wystąpienia nawrotu choroby czy powstania przerzutów. Do najczęściej oznaczanych markerów nowotworowych należą: CEA, PSA, hCG, AFP, CA125. Dużą grupę związków stanowią także inne substancje aktywne, które w ostatnim czasie są szeroko badane przez naukowców. Ich podwyższone stężenie w organizmie pacjenta również może świadczyć o początku rozwoju procesu onkogenezy. Takie związki nazywane są w literaturze potencjalnymi markerami nowotworowymi np. laminina-5, immunoproteasom, IL-6, YKL-40.

Do metod analitycznych pozwalających na oznaczenie poziomu potencjalnych jak i już komercyjnie oznaczanych markerów nowotworowych możemy zaliczyć: testy immunohistochemiczne i immunoenzymatyczne, metodę radioimmunologiczną oraz radioimmunometryczną ale także spektrometrię mas, macierze białkowe czy Powierzchniowy Rezonans Plazmonów w wersji Imaging.

Abstract

In the 21st century, malignant diseases continue to be classified as a group of the most incurable human diseases. To improve the prognosis of patients, an increasing number of researchers are focusing on analyzing an ever-increasing number of active substances that are later classified as biomarkers.

Biomarkers are indicators of physiological or disease processes whose concentration increases with the development of a tumor or other disease. They are also often used to assess the level of response of the body to the pharmacological treatment.

Cancer markers are compounds that increase the concentration in the human body testifies to the development of the most common cancer. Tumor markers can include not only substances produced by cancer cells, such as proteins, hormones or enzymes but also those produced by healthy cells. Regular assessment of the level of primary tumor markers in a patient can evaluate the radicality of his or her surgical treatment, but also the possibility of relapse or metastasis. The most commonly identified tumor markers are CEA, PSA, hCG, AFP, CA125. A large group of compounds are also active substances, which have recently been widely studied by scientists. Their elevated concentration in the patient's body also may indicate the beginning of oncogenesis development. Such compounds are referred to in the literature as potential tumor markers eg laminin-5, immunoproteasome, IL-6, YKL-40. Analytical methods for the determination of levels of potential and already commercially available cancer markers include immunohistochemistry and immunoenzymatic assays, radioimmunoassay and radioimmunometric methods, but also mass spectrometry, protein matrixes and Surface Plasmon Resonance Imaging.

Wprowadzenie

W dzisiejszych czasach, gdy rozwój metod diagnostycznych i terapeutycznych jest na bardzo wysokim poziomie, nadal obserwujemy znaczny wzrost zachorowalności na nowotwory. Niestety umieralność z powodu tych schorzeń jest ciągle zmurą naszej cywilizacji. W samej Polsce w wielu przypadkach choroba nowotworowa rozpoznawana jest już w tak późnym stadium, że wyklucza się skuteczne leczenie. Dlatego wielu naukowców dąży do wykrycia takich substancji i opracowania takich metod badawczych, które pozwolą na znacznie szybszą diagnozę pacjentów oraz lepszą ocenę stanu zaawansowania choroby. Obecnie w diagnostyce oznaczanie markerów nowotworowych pełni wyłącznie funkcję wspomagającą. Szersze zastosowanie ma ocena tych znaczników w procesie leczniczym i w trakcie długoterminowej obserwacji pacjentów po leczeniu.

Biomarkery zaliczamy do cech biologicznych, które mają zazwyczaj charakter cząsteczkowy. Są one wykorzystywane jako wskaźniki procesów fizjologicznych lub chorobowych, które zachodzą w naszym organizmie. W niektórych przypadkach biomarkery używane są również do oceny stopnia odpowiedzi organizmu na zastosowane leczenie farmakologiczne. Aby zwiększyć szansę chorego pacjenta na całkowite wyleczenie trzeba jak najszybciej wykryć stężenie biomarkera znacząco odbiegające od normalnego poziomu. Cennym źródłem informacji o biomarkerach jest osocze, gdyż jest zbiorem ludzkich białek. Ponadto pobieranie osocza jest zabiegiem szybkim, mało kosztownym a otrzymane próbki można łatwo przechowywać i poddawać obróbce (Płodzich, 2013).

Markery nowotworowe to substancje, których najczęściej podwyższone stężenie w organizmie świadczy o rozpoczęciu procesu onkogenezy. Do markerów nowotworowych możemy zaliczyć nie tylko substancję produkowane przez komórki nowotworowe np. hormony, enzymy czy inne białka, ale również te wytwarzane przez zdrowe komórki (Glas, Roos et al. 2003). Najczęściej markery chorób nowotworowych oznacza się na podstawie badania krwi, ale w wielu przypadkach wykorzystuje się również próbki moczu czy homogenaty tkanek. Regularny pomiar stężenia podstawowych markerów nowotworowych u chorego pozwala na ocenę radykalności leczenia chirurgicznego ale także możliwości wystąpienia nawrotu choroby czy powstania przerzutów (Pietrowska, 2009, Soborczyk, Deptała, 2007).

Najczęściej oznaczane markery nowotworowe

Według doniesień literaturowych pierwsze markery nowotworowe zostały odkryte ponad 40 lat temu. Posiłkując się pierwszymi pracami naukowymi nad budową i znaczeniem markerów stwierdzono, że każdy typ guza ma specyficzną dla siebie substancję markerową. Niestety późniejsze badania wykazały, że dany rodzaj nowotworu może wydzielać kilka markerów. W Tabeli 1. przedstawiono najczęściej oznaczane markery nowotworowe w naszym organizmie, typ nowotworu któremu odpowiadają oraz metodę jego oznaczania.

Tabela 1. Zestawienie najczęściej oznaczanych markerów nowotworowych, typy schorzeń nowotworowych charakterystycznych dla opisanych markerów oraz metody oznaczania tych związków.

Przykłady markerów nowotworowych	Typy nowotworów	Metody oznaczania markera nowotworowego	Literatura
CA 125 (Antygen nowotworowy CA 125)	Nowotwór: jajnika, trzustki i dróg żółciowych, nerki, płuca.	Test ELISA	(Kotowicz , Fuksiewicz, 2013, Pietrowska,2009)
CA 72-4 (Antygen nowotworowy CA 72-4)	Nowotwór: jajnika, żołądka, jelita grubego wysięk opłucnowy.	Technika radioimmunologiczna (RIA) Test ELISA	(Pietrowska,2009, Carpelan- Holmström , Louhimo et al. 2002)
CA 19-9 (Antygen nowotworowy CA 19-9)	Nowotwór trzustki, jelita grubego wysięk opłucnowy.	Metoda radioimmunometrycz-na (IRMA) Technika radioimmunologiczna (RIA)	(Halm , Schumann et al. 2000, Ucar, Semerci et al. 2008)
AFP (Alfa feto proteina)	Nowotwór: jajnika, wątroby, jąder.	Test ELISA, Immunohistochemia	(Liu, Feng, 2015, Wu , Fu et al. 2007)
HCG (Gonadotropina kosmówkowa)	Nowotwór: jajnika, jąder.	Immunohistochemia Test ELISA	(Pietrowska,2009 Wu , Fu et al. 2007)
CEA (Antygen karcinoembrionalny)	Nowotwór: piersi, trzustki i dróg żółciowych, żołądka, płuc, pęcherza moczowego.	Technika radioimmunologiczna (RIA), Test ELISA, Immunohistochemia Metoda chemiluminescencji	(Shingo ., Hirofumi et al. 2002, Chmura, Wojcieszek et al. 2009, Liu, Feng et al. 2015, Wu , Fu et al. 2007)
PSA (Swoisty antygen gruczołu krokowego)	Nowotwór: prostaty.	Test ELISA Immunohistochemia	(Varma , Berney et al. 2004)
Galektyna-3	Nowotwór: brodawkowaty tarczycy.	Immunohistochemia	(Nikiel, Chekan et al. 2006)
TPA (Poliptydowy antygen tkankowy)	Nowotwór: jajnika, piersi, trzustki i dróg żółciowych, okrężnicy i odbytnicy, wątroby, jąder lub prostaty.	Technika radioimmunologiczna (RIA)	(Pietrowska, 2009)
CA 50 (Antygen nowotworowy CA 50)	Nowotwór: brodawkowaty tarczycy, pęcherza moczowego, piersi.	Immunohistochemia Metoda radioimmunometryczna (IRMA)	(Nikiel, Chekan et al. 2006, Ucar, Semerci et al. 2008, Pietrowska, 2009)
Mono Total	Nowotwór: płuc	Metoda radioimmunometryczna (IRMA)	(Wójcik, Tarapacz et al. 2009)
Cytokeratyna 19, ferrytyna	Nowotwór: płuc	Metoda chemiluminescencji	(Załęska, Szturmowicz et al. 2010)

Substancje aktywne jako potencjalne markery nowotworowe

W naszym organizmie istnieje także szereg substancji aktywnych, których podwyższona lub znikoma zawartość w płynach ustrojowych człowieka może świadczyć o rozwoju poważnych schorzeń również nowotworu. Świadczy o tym coraz większe zainteresowanie naukowców takimi substancjami jak np. cytokiny. W czasie rozwoju nowotworu dochodzi do niekontrolowanej nadekspresji genów cytokin i ich receptorów co skutkuje ich zwiększoną syntezą w komórkach. W Tabeli 2 podano przykładowe cytokiny oraz inne substancje aktywne, które mogą w przyszłości pełnić rolę markerów nowotworowych.

Tabela 2. Zestawienie przykładowych związków aktywnych jako potencjalnych markerów nowotworowych.

Substancje aktywne jako potencjalne markery nowotworowe	Typy nowotworów, którym odpowiada dana substancja	Metody oznaczania potencjalnego markera nowotworowego	Literatura
IL-6 (Interleukina 6)	Nowotwór: żołądka. płuc		(Kim, Song et al. 2003, Adachy, Aoki et al. 2006)
VEGF (Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego)	Nowotwór: płuc żołądka.	Test ELISA Test ELISA Technika radioimmunologiczna (RIA)	(Kim, Song et al. 2003, Adachy, Aoki et al. 2006)
YKL-40 (Białko sekrecyjne z rodziny chityna)	Nowotwór: szyjki macicy marskość wątroby czerniak płuc glejnak	Immunohistochemia	(Tanwar , Gilbert et al. 2002 Rusak , Jabłońska et al. 2016)
IGF2 (Insulinopodobny czynnik wzrostu)	Nowotwór: jajnika.		(Bystrom, Sheng et al. 2012, Thomas, Kohler et al. 2011)
SCC (Antygen raka płaskonabłonkowego)	Nowotwór: szyjki macicy	Spektrometria mas Metoda chemiluminescencji Technika SPRI Technika radioimmunologiczna (RIA)	(Chmura, Wojcieszek et al. 2009)
Kolagen IV	Nowotwór: pęcherza moczowego, piersi, prostaty.		(Sankiewicz, Łukaszeński et al. 2016, Kalluri, Zeisberg 2006)

Proteasom/immunoproteasom	Nowotwór: Ostra białaczka limfoblastyczna Pęcherza moczowego	Technika SPRI Immunohistochemia	(Gorodkiewicz, Ostrowska et al. 2011, Sankiewicz, Łukaszewski et al. 2016)
Laminina-5	Nowotwór: pęcherza moczowego, piersi, prostaty.	Technika SPRI Test ELISA	(Sankiewicz, Romanowicz et al. 2016)
MMP-1 (Metaloproteinaza macierzy 1) Substancje aktywne jako potencjalne markery nowotworowe	Nowotwór: pęcherza moczowego, prostaty. Typy nowotworów, którym odpowiada dana substancja	Test ELISA Technika SPRI Metody oznaczania potencjalnego markera nowotworowego	(Mor, Visintin et al. 2005, Tokarzewicz, Romanowicz et al. 2016) Literatura (Kim, Song et al. 2003,
IL-6 (Interleukina 6)	Nowotwór: żołądka. płuc	Test ELISA	Adachy, Aoki et al. 2006)
VEGF (Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego)	Nowotwór: płuc żołądka.	Test ELISA	(Kim, Song et al. 2003, Adachy, Aoki et al. 2006)
YKL-40 (Białko sekrecyjne z rodziny chityna)	Nowotwór: szyjki macicy marskość wątroby czerniak płuc glejak	Technika radioimmunologiczna (RIA) Immunohistochemia Spektrometria mas	(Tanwar , Gilbert et al. 2002 Rusak , Jabłońska et al. 2016) (Bystrom, Sheng et al. 2012, Thomas, Kohler et al. 2011)
IGF2 (Insulinopodobny czynnik wzrostu)	Nowotwór: jajnika.		
SCC (Antygen raka płaskonabłonkowego)	Nowotwór: szyjki macicy	Metoda chemiluminescencji Technika SPRI Technika radioimmunologiczna (RIA)	(Chmura, Wojcieszek et al. 2009) (Sankiewicz, Łukaszewski et al. 2016, Kalluri, Zeisberg 2006)
Kolagen IV	Nowotwór: pęcherza moczowego, piersi, prostaty.		
Proteasom/immunoproteasom Laminina-5 MMP-1 (Metaloproteinaza macierzy 1) Substancje aktywne jako potencjalne markery nowotworowe	Nowotwór: Ostra białaczka limfoblastyczna Pęcherza moczowego Nowotwór: pęcherza moczowego, piersi, prostaty. Nowotwór: pęcherza moczowego, prostaty. Typy nowotworów, którym odpowiada dana substancja	Technika SPRI Immunohistochemia Technika SPRI Test ELISA Test ELISA Technika SPRI Metody oznaczania potencjalnego markera nowotworowego	(Gorodkiewicz, Ostrowska et al. 2011, Sankiewicz, Łukaszewski et al. 2016) (Sankiewicz, Romanowicz et al. 2016) (Mor, Visintin et al. 2005, Tokarzewicz, Romanowicz et al. 2016) Literatura

<p>IL-6 (Interleukina 6) VEGF (Czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego) YKL-40 (Białko sekrecyjne z rodziny chityna) IGF2 (Insulinopodobny czynnik wzrostu) SCC (Antygen raka płaskonabłonkowego)</p>	<p>Nowotwór: żołądka. płuc Nowotwór: płuc żołądka. Nowotwór: szyjki macicy marskość wątroby czerniak płuc glejak Nowotwór: jajnika. Nowotwór: szyjki macicy</p>	<p>Test ELISA Test ELISA Technika radioimmunologiczna (RIA) Immunohistochemia Spektrometria mas Metoda chemiluminescencji</p>	<p>(Kim, Song et al. 2003, Adachy, Aoki et al. 2006) (Kim, Song et al. 2003, Adachy, Aoki et al. 2006) (Tanwar , Gilbert et al. 2002 Rusak , Jabłońska et al. 2016) (Bystrom, Sheng et al. 2012, Thomas, Kohler et al. 2011) (Chmura, Wojcieszek et al. 2009)</p>
<p>Kolagen IV Proteasom/immunoproteasom Laminina-5 MMP-1 (Metaloproteinaza macierzy 1)</p>	<p>Nowotwór: pęcherza moczowego, piersi, prostaty. Nowotwór: Ostra białaczka limfoblastyczna Pęcherza moczowego Nowotwór: pęcherza moczowego, piersi, prostaty. Nowotwór: pęcherza moczowego, prostaty.</p>	<p>Technika SPRI Technika radioimmunologiczna (RIA) Technika SPRI Immunohistochemia Technika SPRI Test ELISA Test ELISA Technika SPRI</p>	<p>(Sankiewicz, Łukaszewski et al. 2016, Kalluri, Zeisberg 2006) (Gorodkiewicz, Ostrowska et al. 2011, Sankiewicz, Łukaszewski et al. 2016) (Sankiewicz, Romanowicz et al. 2016) (Mor, Visintin et al. 2005, Tokarzewicz, Romanowicz et al. 2016)</p>
<p>Substancje aktywne jako potencjalne markery nowotworowe IL-6 (Interleukina 6) VEGF (Czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego)</p>	<p>Typy nowotworów, którym odpowiada dana substancja Nowotwór: żołądka. płuc Nowotwór: płuc żołądka.</p>	<p>Metody oznaczania potencjalnego markera nowotworowego Test ELISA Test ELISA</p>	<p>Literatura (Kim, Song et al. 2003, Adachy, Aoki et al. 2006) (Kim, Song et al. 2003, Adachy, Aoki et al. 2006)</p>

Podstawowe metody oznaczania potencjalnych jak i terapeutycznie stosowanych markerów nowotworowych:

Proteomika jest jedną z dziedzin badań naukowych pozwalających na monitorowanie czynności wybranego narządu lub całego organizmu ludzkiego. Jest to dziedzina nauki zajmująca się analizą proteomu czyli komponentu białkowego kodowanego przez genom. Według definicji sam proteom jest to grupa białek występujących w komórce, tkance czy organizmie w określonym czasie (Płodziech,

2013). Na podstawie obecnych doniesień literaturowych proteomika definiowana jest jako nauka umożliwiająca identyfikację, opisanie oraz oznaczenie ilościowe wszystkich białek biorących udział w określonych szlakach biochemicznych. Eksperymenty przeprowadzane w ramach badań proteomicznych dostarczają bardzo dokładnych i kompleksowych informacji na temat funkcjonowania danego organizmu. Jednak analiza proteomu jest o wiele bardziej skomplikowana niż analiza genomu (Pietrowska, 2009).

Immunohistochemia

Immunohistochemia należy do grupy testów diagnostycznych udzielających nam informacji o obecności danego antygeny w badanej tkance pacjenta oraz o jego ewentualnym położeniu w organizmie człowieka (Walker, 2004).

Dzięki pobraniu od chorego pacjenta wycinków tkanek, ich inkubacji w obecności określonych przeciwciał a następnie obserwacji osadów barwnika pod mikroskopem możemy stwierdzić gdzie doszło do rozpoznania badanego antygeny. Istnieje kilka odmian reakcji immunohistochemicznych takich jak: reakcja pośrednia i bezpośrednia, reakcja z awidyną i biotyną.

Reakcja bezpośrednia przebiega poprzez inkubację tkanki chorego pacjenta, w której obecny jest antygen A. Jest on następnie znakowany odpowiednim przeciwciałem. Produktem tej reakcji jest kompleks antygen-przeciwciało, który można obserwować pod mikroskopem. Reakcja jest prosta w analizie, ma natomiast zasadniczą wadę; połączenie chemiczne przeciwciała ze znacznikiem przebiega na zasadzie wiązania kowalencyjnego, które powoduje deformacje kształtu cząsteczki przeciwciała (Wu, Fu et al. 2007).

W przypadku reakcji pośredniej analiza badanego materiału jest bardziej złożoną i trudniejszą do wykonania reakcją immunohistochemiczną. Ma jedną zasadniczą zaletę; w reakcji pośredniej przeciwciało, które łączy się z badanym antygenem nie jest znakowane, co wyklucza powstanie zmian w strukturze cząsteczki przeciwciała (Fedchenko, Reifenrath, 2014).

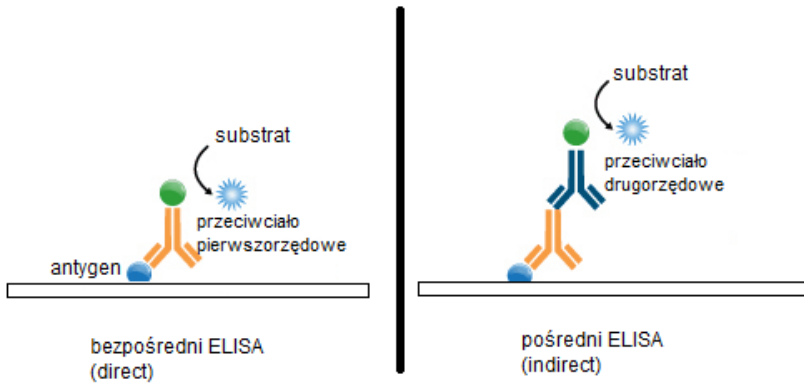
Reakcja z awidyną i biotyną nie jest w pełni reakcją immunologiczną. Jej mechanizm przypomina jednak reakcje immunohistochemiczne. Opiera się ona na wykorzystaniu trwałego i bardzo swoistego połączenia, które tworzy się pomiędzy awidyną, glikoproteidem, a biotyną, niskocząsteczkową witaminą H wyodrębnioną z żółtka. Jedna cząsteczka awidyny łączy się z 4 cząsteczkami biotyny. Biotynę można przyłączyć na drodze chemicznej z przeciwciałami (Badowska-Kozakiewicz, 2013).

Za pomocą metody immunohistochemicznej oznaczano takie markery nowotworowe jak: CEA, AFP, PSA hCG. Przy oznaczaniu tych markerów zastosowano dwustopniową metodę immunoperoksydazową z kompleksem EnVision+™/HRP oraz przeciwciała poli- i monoklonalne.

Test immunoenzymatyczny (ELISA)

Test immunoenzymatyczny jest jedną z najważniejszych, najczulszych i najczęściej wykorzystywanych metod diagnostycznych. Dzięki testowi ELISA można oznaczyć stężenie danego antygeny w próbce pochodzącej od pacjenta. W przypadku standardowych testów takich jak immunohistochemia jednorazowo oznacza się tylko jedną próbkę. W przypadku metody ELISA jednocześnie możemy

oznaczać bardzo dużą liczbę próbek (Scholler, Crawford et al. 2006). Metodę można również bardzo łatwo zautomatyzować. Możemy wyróżnić kilkadziesiąt odmian testu ELISA. Wszystkie opierają się jednak na dość podobnych zasadach. Do dwóch najważniejszych odmian możemy zaliczyć testy bezpośrednie i pośrednie. Test ELISA wykorzystywany jest do oznaczania białek w próbkach przy użyciu przeciwciał poli- i monoklonalnych połączonych z odpowiednim enzymem. Ideą tego testu jest związanie przeciwciała z danym enzymem, które może specyficznie rozpoznać dane białko obecne w badanej próbce. Następnie dochodzi do utworzenia kompleksu przeciwciało- antygen. Po wypłukaniu resztek przeciwciała dodaje się substrat dla enzymu połączonego z przeciwciałem i zachodzi reakcja enzymatyczna. Cały pomiar ma charakter ilościowy (Mor, Visintin et al. 2005) . Na Rycinie 1 przedstawiono schemat przebiegu reakcji immunoenzymatycznej pośredniej i bezpośredniej dla określonego antygeny.



Rycina 1. Schemat idealowy przebiegu reakcji immunoenzymatycznej dla dwóch podstawowych rodzajów testu ELISA bezpośredniego i pośredniego [opracowanie własne]

Testy ELISA są wykorzystywane do oznaczania markerów nowotworowych m.in. CA-125, CA 72-4, AFP, PSA.

Metoda radioimmunologiczna (RIA)

RIA to metoda immunochemiczna bazująca na wykrywaniu reakcji antygeny ze specyficznym dla niego przeciwciałem, wykorzystując pomiar radioaktywności izotopu promieniotwórczego, którym znakowany jest jeden ze składników reakcji (Barnes, White et al. 2012). Dzięki metodzie RIA możemy oznaczać ilościowo badane antygeny. Podczas przeprowadzania pomiaru jeden składnik reakcji jest połączony z nośnikiem a drugi z fazą ciekłą. Drugi sposób pomiaru bazuje na reakcji gdzie oba składniki przeciwciało i antygen znajdują się w fazie ciekłej. Następnie wyznakowany antygen inkubowany jest z płynem zawierającym przeciwciała. Jako standard dodaje się pewną ilość niewyznakowanego antygeny. W ostatnim etapie pomiaru z roztworu izoluje się kompleks antygen-przeciwciało i mierzy radioaktywność wybranej frakcji. Obecnie z powodu zagrożeń wynikających z pracy ze związkami radioaktywnymi do oznaczeń antygenów w próbkach wykorzystuje się testy ELISA .

Za pomocą metody radioimmunologicznej można oznaczać takie markery nowotworowe jak: AFP, PSA, CA-125, CEA.

W przypadku tych markerów najczęściej wykorzystywane są przeciwciała poliklonalne; rzadziej monoklonalne ze względu na spadek czułości metody, gdyż jest ona bardzo mocno związana z selektywnością przeciwciała w stosunku do badanego antygeny (Barnes, White et al. 2012).

Metoda radioimmunometryczna (IRMA)

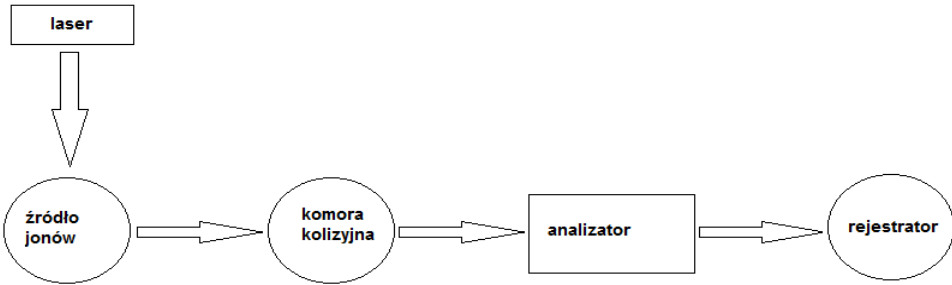
W metodzie radioimmunometrycznej do pomiaru wykorzystuje się dwa przeciwciała, z czego jedno znakowane jest radioizotopem a drugie skierowane przeciwko innej determinacie antygenowej badanej substancji. Następnie do próbki zawierającej przytwierdzone przeciwciała wprowadza się antygen i przeciwciała znakowane radioizotopem. Z tak powstałego kompleksu przeciwciała-antygen-przeciwciała wyflukuje się resztki przeciwciała znakowanego i mierzy się radioaktywność kompleksu (Wein, Lehmann et al. 2002). Dzięki wykorzystaniu tego rodzaju metody oznacza się np. CA 50, CA 19-9, Mono Total. W przypadku tego ostatniego markera, należącego do grupy cytokeratyn, pomiar wykonywany jest z wykorzystaniem przeciwciała opłaszczonego na perełkach polistyrenowych, które stanowią fazę stałą. Następnie używa się zestaw odczynnikowy zawierający trzy przeciwciała monoklonalne wiążące epitopy cytokeratyny oraz jedno przeciwciała detekcyjne znakowane jodem 125 (Wójcik, Tarapacz et al. 2009).

Metoda chemiluminescencyjna

Metoda chemiluminescencyjna to technika, która wykorzystuje znaczniki takie jak np. lucyferyna, izoluminol. Substancje te pod wpływem reakcji emitują światło o danej długości fali. Dzięki temu można wykonać pomiar stężenia badanej substancji (Dulak, Piwońska et al. 1998). Metodą chemiluminescencji oznacza się cytokeratynę 19 i ferrytynę. Reagenty (lucyferyna i izoluminol) w odpowiednich zestawieniach tworzą tzw. sondy chemiluminescencyjne, które w odpowiednim połączeniu są bardzo czułym detektorem analitycznym. Następnie wybrany utleniacz utlenia związek badany, w wyniku czego powstaje utleniony produkt w stanie wzbudzonym. W wyniku rekombinacji następuje emisja kwantów światła.

Spektrometria mas

Spektrometria mas jest uniwersalną metodą, w której wykorzystuje się kilka różnorodnych technik wzbudzania analitu oraz analizy otrzymanych jonów. Najczęściej wykorzystywana w pomiarach jest desorpcja laserowa z udziałem matrycy (MALDI). Zasadą tej metody jest pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego jonów powstających z jonizacji cząsteczek badanych związków chemicznych. Standardowy aparat do spektrometrii mas zbudowany jest z komory jonizacyjnej, analizatora i detektora, sprzężonych z komputerowym systemem kontroli oraz rejestracji i analizy danych. Na Rycinie 2 przedstawiono schemat budowy aparatu z desorpcją laserową z udziałem matrycy MALDI.

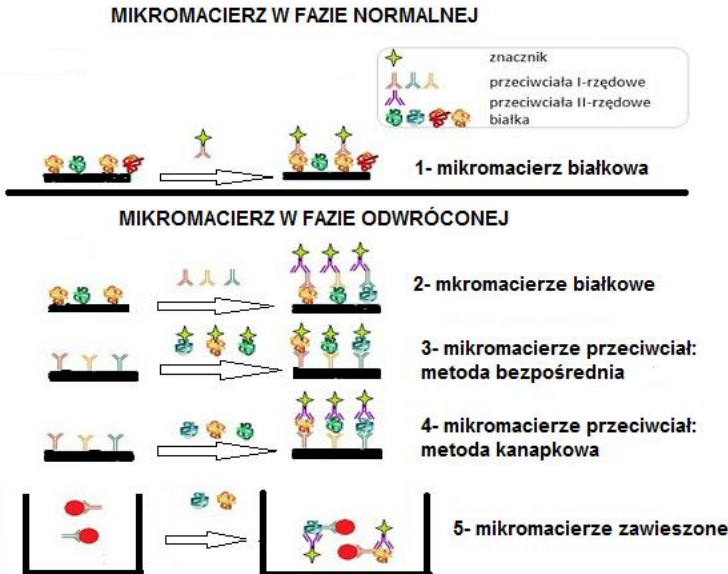


Rycina 2. Schemat budowy aparatu z desorpcją laserową z udziałem matrycy MALDI [opracowanie własne]

Badania techniką spektrometrii mas charakteryzują się wysoką czułością oraz możliwością oznaczania białek o bardzo małych stężeniach. Dzięki temu stała się konkurencyjną metodą dla obecnych technik stosowanych w proteomice (Karczmarski, Mikula et al. 2009). Za pomocą spektrometrii mas możemy oznaczyć takie potencjalne markery jak: APoE, SAA4.

Macierze białkowe

Za pomocą macierzy białkowych możemy dokładnie określić typ i ilość białka w badanym materiale. Metoda polega na unieruchamianiu na cienkich płytkach milionów kopii różnych przeciwciał. Następnie każde z nich łączy się z określonym fragmentem białka. Dzięki specjalnym macierzom białkowym możemy monitorować oddziaływania białko-białko lub białko-fosfolipid w komórkach. Obecnie w badaniach naukowych wykorzystuje się dwa podstawowe typy macierzy: mikromacierze białkowe z fazą normalną (RPPM) oraz fazą odwróconą (FPPM). Na Rycinie 3 przedstawiono schemat ideowy pomiaru.



Rycina 3. Schemat ideowy pomiaru metodą macierzy białkowych z wykorzystaniem mikromacierzy w fazie normalnej (RPPM) oraz w fazie odwróconej (FPPM) [opracowanie własne na podstawie (Charkiewicz, Jasińska et al. 2015)]

Macierze białkowe są najczęściej wykorzystywane przy określaniu różnic w profilach ekspresji białek np. przy nowotworach. Przy pomocy tej metody analizowano poziom ponad 169 białek w próbkach pacjentów z np. rakiem jajnika lub kobiet cierpiących na stan przedrzucawkowy. Wśród analizowanych białek były takie potencjalne markery jak np. IP-10, MCP-1 czy IL-6 (Charkiewicz, Jasińska et al. 2015).

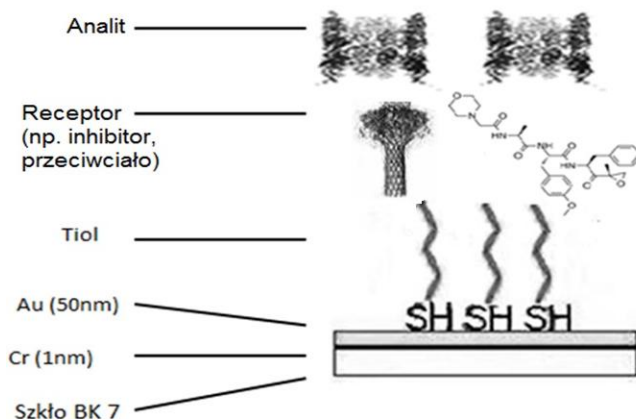
Cytometria przepływowa

Jest to metoda, która pozwala na jakościowe i ilościowe oznaczanie właściwości fizycznych i biologicznych komórek. Dzięki cytometrii przepływowej możemy kontrolować przebieg leczenia oraz ocenić stan czynnościowy komórek biorących udział w mechanizmach chorobowych i obronnych. Cytometria przepływowa pozwala na analizę dużej liczby komórek w dość krótkim czasie (Burchardt, Machowska et al. 2008). Standardowy aparat do cytometrii przepływowej zbudowany jest z trzech układów: optycznego, elektronicznego, powietrznego oraz z zestawu do transportu cieczy. W czasie pomiaru znakowane komórki są formowane w cienki strumień, który następnie jest przesuwany w stronę strefy pomiaru. W kolejnym etapie komórki są naświetlane zogniskowaną wiązką laserową, gdzie rozpraszają światło i dochodzi do wzbudzenia fluorochromów przyłączonych do komórki. Natężenie światła mierzone jest za pomocą odpowiednich detektorów, które są połączone z rejestratorem (Skotny, Pucińska, 2013).

Za pośrednictwem cytometrii przepływowej oznacza się najczęściej markery różnych typów białaczek np. marker CD65, MPO, CD15, TdT (Rusak, Pietruczuk et al. 2006).

Powierzchniowy rezonans plazmonów w wersji imaging (SPRI)

Powierzchniowy rezonans plazmonów to metoda oparta na analizie zmian współczynników załamania światła powstałych podczas kumulacji kolejnych biomolekuł na powierzchni metalu (Homola, Yee et al. 1999). Technika ta wykorzystuje plazmony powierzchniowe czyli wolne elektrony metalu. W metodzie SPR tradycyjne sensory rejestrują zależność refleksyjności jako funkcję kąta padania. Dzięki technice Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging można wyeliminować złożoność skanowania kąta, gdyż pomiarów dokonuje się przy określonym stałym kącie padania dla danego analitu. Światło odbite zbierane jest za pomocą kamery CCD, która odczytuje natężenie światła odbitego w postaci obrazu. Kąt przy jakim wykonuje się pomiary, leży w liniowym obszarze spadku refleksyjności (Steiner, 2004). Zmiany natężenia światła są wtedy proporcjonalne do zmian współczynnika załamania światła spowodowanych związaniem kolejnych biomolekuł na powierzchni bioczuJNIKA. Po adsorpcji kolejnych cząsteczek rezonans zachodzi przy wyższych kątach padania (Brockman, Nelson et al. 2000). Standardowy bioczuJNIK składa się z następujących elementów: płytka szklana pokryta warstewką chromu (1nm), warstewka złota (50nm), oraz monowarstwa tiolu, który pozwala na unieruchomienie zimmobilizowanego receptora specyficznego dla danego analitu. Za pomocą techniki SPRI oznaczono takie substancje jak laminina-5, kolagen-4, proteasom. Schemat ideowy takiego bioczuJNIKA przedstawia Rycina 4.



Rycina 4. Schemat ideowy standardowego biocujnika SPRi [opracowanie własne].

Powierzchniowy rezonans plazmonów charakteryzuje się bardzo szerokim zastosowaniem i staje się konkurencyjny do testów ELISA. Dzięki tej metodzie można badać interakcje między biomolekułami, tj.: białko-białko, białko-DNA, enzym-inhibitor, receptor-lek i wiele innych. Wszystkie te badania bazują na tak zwanych sensogramach, z których można odczytać różne parametry charakteryzujące dane oddziaływanie.

Podsumowanie

Markery nowotworowe są zazwyczaj glikoproteinami lub peptydami. Występują najczęściej w moczu lub osoczu krwi. Niestety wiele markerów jest charakterystycznych dla kilku typów nowotworów. Dlatego obecnie markery nowotworowe nie mogą stanowić samodzielnego źródła diagnozowania choroby. Są one jednak bardzo wartościowym uzupełnieniem innych rodzajów badań np. histopatologii. Obecnie coraz więcej badań naukowych opiera się na opracowaniu nowych metod analitycznych pozwalających na tak czułe i bardziej precyzyjne oznaczanie markerów, aby mogły one zostać wykorzystane do kompletnego diagnozowania chorych.

Literatura

Adachy Y., Aoki C., Yoshio-Hoshino N., Takayama K., Curiel D. T., Nishimoto N. **Interleukin-6 induces both cell growth and VEGF production in malignant mesotheliomas**. *International Journal of Cancer*. 2006; 119: 1303-11.

Badowska-Kozakiewicz A. **Zastosowanie metod immunohistochemicznych na przykładzie badań nowotworów gruczołu sutkowego u psów**. *Życie Weterynarii*. 2013; 88: 29-35.

Barnes N.S., White P.C., Hutchison M.R. **Time to failure of oral therapy in children with type 2 diabetes: a single center retrospective chart review**. *Pediatric Diabetes*. 2012; 13: 578-582.

Brockman J. M., Nelson B. P., Corn R. M. **Surface Plasmon Resonance Imaging measurements of ultrathin organic films**. *Annual Review Physical Chemistry*. 2000; 51: 41-63

Burchardt D., Machowska L., Derwich K., Samara H., Dworacki G. **Applications of flow cytometry in clinical diagnostics – its applications to diagnose and recognize pathological changes**. *Nowiny Lekarskie*. 2008; 77: 324-329.

- Bystrom C., Sheng S., Zhang K., Caulfield M., Clarke N., Reitz R. **Clinical Utility of Insulin-Like Growth Factor 1 and 2; Determination by High Resolution Mass Spectrometry.** PLoS One. 2012; 7: 1-7.
- Carpelan-Holmström M., Louhimo J., Stenman U.H., Alfthan H., Haglund C. **CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers.** Anticancer Research. 2002; 22: 2311-2316.
- Charkiewicz K., Jasińska E., Ludański P. **Identification of proteomic biomarkers of preeclampsia using protein microarray and tandem mass spectrometry.** Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2015; 69: 562-570.
- Chmura A., Wojcieszek A., Mrochem J., walaszek-Gruszka A., Deja R., Bartnik W. **Usefulness of the SCC, CEA Cyfra 21.1 and CRP markers for the diagnosis and monitoring of cervical squamous cell carcinoma.** Ginekologia Polska. 2009; 80: 361-366.
- Czerniak E., Deja R., Krauze-Balwińska Z., Bartnikowa W. **Porównanie dwóch immunoenzymatycznych metod oznaczania stężenia całkowitego PSA w surowicy krwi.** Diagnostic Ambulatory. 1999; 35: 147-157.
- Dulak J., Piwońska B., Debińska-Kieć A. **Metody biologii molekularnej w diagnostyce klinicznej.** Badania Diagnostyczne. 1998; 4:1-6.
- Fedchenko N., Reifenrath J. *Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review.* Diagnostic Pathology. 2014; 9: 221.
- Glas A.S., Roos D., Deutekom M., Zwinderman A.H., Bossuyt P.M.M., Kurth K.H. **Tumor Markers in the Diagnosis of Primary Bladder Cancer. A Systematic Review.** The Journal of Urology. 2003; 169: 1975-1982.
- Gorodkiewicz E., Ostrowska H., Sankiewicz A. **SPR imaging biosensor for the 20S proteasome: sensor development and application to measurement of proteasomes in human blood plasma.** Microchimica Acta. 2011; 175: 177-184.
- Halm U., Schumann T., Schiefke J., Witzigmann H., Mossner J., Keim V. **Decrease of CA 19-9 during chemotherapy with gemcitabine predicts survival time in patients with advanced pancreatic cancer.** Journal of Cancer. 2000; 82: 1013-1016.
- Homola J., Yee S.S., Gauglitz G. **Surface plasmon resonance sensors: review.** Sensors and Actuators. 1999: 3-15.
- Kalluri R., Zeisberg M. **Fibroblasts in cancer.** Nature Reviews Cancer. 2006; 6: 392-401.
- Karczmarski J., Mikula M., Hennig E., Rubel T., Ostrowski J. **Perspectives of mass spectrometry-based disease biomarkers discovery in plasma or serum peptidome.** Postępy Nauk Medycznych. 2009; 2: 149-156.
- Kim H., Song S., Park S., Kang Y., Lee K. **Elevated levels of circulating platelet microparticles VEGF, Il-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor.** European Journal of Cancer. 2003; 39: 184-191.
- Kotowicz B., Fuksiewicz M. **Standardowe i potencjalne markery nowotworowe u chorych na raka szyjki macicy.** Journal of Oncology. 2013; 63: 403-407.
- Liu N., Feng F., Liu Z., Ma Z. **Porous platinum nanoparticles and PdPt nanocages for use in an ultrasensitive immunoelectrode for the simultaneous determination of the tumor markers CEA and AFP.** Microchimica Acta. 2015; 182: 1143-1151.
- Mor G., Visintin I., Lai Y., Zhao H., Schwartz P. **Serum protein markers for early detection of ovarian cancer.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005; 102: 7677-7682.
- Nikiel B., Chekan M., Jaworska M., Jarzab M., Maksymiuk B. **Expression of the selected adhesive molecules (cadherin E, CD44, LGAL3 and CA 50) in papillary thyroid carcinoma.** Journal of Endocrinology. 2006; 57: 326-335.
- Pietrowska M. **Markery nowotworowe badane metodami proteomiki w osoczu i surowicy krwi.** Biotechnologia, 2009; 85: 39-53.
- Płodzich A. **Proteomics and its application in selected diseases.** Journal of Transfusion Medicine. 2013; 6: 48-59.

- Rusak A., Jabłońska K., Dziągłel P. **The role of YKL-40 in a cancerous process.** Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2016; 70: 1286-1299.
- Rusak M., Pietruczuk M., Osada J., Hołub M. **Cytometria przepływowa w diagnostyce chorób nowotworowych układu krążenia.** Diagnostyka Laboratoryjna. 2006; 42: 455-466.
- Sankiewicz A., Łukaszewski Z., Trojanowska K., Gorodkiewicz E. **Determination of collagen type IV by Surface Plasmon Resonance Imaging using a specific biosensor.** Analytical Biochemistry. 2016; 515: 40-46.
- Sankiewicz A., Markowska A., Łukaszewski Z., Puzan B., Gorodkiewicz E. **Methods for 20S Immunoproteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPRI Biosensors.** Cellular and Molecular Bioengineering. 2017; 10: 174-185.
- Sankiewicz A., Romanowicz L., Laudański P., Żelazowska-Rutkowska B., Puzan B., Cylwik B., Gorodkiewicz E. **SPR imaging biosensor for determination of laminin-5 as a potential cancer marker in biological material.** Analytical Bioanalytical Chemistry. 2016; 408: 5269-5276.
- Scholler N., Crawford M., Sato A., Kiviat N., Urban N. **Bead-Based ELISA for Validation of Ovarian Cancer Early Detection Markers.** Clinical Cancer Research. 2006; 12: 2117-2124.
- Shingo N., Hirofumi Y., Tadashi O., Norikazu M., Takashi M., Osamu T. **Comparative Detection of Lymph Node Micrometastases of Stage II Colorectal Cancer by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry.** Journal of Clinical Oncology . 2002; 20: 4232-4241.
- Skotny A., Pucińska J. **Modern flow cytometry.** Acta Bio-Optica et Informatica Medica. 2013; 19: 3-10.
- Soborczyk A., Deptała A. **Markery nowotworowe w praktyce klinicznej.** Choroby Serca i Naczyń. 2007; 4: 184-189.
- Steiner G. **Surface Plasmon Resonance Imaging.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2004; 379:328-331.
- Tanwar M.K., Gilbert M.R., Holland E.C. **Gene Expression Microarray Analysis Reveals YKL-40 to Be a Potential Serum Marker for Malignant Character in Human Glioma.** Cancer Research. 2002; 62: 4364-4368.
- Thomas A., Kohler M., Schanzer W., Delahaut P., Thevis M. **Determination of IGF-1 and IGF-2 their degradation products and synthetic analogues in urine by LC-MS/MS.** Analyst. 2011; 136: 1003-1012.
- Tokarzewicz A., Romanowicz L., Sveklo I., Gorodkiewicz E. **The development of a matrix metalloproteinase-1 biosensor based on the surface plasmon resonance imaging technique.** Analytical Methods. 2016; 8: 6428-6435.
- Ucar E., Semerci E., Ustun H., Yetim T., Huzmeli C., Gullu M. **Prognostic value of preoperative CEA, CA 19-9, CA 72-4, and AFP levels in gastric cancer.** Advances in Therapy. 2008; 25: 1075-1084.
- Varma M., Berney D.M., Jasoni B., Rhodes A. **Technical variations in prostatic immunohistochemistry: need for standardisation and stringent quality assurance in PSA and PSAP immunostaining.** Journal of Clinical Pathology. 2004; 57: 687-690.
- Walker R. A. **Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I.** Histopathology. 2006; 49: 406-10.
- Wein B., Lehmann T., Keyzers D., Schubert H., Kohnen M. **Detailed image classification code for image retrieval of medical images (IRMA).** Springer. 2002; 16: 513-517.
- Wójcik E., Tarapacz J., Sobolewska K. **Ocena użyteczności markera Mono Total w diagnostyce chorych na raka płuca.** Journal of Laboratory Diagnostic. 2009; 45: 75-80.
- Wu J., Fu Z., Yan F., Ju H. **Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers.** Trends in Analytical Chemistry. 2007; 26: 679-688.
- Załęska M., Szturmowicz M., Zych J., Demkow U., Roszkowski-Śliż K. **Elevated serum NSE level in locally advanced and metastatic NSCLC predispose to better response to chemotherapy but worse survival.** Pneumonologia Alergologia Polska. 2010; 78: 14-20.

Wybrane składniki błony podstawnej i ich związek z procesem nowotworzenia

Łukasz Ołdak¹, Anna Sankiewicz¹, Ewa Gorodkiewicz¹

¹Zakład Elektrochemii, Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku, Ciołkowskiego 1K, 15-245, Białystok, Polska

Autor korespondencyjny:

Anna Sankiewicz, ania@uwb.edu.pl

Uniwersytet w Białymstoku, Instytut Chemii, Zakład Elektrochemii, Ciołkowskiego 1K, 15-245, Białystok, Polska

Streszczenie

Ostatnie postępy w nauce zwróciły uwagę na znaczenie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), a zwłaszcza błony podstawnej (BM), w regulacji zachowania komórek i głównych procesów związanych z progresją nowotworu. Błona podstawna jest białkową siatką macierzy zewnątrzkomórkowej, która pełni funkcję łącznika nabłonka z tkanką łączną, odpowiada również za transport substancji odżywczych oraz metabolitów do oraz z tkanek łącznych, określa drogi migracji komórek nabłonkowych. Szkieletem BM jest kolagen IV. Innymi jej składnikami są: laminina, integryny, entaktyna, witronektyna, fibronektyna oraz inne rodzaje kolagenu (m. in. VI, VII). Kolagen IV jest substratem dla metaloproteinaz w procesie proteolizy, który początkuje degradację błony podstawnej. Laminina pobudza natomiast wzrost oraz różnicowanie się komórek i tkanek, ma również ogromne znaczenie w promowaniu inwazji nowotworowej przez oddziaływanie z innymi składnikami błony podstawnej. Praca stanowi przegląd badań nad rolą wybranych składników błony podstawnej jako potencjalnych markerów nowotworowych.

Abstract

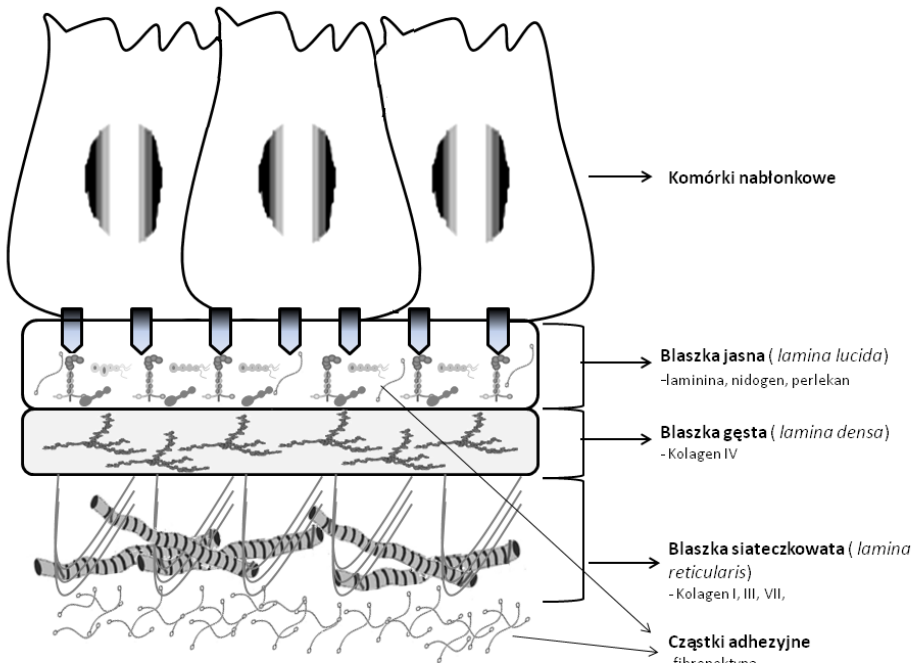
Recent progress in science has highlighted the importance of extracellular matrix (ECM) and basement membrane in regulation of cellular behavior and main processes during cancer progression. The basement membrane is specialized protein form of extracellular matrix. It plays an important role as an epithelial abutment, also responsible for the transport of nutrients and metabolites to and from connective tissues, determines the pathway of epithelial cells migration. The skeleton of this structure is collagen IV. Other predominant components are: laminin, integrins, entactin, vitronectin, fibronectin and other types of collagen (e.g. VI, VII). Collagen IV is a substrate for metalloproteinases in the process of proteolysis, which initiates degradation of the basement membrane, laminin stimulates the growth and differentiation of cells and tissues. It is also of great importance in promoting cancer invasion by interacting with other components of the basement membrane.

The article presents a review of research on the role of some components of the basement membrane as potential tumor markers.

Macierz zewnątrzkomórkowa i błona podstawna

Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) jest siecią makrocząstek, która otacza komórki oraz stanowi ważny składnik mikrośrodowiska komórkowego. ECM składa się z cząstek strukturalnych takich jak: kolageny, elastyna oraz cząstek adhezyjnych, do których należą: laminina, fibronektyna, witronektyna oraz trombospondyna. W jej skład wchodzi również różne proteoglikany i glikozoaminoglikany. Jedną ze struktur ECM jest błona podstawna, która pełni funkcję bariery oddzielającej nabłonek od otaczającej go tkanki łącznej właściwej (Nicolof, Deliiyski, et al. 2010). Jest ona wyspecjalizowaną strukturą za pomocą której nabłonek łączy się mechanicznie z podłożem (jest to ważne w przypadku m.in. naskórka, który narażony jest na uszkodzenia mechaniczne). Pełni również ważną rolę w transporcie substancji

odżywczych oraz metabolitów przez naczynia krwionośne tkanki łącznej. Wyróżniamy trzy warstwy błony podstawnej: blaszkę jasną (łac. *lamina lucida*), blaszkę gęstą (łac. *lamina densa*), warstwę włókienek i makrocząsteczek kolagenowych (blaszka siateczkowata, łac. *lamina reticularis*) (rys.1). Struktura ta charakteryzuje się różną grubością, zależnie od rodzaju nabłonka, jednak nie przekracza na ogół 0,2 μm . Blaszkę gęstą zbudowana jest głównie z kolagenu typu IV, który tworzy ciekłą siatkę i pełni rolę rusztowania dla innych składników tej struktury. Blaszkę jasną składa się z subtelných wypustek podstawnej powierzchni komórek nabłonkowych, a także z glikoprotein takich jak lamininy (w tym laminina-5). W blaszce jasnej znajduje się również nidogen, czyli białko odpowiedzialne za połączenie lamininy z kolagenem IV. Innymi składnikami są proteoglikany takie jak perlekan oraz agryna (Sawicki, Malejczyk, 2015; Stanley, Woodley et al. 1982, Pozzi, Yurchenco et al. 2017).



Rys.1 Schemat struktury błony podstawnej.

Macierz zewnątrzkomórkowa pełniąc funkcję integrującą tkanki odgrywa istotną rolę w rozwoju wielu chorób, a zwłaszcza progresji nowotworu. Wiele badań wskazuje na zdolność komórek nowotworowych do interakcji z ECM. Mogą się one łączyć ze specyficznymi glikoproteinami macierzy zewnątrzkomórkowej, takimi jak fibronektyna, kolagen i laminina, wykorzystując do tego integryny lub inne receptory powierzchniowe komórki (Ioachim, Michael, et al, 2005). Nie bez znaczenia pozostają również mechanizmy regulujące, które zapewniają, że dynamika ECM,

czyli jej produkcja, degradacja i przebudowa jest prawidłowa podczas rozwoju oraz funkcjonowania narządu. Zakłócenie tych mechanizmów powoduje deregulację i dezorganizację ECM. Prowadzi to do nieprawidłowych zachowań komórek. Konsekwencją jest zaburzenie homeostazy oraz funkcjonowania narządu (Kalluri 2003).

Nieprawidłowa dynamika ECM jest cechą charakterystyczną nowotworów. Podczas tworzenia guza nowotworowego zwiększa się osadzanie kolagenu (I, II, III, V, IX) w tkankach, natomiast wraz z wiekiem następuje spadek syntezy kolagenów, na rzecz zwiększenia aktywności metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs). Również inne składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, ułatwiające przekazywanie sygnału przez czynniki wzrostu są nadprodukowane w przypadku występowania nowotworu (Lu, Weaver, et al. 2012).

Przerzutowanie (metastaza) nowotworu związane jest z inwazją komórek do otaczającej ECM. Aby do tego doszło, musi nastąpić uszkodzenie struktury błony podstawnej. Enzymy takie jak metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), dezintegryna oraz metaloproteiny z motywami trombospondyny oraz proteazy serynowe (np. plazmina), degradują struktury ECM, co sprzyja przedostaniu się komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych lub limfatycznych i tworzeniu wtórnych ognisk nowotworowych (Liotta, 2016).

Nieprawidłowości w błonie podstawnej mogą powodować wiele innych chorób. Przykładowo: mutacje genów kodujących białka błony podstawnej prowadzą do dystrofii mięśniowej (Sawicki, Malejczyk, 2015), zespołu Alporta (Sawicki, Malejczyk, 2015; Klimek, Kulig, et al. 2006), czy pęcherzykowego oddzielania się naskórka (Klimek, Kulig, et al. 2006). Zaburzenia układu immunologicznego powodują produkcję przeciwciał przeciwko składnikom własnym błony podstawnej nabłonków płuc i nerek. W konsekwencji tego, wywoływane są choroby tych narządów, które mają podobne objawy do zespołu Goodpasture'a (Sawicki, Malejczyk, 2015, Niemczyk, Woźniacki, 2008). W przypadku cukrzycy typu 2 błona podstawna nabłonka nerek ulega zgrubieniu i przepuszcza cząsteczki białek, co prowadzi do białkomoczu (Sawicki, Malejczyk, 2015).

Podsumowując, nieprawidłowe zmiany zachodzące w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej mogą znacząco zmieniać jej właściwości biochemiczne, potęgować działania onkogenne różnych szlaków sygnałowych czynników wzrostu, a także deregulować zachowania komórkowe podczas złośliwej transformacji (Lu, Weaver, et al. 2012).

Oznaczanie składników ECM, a głównie błony podstawnej, od wielu lat cieszy się zainteresowaniem naukowców, którzy prowadzą badania w kierunku zastosowania ich jako biomarkerów, zwłaszcza w chorobach nowotworowych.

Lamininy

Lamininy (LNs) to wielofunkcyjne białka adhezyjne komórek, występujące w błonach podstawnych. Charakteryzują się one dużą masą cząsteczkową. Gromadzą się głównie w macierzy zewnątrzkomórkowej komórek nerwowo-rdzeniowych, szkieletowych, śródbłonkowych oraz nabłonkowych (Katayama, Sekiguchi, 2004). W rzeczywistości lamininy związane z błoną odgrywają aktywną rolę w regulowaniu proliferacji i migracji komórek. LNs zlokalizowane są zarówno w zarodkowym, jak

i dojrzałym układzie naczyniowym. Różne rodzaje izoform laminin przyczyniają się do kontrolowania śródbłonkowej oraz okołonaczyniowej części błony podstawnej (Malvasi, Cavallotti, et al. 2017). Glikoproteiny te zwykle tworzą krzyżową strukturę złożoną z jednego łańcucha α , łańcucha β oraz γ . Obecnie wyróżniamy 11 odrębnych podjednostek laminin, wśród których znajduje się laminina-5 ($\alpha3$ - $\beta3$ - $\gamma2$). Białko to okazało się być markerem inwazyjności dla komórek nabłonka w wielu badaniach immunohistochemicznych, ponieważ ulegało wzmożonej ekspresji w komórkach nabłonkowych nowotworu. Pyke i współpracownicy wykazali, że mRNA łańcucha $\gamma2$ lamininy-5 ulega wzmożonej ekspresji w przypadku nowotworów: jelita grubego, piersi. Wykazali również zwiększoną ekspresję w fazie wzrostu promieniowego trzech rodzajów czerniaków. Zauważono jednak brak ekspresji w niektórych rodzajach nowotworów mezenchymalnych. Wzmożoną ekspresję mRNA dla łańcucha $\gamma2$ obserwuje się również w przypadku raka prostaty. (Pyke, Romer, et al. 1994; Hao, Yang, et al. 1996; Lohi, Oivula, et al. 2000; Masaki, Matsukoa, et al. 2003). Nowotworowe komórki nabłonka preferują adhezję do lamininy-5, wykorzystując przy tym integryny jako specyficzne receptory. Jedną z ważniejszych funkcji LN-5 jest indukcja migracji komórek. Zwiększoną jej aktywność obserwuje się po przetwarzaniu proteolitycznym N-końcowych fragmentów łańcucha $\gamma2$. Okazało się, że w procesie tym bierze udział głównie kilka rodzajów metaloproteinaz zewnątrzkomórkowych. Zdegradowane łańcuchy $\gamma2$, uwalniane z komórek inwazyjnych mogą być poddawane immunodetekcji i wykorzystywane w diagnostyce klinicznej różnych nowotworów. Dowiedziono, że każdy ze składników LN-5 ulega proteolitycznej degradacji na mniejsze fragmenty po to, aby wytworzyć dojrzały heterotrimer o zwiększonej aktywności promowania migracji komórek. N-końcowe przetwarzanie łańcucha $\gamma2$ prowadzi do stabilizacji powstałej cząsteczki w ECM. Wykorzystując testy immunologiczne typu sandwich z monoklonalnymi przeciwciałami, rozpoznającymi łańcuchy $\alpha3$, $\beta3$, lub $\gamma2$, wykazano, że cząsteczka LN-5 jest wydzielana nie tylko pozakomórkowo do supernatantu z hodowli komórkowej, ale również osadza się w macierzy zewnątrzkomórkowej nabłonka. Inaczej zachowują się fragmenty łańcucha $\gamma2$, które to nie zostały odnalezione w ECM, natomiast stwierdzono ich obecność w płynach hodowlanych. Zasugerowano więc, że N-końcowe fragmenty łańcucha $\gamma2$ włączane są do krążenia biologicznego. Stwierdzono, że ilość fragmentów łańcucha $\gamma2$ wzrasta gwałtownie u pacjentów ze stwierdzonym nowotworem trzustki z przerzutami do wątroby. Zauważono znaczące różnice, porównując otrzymane wcześniej wspomniane wyniki z wynikami badań przeprowadzonymi u pacjentów z nieprzerzutowym rakiem trzustki lub innymi łagodnymi chorobami tego narządu (Katayama, Sekiguchi, 2004).

Podsumowując, laminina-5 ma dwie przeciwstawne właściwości. Z jednej strony zachowuje integralność tkanki, z drugiej natomiast pobudza ruchliwość komórek w macierzy zewnątrzkomórkowej. Poziom lamininy-5 ulega zmianie w przypadku takich nowotworów jak: płaskonabłonkowy rak sutka, czerniak oraz rak jelita grubego (tabela1) (Kang, Ha, et al., 2013). Badania wskazują również, że ekspresja LN-5 jest istotnie powiązana z kliniczno-patologicznymi cechami raka pęcherza. Okazuje się więc, że laminina-5 może promować ruchliwość i inwazję komórek NBT-II (Grassi, Moens, et al. 1999). Biorąc pod uwagę znaczenie inwazyjności

i progresji w planowaniu leczenia oraz prognozowania dla pacjentów z rakiem pęcherza, badanie lamininy-5 oraz jej podjednostek powstałych w wyniku proteolizy, może doprowadzić do opracowania nowych, ściśle ukierunkowanych terapii, mających na celu zahamowanie zdolności LN-5 do stymulowania wzrostu guza nowotworowego, a także jego rozprzestrzeniania się (Kang, Ha, et al. 2013).

Kolagen IV

Kolagen IV (COLIV) jest głównym składnikiem błony podstawnej, która otacza naczynia krwionośne guza nowotworowego, tworząc nieciągłe struktury podobne do błony podstawnej. COLIV syntezowany jest podczas angiogenezy i osadza się wokół komórek śródbłonna i perycytów, przez co może być uznawany jako marker aktywności angiogennej. Degradacja COLIV zachodzi podczas inwazji i rozsiewu nowotworowego z przerzutami (Robledo, Arriaga-Pizano, et al. 2005). COLIV, w porównaniu do innych białek błony podstawnej, ulega silnej ekspresji w zrębie raka trzustki. Stwierdzono, że COLIV jest ważnym czynnikiem autokrynnym regulacji wzrostu i migracji w komórkach raka trzustki. W badaniach linii komórkowych raka trzustki wykazano interakcję między COLIV a receptorami integrynowymi obecnymi w tkance raka trzustki (Ohlund, Franklin, et al. 2013).

Wysoki poziom tego białka wykryto między innymi w surowicy pacjentów z przerzutowym rakiem piersi, rakiem jelita grubego, żołądka oraz płuc, a także w przypadku nowotworu wątroby (Ambiru, Miyazaki, et al. 1995; Hong, Hong, et al. 1995; Mazouni, Arun, et al. 2008). Podwyższony poziom COLIV udokumentowano również u pacjentów z marskością wątroby i przewlekłymi chorobami nerek w porównaniu do osób zdrowych (Hong, Hong, et al. 1995; Xu, Wu, et al. 2002).

Podsumowując, wyższe poziomy COLIV obserwuje się, w przypadku raka jelita grubego, u pacjentów z przerzutami do wątroby, w porównaniu do tych, którzy takich przerzutów nie mieli (tabela 1). Zwiększone poziomy tego białka we krwi pacjentów z nowotworem mogą być wskaźnikiem wysokiego poziomu angiogenezy lub spowodowane są zwiększonym rozkładem COLIV w wyniku inwazji (Mazouni, Arun, et al. 2008).

Fibronektyna

Fibronektyna (FN) jest glikoproteina, która występuje w dwóch formach: osoczowej (forma rozpuszczalna) oraz komórkowej (forma nierozpuszczalna, związana z błoną komórkową oraz obecna w macierzy zewnątrzkomórkowej jako środek sieciujący). Posiada odpowiednie domeny, za pomocą których łączy się z heparyną, kolagenem, fibryną, powierzchniami bakterii, a także z receptorami integrynowymi. Bierze czynny udział w procesach migracji, adhezji, wzrostu i różnicowania komórek (Pankov, Yamada 2002). Fibronektyna to jedna z biologicznie czynnych glikoprotein, niezbędny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej, który może być ważny jako potencjalny biomarker. FN obecna jest w osoczu oraz różnych typach tkanek. Odgrywa istotną rolę w różnicowaniu, gojeniu się ran i rozwoju embrionalnym. Podstawową jednostką strukturalną FN jest dimer utworzony najczęściej z podobnych, ale nie zawsze identycznych łańcuchów polipeptydowych o masie cząsteczkowej około 250 kDa. Fibronektyna osoczowa jest białkiem globularnym, które składa się z niezależnie złożonych domen globularnych

oraz charakteryzuje się dosyć zwartą konformacją. Natomiast forma komórkowa, nierozpuszczalna, ma wydłużoną konformację i może być złożona w fibryle. Postać rozpuszczalna fibronektyny nie występuje jedynie w osoczu. Znajduje się ona również w innych płynach biologicznych, takich jak płyn owodniowy, płyn mózgowo-rdzeniowy, czy ślina. Odkładanie FN do macierzy zewnątrzkomórkowej i obrót fibronektyny jest procesem dynamicznym. Istnieje stan równowagi pomiędzy tworzeniem ECM, przebudową oraz jej degradacją. Włókna fibronektynowe zapewniają macierzy stabilność i sztywność. Zmiany w ekspresji fibronektyny, organizacji, degradacji i jej stężenia w płynach ustrojowych zauważono w przypadku różnych chorób (tabela 1). Stężenie fibronektyny wzrasta w osoczu pacjentów ze stwierdzonym rakiem żołądka (David, Nesland, et al. 1994; Tas, Bilgin, et al. 2016), rakiem jelita grubego (Saito, Nishimura, et al. 2008), rakiem piersi (Ruiz-Garcia, Scott, et al. 2010), rakiem pęcherza (Habasch, Abdul-Rasheed, et al. 2014) oraz przy innych chorobach niebędących nowotworami np. w chorobach reumatycznych, (Mette, Ozturk, et al. 1998), chorobie niedokrwiennej serca (Soon Song, Kyung Kim, et al. 2001), cukrzycy (Kanters, Banga, 2001). Fibronektyna wykryta w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy może być potencjalnym markerem epilepsji (Xi, Wang, et al. 2015). Stężenie FN w osoczu ma niskie wartości u pacjentów z sepsą w porównaniu do osób zdrowych, a także pacjentów z różnymi niezakaźnymi chorobami. Wydaje się więc, że fibronektyna mogłaby być markerem sepsy (Ruiz Martin, Prieto Prieto, et al. 2004; Sankiewicz, Romanowicz, et al. 2018). W tabeli 1 pokazano zastosowanie oznaczania fibronektyny jako biomarkera.

Tenascyna

Tenascyna (TN) jest jedną z glikoprotein wchodzących w skład macierzy zewnątrzkomórkowej. Obecnie znane są cztery białka należące do tej rodziny, czyli: tenascyna C, R, W i X. Najszerzej badaną tenascyną jest TN-C. Tenascyna oraz fibronektyna wykazują konkurencyjne funkcje, które, jak się okazuje, są ważne dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Tenascyna zawiera 14 powtórzeń domeny podobnej do naskórkowego czynnika wzrostu. Przypuszcza się, że tenascyna bierze udział w interakcjach nabłonkowo-mezenchymalnych oraz wykazuje funkcje adhezyjne i pobudzające wzrost komórek (Ioachim, Michael, et al. 2005). Zauważono nieco wzmożoną ekspresję tenascyny podczas inwazji guza nowotworowego (Ioachim, Michael, et al. 2005; Titta, Wahlstrom, et al. 1993; Booth, Harnden, et al. 2002). Tenascyna jest w stanie konkurować z fibronektyną m.in. o to, czy komórki są przyłączane oraz o stopień ich rozprzestrzenienia. Wynika z tego, że równowaga między tymi dwoma białkami w ECM ma istotne znaczenie fizjologiczne (Chiquet-Ehrismann, Kalla, et al. 1988). Badano znaczenie tenascyny w rozwoju nowotworu pęcherza (Ioachim, Michael, et al. 2005). W zdrowym nabłonku pęcherza stwierdzono słabą immunoreaktywność tenascyny. Nie stwierdzono jednak istotnie podwyższonej ekspresji tenascyny w zrębie guzów raka pęcherza. Ekspresja tenascyny w zrębie guzów była istotnie wyższa jedynie w słabo zróżnicowanych guzach w porównaniu do guzów umiarkowanie i bardzo zróżnicowanych. Dodatkowo ekspresja tenascyny była dodatnio skorelowana z dwoma wskaźnikami proliferacyjnymi, Ki-67 oraz PCNA, ponadto również z ekspresją fibronektyny, kolagenu IV i gęstością mikronaczyń. Przeprowadzono badania mające na celu

wykazanie znaczenia prognostycznego tenascyny w procesie leczenia za pośrednictwem elektroresekcji guza pęcherza moczowego (TURBT). Pacjenci, u których stwierdzono niską ekspresję tenascyny nie mieli tak szybko nawrotu choroby w porównaniu do pacjentów z wysokim poziomem ekspresji tej glikoproteiny. Ekspresja tenascyny nie okazała się jednak być niezależnym czynnikiem prognostycznym dla nowotworu pęcherza moczowego (Ioachim, Michael, et al. 2005). Badano również ekspresję tenascyny w raku piersi i stwierdzono, że może ona być związana z aktywacją komórek śródbłonna, a także odgrywać ważną rolę w angiogenezie nowotworu (Tokes, Hortovanyi, et al. 1999).

Nidogen

Nidogen, dawniej nazywany entaktyną, zaliczany jest do glikoprotein. Jest obecny w blaszce jasnej błony podstawnej. Pełni funkcję łącznika pomiędzy kolagenem IV, lamininą oraz proteoglikanami. Jest więc istotnym składnikiem stabilizującym strukturę całej błony podstawnej. Oddziałuje z cząsteczkami receptora komórkowego i kontroluje polaryzację, migrację i inwazję komórek. Zidentyfikowano dwa rodzaje nidogenów: nidogen-1 (NID1) i nidogen-2 (NID2). Nidogeny odgrywają kluczową rolę podczas organogenezy w rozwoju późnego embrionu, szczególnie w rozwoju serca i płuc (Miosge, Holzhausen et al. 2001). Od kilku lat prowadzi się badania nad znaczeniem nidogenu w rozwoju nowotworu. Wykazano m.in. jego potencjalne znaczenie jako markera raka jajnika (Li, Zhang, et al. 2015), raka płaskonabłonkowego przełyku (Chai, Cheung et al. 2017), czerniaka oraz raka sutka przerzutującego do płuc (Alečković, Wei, et al. 2017).

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – enzymy hydrolizujące białka ECM i BM

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) to enzymy, które bezpośrednio uczestniczą w przerzutowaniu nowotworowym. W fizjologicznych warunkach MMPs biorą udział w embriogenezie, angiogenezie, gojeniu się ran oraz agregacji płytek. Metaloproteinazy uczestniczą również w procesach nowotworowych. Regulują wzrost i proliferację komórek, są odpowiedzialne za powstawanie przerzutów, uczestniczą w angiogenezie oraz odpowiedzi immunologicznej organizmu. Szczególnie ważną metaloproteinazą jest MMP-2 oraz MMP-9. Są to enzymy, które mają największą zdolność do degradowania kolagenu IV, czyli głównego składnika, szkieletu BM. Utrata ciągłości błony podstawnej początkuje proces migracji komórek nowotworowych z guza pierwotnego, a tym samym warunkuje tworzenie się przerzutów w miejscach bardziej odległych. W normalnych warunkach synteza metaloproteinaz ma miejsce w komórkach macierzy współtworzącej określoną tkankę łączną. Jednak w przypadku wystąpienia nowotworu, MMPs syntezowane są również przez komórki patogenne (Łapka, Goździalska, et al. 2006). Zaburzenia równowagi między metaloproteinazami a ich inhibitorami są głównym powodem rozwoju wielu nowotworów, w tym raka piersi oraz raka trzustki (Yamamoto, Itoh, et al. 2001). Metaloproteinazy posiadają zdolność do degradacji kolagenu IV. Skutkiem tego jest stymulacja angiogenezy oraz naciekanie tkanek sąsiadujących oraz tworzenie odległych przerzutów. W przypadku wielu złośliwych nowotworów wykazano wzmożoną ekspresję MMPs, dla których substratami są

składniki błony podstawnej oraz macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak kolagen typu IV, laminina, fibronektyna, entaktyna, fibryna, elastyna i wiele innych. Poczynione dotychczas badania potwierdzają rolę metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i ich inhibitorów w diagnostyce nowotworów, a zwłaszcza raka trzustki. Podwyższona ekspresja i aktywność MMPs w krwi oraz tkankach pacjentów z rakiem trzustki może mieć potencjalne zastosowanie jako marker inwazyjności i ryzyka powstawania odległych przerzutów, w szczególności tych powstających do wątroby (Łukaszewicz, Mroczko, et al. 2008).

Tabela 1. Przegląd badań nad składnikami błony podstawnej jako biomarkerów w procesach chorobowych.

Potencjalny marker nowotworowy	Znaczenie	Literatura
Laminina-5	Wzrost ilości fragmentów łańcucha $\gamma 2$ u pacjentów z nowotworem trzustki z przerzutami do wątroby	(Katayama, Sekiguchi, 2004)
	Ekspresja łańcucha $\gamma 2$ jako wskaźnik początku transformacji złośliwej łagodnego gruczolaka jelita grubego.	(Masaki, Matsuoka, 2003)
	Powiązanie ekspresji LN-5 z rakiem pęcherza; LN-5 może promować ruchliwość i inwazję komórek NBT-II	(Grassi, Moens, et al., 1999)
	Wzrost stężenia lamininy-5 w osoczu osób chorych na nowotwór pęcherza w porównaniu z grupą kontrolną	(Sankiewicz, Romanowicz, et al., 2016)
	Wzrost ekspresji LN-5 u pacjentów z rakiem sutka z przerzutami do węzłów chłonnych	(Kwon, Chae, et al. 2012)
Kolagen IV	Podwyższone poziomy kolagenu IV u pacjentów z rakiem jelita grubego oraz przerzutami do wątroby w porównaniu do grupy pacjentów bez przerzutów → przypuszcza się wysoki poziom angiogenezy lub inwazji nowotworowej	(Ambiru, Miyazaki, et al. 1995; Hong, Hong, et al. 1995; Mazouni, Arun, et al., 2008)
	Ulega silniejszej ekspresji w przypadku raka trzustki w porównaniu do innych białek błony podstawnej	(Ohlund, Franklin, et al., 2013)
	Ulega silniejszej ekspresji w pobliżu komórek raka trzustki i oddziałuje z integrynami $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ na powierzchni komórek rakowych	(Ohlund, Franklin, et al., 2013)
	Promuje wzrost i migrację komórek oraz hamuje apoptozę	(Ohlund, Franklin, et al., 2013)
	Wysoki poziom stwierdzono w surowicy pacjentów z przerzutowym rakiem piersi, rakiem jelita grubego, żołądka, płuc, wątroby	(Ambiru, Miyazaki, et al. 1995; Hong, Hong, et al. 1995; Mazouni, Arun, et al., 2008)
	Wyższy poziom kolagenu zanotowano również u pacjentów z marskością wątroby i z chorobami nerek	(Hong, Hong, et al. 1995; Xu, Wu, et al., 2002)
Fibronektyna	Stężenie fibronektyny jest wyższe u pacjentów w przypadku nowotworu: żołądka jelita grubego piersi pęcherza moczowego a także ze stwierdzonymi chorobami nienowotworowymi takimi jak:	(David, Nesland, et al. 1994; Tas, Bilgin, et al. 2016) (Saito, Nishimura, et al., 2008) (Ruiz-Garcia, Scott, et al., 2010) (Habasch, Abdul-Rasheed, et al. 2014)

	choroba reumatyczna choroba niedokrwienna serca cukrzyca	(Mette, Ozturk, et al. 1998) (Soon Song, Kyung Kim, et al. 2001) (Kanters, Banga, 2001)
	Fibronektyna jest obecna w płynie mózgowo-rdzeniowym osób chorych na epilepsję	(Xi, Wang, et al. 2015)
	Wykazano niskie stężenie FN u osób z sepsą	(Ruiz Martin, Prieto Prieto, et al. 2004)
Tenascyna	Wzrost ekspresji podczas inwazji guza nowotworowego	(Ioachim, Michael, et al. 2005; Titta, Wahlstrom, et al. 1993; Booth, Harnden, et al. 2002)
	Ekspresja tenascyny jest wyższa w słabo zróżnicowanych guzach nowotworowych	(Ioachim, Michael, et al. 2005)
	Ekspresja tenascyny jest skorelowana dodatnio z dwoma wskaźnikami proliferacyjnymi: Ki-67 oraz PCNA, a także z ekspresją fibronektyny i kolagenu IV; zależy również od gęstości mikronaczyń	(Ioachim, Michael, et al. 2005)
	Ekspresja tenascyny okazuje się jednak nie być niezależnym czynnikiem prognostycznym dla nowotworu pęcherza moczowego	(Ioachim, Michael, et al. 2005)
Nidogen	Podwyższone stężenie w osoczu u osób z rakiem jajnika oraz wzrost stężenia wraz ze stadium nowotworu.	(Li, Zhang, et al. 2015)
	Podwyższona ekspresja w komórkach raka płaskonabłonkowego przełyku	(Chai, Cheung et al. 2017)
	Podwyższona ekspresja zwiększa migrację, inwazję i wiązanie komórek do śródbłonka.	(Alečković, Wei, et al. 2017)
MMPs	Zaburzenia równowagi między MMPs a ich inhibitorami są powodem nowotworów m. in. piersi oraz trzustki	(Yamamoto, Itoh, et al. 2001)
	Zdolność do degradacji kolagenu IV, co pociąga za sobą duże ryzyko przerzutowania	(Łukasiewicz, Mroczo, et al. 2008)

Podsumowanie

Wysoce wyspecjalizowana struktura, jaką jest błona podstawna, odgrywa niezwykle ważną rolę w organizmie żywym. Jej składniki odpowiadają za prawidłowe zachowywanie się komórek oraz bezpośrednio uczestniczą w progresji nowotworów. BM stanowi siatkę białkową dla macierzy zewnątrzkomórkowej. Łączy nabłonek z podłożem, uczestniczy w procesach transportu metabolitów i substancji odżywczych do i na zewnątrz naczyń krwionośnych. Nieprawidłowości w błonie podstawnej i zaburzenia układu immunologicznego prowadzą do powstawania wielu różnych chorób, w tym, przede wszystkim, nowotworów. Niezwykle ważne jest, aby w organizmie utrzymana była odpowiednia kontrola nad ekspresją oraz aktywnością enzymów ECM. Zaburzenia równowagi w funkcjonowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej mogą doprowadzić do degradacji błony podstawnej. Powodują one również wzmocnienie zachowań onkogennych komórek, niepra-

widłości w funkcjonowaniu narządów oraz nadprodukcję składników przekazujących sygnały przez czynniki wzrostu.

Literatura

Alečković M., Wei Y., LeRoy G., Sidoli S., Liu D.D., Garcia B.A., Kang Y. **Identification of Nidogen 1 as a lung metastasis protein through secretome analysis.** Genes and Development. 2017;31(14):1439-1455.

Ambiru S., Miyazaki M., Nakagawa K., Nakajima N. **Increased serum type IV collagen 7-S levels in patients with hepatic metastasis.** The American of Gastroentology. 1995; 90(5): 783-787.

Booth C., Harnden P., Selby P. J., Southgate J. **Towards defining roles and relationships for tenascin-C and TGFbeta-1 in the normal and neoplastic urinary bladder.** The Journal of Pathology. 2002; 198(3): 359-368. doi: 10.1002/path.1214.

Chai A.W.Y., Cheung A.K.L., Dai W., Ko J.M.Y., Lee N.P.Y., Chan K.T., Law S.Y., Lung M.L. **Elevated levels of serum nidogen-2 in esophageal squamous cell carcinoma.** Cancer Biomarkers. 2017 doi: 10.3233/CBM-170484.

Chiquet-Ehrismann R., Kalla P., Pearson C. A., Beck K., Chiquet M. **Tenascin interferes with fibronectin action.** Cell. 1988; 53(3): 383-390.

David L., Nesland J. M., Holm R., Sobrinho-Simoes M. **Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma.** Cancer. 1994; 73(518): 527.

Grassi M., Moens G., Rousselle P., Thiery J. P., Jouanneau J. **The SFL activity secreted by metastatic carcinoma cells is related to laminin 5 and mediates cell scattering in an integrin- independent manner.** Journal of Cell Science. 1999; 112: 2511-2520.

Habash N. K., Abdul-Rasheed O. F., Al-Nasiri U. S. **Evaluation of serum and urinary fibronectin as a diagnostic marker of bladder cancer.** Iraqi Journal of Medical Sciences. 2014; 3(12): 267-272.

Hao J., Yang Y., McDaniel K. M., Dalkin B. L., Cress A. E., Nagle R. B. **Differential expression of laminin 5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) by human malignant and normal prostate.** American Journal of Pathology. 1996; 149: 1341-1349.

Hong W. S., Hong S. I., Park S. Y., Son Y., Lee Y. S., Chung Y. H., Yang S. K., Suh D. J., Min Y. I. **Elevation of serum type IV collagen in liver cancer as well as liver cirrhosis.** Anticancer Research. 1995; 15(6B): 2777-2780.

Ioachim E., Michael M., Stravropoulos N. E., Kitsiou E., Salmas M., Malamou-Mitsi V. A **clinicopathological study of the expression of extracellular matrix components in urothelial carcinoma.** BJU International. 2005; 95: 655-658.

Kalluri R., **Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis.** Nature Review Cancer. 2003; 3(6):422-433.

Kang S. G., Ha Y. R., Ko Y. H., Kang S. H., Joo K. J., Cho H. Y., Park H. S., Kim C. H., Kwon S. Y., Kim J. J., Cheon J., Lee J. G. **Effect of laminin 332 on motility and invasion in bladder cancer.** Kaohsiung Journal of Medical Sciences. 2013; 29: 423-428.

Kanters S. D. J., Banga J. D., Algra A., Frijns R. C. J., Beutler J. J., Fijnheer R. **Plasma Levels of Cellular Fibronectin in Diabetes.** Diabetes Care. 2001; 24(2): 323-327.

Katayama M., Sekiguchi K. **Laminin-5 in epithelial tumor invasion.** Journal of Molecular Histology. 2004; 35: 277-282.

Klimek I., Kulig A., Kałużyński A. **Choroba cienkich błon podstawnych – podłoże genetyczne, obraz morfologiczny i kliniczny.** Przegląd Pediatryczny. 2006; 1(36): 70-75.

Kwon S.Y., Chae S.W., Wilczynski S.P., Arain A., Carpenter., Philip M., **Laminin 332 expression in breast carcinoma.** 2012; 20(2) :159-164.

- Li L, Zhang Y, Li N, Feng L, Yao H, Zhang R, Li B, Li X, Han N, Gao Y, Xiao T, Wu L. **Nidogen-1: a candidate biomarker for ovarian serous cancer.** Japanese Journal of Clinical Oncology . 2015; 45(2):176-82.
- Liotta L. A., **Adhere, Degrade, and Move: the three-step model of invasion.** Cancer Research. 2016; 76(11):3115-3117.
- Lohi J., Oivula J., Kivilaakso E., Kiviluoto T., Frojzman K., Yamada Y., Burgeson R. E., Leivo I., Virtanen I. **Basement membrane laminin-5 is deposited in colorectal adenomas and carcinomas and serves as a ligand for $\alpha 3\beta 1$ integrin.** Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 2000; 3(108): 161-172.
- Lu P., Weaver V. M., Werb Z. **The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression.** The Journal Of Cell Biology. 2012; 4(196): 395-399.
- Łapka A., Goździalska A., Jaśkiewicz J. **Rola metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w nowotworach piersi ze szczególnym uwzględnieniem roli żelatynazy A oraz żelatynazy B.** Postępy biologii komórki. 2006; 4(33): 683-693.
- Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmítkowski M. **Rola metaloproteinaz i ich inhibitorów w raku trzustki.** Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej. 2008; 62: 141-146.
- Malvasi A., Cavallotti C., Resta L., Mynbaev O. A., Di Tommaso S., Vergara D., Gustapane S., Giacci F., Tinelli A. **Laminin and Collagen IV: Two Polypeptides as Marker of Dystocic Labor.** Bentham Science. 2017; 2(18): 149-151.
- Masaki T., Matsuoka H., Sugiyama M., Abe N., Izumisato Y., Sakamoto A., Atomi Y. **Laminin-5 $\gamma 2$ chain expression as a possible determinant of tumor aggressiveness in T1 colorectal carcinomas.** Digestive Diseases and Sciences. 2003; 2(48): 272-278.
- Mazouni C., Arun B., Andre F., Ayers M., Krishnamurthy S., Wang B., Hortobagyi G. N., Buzdar A. U., Pusztai L. **Collagen IV levels are elevated in the serum of patients with primary breast cancer compared to healthy volunteers.** British Journal of Cancer. 2008; 99: 68-71.
- Mette N., Ozturk I. H., Colpan L. **Plasma fibronectin and urine glycosaminoglycan levels in rheumatic disease.** Tropical Journal of Medical Sciences. 1998; 28: 437-441.
- Miosge N., Holzhausen S., Zelent C., Sprysch P., Herken R. **Nidogen-1 and nidogen-2 are found in basement membranes during human embryonic development.** **The Histochemical Journal. 2001; 33(9-10):523-30.**
- Niemczyk S., Woźniacki Ł. **Zespół Goodpasture'a.** Nefrologia i Dializoterapia Polska. 2008; 3(12): 206-209.
- Nicoloff G., Delijyski T., Nikolov A. **Detection of serum collagen type IV and elastin derived peptides in patients with breast cancer.** Diabetologia Croatica. 2010; 3(39): 83-84.
- Ohlund D., Franklin O., Lundberg E., Lundin C., Sund M. **Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop.** BMC Cancer. 2013; 13(154): 1-10.
- Pankov R., Yamada K. M. **Fibronectin at a glance.** Cell Science at a Glance. 2002; 115(20): 3861-3863.
- Pozzi A., Yurchenco P.D., Iozzo R.V.** The nature and biology of basement membranes. **Matrix Biology. 2017; 57-58:1-11.**
- Pyke C., Rømer J., Kallunki P., Lund L. R., Ralfkiaer E., Danø K., Tryggvason K. **The $\gamma 2$ chain of laminin/laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers.** American Journal of Pathology. 1994; 145(4): 782-791.
- Robledo T., Arriaga-Pizano L., Lopez-Perez M., Salazar E. P. **Type IV collagen induces STAT5 activation in MCF7 human breast cancer cells.** Matrix Biology. 2005; 24(7): 469-477.

Ruiz-Garcia E., Scott V., Machavoine C., Bidart J. M., Lacroix L., Delalogue S., Andre F. **Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening.** British Journal of Cancer. 2010; 102: 462-468.

Ruiz Martin G., Prieto Prieto J., Veiga de Cabo J., Gomez Lus L., Barberan J., Gonzalez Landa J. M., Fernandez C. **Plasma fibronectin as a marker of sepsis.** International Journal of Infectious Diseases. 2004; 4(8): 236-243.

Saito N., Nishimura H., Kameoka S. **Clinical significance of fibronectin expression in colorectal cancer.** Molecular Medicine Reports. 2008; 1(1): 77-81.

Sankiewicz A., Romanowicz L., Laudanski P., Zelazowska-Rutkowska B., Puzan B., Cylwik B., Gorodkiewicz E. **SPR imaging biosensor for determination of laminin-5as a potential cancer marker in biological material.** Analytical & Bioanalytical Chemistry. 2016; 19(408): 5269-5276.

Sankiewicz A., Romanowicz L., Pyc M., Hermanowicz A., Gorodkiewicz E. **SPR imaging biosensor for the quantitation of fibronectin concentration in blood samples.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018; 150: 1-2.

Sawicki W., Malejczyk J. **Tkanka nabłonkowa.** In: Jedlińska J., Cynkier B., Sierakowska A. (Editors) **Histologia.** 2015; Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa (Polska); ISBN: 978-83-200-4349-5.

Soon Song K., Kyung Kim H., Shim W., Ha Jee S. **Plasma fibronectin levels in ischemic heart disease.** Atherosclerosis. 2001; 2(154): 449-453.

Stanley J.R., Woodley D.T., Katz S.I., Martin G.R. Structure and function of basement membrane. **Journal of Investigative Dermatology, 1982; 79(1):69-72.**

Tas F., Bilgin E., Karabulut S., Tastekin D., Duranyildiz D. **Levels of serum fibronectin as a biomarker in gastric cancer patients: Correlation with clinical diagnosis and outcome.** Molecular and clinical oncology. 2016; 4(4): 655-659.

Tiitta O., Wahlstrom T., Virtanen I., Gould VE. **Tenascin in inflammatory conditions and neoplasms of the urinary bladder.** Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology. 1993; 63: 283-287.

Tokes A. M., Hortovanyi E., Kulka J., Jackel M., Kerenyi T., Kadar A. **Tenascin expression and angiogenesis in breast cancers.** Pathology – Research and Practice. 1999; 195(12):821-828.

Xi Z., Wang X., Luo J., Wang W., Xiao F., Chen D., Wang S., Li M., Wang L. **Fibronectin is a potential cerebrospinal fluid and serum epilepsy biomarker.** Epilepsy & Behavior. 2015; 48: 66-69.

Xu X., Wu Z., Zhou Q., Zhang Y., Wu D. **The role of determining the levels of serum collagen type IV in diagnosing early diabetic nephropathy.** Renal Failure. 2002; 24(6): 747-753.

Yamamoto H., Itoh F., Iku S., Adachi Y., Fukushima H., Sasaki S., Mukaiya M., Hirata K., Imai K. **Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression.** Journal of Clinical Oncology. 2001; 19(4): 1118-1127.

Rola aktywacji receptorów estrogenowych i szlaków Erk/Akt w etiologii glejaków

Klaudia Klicka¹, Anna Kosowska², Stanisław Szlufik^{2,3}, Jarosław Józwiak²

¹Studenckie Koło Naukowe Neurobiologii Molekularnej, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny

³Klinika Neurologii Wydziału Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Dane kontaktowe do autora korespondencyjnego:

E-mail: jaroslaw.jozwiak@gmail.com

Adres do korespondencji: dr hab. n. med. Jarosław Józwiak, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Streszczenie

Glejakki są najczęstszymi pierwotnymi wewnątrzczaszkowymi nowotworami mózgu. W 2016 roku zaktualizowano ich podział, biorąc pod uwagę parametry molekularne oraz charakterystykę histologiczną. W literaturze opisywana jest rola szlaków Mek/Erk i PI3K/Akt w patogenezie glejaków. Wg WHO wyróżniamy cztery stopnie złośliwości nowotworów (WHO I-IV). U dzieci najczęściej występującym spośród tej grupy nowotworów jest gwiaździatek włosowatokomórkowy (WHO I), a u dorosłych glejak wielopostaciowy (WHO IV). Wśród czynników ryzyka rozwoju nowotworu wymieniane jest głównie promieniowanie jonizujące. Badania epidemiologiczne dowodzą częstszego występowania glejaków u mężczyzn, jednocześnie wskazując również na wpływ żeńskich hormonów na ryzyko zachorowania oraz zmniejszenie ekspresji receptorów estrogenowych wraz ze wzrostem stopnia złośliwości glejaków. Receptory estrogenowe ER α oraz ER β należą do nadrodziny czynników transkrypcyjnych aktywowanych ligandem. Dotychczas opisano wpływ receptora estrogenowego ER β na wrażliwość komórek glejowych na chemioterapię poprzez szlak PI3K/Akt oraz pozytywną korelację pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego ER α u pacjentów z glejakiem wielopostaciowym, a długością ich przeżycia. Badania wykazują również wpływ selektywnych modulatorów receptora estrogenowego na wrażliwość komórek glejaka na chemioterapię, m.in. tamoksifen, co może być w przyszłości wykorzystane w leczeniu tych nowotworów. Dotychczasowe dane literaturowe przemawiają za niezależnym wpływem estrogenów na hamowanie wzrostu glejaków. Konieczne są dalsze badania, mające na celu określenie dokładnego szlaku oddziaływania estrogenów na komórki glejaka.

Abstract

Gliomas are the most common primary intracranial brain tumors. In 2016, their classification was updated, taking into consideration molecular parameters and histological characteristics. The role of Mek/Erk and PI3K/Akt pathways in the pathogenesis of gliomas is described in the literature. According to the WHO, we distinguish four degrees of malignancy of tumors (WHO I-IV). In children, the most common is juvenile astrocytoma (WHO I), and in adults, glioblastoma multiforme (WHO IV). Among the risk factors for tumor development, ionizing radiation is mainly mentioned. Epidemiological studies proved higher incidence of gliomas in men and demonstrated the effect of female hormones on the risk of glioma as well as the correlation between expression of estrogen receptors and increased malignancy of gliomas. Estrogen receptors, ER α and ER β , belong to the superfamily of ligand-activated transcription factors. The influence of estrogen receptor ER β on the sensitivity of glial cells to chemotherapy through the PI3K/Akt pathway and the positive correlation between the expression of estrogen receptor ER α in patients with glioblastoma multiforme and their survival were described in the literature. Research also shows the effect of selective estrogen receptor modulators on the sensitivity of glioblastoma cells to chemotherapy, including tamoxifen, which may be used in the future to treat these cancers. The foregoing literature data support an independent influence of estrogens on the inhibition of glioma growth. Further studies are needed to determine the exact pathways of estrogen activity on glioma cells.

Charakterystyka kliniczna, podział i epidemiologia glejaków

Glejak jest to grupa nowotworów ośrodkowego układu nerwowego wywodzących się z komórek glejowych. Stanowią biologicznie bardzo heterogenną grupę. W 2016 roku Światowa Organizacja Zdrowia zaktualizowała podział guzów ośrodkowego układu nerwowego biorąc pod uwagę parametry molekularne oraz charakterystykę histologiczną. Ocena obu parametrów jest często niezbędna do ustalenia właściwego stopnia złośliwości. Guzy OUN podzielono na grupy: rozproszone guzy astrocytarne i oligodendrogleju, inne gwiaździki, wyściółczaki, inne glejaki, guzy splotu naczyniówkowego, neuronalne i mieszane guzy neuronalno-glejowe, guzy regionu szyszynki, guzy zarodkowe, guzy nerwów czaszkowych i rdzeniowych, oponiaki, mezenchymalne nowotwory nie meningotelialne, guzy melanocytowe, chłoniaki, nowotwory histiocytowe, nowotwory z regionu siodłowego i przerzuty. Klasyfikacja złośliwości glejaków według WHO składa się z 4 stopni. (Wen and Huse 2017). Glejaki są najczęstszymi pierwotnymi wewnątrzczaszkowymi guzami mózgu (Barker, Weller et al. 1976). U dorosłych najczęściej występuje glejak wielopostaciowy (WHO IV) a u dzieci gwiaździk włosowatokomórkowy (WHO I) (Qaddoumi, Sultan et al. 2009, Ostrom, Gittleman et al. 2014, Ostrom, Gittleman et al. 2018). Zachorowanie na glejaka dziecięcego o niskiej złośliwości wiąże się z bardzo dobrym rokowaniem i 20-letnim przeżyciem na poziomie 87% (Bandopadhyay, Bergthold et al. 2014). Natomiast 5-letnie przeżycie pacjenta chorego na glejaka wielopostaciowego leczonego terapią kombinowaną szacowane jest na 9,8% (Oike, Suzuki et al. 2013).

Jedną spośród klinicznych klasyfikacji nowotworów mózgu obejmuje podział na guzy zlokalizowane nadnamiotowo (umiejscowione powyżej namiotu mózdzku) oraz podnamiotowo (poniżej namiotu mózdzku, w tylnym dole czaszki). U dzieci, w zależności od typu nowotworu, od 30 do 60 % nowotworów mózgu zlokalizowanych jest nadnamiotowo. W badaniach wykazano, iż nowotwory OUN u dzieci różnią się molekularnie i genetycznie od nowotworów u osób dorosłych (Zamora, Huisman et al. 2017). Kliniczna klasyfikacja nowotworów mózgu wieku dorosłego uwzględnia między innymi pierwotną lokalizację komórek nowotworowych, natomiast u dzieci klasyfikacja dotyczy tkanki, z której powstały (Prasad, Ravi et al. 2017). Pomimo ogólnoświatowej akceptacji klasyfikacji WHO przez neuropatologów, guzy te nadal są klinicznie określane za pomocą wielu terminów, z powodu odmiennej predykcji dla młodych pacjentów i pewnych miejsc anatomicznych (Bikowska-Opalach, Szlufik et al. 2014).

Charakterystyka molekularna glejaków

Molekularne mechanizmy powstawania glejaków nie zostały w pełni poznane. Pod wpływem czynników powodujących zaburzenia genetyczne, dochodzi do nieprawidłowego działania genów, których mutacje przyczyniają się do powstania nowotworu. Wyróżniamy m. in. geny supresorowe nowotworzenia. Białkowe produkty tych genów działają hamująco w procesie proliferacji, regulują cykl komórkowy i różnicowanie się komórek. Utrata funkcji przez te geny powoduje nowotworzenie. Pod wpływem mutacji zmienione mogą zostać również proto-onkogeny. Uaktywniają się one do onkogenów kodujących białka, które odpowiadają

za proliferację, różnicowanie, hamowanie apoptozy. Komórki z nieprawidłowym DNA zaczynają się w niekontrolowany sposób namnażać, co prowadzi w konsekwencji do rozwoju nowotworu (Jones, Gronych et al. 2012). Badania sugerują że znacząca może być mutacja punktowa powodująca zaburzenia w funkcjonowaniu onkogenu BRAF. Dochodzi do połączenia KIAA1549 i BRAF. Mutacje *BRAF* stwierdzone były w około 60-80% przypadków gwiaździaka włosowatokomórkowego o lokalizacji podnamiotowej (Faulkner, Ellis et al. 2015, Gessi and Pietsch 2013). Najnowsze analizy bioinformatyczne wskazują również gen *p53* jako potencjalnie niezwykle istotny w patogenezie glejaków poprzez wpływ na szlaki Wnt i *p53*. Także geny *BDNF* oraz *CDK1* wydają się mieć wpływ na rozwój guzów poprzez cykl komórkowy i szlak *p53* (Wang, Wei et al. 2018). Wyniki analizy bioinformatycznej wykonanej przez Liu et al. sugerują obniżoną regulację genów *CDK17*, *GNA13*, *PHF21A* i *MTHFD2* jako biomarkerów oraz celów terapeutycznych w leczeniu glejaków (Liu, Xu et al. 2017).

Charakterystyka szlaków MEK/ERK i PI3K/AKT

Kinaza mTOR pełni istotną funkcję w regulacji procesów związanych ze wzrostem komórki, podziałem komórkowym, a także procesem proliferacji oraz degradacji w komórce. Wpływa na biosyntezę białek, promuje angiogenezę i hamuje autofagię. Zmieniona aktywność kinazy mTOR obserwowana jest w przypadku powstawania wielu nowotworów (Dazert and Hall 2011, Zoncu, Efeyan et al. 2011). Inhibitory kinazy mTOR m. in. rapamycyna, everolimus oraz temsyrolimus, znalazły zastosowanie w leczeniu onkologicznym (Ghidini, Petrelli et al. 2017) (Karvelas, Roumpi et al. 2018), a także w terapii guzowatości oraz w immunosupresji (Waldner, Fantus et al. 2016, Singh and Subbian 2018). Badania wskazują na znaczącą rolę kinazy mTOR w patogenezie glejaków (Machado, Alvarenga et al. 2018). W szlaku Ras/Raf/Mek/Erk jak i PI3K/Akt dochodzi do aktywacji kinazy mTOR i poprzez aktywację kinazy S6K oraz 4E-BP-1 promocji przeżycia komórki, jej wzrostu i podziałów. Wykazano rolę PI3K w patogenezie glejaków oraz jej związek ze złośliwością nowotworu, zmniejszoną apoptozą komórek oraz gorszym rokowaniem dla pacjentów (Chakravarti, Zhai et al. 2004). W rozwoju gwiaździaka włosowatokomórkowego znacząca jest również rola szlaku sygnałowego MAPK. Kinazy MAPK są zaangażowane w działanie większości pozajądrowych onkogenów, a ich zaburzenia mogą powodować rozwój nowotworu (Jones, Gronych et al. 2012).

Rola receptorów estrogenowych w etiologii glejaków

Receptory estrogenowe ER α oraz ER β należą do nadrodziny czynników transkrypcyjnych aktywowanych ligandem. Poprzez wiązanie z estrogenowymi elementami odpowiedzi w DNA wpływają na transkrypcję. Są one jednym z regulatorów przepływu sygnału w komórce i biorą udział w onkogenezie. Znaczący wpływ na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego mają hormony steroidowe. Najnowsze badania podkreślają ich znaczącą rolę jako neuroprzekazników. Zaburzenia w ich funkcjonowaniu mają zarówno negatywny wpływ na funkcjonowanie całego organizmu, jak również na patologię poszczególnych układów (Vandegrift, You et al. 2017). W wielośrodkowej analizie zbiorczej wpływu żeńskich hormonów płciowych na ryzyko glejaka wyróżniono wczesne

dojrzewanie płciowe, stosowanie doustnej antykoncepcji hormonalnej oraz hormonalnej terapii zastępczej jako czynniki wpływające na niższe ryzyko zachorowania na glejaka (Krishnamachari, Il'yasova et al. 2014). Wg badań epidemiologicznych mężczyźni są bardziej narażeni na zachorowanie. U mężczyzn występowały częściej glejaki wielopostaciowe, gwiaździaki oraz skąpodrzewiaki (Ostrom, Gittleman et al. 2014). Glejak wielopostaciowy występuje 1,5 do 2 razy częściej u mężczyzn, niż u kobiet, a iloraz szans ryzyka zachorowania u kobiet w stosunku do ryzyka zachorowania u mężczyzn zmienia się w poszczególnych kategoriach wiekowych i jest najniższy pomiędzy okresem dojrzewania (przedział 10-14 lat), a okresem menopauzy (przedział 50-54 lata), po czym wzrasta w wyższych przedziałach wiekowych (McKinley, Michalek et al. 2000). Powyższe dane epidemiologiczne mogą sugerować ochronny wpływ żeńskich hormonów płciowych w zachorowaniu na glejaka.

W badaniach wykazano ekspresję mRNA receptora estrogenowego w gleju (Santagati, Melcangi et al. 1994). Oceniając poziom receptorów steroidowych w glejakach, tylko w przypadku 17% glejaków wykazano obecność receptorów estrogenowych i to w obniżonej ilości, w porównaniu do innych receptorów steroidowych: progesteronowego, androgenowego i glukokortykoidowego, które były obecne odpowiednio w 50%, 42% i 58% badanych guzów (Brentani, Lopes et al. 1984).

Dalsze badania ekspresji mRNA receptorów steroidowych w glejakach potwierdzają obniżoną ekspresję receptora estrogenowego, w przeciwieństwie do innych receptorów hormonów steroidowych (Paoletti, Butti et al. 1990, Carroll, Zhang et al. 1995, Assimakopoulou, Sotiropoulou-Bonikou et al. 1998). Kolejne badania nie potwierdziły wyników tych doniesień i wykazują korelację między obniżoną ekspresją ER β , a wzrostem złośliwości guzów (Batistatou, Stefanou et al. 2004). Obniżona ekspresja ER β może być również związana z gorszym rokowaniem dla pacjenta i może być czynnikiem prognostycznym przeżycia pacjenta (Batistatou, Kyzas et al. 2006, Kefalopoulou, Tzelepi et al. 2012). Podobne zależności wykazano badając mRNA ER α , którego ekspresja obniżała się wraz ze wzrostem złośliwości guzów, a zwiększona ekspresja była skorelowana z długością życia pacjentów (Duenas Jimenez, Candanedo Arellano et al. 2014). Uważa się, że w powstawaniu nowotworów ma znaczenie zaburzenie funkcjonowania receptorów AR, ER α i ER β i ich koaktywatorów SRC. Zmiana ekspresji receptorów AR, ER α i ER β i ich koaktywatora SRC-3 może być związana z procesem powstawania glejaków. Nie wykazano różnicy w poziomie w ekspresji AR, ER α , ER β , i ich koaktywatorów SRC-1, SRC-3 ze względu na płeć i wiek w tkance zmienionej nowotworowo i tkance prawidłowej. Natomiast okazało się, że znacznie wyższy poziom AR, ER α , ER β , i SRC-3 występuje w przypadku niskiego stopnia złośliwości, w porównaniu do wysokiego stopnia złośliwości (Gonzalez-Arenas, Hansberg-Pastor et al. 2012, Liu, Zhang et al. 2014). Kolejne badania koaktywatorów receptorów estrogenowych: AIB1, TIF2 i PELP1 wykazały ich istotną rolę w patogenezie i progresji gwiaździaków oraz możliwe znaczenie prognostyczne. Podwyższona ekspresja AIB1, TIF2, and PELP1 była zauważalna w glejakach w wyższym stopniu złośliwości i wiązała się z gorszym rokowaniem (Kefalopoulou, Tzelepi et al. 2012).

Rolę szlaku receptora estrogenowego β w patogenezie glejaka potwierdzają badania z wykorzystaniem agonisty ER β , liquiritigeninu. W modelu przeszczepu heterogenego zmniejszono wzrost guza *in vivo* przy użyciu tej substancji, co daje nadzieję na wykorzystanie jej w leczeniu pacjentów (Sareddy, Nair et al. 2012).

Związek receptorów estrogenowych ze szlakami kinazy mTOR

Uważa się, iż receptory estrogenowe, jak i szlaki Mek/Erk oraz PI3K/Akt mogą pełnić kluczową rolę w patogenezie glejaków. Sugeruje się związek pomiędzy nadekspresją izoform ER β 1 i ER β 5, a zwiększoną ekspresją białka PTEN, które pełni rolę supresora nowotworzenia oraz zahamowaną aktywacją szlaku PI3K/AKT/mTOR. Dodatkowo izoforma ER β 5, której ekspresja jest zwiększona w glejakach w stosunku do zdrowej tkanki, hamuje szlak MAPK/ERK (Li, Winters et al. 2013). Związek pomiędzy ER β , a szlakiem PI3K/AKT/mTOR potwierdza także wpływ agonisty ER β , liquiritigeninu, na zwiększenie chemiowrażliwości glejaka wielopostaciowego na działanie temozolomidu poprzez wyżej wymieniony szlak. Efekt ten sprawdzono poprzez zahamowanie szlaku insulinopodobnym czynnikiem wzrostu IGF-1, co niwelowało pozytywny efekt działania liquiritigeninu (Liu, Wang et al. 2015).

Rola SEMR w leczeniu glejaków

SEMR to selektywne modulatory receptora estrogenowego. Wśród nich wyróżniamy m.in. raloksifen oraz tamoksifen. Są to leki, które wykazują działanie agonistyczne lub antagonistyczne w stosunku do receptora estrogenowego w zależności od rodzaju tkanki. Tamoksifen jest stosowany do terapii raka piersi (Kassem, Megahed et al. 2018), a raloksifen, agonista receptorów estrogenowych w tkance kostnej, w terapii osteoporozy u starszych osób (Um, Cho et al. 2017). W badaniach *in vitro* oba leki uwrażliwiały komórki glejaka wielopostaciowego na działanie temozolomidu (Baritchii, Jurj et al. 2016). Jednakże długie zastosowanie tamoksifenu wywołuje oporność komórek na jego działanie. Przypuszcza się, iż tamoksifen wpływa na receptor estrogenowy ER α 36, jednakże konieczne są dalsze badania (Liu, Huang et al. 2016). Rozpoczęto badania kliniczne z zastosowaniem tamoksifenu w leczeniu glejaków. Połączenie tamoksifenu z karboplatiną u pacjentów z nawracającym glejakiem wysokiej złośliwości nie wykazywało większej skuteczności w stosunku do innych terapii stosowanych w tym przypadku (Tang, Roldan et al. 2006). Badania pierwszej fazy nad połączeniem tamoksifenu z temozolomidem wykazały, że maksymalna tolerowana dawka tamoksifenu to 100 mg/m² i może być on skuteczny w leczeniu glejaków o wysokiej złośliwości, stąd konieczne są dalsze badania kliniczne drugiej fazy (Patel, DiBiase et al. 2012).

Podsumowanie

Powyższe dane wskazują na ważną rolę receptorów estrogenowych w patogenezie glejaków. Badania epidemiologiczne sugerują ochronny wpływ estrogenów na zachorowanie na glejaki. Kolejne badania ekspresji receptorów estrogenowych w glejakach o różnej złośliwości potwierdzają tę tezę wykazując niższą ekspresję wraz ze wzrostem stopnia złośliwości. Ważnym w poznaniu mechanizmu wpływu estrogenów na rozwój nowotworów jest powiązanie receptorów estrogenowych ze szlakiem mTOR, który pełni kluczową rolę w patogenezie glejaków poprzez wpływ

na wzrost komórek, zahamowanie apoptozy i autofagii oraz promowanie ich podziałów. Rozpoczęto badania kliniczne z wykorzystaniem selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych z różnymi chemioterapeutykami. Konieczne są jednak badania kolejnych faz, by potwierdzić skuteczność stosowania tych preparatów. Podsumowując, ekspresja receptorów estrogenowych w glejakach, ich powiązanie ze szlakami Akt/Erk oraz potencjał terapeutyczny mogą w istotny sposób przyczynić się do poznania patogenyzy rozwoju glejaków, jak również pozwolić na wprowadzenie ich do leczenia pacjentów z glejakami mózgu, wpływając jednocześnie na poprawę ich rokowań.

Literatura

- Assimakopoulou, M., G. Sotiropoulou-Bonikou, T. Maraziotis and J. Varakis (1998). **Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors?** Clin Neuropathol 17(1): 27-34.
- Bandopadhyay, P., G. Berghold, W. B. London, L. C. Goumnerova, A. Morales La Madrid, K. J. Marcus, D. Guo, N. J. Ullrich, N. J. Robison, S. N. Chi, R. Beroukhir, M. W. Kieran and P. E. Manley (2014). **Long-term outcome of 4,040 children diagnosed with pediatric low-grade gliomas: an analysis of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) database.** Pediatr Blood Cancer 61(7): 1173-1179.
- Baritchi, A., A. Jurj, O. Soritau, C. Tomuleasa, L. Raduly, O. Zanoaga, D. Cernea, C. Braicu, I. Neagoe and I. Stefan Florian (2016). **Sensitizer drugs for the treatment of temozolomide-resistant glioblastoma.** J buon 21(1): 199-207.
- Barker, D. J., R. O. Weller and J. S. Garfield (1976). **Epidemiology of primary tumours of the brain and spinal cord: a regional survey in southern England.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 39(3): 290-296.
- Batistatou, A., P. A. Kyzas, A. Goussia, E. Arkoumani, S. Voulgaris, K. Polyzoidis, N. J. Agnantis and D. Stefanou (2006). **Estrogen receptor beta (ERbeta) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours.** J Neurooncol 77(1): 17-23.
- Batistatou, A., D. Stefanou, A. Goussia, E. Arkoumani, A. G. Papavassiliou and N. J. Agnantis (2004). **Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm.** J Cancer Res Clin Oncol 130(7): 405-410.
- Bikowska-Opalach, B., S. Szlufik, W. Grajkowska and J. Jozwiak (2014). **Pilocytic astrocytoma: a review of genetic and molecular factors, diagnostic and prognostic markers.** Histol Histopathol 29(10): 1235-1248.
- Brentani, M. M., M. T. Lopes, V. R. Martins and J. P. Plese (1984). **Steroid receptors in intracranial tumors.** Clin Neuropharmacol 7(4): 347-350.
- Carroll, R. S., J. Zhang, K. Dashner, M. Sar and P. M. Black (1995). **Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms.** Neurosurgery 37(3): 496-503; discussion 503-494.
- Chakravarti, A., G. Zhai, Y. Suzuki, S. Sarkesh, P. M. Black, A. Muzikansky and J. S. Loeffler (2004). **The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas.** J Clin Oncol 22(10): 1926-1933.
- Dazert, E. and M. N. Hall (2011). **mTOR signaling in disease.** Curr Opin Cell Biol 23(6): 744-755.
- Gessi, M. and T. Pietsch (2013). **The diagnostic role and clinical relevance of determination of BRAF status in brain tumors.** Personalized Medicine 10(4): 405-412.
- Duenas Jimenez, J. M., A. Candanedo Arellano, A. Santerre, S. Orozco Suarez, H. Sandoval Sanchez, I. Feria Romero, R. Lopez-Elizalde, M. Alonso Venegas, B. Netel, B. de la Torre Valdovinos and S. H.

- Duenas Jimenez (2014). **Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas.** *J Neurooncol* 119(2): 275-284.
- Faulkner, C., H. P. Ellis, A. Shaw, C. Penman, A. Palmer, C. Wragg, M. Greenslade, H. R. Haynes, H. Williams, S. Lowis, P. White, M. Williams, D. Capper and K. M. Kurian (2015). **BRAF Fusion Analysis in Pilocytic Astrocytomas: KIAA1549-BRAF 15-9 Fusions Are More Frequent in the Midline Than Within the Cerebellum.** *J Neuropathol Exp Neurol* 74(9): 867-872.
- Ghidini, M., F. Petrelli, A. Ghidini, G. Tomasello, J. C. Hahne, R. Passalacqua and S. Barni (2017). **Clinical development of mTor inhibitors for renal cancer.** *Expert Opin Investig Drugs* 26(11): 1229-1237.
- Gonzalez-Arenas, A., V. Hansberg-Pastor, O. T. Hernandez-Hernandez, T. K. Gonzalez-Garcia, J. Henderson-Villalpando, D. Lemus-Hernandez, A. Cruz-Barrios, M. Rivas-Suarez and I. Camacho-Arroyo (2012). **Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ERalpha activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators.** *Biochim Biophys Acta* 1823(2): 379-386.
- Jones, D. T., J. Gronych, P. Lichter, O. Witt and S. M. Pfister (2012). **MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma.** *Cell Mol Life Sci* 69(11): 1799-1811.
- Karvelas, G., A. Roumpi, C. Komporozos and K. Syrigos (2018). **Everolimus as cancer therapy: Cardiotoxic or an unexpected antiatherogenic agent? A narrative review.** *Hellenic J Cardiol.*
- Kassem, M. A., M. A. Megahed, S. K. Abu Elyazid, F. I. Abd-Allah, T. M. Abdelghany, A. M. Al-Abd and K. M. El-Say (2018). **Enhancing the Therapeutic Efficacy of Tamoxifen Citrate Loaded Span-Based Nano-Vesicles on Human Breast Adenocarcinoma Cells.** *AAPS PharmSciTech.*
- Kefalopoulou, Z., V. Tzelepi, V. Zolota, P. D. Grivas, C. Christopoulos, H. Kalofonos, T. Maraziotis and G. Sotiropoulou-Bonikou (2012). **Prognostic value of novel biomarkers in astrocytic brain tumors: nuclear receptor co-regulators AIB1, TIF2, and PELP1 are associated with high tumor grade and worse patient prognosis.** *J Neurooncol* 106(1): 23-31.
- Krishnamachari, B., D. Il'yasova, M. E. Scheurer, M. L. Bondy, M. Wrensch and F. G. Davis (2014). **A pooled multisite analysis of the effects of female reproductive hormones on glioma risk.** *Cancer Causes Control* 25(8): 1007-1013.
- Li, W., A. Winters, E. Poteet, M. G. Ryou, S. Lin, S. Hao, Z. Wu, F. Yuan, K. J. Hatanpaa, J. W. Simpkins and S. H. Yang (2013). **Involvement of estrogen receptor beta5 in the progression of glioma.** *Brain Res* 1503: 97-107.
- Liu, C., Y. Zhang, K. Zhang, C. Bian, Y. Zhao and J. Zhang (2014). **Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors.** *Cancer Epidemiol* 38(3): 291-297.
- Liu, M., Z. Xu, Z. Du, B. Wu, T. Jin, K. Xu, L. Xu, E. Li and H. Xu (2017). **The Identification of Key Genes and Pathways in Glioma by Bioinformatics Analysis.** *J Immunol Res* 2017: 1278081.
- Liu, X., L. Wang, J. Chen, Q. Ling, H. Wang, S. Li, L. Li, S. Yang, M. Xia and L. Jing (2015). **Estrogen receptor beta agonist enhances temozolomide sensitivity of glioma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway.** *Mol Med Rep* 11(2): 1516-1522.
- Liu, Y., L. Huang, X. Guan, H. Li, Q. Q. Zhang, C. Han, Y. J. Wang, C. Wang, Y. Zhang, C. Qu, J. Liu and W. Zou (2016). **ER-alpha36, a novel variant of ERalpha, is involved in the regulation of Tamoxifen-sensitivity of glioblastoma cells.** *Steroids* 111: 127-133.
- Machado, L. E., A. W. Alvarenga, F. F. da Silva, M. Roffe, M. D. Begnami, L. F. B. Torres, I. W. da Cunha, V. R. Martins and G. N. M. Hajj (2018). **Overexpression of mTOR and p(240-244)S6 in IDH1 Wild-Type Human Glioblastomas Is Predictive of Low Survival.** *J Histochem Cytochem*: 22155417750838.

- McKinley, B. P., A. M. Michalek, R. A. Fenstermaker and R. J. Plunkett (2000). **The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995.** *J Neurosurg* 93(6): 932-939.
- Oike, T., Y. Suzuki, K. Sugawara, K. Shirai, S. E. Noda, T. Tamaki, M. Nagaishi, H. Yokoo, Y. Nakazato and T. Nakano (2013). **Radiotherapy plus concomitant adjuvant temozolomide for glioblastoma: Japanese mono-institutional results.** *PLoS One* 8(11): e78943.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Liao, C. Rouse, Y. Chen, J. Dowling, Y. Wolinsky, C. Kruchko and J. Barnholtz-Sloan (2014). **CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011.** *Neuro Oncol* 16 Suppl 4: iv1-63.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, L. Stetson, S. Virk and J. S. Barnholtz-Sloan (2018). **Epidemiology of Intracranial Gliomas.** *Prog Neurol Surg* 30: 1-11.
- Paoletti, P., G. Butti, C. Zibera, M. Scerrati, N. Gibelli, R. Roselli, L. Magrassi, G. Sica, G. Rossi and G. Robustelli della Cuna (1990). **Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors.** *J Neurosurg* 73(5): 736-742.
- Patel, S., S. DiBiase, B. Meisenberg, T. Flannery, A. Patel, A. Dhople, S. Cheston and P. Amin (2012). **Phase I clinical trial assessing temozolomide and tamoxifen with concomitant radiotherapy for treatment of high-grade glioma.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 82(2): 739-742.
- Prasad, K. S. V., D. Ravi, V. Pallikonda and B. V. S. Raman (2017). **Clinicopathological Study of Pediatric Posterior Fossa Tumors.** *J Pediatr Neurosci* 12(3): 245-250.
- Qaddoumi, I., I. Sultan and A. Gajjar (2009). **Outcome and prognostic features in pediatric gliomas: a review of 6212 cases from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database.** *Cancer* 115(24): 5761-5770.
- Santagati, S., R. C. Melcangi, F. Celotti, L. Martini and A. Maggi (1994). **Estrogen receptor is expressed in different types of glial cells in culture.** *J Neurochem* 63(6): 2058-2064.
- Sareddy, G. R., B. C. Nair, V. K. Gonugunta, Q. G. Zhang, A. Brenner, D. W. Brann, R. R. Tekmal and R. K. Vadlamudi (2012). **Therapeutic significance of estrogen receptor beta agonists in gliomas.** *Mol Cancer Ther* 11(5): 1174-1182.
- Singh, P. and S. Subbian (2018). **Harnessing the mTOR Pathway for Tuberculosis Treatment.** *Front Microbiol* 9: 70.
- Tang, P., G. Roldan, P. M. Brasher, D. Fulton, W. Roa, A. Murtha, J. G. Cairncross and P. A. Forsyth (2006). **A phase II study of carboplatin and chronic high-dose tamoxifen in patients with recurrent malignant glioma.** *J Neurooncol* 78(3): 311-316.
- Um, M. J., E. A. Cho and H. Jung (2017). **Combination Therapy of Raloxifene and Alendronate for Treatment of Osteoporosis in Elderly Women.** *J Menopausal Med* 23(1): 56-62.
- Vandegrift, B. J., C. You, R. Satta, M. S. Brodie and A. W. Lasek (2017). **Estradiol increases the sensitivity of ventral tegmental area dopamine neurons to dopamine and ethanol.** *PLoS One* 12(11): e0187698.
- Waldner, M., D. Fantus, M. Solari and A. W. Thomson (2016). **New perspectives on mTOR inhibitors (rapamycin, rapalogs and TORKinibs) in transplantation.** *Br J Clin Pharmacol* 82(5): 1158-1170.
- Wang, R., J. Wei, Z. Li, Y. Tian and C. Du (2018). **Bioinformatical analysis of gene expression signatures of different glioma subtypes.** *Oncol Lett* 15(3): 2807-2814.
- Wen, P. Y. and J. T. Huse (2017). **2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors.** *Continuum (Minneapolis, Minn)* 23(6, Neuro-oncology): 1531-1547.
- Zamora, C., T. A. Huisman and I. Izbudak (2017). **Supratentorial Tumors in Pediatric Patients.** *Neuroimaging Clin N Am* 27(1): 39-67.
- Zoncu, R., A. Efeyan and D. M. Sabatini (2011). **mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1): 21-35.

Analiza porównawcza ekspresji genów *MMP2* i *TIMP3* w niedrobnokomórkowym raku płuca

Magda Barańska, Karolina H. Czarnecka, Ewa Brzezińska-Lasota
Zakład Biomedycyny i Genetyki Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

Korespondencja:

Dr n. med. Karolina H. Czarnecka, karolina.czarnecka@umed.lodz.pl
Zakład Biomedycyny i Genetyki, Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

Streszczenie

Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) jest jednym z najczęściej występujących raków na świecie odpowiedzialnym za najwyższy współczynnik śmiertelności u mężczyzn. W nowotworach płuca zaobserwowano zmianę ekspresji genu *MMP-2* kodującego metaloproteinazę rozkładającą kolagen typu IV – składnik błony podstawnej. Metaloproteinazy i ich inhibitory (np. *TIMP-3*) biorą udział w procesie remodelingu macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i mogą wpływać na proces progresji nowotworowej oraz przerzutowania. Ostatnie badania wskazują, że zmiany ekspresji *MMP-2* i *TIMP-3* mogą być istotne diagnostycznie czy mieć wartość predykcyjną. Porównaliśmy ekspresję genów *MMP-2* i *TIMP-3* w NDRP w tkance nowotworowej i kontrolnej oraz w grupach zróżnicowanych ze względu na: histotyp raka, wielkość guza, stopień zaawansowania nowotworu, wiek i płeć pacjentów oraz intensywność palenia tytoniu. Przeanalizowaliśmy materiał pobrany śródoperacyjnie podczas zabiegów lobektomii i pneumonektomii z NDRP z guza i marginesu zmiany. Następnie, przeprowadziliśmy procedury mające na celu izolację RNA, ocenę jego jakości, przepisanie na cDNA, a ostatecznie ocenę relatywnej ekspresji genów.

Zaobserwowaliśmy istotnie wyższy poziom ekspresji *MMP-2* w porównaniu do *TIMP-3* zarówno w tkance kontrolnej i nowotworowej u pacjentów z NDRP. Wykazaliśmy istotne obniżenie ekspresji *TIMP-3* w tkance nowotworowej w przypadku obecności przerzutów do węzłów chłonnych w porównaniu do stanu bez przerzutów. W tkance otaczającej guz wykazaliśmy również ujemną korelację pomiędzy poziomem ekspresji *TIMP-3* u intensywnością palenia, co wskazuje że proces remodelingu ECM zachodzi przed transformacją nowotworową. Zakładając różnice w ekspresji genu *TIMP-3* w zależności od zajęcia węzłów chłonnych oraz intensywności palenia możemy rozważyć badanie ekspresji tego genu jako potencjalnego markera agresywności nowotworu..

Słowa kluczowe: Niedrobnokomórkowy rak płuca, NDRP, *MMP-2*, *TIMP-3*, markery NDRP

Abstract

Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) is one of the most prevalent cancers worldwide responsible for the highest mortality ratio among men. In lung cancers there was observed a difference in *MMP-2* expression- gene encoding protein capable of degrading type IV collagen – a component of basement membrane. Metalloproteinases and its inhibitors (eg. *TIMP-3*) take part in the ECM remodeling process which is an essential step in cancer progression and metastasis of many cancers. The recent studies suggest that expression changes of investigated genes may have a predictive value. We compared *MMP-2* and *TIMP-3* genes' expression in NSCLC in cancer and control tissue and in groups: of cancer histotype, tumor size, cancer stage, patients' age, sex and smoking intensity. We analysed the material obtained during pneumonectomy or lobectomy from the tumor and operational margin. Later, we performed procedures in order to obtain RNA from the tissue, its quality assessment, transcription into cDNA and finally analysis of relative expression of mentioned genes.

We observed a statistically significant growth of *MMP-2* expression in comparison to *TIMP-3* in cancer and as well in control tissue in NSCLC. Furthermore, we proved statistically significant decrease of *TIMP-3* expression in cancer tissue in presence of lymph nodes metastasis (in comparison to patients without lymph nodes metastasis). In the macroscopically unchanged tissue from operational margin we

proved a decreasing correlation of TIMP-3 expression with smoking intensity, which indicates that ECM remodeling process appears before the cancer transformation.

Assuming the differences in TIMP-3 expression depending on lymph nodes involvement and smoking intensity, we may consider expression analysis of this gene as a potential marker of the tumor aggressiveness.

Keywords: Non-small cell lung carcinoma, NSCLC, MMP-2, TIMP-3, NSCLC markers,

Wstęp

Niedrobnokomórkowy rak płuca

Rak płuca jest uznawany za drugi co do częstości nowotwór na świecie – 1,2 miliona zachorowań (stanowiąc 12% wszystkich zachorowań na nowotwory), jest również najczęstszą przyczyną zgonów wśród mężczyzn (Didkowska 2009, Globocan, 2012). W Europie rak płuca stanowi 21% nowotworów złośliwych wśród mężczyzn i jest odpowiedzialny za 29% zgonów z powodu raka. Najwyższe współczynniki zapadalności na raka płuca są odnotowywane w Belgii (75,2/100 000 osób); Holandii (74,4/100 000 osób) oraz Luksemburgu (66/100 000 osób) (Brocki, Rokicki 2010). W Polsce również obserwowana jest wysoka zapadalność oraz duża różnica we współczynniku zachorowań pomiędzy kobietami (22,3/100 000 osób), a mężczyznami (81,9 /100 000 osób).

Ocena stopnia zaawansowania raka płuca jest sumą wielkości guza pierwotnego, obecności przerzutów do węzłów chłonnych wartowniczych oraz przerzutów odległych. W raku płuca wyróżnia się główne stadia zaawansowania: 0, I, II, III, oraz IV (Jassem, Krzakowski 2009).

- stadium 0 występuje w przypadku raka *in situ* – ograniczonego do tkanki jednego narządu, nie przekraczającego jej granicy, nie ma postaci guza oraz nie nacieka sąsiednich tkanek;
- stadium IA występuje, gdy guz największy wymiar guza ma maksymalnie 3 cm (odpowiadający T1 w skali TNM), nie ma przerzutów do węzłów chłonnych wartowniczych oraz przerzutów odległych. Brak przerzutów wykazywany jest w stadium IB, jednak w tym przypadku guz może mieć wielkość do 5 cm (T2).
- stadium IIA – największy wymiar guza to maksymalnie 5 cm (T2), mogą pojawiać się przerzuty do węzłów chłonnych po stronie guza lub śródplucnych, brak przerzutów odległych. Stadium IIB zawiera również guzy o wielkości do 7 cm (T3) jednak bez przerzutów do węzłów chłonnych;
- stadium IIIA oraz IIIB charakteryzują się dużym zróżnicowaniem wielkości guza, jednak w większości przypadków obecne są przerzuty do węzłów chłonnych w okolicy ostrogi tchawicy oraz śródpiersia. W stadium IIIB możliwe są przerzuty do węzłów chłonnych po stronie przeciwnej od miejsca gdzie znajduje się guz. Brak przerzutów odległych;
- stadium IV obejmuje dowolny rozmiar guza i zróżnicowane miejsca przerzutów do węzłów chłonnych wartowniczych, różni się jednak od wcześniejszych obecnością przerzutów odległych.

Rak płuca ze względu na zróżnicowanie histologiczne można podzielić na 2 typy charakteryzujące się odmiennym rokowaniem: Niedrobnokomórkowy Rak Płuca (NDRP) i Drobnokomórkowy rak płuca (Zheng, 2016) (Tabela 1). NDRP stanowi 85-90% wszystkich przypadków rozpoznania raka płuca i jest typem, który stanowi

najczęstszą przyczynę zgonów (Wakelee, 2014). Pięcioletni wskaźnik przeżycia wynosi około 15% (Siegel, 2012). Detekcja we wczesnym stadium (AJCC I/II) znacząco zwiększa szanse przeżycia (Ferlay, 2010), dlatego niezwykle istotny jest rozwój wczesnej diagnostyki. NDRP charakteryzuje się dużą różnorodnością utkania histologicznego, często pojawia się mieszane utkanie w obrębie guza.

Tabela 1. Podział raka płuca na typy i podtypy

Rak płuca				
Niedrobnokomórkowy rak płuca (~85%)			Drobnokomórkowy rak płuca (~10%)	
Gruczolakorak (~40%)	Rak płaskonabłonkowy (~25%)	Rak wielkokomórkowy (~15%)	Inne (~10%)	

Najczęściej występującym podtypem NDRP jest gruczolakorak, który rozwija się z komórek gruczolowych produkujących śluz. Gruczolakorak lokalizuje się najczęściej w zewnętrznej części płuc i może dawać wczesne przerzuty do węzłów chłonnych. Zazwyczaj jego wzrost przebiega wolniej niż raka płaskonabłonkowego (Li, 2014). Z kolei rak płaskonabłonkowy rozwija się z nabłonka oskrzelowego i wykazuje dojrzewanie płaskonabłonkowe (Jassem, Krzakowski 2009). Ma tendencję do wolniejszego wzrostu, późniejszego przerzutowania oraz jest silniej związany z paleniem – palacze stanowią około 90% pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym (Li, 2014).

U chorych ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca stosuje się leczenie chirurgiczne (lobektomia lub pneumonektomia), które jest leczeniem z wyboru u chorych w I oraz II stadium rozwoju nowotworu. U chorych w III i IV stadium NDRP leczenie chirurgiczne stosuje się rzadko, zwykle w przypadku obecnego pojedynczego przerzutu oraz możliwego usunięcia ogniska pierwotnego. Chemioterapię stosuje się w celu przedoperacyjnego zmniejszenia rozmiaru guza, w przypadku wysokiego ryzyka rozsiewu, oraz gdy wyniki leczenia chirurgicznego są niewystarczające. Zdiagnozowanie NDRP w zaawansowanych stadiach, ogranicza możliwość zastosowania leczenia chirurgicznego oraz klasycznej chemioterapii, która może być nieskuteczna, ze względu na znaczącą toksyczność oraz wyjściowy zły stan zdrowia pacjentów, spowodowany progresją choroby nowotworowej. W takiej sytuacji uzupełnieniem chemioterapii, zwłaszcza u pacjentów z III stadium NDRP, jest radykalna radioterapia (Jassem, Krzakowski, 2009). Obecnie, pokłada się nadzieję w chemioterapii na bazie związków cis-platyny (Wakelee, 2014), której stosowanie po operacji chirurgicznej prowadzi do zmniejszenia śmiertelności o 6,9% w stosunku do grupy kontrolnej (Sarin, 2017). Skuteczność chemioterapii jest jednak ograniczona ze względu na lekooporność, wrodzoną jak i nabytą. Ponadto, w niektórych przypadkach NDRP stosuje się leczenie ukierunkowane molekularnie, celowane na białka uczestniczące w procesie onkogenezy – na przykład EGFR – naskórkowy czynnik wzrostu – oraz inhibitory angiogenezy (Jassem, Krzakowski, 2009).

Rola genu *MMP-2* w niedrobnokomórkowym raku płuca

Fizjologicznie, gen *MMP-2* koduje enzym metaloproteinazę 2, który jest kolagenazą należącą do grupy wielofunkcyjny cynkowych endopeptydaz. Jedną z jego głównych funkcji jest cięcie kolagenu typu IV, który jest składnikiem błon podstawnych. Odpowiada zatem za rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach embriogenezy, czy remodelingu tkankowego. W przeciwieństwie do innych białek z rodziny metaloproteinaz, aktywacja *MMP-2* może zachodzić na błonie komórkowej, a nie tylko w macierzy zewnątrzkomórkowej. Metaloproteinazy pełnią aktywną rolę w regulacji proliferacji komórek guza, migracji, apoptozie oraz zapaleniu (Butkiewicz 2015). *MMP-2* oraz *MMP-9* uwalniają czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) oraz czynnik wzrostu fibroblastów, i zwrótnie zwiększają produkcję metaloproteinaz (Butkiewicz, 2015). W literaturze opisywana jest zależność między ekspresją metaloproteinaz, a cechami klinicznymi i patologicznymi w raku płuca (Xiao XY, 2015). Na gen *MMP-2* oddziałują również białka, na przykład PML (ang. *promyelotic leucoma protein* – białko białaczki promielocytowej), które hamuje transkrypcję *MMP-2* i zmniejsza inwazję komórek (Hong-Yi, 2014). Geny kodujące metaloproteinazy mają związek z przerzutowaniem, co jest promowane m.in. przez białko LOX – jego ekspresja pozytywnie koreluje z ekspresją *MMP-2* i *MMP-9* (Liu, 2014). W badaniach Bremnes i wsp. wykazano że poziom ekspresji metaloproteinaz w grupie pacjentów z NDRP był korelowany ze stopniem zawiązania choroby nowotworowej (agresywnością guza) oraz gorszymi prognozami (Bremnes, 2006).

Rola genu *TIMP-3* w niedrobnokomórkowym raku płuca

Tkankowy inhibitor metaloproteinaz 3 (*TIMP-3*) hamuje aktywność enzymów, które odgrywają istotną rolę w rozwoju oraz przerzutowaniu NDRP. Aktywność *TIMP-3* koncentruje się głównie na hamowaniu wzrostu guza oraz angiogenezy (Anand, 1996). Powoduje zahamowanie adhezji komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej i promuje aktywację apoptozy poprzez ścieżkę kaspazy 8 (Kallio, 2010). Badania wskazują, że zahamowanie ekspresji *TIMP-3* w NDRP przez różne geny (np. *EZH2*, *MMP*) powoduje progresję guza oraz przerzuty (Chunhua, 2013)

Poza tradycyjnym określeniem histotypu raka oraz oceną w skali TNM, zwraca się obecnie dużą uwagę na diagnostykę molekularną niedrobnokomórkowego raka płuca, w celu określenia rokowania oraz prawdopodobieństwa odpowiedzi na leczenie. Molekularne wskaźniki brane pod uwagę obejmują profile ekspresji genów na poziomie mRNA, poziomy ekspresji białek czy cząsteczek regulatorowych takich jak miRNA (Jassem, Krzakowski, 2009).

Cel badań

Celem niniejszego badania było określenie różnic w poziomie względnej ekspresji genów *MMP-2* oraz *TIMP-3* u pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Zakładając zaobserwowanie różnic w ekspresji można oprzeć na tym fakcie prognozę oraz prowadzić dalsze badania w celu opracowania biomarkerów służących do wczesnej diagnostyki tej jednostki chorobowej.

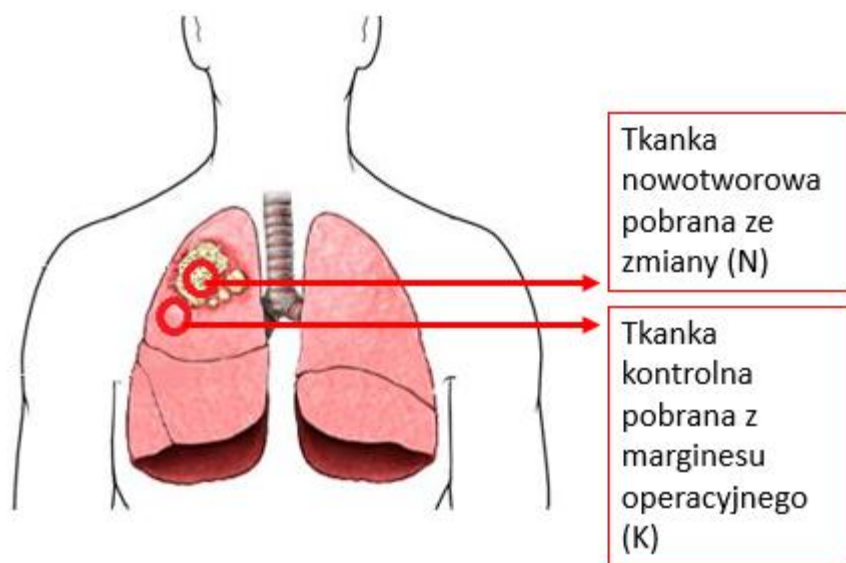
Material i metody

W badaniach przeanalizowano materiał pochodzący od 42 pacjentów – 14 kobiet i 28 mężczyzn ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Materiał pobrano podczas planowych zabiegów usunięcia płuca lub jego fragmentu w Klinice Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2014-2017. Badanie przeprowadzono zgodnie z Deklaracją Helsińską, na badania wydała zgodę Komisja Etyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (zgoda nr RNN/140/10/KE). Do badania zostali zakwalifikowani jedynie pacjenci z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, którzy nie zostali wcześniej poddani chemioterapii, radioterapii, bez innych nowotworów w wywiadzie. Do badania pobrano fragmenty tkanki płuca z ogniska zmiany oraz tkanki niezmięnionej makroskopowo z marginesu zmiany (Rycina 1.). Po resekcji materiał poddano badaniom histopatologicznym mającym na celu ustalenie ostatecznego rozpoznania. W badanej grupie 20 pacjentów reprezentowało podtyp gruczolakoraka, natomiast 21 raka płaskonabłonkowego. Część materiału przeznaczona do badań molekularnych była przechowana w buforze RNAlater stabilizującym RNA w temperaturze -80°C . RNA zostało wyizolowane z tkanki zestawem Qiagen RNA mini Kit zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Ilość i jakość materiału została oceniona spektrofotometrycznie – mierzono współczynnik absorpcji próbki przy długościach fali $\lambda=260$ i 280 nm (Biophotometr, Eppendorf, Niemcy). Wyliczano wartość współczynnika A260/280 w celu ustalenia czystości wyizolowanego RNA. Kryteriami kwalifikujące do dalszej analizy było stężenie powyżej 50 ng/ μl i wartościach współczynnika A260/280 mieszczących się w zakresie 1,8-2,0. Następnie, materiał poddano procedurze odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA za pomocą High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Ocenę relatywnej ekspresji genów *TIMP3* i *MMP2* oceniono korzystając z metody real-time PCR z użyciem sond fluorogenicznych TaqMan, korzystając z metody $\Delta\Delta\text{Ct}$. Kalibratorem był gen BAKT, a RNA referencyjnym było RNA wyizolowane z ze zdrowej tkanki płuca (*Human Lung Total RNA*, Ambion, USA).

Porównywano relatywną ekspresję badanych genów w grupach zróżnicowanych ze względu na wiek, płeć, podtyp histologiczny NDRP, wielkość guza, klasyfikację TNM, AJCC, zajęcie wartowniczych węzłów chłonnych oraz intensywność palenia tytoniu wyrażoną w paczkolatach. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 10.1.

Wyniki przeprowadzonych badań

Przeprowadzono analizę ekspresji dwóch badanych genów: *MMP-2* i jego inhibitora *TIMP-3* w tkance z rozpoznaniem raka niedrobnokomórkowego płuca oraz w tkance kontrolnej pochodzącej z marginesu operacyjnego, niezmięnionej makroskopowo. Dokonano oceny ekspresji w poszczególnych parach tkanek oraz w grupach zgodnie z cechami klinicznymi pacjentów i patologicznymi zmiany. Ogólnie ekspresję zbadano u 41 pacjentów: 20 pacjentów z gruczolakorakiem i 21 z rakiem płaskonabłonkowym. Opisywane zależności w tabelach są przedstawione jako mediany.



Rycina 1. Przykładowe miejsca pobrania materiału do analiz

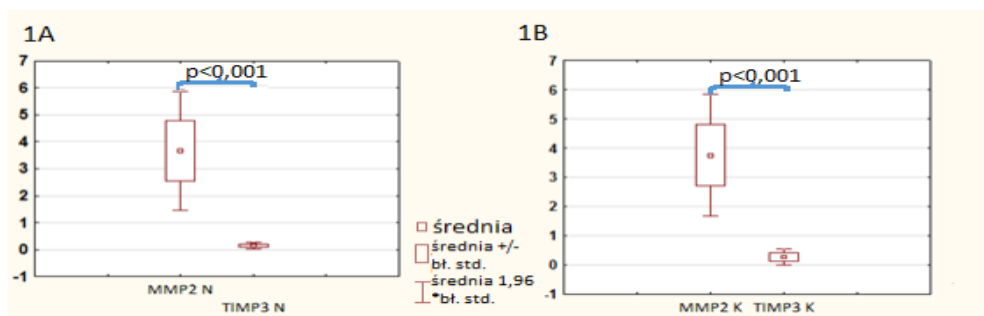
Analiza ekspresji (mediany) badanych genów *MMP-2* i *TIMP-3* w tkance nowotworowej względem kontrolnej oraz w grupach rozpoznających

Tabela 2. Porównanie ekspresji *MMP-2* i *TIMP-3* w tkance nowotworowej i kontrolnej

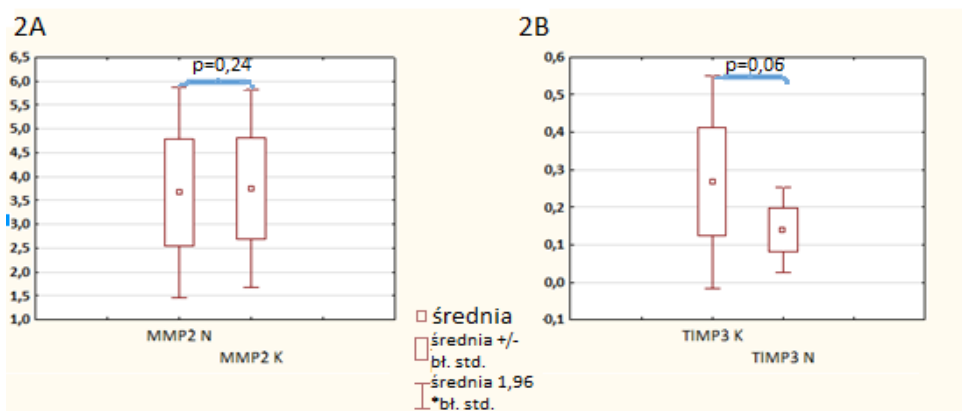
	Mediana	
	Tkanka kontrolna (K)	Tkanka Nowotworowa (N)
<i>MMP-2</i>	1,3760	0,9001
<i>TIMP-3</i>	0,0133	0,0053

Ekspresja genu *MMP-2* względem *TIMP-3* była istotnie statystycznie wyższa w zarówno w tkance nowotworowej ($p < 0,001$; test U Manna-Whitneya), jak i kontrolnej ($p < 0,001$; test U Manna-Whitneya) (wykres 1, tabela 2). Zaobserwowano również dodatnią korelację pomiędzy wartością *TIMP-3* a *MMP-2* w korelacji porządku rang Spearmana (tabela 4).

Ekspresja genu *MMP-2* w tkance nowotworowej była niższa niż w kontrolnej, jednak zaobserwowana zmiana nie była istotna statystycznie ($p = 0,24$). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku genu *TIMP-3* ($p = 0,06$) (wykres 2., Tabela 2).



Wykres 1. Porównanie ekspresji badanych genów w tkance nowotworowej (*MMP-2* vs *TIMP-3*; test U Manna-Whitneya) (1A) oraz kontrolnej. (*MMP-2* vs *TIMP-3*; test U Manna-Whitneya) (1B).



Wykres 2 Ocena różnic w poziomie ekspresji między tkanką kontrolną i nowotworową dla genu *MMP-2* (2A) oraz *TIMP-3* (2B).

Porównanie ekspresji genów w grupach płci oraz w grupach rozpoznai

Tabela 3. Porównanie ekspresji *MMP-2* i *TIMP-3* w grupach płci oraz w grupach rozpoznai

	Mediany: płeć				Mediany: podtypy			
	K	N	K	N	K	N	K	N
Płeć	Kobiety		Mężczyźni		Gruczolakorak		Rak płaskonabłonkowy	
<i>MMP-2</i>	1,2870	0,7601	1,5161	1,0614	1,4985	1,2321	1,0145	0,5302
<i>TIMP-3</i>	0,0213	0,0091	0,0131	0,0046	0,0125	0,0055	0,0131	0,0042

Ekspresja *MMP-2* była wyższa u mężczyzn, zarówno w tkance nowotworowej, jak i kontrolnej. Odwrotna prawidłowość została zaobserwowana w stosunku do genu *TIMP-3*, którego ekspresja była wyższa w grupie kobiet. Żadna z opisanych zależności nie była istotna statystycznie.

W grupie pacjentów z rozpoznaniem gruczolakorakiem zaobserwowano wyższą ekspresję *MMP-2* odpowiednio tkance kontrolnej i nowotworowej oraz *TIMP-3*

w tkance nowotworowej w porównaniu do raka płaskonabłonkowego. Z kolei ekspresja *TIMP-3* w materiale z marginesu operacyjnego była obniżona w gruczolakoraku. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic dla genu *MMP-2* pomiędzy tkankami nowotworowymi a kontrolnymi w grupach pacjentów w zależności od podtypu NDRP (test U Manna-Whitneya).

Ekspresja genów w stosunku do intensywności palenia, wyrażonej w paczkolatach

Tabela 5. Analiza korelacji ekspresji badanych genów oraz wieku i intensywności palenia tytoniu (w paczkolatach)

	Korelacja porządku rang Spearmana (podane współczynniki korelacji)			
	<i>MMP-2</i> K	<i>MMP-2</i> N	<i>TIMP-3</i> K	<i>TIMP-3</i> N
<i>MMP-2</i> K	1,0000	0,2550	0,4746	-0,1974
<i>MMP-2</i> N	0,2550	1,0000	0,0680	0,2605
<i>TIMP-3</i> K	0,4746	0,0681	1,0000	0,2352
<i>TIMP-3</i> N	-0,1974	0,2605	0,2352	1,0000
Wiek	0,1397	-0,0765	-0,0077	-0,0731
Intensywność palenia	-0,0206	-0,0058	-0,4104	0,0181

Wykazano dodatnią korelację ekspresji genów – *TIMP-3* i *MMP-2* w tkance kontrolnej (współczynnik korelacji rang Spearmana 0,472; $p=0,002$). Wraz z wiekiem pacjentów rosła ekspresja genu *MMP-2* w tkance kontrolnej, a malała w przypadku genów *MMP-2* w tkance nowotworowej oraz *TIMP-3* w tkance nowotworowej i kontrolnej.

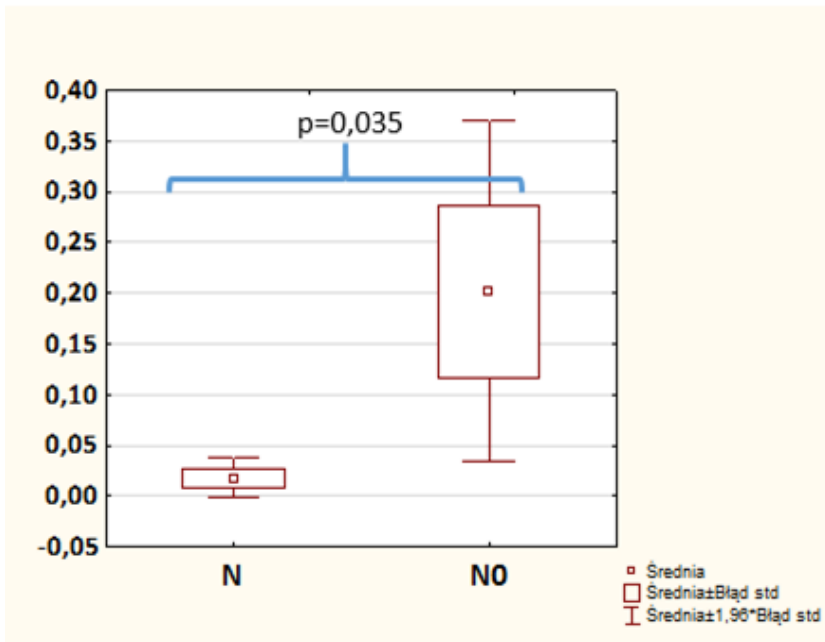
Wraz ze wzrostem intensywności palenia wyrażonej w paczkolatach (iloczyn liczby papierosów wypalonych w ciągu doby i lat nałogu) zaobserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji genu *TIMP-3* w tkance kontrolnej (współczynnik korelacji rang Spearmana -0,4104; $p=0,009$). Ponadto, wraz ze wzrostem liczby paczkałów zaobserwowano słabą korelację ujemną z ekspresją *MMP-2* w tkance kontrolnej oraz nowotworowej. Słaba dodatnia korelacja była zaobserwowana w przypadku genu *TIMP-3*.

Ekspresja genów w zależności od wielkości guza (skala pTNM) oraz w zależności od zajęcia węzłów wartowniczych

Tabela 6 Porównanie ekspresji genów *MMP-2* i *TIMP-3* w zależności od wielkości guza pierwotnego oraz zajęcia węzłów chłonnych wartowniczych

	Mediany									
	pT1		pT2		pT3		Węzły niezajęte (N0)		Węzły zajęte (N1/N2)	
	K	N	K	N	K	N	K	N	K	N
<i>MMP-2</i>	1,4463	0,8821	1,0735	0,4789	2,752	1,4142	1,3304	0,9103	1,4877	0,6451
<i>TIMP-3</i>	0,0131	0,0035	0,0122	0,0116	0,0186	0,0022	0,0131	0,0082	0,0105	0,0028

Ekspresja *MMP-2* w tkance nowotworowej była najwyższa w guzach o największej średnicy (pT3), natomiast najniższa w grupie pT2. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku ekspresji genu *TIMP-3* w tkance nowotworowej – najniższa ekspresja w największych guzach (pT3), a najwyższa w guzach zakwalifikowanych do kategorii pT2 (tabela 6). Ekspresja *MMP-2* oraz *TIMP-3* była niższa w tkance nowotworowej niż kontrolnej we wszystkich grupach w zależności od rozmiaru guza oraz zajęcia/braku zajęcia węzłów chłonnych. Zaobserwowano, że poziom ekspresji obydwu badanych genów w tkance nowotworowej był wyższy w przypadku braku zajęcia węzłów chłonnych wartowniczych (grupa N0) w do grupy N1/N2). Różnica w ekspresja genu *TIMP-3* w próbkach tkanek nowotworowych od pacjentów z zajęтыми węzłami chłonnymi oraz bez przerzutów do węzłów była istotna statystycznie ($p=0,035$, test U Manna-Whitneya) (wykres 3).



Wykres 3 Porównanie ekspresji *TIMP-3* w tkance nowotworowej w przypadku braku przerzutów do węzłów wartowniczych (N0) z grupą w której pojawiły się takie przerzuty (N1/N2)

Ocena ekspresji genów w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu w skali AJCC

Tabela 7 Porównanie ekspresji genów *MMP-2* i *TIMP-3* w zależności od stadium zaawansowania nowotworu w skali AJCC.

	Mediany					
	AJCC I		AJCC II		AJCC III	
	K	N	K	N	K	N
<i>MMP-2</i>	1,516	0,905	1,000	0,530	3,128	0,807
<i>TIMP-3</i>	0,016	0,005	0,008	0,011	0,019	0,003

Najwyższą ekspresję *MMP-2* stwierdzono w tkance nowotworowej w stadium AJCC I, a następnie AJCC III. Najwyższa ekspresja *TIMP-3* była obserwowana w stadium AJCC II, w którym to stadium ekspresja *MMP-2* była najniższa. Wartości ekspresji genów w tkance kontrolnej były wyższe niż w tkance nowotworowej (wyłączając stadium AJCC II dla genu *TIMP-3*).

Dyskusja

W naszym badaniu wykazano istotne statystycznie podwyższenie ekspresji *MMP-2* przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji genu *TIMP-3* odpowiednio w tkance nowotworowej oraz kontrolnej. Obniżenie poziomu *TIMP-3* będącego inhibitorem m.in. metaloproteinaz oraz podwyższenie ekspresji *MMP-2* sugeruje zwiększoną aktywność białek biorących udział w przebudowywaniu macierzy zewnątrzkomórkowej. Świadczy to o przewadze procesów degradacji ECM w nad inhibicją przebudowy. Następstwem takiej przebudowy może być proliferacja komórek nowotworowych oraz ich migracji do innych lokalizacji.

Kanoth (2012) prowadząc badania na białku *MMP-2* zauważył, że ich poziom w surowicy jest znacząco wyższy niż w przypadku badanych zdrowych osób. Wyniki naszych badań – ekspresja *MMP-2* wyższa w tkance kontrolnej, niezależnie od płci – nie są zgodne z obserwacjami Kanoth. Jednak należy podkreślić, iż w naszym badaniu porównaliśmy ekspresję genu w tkance nowotworowej i sąsiadującej tkance niezmienionej makroskopowo, a nie u osób bez choroby nowotworowej. Z kolei Ishikawa i wsp. (2004) w swoim badaniu wykazali że u ponad połowy pacjentów ekspresja *MMP-2* była wyższa w fibroblastach sąsiadujących komórkami raka NDRP, niż w raku, co może wskazywać na rolę *MMP-2* jako modulatora macierzy zewnątrzkomórkowej w komórkach fibroblastów w procesie progresji nowotworowej w NDRP. Ponadto ekspresja białka *MMP-2* w fibroblastach była istotnie wyższa w raku płaskonabłonkowym niż gruczolakoraku, co może być traktowane jako niezależny czynnik prognostyczny dla raka płaskonabłonkowego (Ishikawa, 2004). Nasze wyniki mogą sugerować, że zmiany ekspresji genów regulujących ECM obserwowane w tkance z marginesu operacyjnego, są zmianami umożliwiającymi transformację nowotworową w szczególności poprzez degradację macierzy i tworzenie mikrośrodowiska do rozwoju naczyń krwionośnych (Ishikawa, 2004). Ponadto remodeling macierzy zewnątrzkomórkowej może być obserwowany w odległości od pierwotnej zmiany w tkance makroskopowo niezmienionej.

Hida (2012) zauważa, że ekspresja metaloproteinaz jest różna w zależności od podtypu raka płuca. Ekspresja *MMP-2* jest wyższa w gruczolakoraku niż w raku płaskonabłonkowym, przeciwną tendencję zaobserwowali autorzy w przypadku *TIMP-3*, gdzie ekspresja w przypadku raka płaskonabłonkowego była wyższa (Hida, 2012). Podobną tendencję zaobserwował Ishikawa i wsp. (2004) odnośnie wyższej ekspresji białka *MMP-2* w komórkach gruczolakoraka w odniesieniu do raka płaskonabłonkowego. Nasze badania potwierdzają wcześniejsze wyniki dotyczące zróżnicowania ekspresji *MMP-2* pomiędzy podtypami. Zaobserwowaliśmy podwyższenie ekspresji *MMP-2* w gruczolakoraku oraz wzrost ekspresji *TIMP-3* w raku płaskonabłonkowym, nie uzyskaliśmy jednak istotności statystycznej, co może wiązać się ze zbyt małą grupą pacjentów.

Analizując ekspresję genów w zależności od wielkości guza (w skali pTNM) wykazaliśmy, że w największych guzach (grupa pT3, w materiale pobranym z tkanki nowotworowej) ekspresja *MMP-2* jest najwyższa, przy najniższym poziomie ekspresji *TIMP-3*. Analogicznie, w materiale z guzów, gdzie ekspresja *MMP-2* była najniższa, obserwowano najwyższą ekspresję *TIMP-3*. Podobne zależności obserwowano w grupach zaawansowania nowotworu wg skali AJCC. Obserwacja ta nie pokrywa się wynikami badań Mino i wsp., gdzie wyciszenie ekspresji *TIMP-3* korelowało ze wzrostem zaawansowania guza w skali AJCC (Mino, 2007). Różnice w obserwacjach mogą wynikać z niskiej liczebności badanej przez nas grupy z zaawansowanym rakiem (AJCC III, n=6). Co ciekawe, Kallio (2010) zaobserwował w przypadku raka drobnokomórkowego płuca że ekspresja *TIMP-3* wzrastała wraz ze stopniem agresywności zmiany, co sugeruje że wartości prognostyczne *TIMP-3* są różne dla różnych typów raka płuca.

Li (2013) w swoich badaniach wspomina, że ekspresja *MMP-2* w tkankach niedrobnokomórkowego raka płuca w przypadku kiedy pojawiły się przerzuty do węzłów wartowniczych jest wyższa, niż w przypadku kiedy takie przerzuty były nieobecne. Wyniki naszych badań są odmienne – w tkance nowotworowej zaobserwowaliśmy że ekspresja *MMP-2* u osób z przerzutami do węzłów chłonnych była niższa niż u osób bez przerzutów. Odwrotną tendencję stwierdziliśmy w przypadku tkanki kontrolnej z marginesu operacyjnego, jednak nie możemy odnieść wyników naszych badań do wcześniejszych prac, gdyż oceniana w nich była jedynie ekspresja genu w nowotworze. Wyniki uzyskane w cytowanych badaniach – obniżenie ekspresji *TIMP-3* w tkance kontrolnej w przypadku zajęcia węzłów wartowniczych sugeruje, że zahamowanie inhibicji *MMP-2* może powodować wzrost poziomu metaloproteinaz. Można w związku z tym wnioskować o związku produktu genu *TIMP-3* z przerzutowaniem. Zmiany w ekspresji genów regulujących rozkładanie macierzy zewnątrzkomórkowej w tkance niezmięnionej makroskopowo sugerują że proces remodelingu ECM nie jest ograniczony jedynie do obszaru guza oraz że remodeling może ułatwiać migracje komórek nowotworowych z guza – zajęcie węzłów wartowniczych. Obserwacje te potwierdzają wyniki uzyskane przez Mino i wsp. (2007) którzy zaobserwowali obniżenie poziomu białka *TIMP-3* w przypadku, gdy były zajęte węzły chłonne. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy ponadto istotne obniżenie ekspresji *TIMP-3* u osób intensywnie palących, co wskazuje że remodeling ECM mediowany przez *TIMP-3* może być związany z odpowiedzią na wpływ substancji zawartych w dymie tytoniowym i prowadzić do rozwoju zmian nowotworowych.

Podsumowując wpływ *MMP-2* i *TIMP-3* na remodeling macierzy zewnątrzkomórkowej może „wyprzedzać” transformację nowotworową w tkance płuca. Istotnie podwyższona ekspresja genu *MMP-2* w stosunku *TIMP-3* zarówno w tkance nowotworowej i jak i kontrolnej świadczy o przewadze procesów degradacji w nad jej inhibicją. Badanie ekspresji genu *TIMP-3* może być rozważane jako potencjalnego markera agresywności nowotworu, czy dodatkowo wskazywać na toczący się proces przebudowy ECM w tkance niezmięnionej makroskopowo otaczającej nowotwór.

Literatura

Anand-Apte B, Bao L, Smith R, et al.: **A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth.** *Biochemistry and Cell Biology* 1996;74:853-862.

Bremnes RM, Camps C, Sirera R. **Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood.** *Lung Cancer* 2006

Brocki M., Rokicki M. Rokicki W.; *Rak płuca* pod red. Jerzego Kołodzieja i Marka Marcynika., Wydawnictwo Termedia 2010.

Butkiewicz, D., Krześniak, M., Drosik, A., Giglok, M., Gdowicz-Kłosok, A., Kosarewicz, A., Rusin, M., Masłyk, B., Gawkowska-Suwińska, M. and Suwiński, R. (2015), **The VEGFR2, COX-2 and MMP-2 polymorphisms are associated with clinical outcome of patients with inoperable non-small cell lung cancer.** *International Journal of Cancer*, 137: 2332-2342.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *International Journal of Cancer* 2010; 27, 2893-2917.

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. **Cancer statistics, 2000.** *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 2000;50:7-33.

Hida Y, Hamada J, **Differential Expressions of Matrix Metalloproteinases, A Disintegrin and Metalloproteinases, and a Disintegrin and Metalloproteinases with Thrombospondin Motifs and their Endogenous Inhibitors Among Histologic Subtypes of Lung Cancers,** *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, volume 12, issue 7, pages 744-752, year 2012, issn 1871-5206/1875-5992.

Ishikawa S, Takenaka K., Yanagihara K., Miyahara R, Kawano, Y., Otake Y., Hasegawa S., Wada H and Tanaka F.. **Matrix Metalloproteinase-2 Status in Stromal Fibroblasts, Not in Tumor Cells, Is a Significant Prognostic Factor in Non-Small-Cell Lung Cancer.** *Clinical Cancer Research* October 1 2004 (10) (19) 6579-6585.

Kallio, J. P., Hopkins-Donaldson, S., Baker, A. H. and Kähäri, V.-M. (2011), **TIMP-3 promotes apoptosis in nonadherent small cell lung carcinoma cells lacking functional death receptor pathway.** *International Journal of Cancer*, 128: 991-996.

Kanoh Y, Abe T, Masuda N, Akahoshi T., **Progression of non-small cell lung cancer: diagnostic and prognostic utility of matrix metalloproteinase-2, C-reactive protein and serum amyloid A,** *Oncology Reports*, (2013);29(2):469-73.

Kuo H-Y, Huang Y-S, Tseng C-H, et al. **PML represses lung cancer metastasis by suppressing the nuclear EGFR-mediated transcriptional activation of MMP2.** *Cell Cycle*. 2014;13(19):3132-3142. doi:10.4161/15384101.2014.949212.

Li B-Q, You J, Huang T, Cai Y-D. **Classification of Non-Small Cell Lung Cancer Based on Copy Number Alterations.** *Viglietto G, ed. PLoS ONE*. 2014;9(2):e88300. doi:10.1371/journal.pone.0088300.

Li, GH., Cui, YS., Wu, QY. et al. **Clinicopathologic significance of b-catenin and matrix metalloproteinase-2 expression in non-small cell lung cancer,** *Medical Oncology* (2013) 30: 437.

Liu J, Ping W, Zu Y, Sun W. **Correlations of lysyl oxidase with MMP2/MMP9 expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer.** *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014;7(9):6040-6047.

Mino, N., Takenaka, K., Sonobe, M., Miyahara, R., Yanagihara, K., Otake, Y., Wada, H. and Tanaka, F. (2007), **Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and its prognostic significance in resected non-small cell lung cancer.** *Journal of Surgical Oncology*., 95: 250-257.

Rathi N. Pillai and Suresh S. Ramalingam, **Advances in the Diagnosis and Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer;** *Molecular Cancer Therapeutics*, 2014 (13) (3) 557-564.

Sarin N, Engel F, Kalayda GV, et al. **Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G₂/M cell cycle arrest.** Ahmad A, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(7):e0181081. doi:10.1371/journal.pone.0181081.

Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E, **Cancer treatment and survivorship statistics CA Cancer Journal for Clinicians.** 2012 Jul-Aug; 62(4):220-41.

Wakelee H, Kelly K, Edelman MJ. **50 Years of Progress in the Systemic Therapy of Non-Small Cell Lung Cancer.** American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Meeting. 2014:177-189.

Xiao XY., Lang XP. (2015) **Correlation between MMP-7 and BFGF Expressions in Non-Small Cell Lung Cancer Tissue and Clinicopathologic Features,** *Cell biochemistry and Biophysics*, 73(2), 427-432.

Xu C., Hou Z., Zhan P., Zhao W., Chang C., Zou J, Hu H., Zhang Y, Yao X, Yu L, Yan J, **EZH2 regulates cancer cell migration through repressing TIMP-3 in non-small cell lung cancer,** *Medical Oncology* (2013) 30(4): 713.

Xu, C., Hou, Z., Zhan, P. et al. **EZH2 regulates cancer cell migration through repressing TIMP-3 in non-small cell lung cancer;** *Medical Oncology* (2013) 30: 713.

Zheng D, Wang R, Ye T, et al. **MET exon 14 skipping defines a unique molecular class of non-small cell lung cancer.** *Oncotarget*. 2016;7(27):41691-41702. doi:10.18632/oncotarget.9541.

źródło internetowe: **Nowotwory złośliwe płucnej i płuca** <http://onkologia.org.pl/nowotwory-zlosliwe-oplucnej-pluca-c33-34/> dostęp z dnia 07.03.2018.

źródło internetowe: **Lung Cancer Incidence, mortality and prevalence Worldwide in 2012.** <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. dostęp z dnia 07.03.2018.

Aktywność ścieżki sygnałowej NF- κ B pod wpływem LPS i TNF wybranych ludzkich liniach komórkowych

The activity of the NF- κ B signal pathway after LPS and TNF treatment in chosen human cell lines

Aleksandra Cwiek^{1*}, Paweł Majewski²

¹Zakład Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, email: aleksandra.cwiek@student.uw.edu.pl

²Zakład Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, email: pmajew@biol.uw.edu.pl

Streszczenie

Hodowle komórkowe mają szerokie zastosowanie w badaniach naukowych oraz medycynie. Duża liczba zwierzęcych i ludzkich linii komórkowych pozwala na wykonywanie między innymi badań nad ich morfologią, wzajemnymi interakcjami zachodzącymi między nimi, mechanizmami różnicowania i dojrzewania komórek czy wpływu na nie różnych substancji, w tym leków, suplementów diet czy toksyn. W niniejszej pracy wykonano ocenę tempa wzrostu hodowli i aktywności szlaku sygnałowego NF- κ B, w czterech różnych liniach ludzkich komórek nowotworowych o morfologii komórek śródbłonka naczyń krwionośnych lub nabłonka jelit: Caco-2, A-431, EA.hy926, T84. Wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy NF- κ B jest kluczowy w rozwoju i podtrzymywaniu stanu zapalnego, z tego względu pomiar jego aktywności, jest dobrym wskaźnikiem zmian zachodzących w komórkach podczas jego przebiegu. Celem niniejszej pracy było stworzenie układu eksperymentalnego do badań właściwości przeciwzapalnych preparatów medycznych, a jako wskaźnik aktywności szlaku NF- κ B wybrano komercyjnie dostępny plazmidowy system reporterowy pNifty2-luc. W ramach przeprowadzonych doświadczeń wykonano ocenę aktywności spontanicznej tego szlaku oraz aktywności stymulowanej cytokiną prozapalną TNF oraz LPS, naśladując w ten sposób w warunkach *in vitro* warunki stanu zapalnego. Przeprowadzone badania wykazały, że najszybciej proliferują komórki A-431 i Caco-2, że istnieje zależność między dawką i czasem stymulacji komórek wybranymi dawkami LPS i TNF, a aktywnością ścieżki NF- κ B.

Abstract

Cell cultures are widely used in scientific research and medicine. The large number of animal and human cell lines allows, among other things, to carry out research on their morphology, mutual interactions between them, mechanisms of cell differentiation and maturation or the influence of various substances, including drugs, dietary supplements and toxins on them. In this work, the assessment of the growth rate of culture and activity of the NF- κ B signaling pathway was performed in four different human carcinoma cell lines showing morphology of epithelial cells derived from blood vessels or intestine: Caco-2, A-431, EA.hy926, T84. The intracellular signaling pathway NF- κ B is key in the development and maintenance of inflammation, therefore, the measurement of its activity is a good indicator of changes in cells during its course. The aim of this work was to create an experimental setup for testing the anti-inflammatory properties of medicinal preparations, and the commercially available plasmid reporter system pNifty2-luc was chosen as an indicator of the activity of the NF- κ B pathway. As part of the experiments carried out, the spontaneous activity of this pathway and activity stimulated by TNF and bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulated by cytokine and thus the conditions of inflammation were imitated in *in vitro* conditions. The conducted studies showed that the most rapidly proliferate A-431 and Caco-2 cells, that there is a relationship between the dose and time of stimulation of cells with selected doses of LPS and TNF, and the activity of the NF- κ B pathway.

Wstęp

Reakcja zapalna jest elementem wieloetapowej odpowiedzi organizmu na czynniki szkodliwe, do których między innymi można zaliczyć: patogeny, uszkodzone komórki czy substancje drażniące. Celem tej reakcji jest między innymi usunięcie z organizmu patogenu, eliminacja komórek martwych i uszkodzonych oraz zainicjowanie naprawy tkanek (Xu, Yin et al. 2014). Cała odpowiedź zachodzi przy udziale wielu komórek, w tym komórek układu odpornościowego, komórek śródbłonna naczyń krwionośnych oraz wydzielanych przez nie wielu związków, w tym cytokin prozapalnych. Przykładem takiej cytokiny jest czynnik martwicy nowotworu TNF (z ang. *Tumor Necrosis Factor*), który jest główną cytokiną prozapalną. Bierze on udział zarówno w procesach fizjologicznych jak i patologicznych. TNF jest wydzielany przez komórki układu odpornościowego, głównie przez aktywne monocyty oraz makrofagi i wpływa między innymi na aktywność limfocytów oraz na szeroko rozumiany metabolizm innych komórek. TNF może także powodować apoptozę w komórkach zdrowych i nowotworowych, pobudzać wątrobę do syntezy białek ostrej fazy i stymulować fagocytozę komórek fagocytarnych (Chu, 2012). Ten sposób obrony organizmu jest elementem odporności wrodzonej, która jest pierwszą linią obrony. Niezwłocznie po pojawieniu się patogenu w organizmie, zainicjowany zostaje rozwój reakcji zapalnej, pobudzone zostają komórki tuczne, komórki dendrytyczne oraz makrofagi, zdolne do fagocytozy i wydzielania mediatorów reakcji zapalnej. Substancje te powodują miejscowe rozszerzenie naczyń krwionośnych i zmianę reprezentacji cząstek adhezyjnych na komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, co prowadzi do zwiększenia migracji leukocytów do miejsca rozwoju reakcji zapalnej. Następnie kontynuowane są procesy takie jak fagocytoza, a fragmenty uszkodzonej tkanki i martwe leukocyty mogą tworzyć ropę. Gromadzące się w miejscu zapalenia komórki zwane naturalnymi zabójcami (z ang. *Natural Killer*) niszczą patogeny oraz zakażone komórki oraz wydzielają interferon, co prowadzi do aktywacji makrofagów, prezentacji antygeny i w końcu do uruchomienia mechanizmów odporności swoistej związanej z aktywacją limfocytów Th (Gołąb, Jakóbsiak et al. 2013).

Rozwój reakcji zapalnej powoduje zmiany w ekspresji ogromnej liczby genów w wielu typach komórek biorących w niej udział. Patogen stymuluje organizm w sposób kaskadowy, ponieważ wpływa bezpośrednio na ekspresję genów kodujących białka o właściwościach prozapalnych, a wiele godzin po stymulacji inicjowana jest aktywacja czynników przeciwzapalnych. Szlak sygnałowy czynnika jądrowego κB (NF-κB, z ang. *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*) jest niezwykle istotny w regulacji tych procesów, ponieważ w dużej mierze kontroluje aktywację tych czynników na poziomie ich transkrypcji (Natoli, 2010).

Białka należące do rodziny czynników transkrypcyjnych NF-κB pełnią ważną funkcję w rozwoju wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i często bezpośrednio kontrolują przebieg zakażenia patogenami. Możliwe jest więc bezpośrednie koordynowanie walki z zakażeniem poprzez modulowanie aktywności tej ścieżki sygnałowej. Podczas stanu zapalnego zauważalna jest wzmożona aktywność klasycznej drogi aktywacji szlaku NF-κB (Natoli, 2010). Aktywacja ta może być

inicjowana za pośrednictwem szeregu różnych typów receptorów (Szołtysek, Janus et al. 2011), między innymi rozpoznających patogeny receptorów Nod-podobnych (NLR, z ang. *Nod-Like Receptors*), receptorów rozpoznających wzorce molekularne, receptorów Toll-podobnych (TLR, z ang. *Toll-like Receptors*) czy receptorów RIG-podobnych (RLR, z ang. *RIG-I-Like Receptors*). Po pojawieniu się odpowiedniego ligandu, łączy się on z receptorem obecnym na powierzchni komórki, co prowadzi do aktywacji ścieżki NF- κ B. Konsekwencją tej aktywacji jest transkrypcyjna regulacja ekspresji wielu genów kodujących szereg cząsteczek związanych ze stanem zapalnym, takich jak cytokiny i chemokiny. W aktywacji tej ogromną rolę mają receptory TLR, dla których ligandem jest LPS błon komórkowych bakterii gram-ujemnych. LPS jest rozpoznawany przez receptor TLR4, zaś receptory TLR1, TLR2, TLR4 i TLR6 mają zdolność rozpoznawania lipidów, z kolei receptory TLR5 i TLR11 rozpoznają białka patogenów (Gołąb, Jakóbiński et al. 2013). Ścieżka sygnałowa NF- κ B, jest nie tylko ważna w trakcie rozwoju oraz trwania reakcji zapalnej, ale również w jej końcowym etapie, czyli kiedy dochodzi do wzmożonej ekspresji cytokin przeciwzapalnych i indukcji apoptozy komórek (Szołtysek, Janus et al. 2011).

Ścieżka sygnałowa NF- κ B

Jak już wspomniano w niniejszej pracy elementy efektorowe ścieżki NF- κ B są czynnikami transkrypcyjnymi zaangażowanymi między innymi w reakcję zapalną oraz w procesy odpornościowe zachodzące zarówno w odpowiedzi odpornościowej wrodzonej jak i nabytej (Zhou, Wang et al. 2015). Ścieżka NF- κ B aktywowana jest również między innymi w procesie apoptozy, różnicowaniu komórek, ich proliferacji, w rozwoju limfocytów B oraz odpowiedzi komórek na czynniki stresowe (Aggarwal, 2004). Oprócz tego moduluje migrację i ruchliwość komórek, a także cykl komórkowy (Hayden, Ghosh et al. 2008). Do tej pory zostało opisanych pięć czynników transkrypcyjnych zaliczanych do rodziny białek NF- κ B: REL (synonim c-REL), RELA (synonim p65), RELB (synonim REL-B), NFKB1 (synonim p50), NFKB2 (synonim p52). Czynniki te należą do dwóch wyodrębnionych grup funkcyjnych (Piotrowska, Iżykowska et al. 2008): pierwsza grupa składa się z trzech pierwszych wymienionych białek (RELA, RELB oraz REL), druga zaś składa się z dwóch ostatnich (NFKB1 i NFKB2). Białka z rodziny NF- κ B potencjalnie mogą tworzyć 15 różnych kombinacji dimerów. Jednak białko RELB może tworzyć jedynie heterodimery, zaś białka REL, RELA, NFKB1, NFKB2 mogą tworzyć zarówno homo- jak i heterodimery (Matthew, 2004). Dimery te pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych, wpływających na ekspresję licznych genów. Jednym z lepiej poznanych czynników transkrypcyjnych tej ścieżki sygnałowej jest heterodimer NFKB1/RELA, który często oznaczany jest również w literaturze jako p50/p65. W cytozolu znajduje się on w stanie nieaktywnym, ponieważ jest związany z inhibitorem czynnika jądrowego κ B (I κ B, z ang. *Inhibitory Proteins of NF- κ B*). Dopiero po aktywacji kinazy I κ B (IKK, z ang. *I κ B Kinase*) dochodzi do fosforylacji I κ B i uwolnienia składowych heterodimeru NFKB1/RELA, które są transportowane do jądra komórkowego i mogą wiązać się ze specyficznymi sekwencjami DNA promotorów genów (Gilmore, 2006). Różnice w budowie poszczególnych dimerów powodują różne efekty na poziomie regulacji ekspresji genów. Wynika to z różnic

w powinowactwie do promotorów genów, co może skutkować hamowaniem lub stymulowaniem transkrypcji. Te same homo- i heterodimery mogą pełnić funkcję zarówno inhibitorów jak i aktywatorów transkrypcji, ale są również znane dimery wykazujące jedynie aktywność aktywatorową (Piotrowska, Iżykowska et al. 2008).

Charakterystyczną cechą dla czynników ścieżki sygnałowej NF-κB (nazywanych w dalszej części tekstu jako: NFκB) jest obecność w ich budowie tak zwanej domeny homologicznej Rel (RHD, z ang. *Rel Homology Domain*) występującej na N-końcowym odcinku łańcucha peptydowego. Jest to domena składająca się z ponad 300 aminokwasów i jest kluczowa, w tworzeniu dimerów tych białek, oraz aby mogło dojść do łączenia się ich z DNA. Ponadto w domenie RHD znajduje się sekwencja będąca sygnałem lokalizacji jądrowej (NLS, z ang. *Nuclear Localization Signal*), który sprawia, że może dojść do transportu dimerów do jądra komórkowego (Hassa, Hottiger et al. 2002).

Aby dimery NFκB mogły pełnić swoją funkcję, niezbędna jest ich aktywacja i przetransportowanie do jądra komórkowego. Aby do tego doszło wiązanie między nimi a IκB, musi ulec zerwaniu, dzieje się to przez fosforylację inhibitora tego szlaku IκB przez kinazę IKK, która składa się z białka enzymatycznego kinazy CHUK (z ang. *conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*), czyli „wszędobylskiej” kinazy z konserwatywną helisą-pętlą-helisą (IKKα, IKK1) i IKBK, które są kinazami inhibitorów ścieżki NF-κB (IKKβ, IKK2) oraz podjednostki strukturalnej IKBKG (IKKγ, IKK3) (Piotrowska, Iżykowska et al. 2008). Po zadziałaniu bodźca aktywującego szlak sygnałowy, na przykład przez przyłączenie do receptora TNFR1 jego ligandu w postaci TNF, ufosforylowany IκB podlega degradacji w proteasomie zaś uwolnione dimery NFκB są transportowane do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym dochodzi do stopniowej akumulacji tych dimerów, które po rozpoznaniu odpowiednich sekwencji DNA promotorowego mogą się z nimi związać. Są to zazwyczaj fragmenty DNA o długości od 9 do 10 par zasad i są nazywane obszarami κB DNA. Ich lokalizacja to głównie obszar promotorów oraz sekwencji wzmacniających transkrypcję docelowych genów (z ang. *Enhancer*). Regulacja transkrypcji zachodzi dzięki wiązaniu się dimerów NFκB do obszarów κB DNA, co z kolei umożliwia rekrutację kolejnych koaktywatorów i/lub korepresorów (Hayden, Ghosh et al. 2008).

Po opisanej powyżej aktywacji czynników ścieżki sygnałowej NF-κB, możliwy staje się ich wpływ na poziom ekspresji wielu genów (Hoesel, Schmid et al. 2013). Do aktywacji tej ścieżki dochodzi jednak przez wiele czynników, z których najważniejszymi wydają się być cytokiny takie jak TNF, produkty metabolizmu bakterii, wirusy oraz czynniki wzrostu (Xueling, Zhu et al. 2015). Wiele stanów patologicznych zachodzących w organizmie wiąże się z nieprawidłowym działaniem ścieżki NF-κB. Wspomniane stany patologiczne to między innymi nowotwory, przewlekłe stany zapalne, astma, choroby serca, zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS, z ang. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), cukrzyca typu I i II, miażdżyca tętnic, choroby neurodegeneracyjne, czy reumatoidalne zapalenie stawów (Hassa, Hottiger et al. 2002).

Opisane właściwości ścieżki sygnałowej NF-κB wskazują na jej bardzo duże znaczenie w organizmie. Nie dziwi więc fakt, że jest ona przedmiotem wielu badań,

a jej aktywność jest miernikiem poziomu aktywności komórek, szczególnie tych, które biorą udział w reakcji zapalnej. Wydaje się również, że ocena jej aktywności może być pierwszym z parametrów służących ocenie właściwości prozapalnych jak i przeciwzapalnych substancji występujących naturalnie w organizmie oraz leków czy preparatów medycznych.

Lipopolisacharyd (LPS)

LPS bakterii gram-ujemnych wchodzi w skład ich zewnętrznej błony komórkowej. Jest on kluczowy zarówno ze względu na udział w podstawowych procesach życiowych bakterii, ale także jest ważnym czynnikiem chorobotwórczym. LPS zawiera w sobie trzy elementy strukturalne: antygen O, czyli O-swoisty łańcuch polisacharydowy, oligosacharyd rdzeniowy i lipid A, zatem jest on hetero polimerem lipidowo-polisacharydowym. Poszczególne składniki LPS mają różne działania: za toksyczność odpowiada lipid A, zaś za immunogenność polisacharyd. Oddziaływania poszczególnych struktur LPS umożliwiają szereg badań, między innymi nad wywoływaniem nekrozy w komórkach nowotworowych, czy indukowaniu stanu zapalnego (Markiewicz, 1993).

W kontekście prezentowanych w niniejszej pracy wyników wykonanych przeze mnie badań istotny wydaje się być wpływ LPS na aktywność układu odpornościowego. Bakterie gram-ujemne, które mają w swojej otoczce LPS, są rozpowszechnione w środowisku, są również składnikiem naturalnej flory jelitowej zwierząt i ludzi. Prawidłowa odpowiedź układu odpornościowego na poszczególne składniki LPS jest formowana już od początku życia każdego organizmu. Dzięki temu, gdy tylko pojawi się w krwioobiegach bakteria martwa, namnażająca się lub choćby fragment jej ściany komórkowej, powoduje to rozpoznanie ich przez układ odpornościowy gospodarza, co z kolei poprzez kaskadę zdarzeń prowadzi do wywołania reakcji zapalnej. Jednak aby lipid A mógł pełnić swoją funkcję biologiczną, LPS musi zostać uwolniony z zewnętrznej błony mikroorganizmu. Działanie lipidu A polega na aktywacji między innymi monocytów, makrofagów czy komórek śródbłona co w konsekwencji powoduje uwalnianie przez nie czynników prozapalnych takich jak prostaglandyny, interleukiny czy TNF, będących głównymi mediatorami rozwoju reakcji zapalnej (Netea, Deuren et al. 2002). W niewielkich stężeniach czynniki te prowadzą do wytworzenia odporności na dany czynnik patogeny czy nekrozy komórek nowotworowych. Jednak gdy ilość cytokin wzrośnie, to zaczynają one działać toksycznie na organizm, co prowadzi do szeregu reakcji takich jak znaczne zwiększenie temperatury ciała, obniżenie ciśnienia krwi, aktywacja układu dopełniacza, a nawet nekroza komórek wchodzących w skład szpiku kostnego. W skrajnych przypadkach może to prowadzić do wstrząsu związanego z uogólnionym zakażeniem organizmu tzw. sepsą, a nawet śmierci (Łodowska, Zięba et al. 2006).

Czynnik martwicy nowotworu

Czynnik martwicy nowotworu (TNF, z ang. *Tumor Necrosis Factor*), to główna cytokina prozapalna, mająca ogromny udział w kontroli przebiegu reakcji zapalnej. Jest ona wytwarzana między innymi przez aktywowane komórki układu odpornościowego takie jak makrofagi czy monocyty, ale również przez komórki takie jak adipocyty, fibroblasty czy keratynocyty. TNF powoduje między innymi kacheksję,

czyli wyniszczenie nowotworowe, stąd inna nazwa tej cytokiny to kacheksyna. Jest ona również związana ze wstrząsem septycznym oraz zmniejszaniem masy guzów nowotworowych (Kriegler, Perez et al. 1988).

Czynnik martwicy nowotworu to glikoproteina, mająca w swojej budowie 182 aminokwasy. Jego działanie na inne komórki zaczyna się połączeniem z receptorem na powierzchni błony komórkowej. Wyróżniono następujące receptory, które znajdują się na komórkach kompetentnych immunologicznie: TNF-R1 – białko p55 i TNF-R2- białko p75. Po pobudzeniu danego receptora, dochodzi do kaskady reakcji, prowadzącej ostatecznie do wyprodukowania i uwolnienia cytokin. TNF ma działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe, ale również na komórki zainfekowane patogenem. Jednym z mechanizmów prowadzących do apoptozy komórek nowotworowych przez tę cytokinę jest doprowadzanie do znacznego wzrostu stężenia wolnych rodników tlenowych (ROS). Procesy nie związane z komórkami nowotworowymi to między innymi pobudzanie wydzielania białek ostrej fazy przez wątrobę, stymulacja fagocytozy czy rekrutowanie neutrofilii. Wykazano związek z podwyższonym poziomem TNF a zachorowaniami na astmę czy na rozmaite alergię, ale również z takimi chorobami autoimmunologicznymi jak choroba Leśniowskiego-Crohna (Gołąb, 2007).

Działanie TNF w komórce jest również związane z aktywnością ścieżki NF-κB. Szereg reakcji wpływa na regulację ekspresji TNF, na przykład metaloproteinaza TACE będąca enzymem przekształcającym czynnik martwicy nowotworu (TACE, z ang. *Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*), jest kluczowa, ponieważ w wyniku jej działania dochodzi do uwalniania TNF (Gołąb, Jakóbsiak et al. 2013). Zidentyfikowano również cząsteczki, które są skierowane przeciwko wewnątrzkomórkowemu szlakom sygnalizacyjnym związanym z TNF, a są to inhibitory fosfodiesterazy cAMP takie jak inhibitor typu 4 (PDE4, z ang. *phosphodiesterase type 4 inhibitor*) oraz białko p38, którego funkcja jest zbliżona do kinaz z grupy kinaz aktywowanych stresem (JNK, z ang. *c-Jun N-terminal kinases*). Co więcej w sygnalizacji cytokiny TNF istotne są również inhibitory szlaku NF-κB, które hamują efekty wywierane przez nią. Ponadto zahamowanie aktywności ścieżki NF-κB, może prowadzić do śmierci komórkowej, przy czym najbardziej wrażliwe na ten mechanizm są komórki nowotworowe (Palladino, Bahjat et al. 2003).

Założenia i cel pracy

Ścieżka sygnałowa NF-κB jest kluczowa dla przebiegu reakcji zapalnej, a jej aktywność jest dobrym wskaźnikiem aktywności komórek biorących w niej udział. Aktywację tej ścieżki, w warunkach *in vitro*, wywołuje wiele czynników, w tym cytokiny prozapalne oraz elementy błon komórkowych bakterii gram-ujemnych. Zmiany aktywności ścieżki NF-κB wpływają na transkrypcję wielu genów, w tym odpowiedzialnych za rozwój reakcji zapalnej. Szlak NF-κB jest nie tylko kluczowy w procesie aktywacji komórek odpornościowych, obserwowanej podczas reakcji zapalnej, ale również dla innych komórek biorących w niej udział, takich jak komórki nabłonka jelit czy śródbłonka naczyń krwionośnych. Zmniejszenie aktywności tej ścieżki pod wpływem różnych związków, może świadczyć o ich właściwościach przeciwzapalnych.

Celem pracy było określenie tempa proliferacji wybranych ludzkich linii komórek śródbłonka naczyń krwionośnych i nabłonka jelit oraz sposobu aktywacji i monitorowania w nich aktywności ścieżki sygnałowej NF-κB.

Materialy i Metody

Linie komórek zastosowane w badaniach

Badania przeprowadzono na ludzkich liniach komórek nowotworowych zbliżonych morfologią do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych lub nabłonka jelit. Komórki hodowano według zaleceń dostarczonych przez ich dostawcę, opisanych w materiałach informacyjnych (ATCC), skład medium hodowlanego wraz z nazwami poszczególnych składowych, ich numerów katalogowych, dostawców i stosowanych stężeń przedstawiono w tabelach 1-4.

Komórki Caco-2 (ATCC® HTB-37™) – adherentne komórki nowotworowe zbliżone morfologią do komórek nabłonkowych jelita.

Tab. 1. Skład medium do hodowli komórek Caco-2

Odczynnik	Nr. katalogowy/firma	Stężenie
DMEM	21969035 / Gibco	-
L-glutamina	25030-081 / Gibco	2 mM
Penicillin-Streptomycin (100x)	15070063 / Gibco	1x
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrome/Merck	5%

Komórki T84 (ATCC® CCL-248™) – adherentne komórki nowotworowe zbliżone morfologią do komórek nabłonkowych jelita.

Tab. 2. Skład medium do hodowli komórek T-84

Odczynnik	Nr. katalogowy/firma	Stężenie
DMEM	21969035 / Gibco	-
L-glutamina	25030-081 / Gibco	2,5 mM
Antybiotic-Antimycotic (100x)	15240062 / Gibco	1x
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrome/Merck	5%

Komórki A-431 (ATCC® CRL-1555™) – adherentne komórki nowotworowe zbliżone morfologią do komórek nabłonkowych naczyń krwionośnych.

Tab. 3. Skład medium do hodowli komórek nowA-431

Odczynnik	Nr. katalogowy/firma	Stężenie
DMEM	21969035 / Gibco	-
L-glutamina	25030-081 / Gibco	4 mM
Antybiotic-Antimycotic (100x)	15240062 / Gibco	1x
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrome/Merck	10%

Komórki EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) – adherentne hybrydowe komórki somatyczne zbliżone morfologią do komórek nabłonkowych naczyń krwionośnych.

Tab. 4. Skład medium do hodowli komórek EA.hy926

Odczynnik	Nr. katalogowy/firma	Stężenie
DMEM	21969035 / Gibco	-
L-glutamina	25030-081 / Gibco	4 mM
Penicillin-Streptomycin (100x)	15070063 / Gibco	1x
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrome/Merck	10%

Ocena tempa wzrostu i morfologii komórek

Tempo wzrostu i morfologia wszystkich czterech badanych linii komórkowych była oceniana na podstawie ich obrazu uzyskanego w mikroskopie odwróconym. Hodowle komórek prowadzono na szalkach Petriego (Primaria, BD), a w kolejnych dniach (2, 4, 6 i 8 dni) po ich aktywacji z zamrożonych próbek wykonywano zdjęcia (pow. 500x) Otrzymane wyniki przedstawiono jako zbiór reprezentatywnych zdjęć, na których widać morfologię komórek i powierzchnię płytki jaką pokrywają w kolejnych dniach prowadzenia hodowli.

W celu ustalenia warunków transfekcji komórek, takich jak dogodny moment transfekcji po rozpoczęciu ich hodowli, przeprowadzono wstępną hodowlę komórek linii Caco-2 na płycie 96 dołkowej (Primaria, BD). Rozlewano po 10, 15, 20, 25, 30, 50 i 100 μl zawiesiny komórek ze standardowej próbki mrożeniowej. Objętość w dołkach uzupełniano do 100 μl medium do hodowli. W kolejnych dniach dokonywano obserwacji tempa wzrostu hodowli i wykonywano dokumentację zdjęciową. Otrzymane wyniki przedstawiono jako zbiór reprezentatywnych zdjęć.

Monitorowanie aktywności szlaku NF-κB

Wskaźnikiem aktywacji ścieżki NF-κB był komercyjnie dostępny plazmidowy system reporterowy pNifty2-Luc (InvivoGen). System ten ma w swojej budowie sekwencje nukleotydowe (DNA), które wiążą elementy efektorowe ścieżki NF-κB (NFκB). Po aktywacji szlaku NF-κB, w jądrach komórek transferowanych tym wektorem, dochodzi do proporcjonalnej do aktywacji szlaku stymulacji powstawania enzymu lucyferazy firefly której sekwencję kodującą zawiera wektor. Stąd pomiar poziomu tego enzymu, w reakcji enzymatycznej przekształcania fluorolucyferyny do oksyfluorolucyferyny, którą przedstawiono na Ryc. 1, wskazuje na poziom aktywacji szlaku NF-κB, związanej z przedostawaniem się NFκB do jąder komórkowych.



Ryc.1. Schemat działania fluorolucyferyny z zestawu One Glo-Tox Kit, Promega.
(ilustracja z materiałów informacyjnych producenta)

W tego typu doświadczeniach, po rozmrożeniu komórki wirowano (125 x g, 8 min.), zawieszano w 10 ml medium hodowlanego i wysiewano na 96-dołkowe płytki, pipetując do każdego dołka po 100 μl zawiesiny komórek. Po 24-72 h hodowli, zależnie od badanej linii komórkowej, komórki osiągały około 50% konfluencji, co

oznacza liczbę komórek pokrywających około 50% powierzchni dołka. W takich warunkach wykonywano transfekcję komórek, zastępując medium hodowlane 100 μ l medium hodowlanego z dodatkiem 0,1 μ g DNA plazmidowego i 0,3 μ l odczynnika do transfekcji TransIT-LT1 (MIR 2300, Mirus). Warunki transfekcji określono na podstawie informacji producenta odczynnika TransIT-LT1, uprzednich obserwacji tempa wzrostu poszczególnych linii oraz wcześniejszych badań (Majewski P.M. et al. 2010). W celu aktywacji ścieżki NF- κ B komórki poddawano działaniu różnych stężeń LPS (Cat. 0111:B4, Sigma Aldrich) lub TNF (Cat. 300-01A, PeproTech), odpowiednio 100-1000 ng/ml (LPS) i 1-20 ng/ml (TNF). Ponadto stężenie 1000 ng/ml LPS i 20 ng/ml TNF zastosowane zostało do określenia czasowej odpowiedzi komórek na te związki. W doświadczeniach tych ścieżka sygnałowa NF- κ B stymulowana była w komórkach przez różny czas, to znaczy od 15 min. do 24h.

Ocenę poziomu aktywności ścieżki NF- κ B wyrażającej się poziomem ekspresji plazmidowej lucyferazy firefly oceniono używając zestawu Dual-Glo (E2940, Promega), dodając po 100 μ l tego odczynnika do każdego z dołków płytki zawierającej komórki z medium hodowlanym w tej samej objętości (1:1). Pomiaru poziomu luminescencji dokonano w czytniku płytkowym Victor 3 (Perkin Elmer), a wyniki wyrażono jako relatywny poziom luminescencji (RLU, z ang. *Relative Luciferase Units*).

Analiza statystyczna

Istotność statystyczną różnic między grupami określano używając testu t-Studenta.

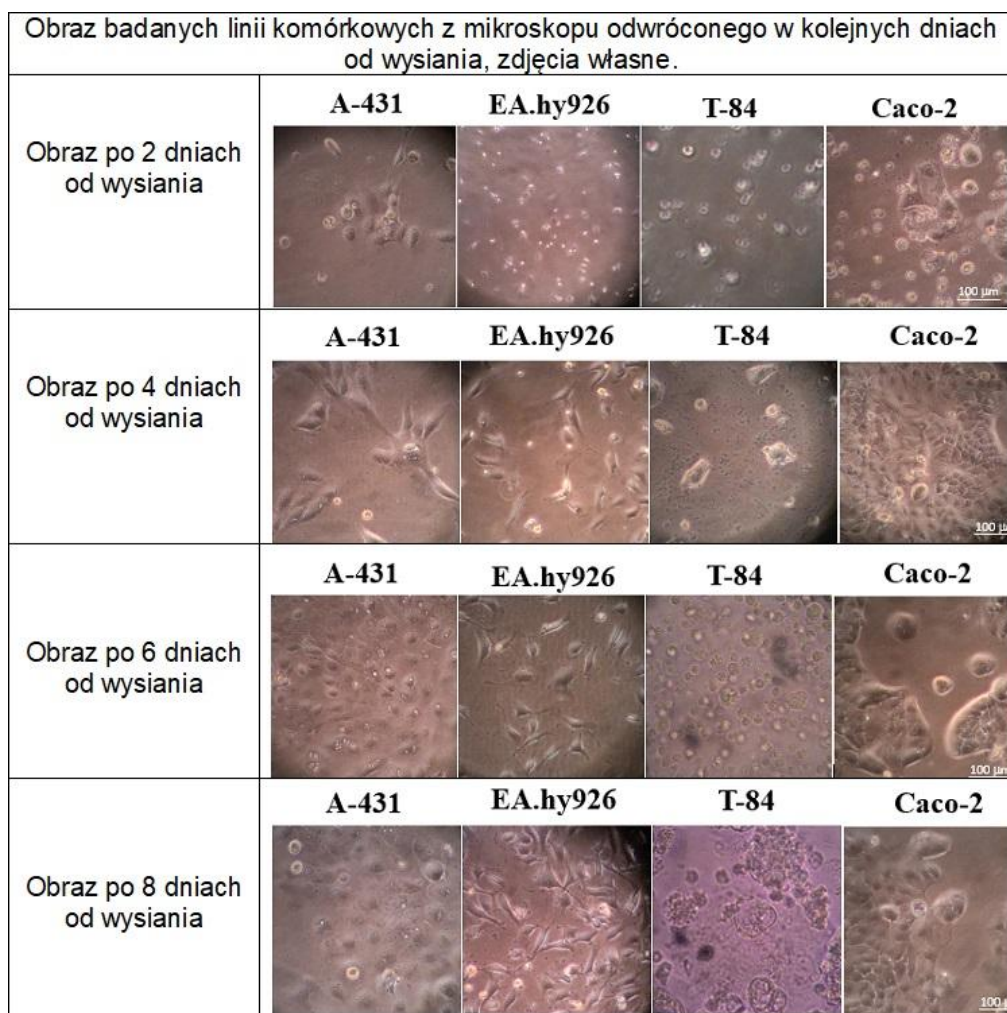
Wyniki

Ocena tempa proliferacji komórek A-431, EA.hy926, T-84, Caco-2

Pierwszym etapem badań była ocena tempa proliferacji wszystkich czterech linii komórkowych. Wykonywano hodowlę tych komórek na szalkach Petriego (Primaria, BD) i w kolejnych dniach (2, 4, 6 i 8 dni) doświadczenia wykonywano zdjęcia hodowli używając mikroskopu odwróconego. Na Ryc. 2, przedstawiono reprezentatywne wyniki tych badań.

Na Ryc. 2. można zauważyć, że po 2 dniach od wysiania najszybciej dzielą się komórki Caco-2, a najwolniej komórki T-84, co wyraża się odpowiednio większą i mniejszą liczbą tych komórek w porównaniu do zdjęć pozostałych badanych linii. Zestawienie zdjęć z 4 dnia analiz wskazuje, że podobnie jak w poprzednim przypadku, komórki Caco-2 osiągnęły największą gęstość, czyli najszybciej się dzieliły, tego dnia wykonano pasaż tych komórek. Do 4 dnia hodowli komórki T-84 nie zmieniły znacząco swojej liczby. Linie A-431 i EA.hy926 po 4 dniach od wysiania wykazywały podobne zagęszczenie co 2 dni wcześniej. Po 6 dniach od wysiania komórek na szalki, wszystkie linie oprócz EA.hy926 osiągnęły wysoki poziom konfluencji. Po 8 dniach od wysiania komórek na szalki liniami, które osiągnęły największą konfluencję były Caco-2 i A-431.

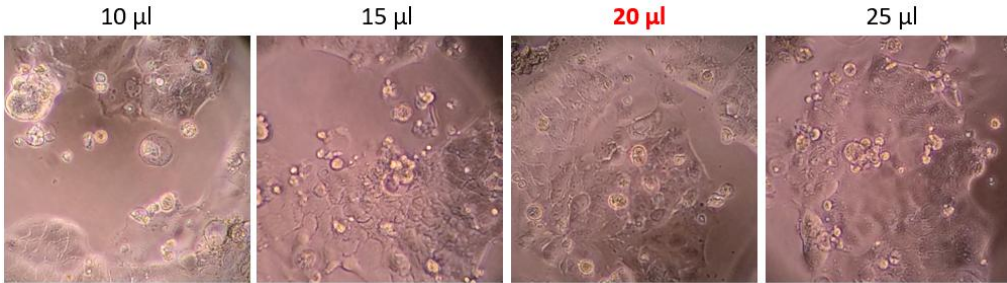
Przedstawione wyniki wskazują, że najwolniej rosną komórki linii T-84 oraz EA.hy926, zaś najszybciej komórki linii Caco-2 i A-431. Przeprowadzone obserwacje pozwoliły na stwierdzenie, że najlepszymi komórkami, pod względem tempa proliferacji do rozwijania modelu doświadczalnego do badań przeciwwzapalnych właściwości preparatów medycznych, są komórki Caco-2 i A-431.



Ryc. 2. Obraz badanych linii komórkowych z mikroskopu odwróconego po 2, 4, 6 i 8 dniach od wysiania, zdjęcia własne

Ustalenie warunków transfekcji komórek

Kolejnym etapem badań było wybranie optymalnej liczby wysiewanych komórek na płytki 96 dołkowe do przeprowadzenia transfekcji i traktowania komórek LPS i TNF. W tym celu przeprowadzono hodowlę wybranych do badań komórek rozlewając po 10, 15, 20, 25, 30, 50 i 100 μ l ze standardowej zawiesiny komórkowej uzyskiwanej podczas pasażu. W kolejnych dniach dokonywano obserwacji wzrostu hodowli i wykonywano zdjęcia, obserwacje hodowli komórek Caco-2. Wybrano reprezentacyjny wynik i pokazano na rycinie (Ryc. 3).



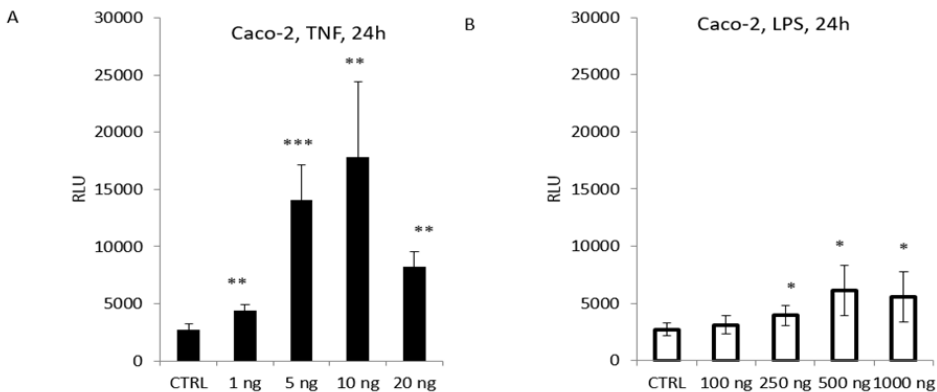
Ryc. 3. Reprezentatywne zdjęcie komórek Caco-2 z mikroskopu odwróconego, przedstawiające hodowlę komórek wysianych na płytki 96 dołkowej w objętości od 10 do 25 μ l standardowej zawiesiny komórkowej po pasażu, 72 h po rozpoczęciu hodowli

Przedstawiona powyżej analiza wskazuje, że optymalna objętość zawiesiny komórek, dodanych do dołków płytki 96-dołkowej to 20 μ l. Komórki te osiągają bowiem dużą konfluencję w 72 h od rozpoczęcia hodowli, co daje możliwość przeprowadzenia procedur związanych z transfekcją i traktowanie komórek LPS i TNF w optymalnych warunkach, czyli ciągłego przyrostu liczby komórek.

Aktywność ścieżki NF- κ B w komórkach Caco-2

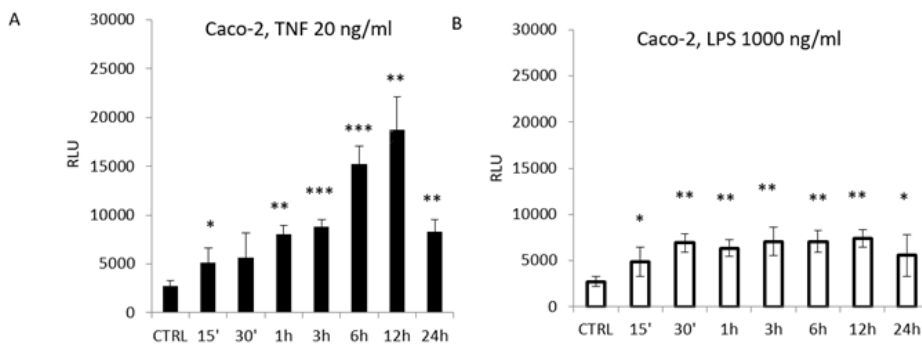
Aby określić aktywność ścieżki NF- κ B, komórki Caco-2 transfekowano wektorem plazmidowym pNifty2-luc, a po 15 h od transfekcji traktowano je TNF lub LPS. Na Ryc. 4 przedstawiono otrzymane wyniki tych badań.

Wszystkie badane stężenia TNF podnosiły aktywność ścieżki NF- κ B po 24 h od jego podania do hodowli, a najwyższą stymulację odnotowano przy stężeniu 10 ng/ml. Wpływ ten był istotny statystycznie przy poziomie ufności statystycznej $p < 0,01$ (Ryc. 4A). Traktowanie komórek LPS, powodowało wzrost aktywności ścieżki NF- κ B w trzech najwyższych stężeniach (Ryc. 4B). Stymulacja LPS była znacznie mniej efektywna niż TNF.



Ryc. 4. Analiza zmian aktywności ścieżki NF- κ B w komórkach Caco-2 poddanych działaniu różnych stężeń TNF (A) i LPS (B). Poziom aktywności ścieżki oceniano po 24h od podania TNF lub LPS. Średnia ($n=4$) \pm odchylenie standardowe, istotność statystyczną różnic między poszczególnymi grupami a grupą CTRL (bez stymulacji TNF lub LPS) określano używając testu T-Studenta, poziom ufności statystycznej oznaczono jako: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Cytokina prozapalna TNF w stężeniu 20 ng/ml podnosiła istotnie statystycznie aktywność ścieżki NF-κB w 15 min., 1, 3, 6, 12 i 24h od jej podania (Ryc. 5A). Największy wpływ miał TNF po 12h od jego podania, zmiana ta była istotna statystycznie na poziomie ufności statystycznej ($p < 0.01$). Podanie komórkom LPS powodowało wzrost aktywności ścieżki NF-κB istotny statystycznie w 15 min, 30 min, 1, 3, 6, 12 i 24 h po podaniu (Ryc. 5B).

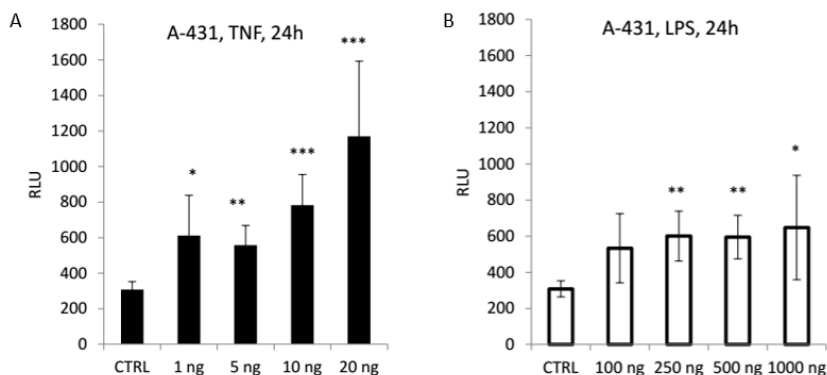


Ryc. 5. Analiza zmian aktywności ścieżki NF-κB pod wpływem różnych stężeń TNF (A) i LPS (B) w komórkach Caco-2. Wpływ czasu podania TNF (A) i LPS (B) na aktywność ścieżki sygnałowej NF-κB w komórkach Caco-2. Poziom aktywności ścieżki oceniano od 15 min. do 24h od podania związków. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 4

Aktywność ścieżki NF-κB w komórkach A-431

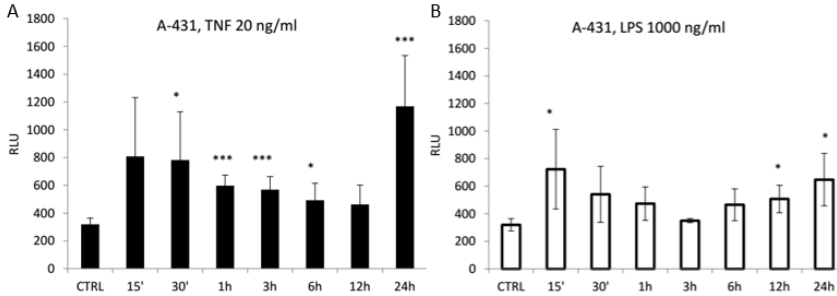
Aby określić aktywność ścieżki NF-κB, komórki A-431 transfekowano wektorem plazmidowym pNifty2-luc, a po 15h od transfekcji traktowano je TNF lub LPS. Na Ryc. 11 przedstawiono otrzymane wyniki.

Wszystkie badane stężenia TNF podnosiły aktywność ścieżki NF-κB po 24 h od jego podania, a najwyższą stymulację odnotowano przy stężeniu 20 ng/ml. Wpływ ten był istotny statystycznie przy poziomie ufności statystycznej $p < 0,001$ (Ryc. 6A). Traktowanie komórek LPS, powodowało wzrost aktywności ścieżki NF-κB w trzech najwyższych stężeniach (Ryc. 6B). Stymulacja LPS była mniej efektywna niż TNF.



Ryc. 6. Analiza zmian aktywności ścieżki NF-κB w komórkach A-431 poddanych działaniu różnych stężeń TNF (A) i LPS (B). Poziom aktywności ścieżki oceniano po 24h od podania TNF lub LPS. Średnia ($n=4$) \pm odchylenie standardowe, istotność statystyczną różnic między poszczególnymi grupami a grupą CTRL (bez stymulacji TNF lub LPS) określano używając testu T-Studenta, poziom ufności statystycznej oznaczono jako: * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Cytokina prozapalna TNF w stężeniu 20 ng/ml podnosiła istotnie statystycznie aktywność ścieżki NF- κ B w 30 min., 1, 3, 6 i 24h od jej podania (Ryc. 7A). Największy wpływ miał TNF po 24h od jego podania, zmiana ta była istotna statystycznie na poziomie ufności statystycznej ($p < 0.001$). Podanie komórkom LPS powodowało wzrost aktywności ścieżki NF- κ B istotny statystycznie w 15 min, 12 i 24 h po podaniu (Ryc. 7B).

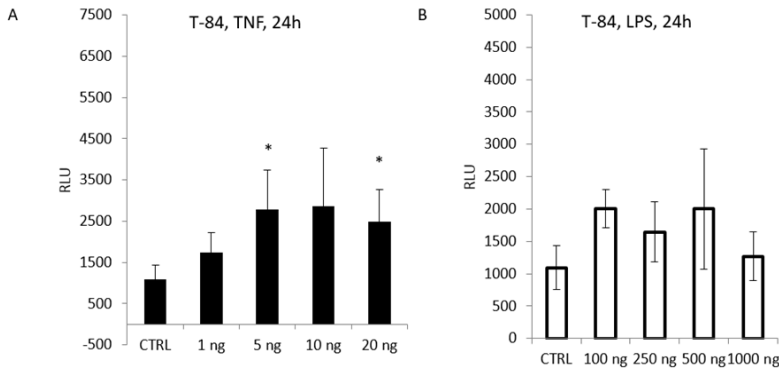


Ryc. 7. Analiza zmian aktywności ścieżki NF- κ B pod wpływem różnych stężeń TNF (A) i LPS (B) w komórkach A-431. Wpływ czasu podania TNF (A) i LPS (B) na aktywność ścieżki sygnałowej NF- κ B w komórkach A-431. Poziom aktywności ścieżki oceniano od 15 min. do 24h od podania związków. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 4

Aktywność ścieżki NF- κ B w komórkach T-84

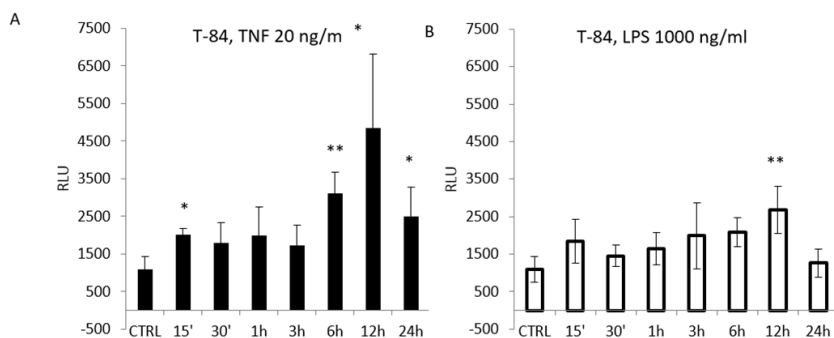
Aby określić aktywność ścieżki NF- κ B, komórki T-84 transfekowano wektorem plazmidowym pNifty2-luc a po 15h od transfekcji traktowano je TNF lub LPS. Na Ryc. 12 przedstawiono otrzymane wyniki.

Wszystkie badane stężenia TNF podnosiły aktywność ścieżki NF- κ B, a najwyższą stymulację odnotowano przy stężeniach 5 i 20 ng/ml. Wpływ ten był istotny statystycznie przy poziomie ufności statystycznej $p < 0,05$ (Ryc. 8A). Traktowanie komórek LPS, powodowało tendencję wzrostową aktywności ścieżki NF- κ B we wszystkich stężeniach, jednak nie było to istotne statystycznie (Ryc. 8B).



Ryc. 8. Analiza zmian aktywności ścieżki NF- κ B w komórkach T-84 poddanych działaniu różnych stężeń TNF (A) i LPS (B). Poziom aktywności ścieżki oceniano po 24h od podania TNF lub LPS. Średnia ($n=4$) \pm odchylenie standardowe, istotność statystyczną różnic między poszczególnymi grupami a grupą CTRL (bez stymulacji TNF lub LPS) określano używając testu T-Studenta, poziom ufności statystycznej oznaczono jako: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Cytokina prozapalna TNF w stężeniu 20 ng/ml podnosiła istotnie statystycznie aktywność ścieżki NF-κB w 15 min., 6, 12 i 24h od jej podania (Ryc. 9A). Największy wpływ miał TNF po 12h od jego podania, zmiana ta była istotna statystycznie na poziomie ufności statystycznej ($p < 0.05$). Podanie komórkom LPS powodowało niewielką tendencję wzrostową aktywności ścieżki NF-κB istotną statystycznie jedynie w 24 h po podaniu (Ryc. 9B).

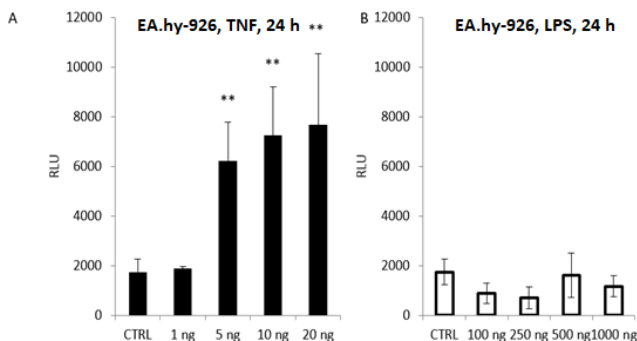


Ryc. 9. Analiza zmian aktywności ścieżki NF-κB pod wpływem różnych stężeń TNF (A) i LPS (B) w komórkach T-84. Wpływ czasu podania TNF (A) i LPS (B) na aktywność ścieżki sygnałowej NF-κB w komórkach T-84. Poziom aktywności ścieżki oceniano od 15 min. do 24h od podania związków. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 4

Aktywność ścieżki NF-κB w komórkach EA.hy-926

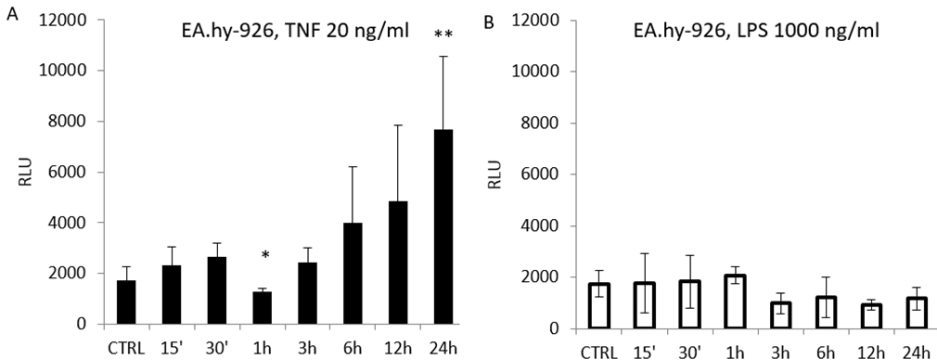
Aby określić aktywność ścieżki NF-κB, komórki EA.hy-926 transfekowano wektorem plazmidowym pNifty2-luc a po 15h od transfekcji traktowano je TNF lub LPS. Na Ryc. 23 przedstawiono otrzymane wyniki.

Wszystkie badane stężenia TNF podnosiły aktywność ścieżki NF-κB, z wyjątkiem stężenia 1 ng/ml, przy którym aktywność była niemal na tym samym poziomie co w próbie kontrolnej. Najwyższą stymulację odnotowano przy stężeniu 20 ng/ml, wpływ ten był istotny statystycznie przy poziomie ufności statystycznej $p < 0,01$ (Ryc. 10A). Traktowanie komórek LPS, nie powodowało wzrostu aktywności ścieżki NF-κB (Ryc. 10B).



Ryc. 10. Analiza zmian aktywności ścieżki NF-κB w komórkach EA.hy-926 poddanych działaniu różnych stężeń TNF (A) i LPS (B). Poziom aktywności ścieżki oceniano po 24h od podania TNF lub LPS. Średnia ($n=4$) \pm odchylenie standardowe, istotność statystyczną różnic między poszczególnymi grupami a grupą CTRL (bez stymulacji TNF lub LPS) określano używając testu T-Studenta, poziom ufności statystycznej oznaczono jako, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Cytokina prozapalna TNF w stężeniu 20 ng/ml podnosiła istotnie statystycznie aktywność ścieżki NF- κ B w 1 i 24h od jej podania (Ryc. 11A). Największy wpływ miał TNF po 24h od jego podania, zmiana ta była istotna statystycznie na poziomie ufności statystycznej ($p < 0.01$). Podanie komórkom LPS nie spowodowało wzrostu aktywności ścieżki NF- κ B, pozostawała ona na tym samym poziomie co próba kontrolna, lub była ona niższa, a wartości te nie były istotne statystycznie (Ryc. 11B).



Ryc. 11. Analiza zmian aktywności ścieżki NF- κ B pod wpływem różnych stężeń TNF (A) i LPS (B) w komórkach Hy-926. Wpływ czasu podania TNF (A) i LPS (B) na aktywność ścieżki sygnałowej NF- κ B w komórkach Hy-926. Poziom aktywności ścieżki oceniano od 15 min. do 24h od podania związków. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 4

Dyskusja

Reakcja zapalna jest elementem fizjologicznej odpowiedzi organizmu na różnego pochodzenia czynniki szkodliwe. Należy ją również wiązać z rozwojem wielu chorób na przykład nowotworowych czy neurodegeneracyjnych (Sanjay, Kenza et al. 2011). Dlatego poszukiwane są wciąż nowe związki przeciwwzapalne oraz testuje się kombinacje leków już istniejących, w celu efektywniejszego zwalczania lub zapobiegania powstawaniu stanów zapalnych. Stworzenie nowoczesnego modelu do testowania i badań właściwości przeciwwzapalnych różnych substancji w warunkach *in vitro*, wydaje się więc uzasadnione i jest odpowiedzią na zapotrzebowanie rynku farmaceutycznego na takie badania. Częścią takiego większego projektu są przedstawione w niniejszej pracy doświadczenia.

Pierwszym etapem tego typu badań jest wybranie odpowiedniej linii komórkowej oraz wskaźnika stanu zapalnego, co jak pokazują opisane w poprzednim rozdziale wyniki, udało się osiągnąć. Testowanym wskaźnikiem była aktywność szlaku sygnałowego NF- κ B, który jak już wspomniano, jest najważniejszym regulatorem rozwoju reakcji zapalnej, aktywności komórek odpornościowych i innych komórek biorących udział w procesach odpornościowych. Elementy efektorowe tego szlaku, wpływają na proliferację komórek, ich różnicowanie, aktywność sekrecyjną i ich długość życia. Szlak NF- κ B zostaje aktywowany podczas rozwoju stanów zapalnych oraz procesów nowotworzenia (Da Silveira Cruz-Machado, Pinato et al. 2012).

W trakcie przebiegu reakcji zapalnej następuje zmiana ekspresji szeregu genów w wielu typach komórek biorących w niej udział, za co w dużej mierze odpowiedzialne są elementy NFκB. Ścieżka sygnałowa NF-κB, kontroluje ekspresję zarówno czynników o właściwościach prozapalnych jak i przeciwzapalnych, co daje jej szczególne znaczenie w kontekście regulacji przebiegu reakcji zapalnej (Natoli, 2010). Aktywność tej ścieżki oceniana w badaniach *in vitro*, jest więc bardzo dobrym wskaźnikiem służącym sprawdzeniu właściwości pro- i przeciwzapalnych różnych związków.

Większość analogicznych do przedstawionych w niniejszej pracy badań, prowadzona jest poprzez ocenę aktywności szlaku NF-κB metodą Western Blot, oceniającą poziom białek tego szlaku w jądrach badanych komórek lub cytoplazmatycznego poziomu inhibitorów tej ścieżki sygnałowej, takich jak IκB. Przykłady tych prac zostały opisane w kolejnych akapitach tej części pracy.

Jak się okazuje, tylko nieliczne badania w podobnym obszarze prowadzone są z zastosowaniem nowoczesnych układów eksperymentalnych, jakim jest stosowanie systemów reporterowych, takich jak pNiFty2-Luc, którego potencjał do pomiaru aktywności szlaku NF-κB został sprawdzony w niniejszej pracy. Przykładem tych badań jest wykorzystanie tego systemu w określeniu wpływu bakterii probiotycznych na modelowanie wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, między innymi na poziom uwalniania cytokin przez limfocyty T (Plantinga, Maren et al. 2011). Autorzy pracy zauważyli, że ogromne zainteresowanie zyskuje stosowanie różnych szczepów bakterii probiotycznych, jako suplementów diety. Stosuje się je w celu unormowania homeostazy jelitowej, polepszenia procesu absorpcji składników odżywczych, a u osób z obniżoną odpornością probiotyki są w stanie przeciwdziałać kolonizacji i zakażeniom jelit przez patogenne bakterie lub grzyby. Ponadto, zwrócili oni uwagę na to, że idealny szczep bakteryjny, który w przyszłości mógłby być stosowany w preparatach probiotycznych do leczenia stanów zapalnych jelit, powinien charakteryzować się niską immunogennością, czyli niską zdolnością do wywoływania odpowiedzi układu odpornościowego. Zbadanie immunogenności, oraz typów limfocytów T biorących udział w odpowiedzi organizmu na potencjalny szczep probiotyczny, są więc kluczowe przy wyborze konkretnego szczepu do produkcji suplementu diety. Badacze ci w swojej pracy porównali wpływ szczepów bakterii *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus casei* pod względem ich zdolności do indukowania odpowiedzi zapalnej, ujawniającej się poprzez wytwarzanie cytokin przez ludzkie i mysie komórki układu odpornościowego w warunkach *in vitro*. Wykazano również, że szczep *B. breve* indukował wydzielanie interferonu gamma (IFN-γ), czyli cytokiny prozapalnej, na niższym poziomie w porównaniu do dwóch pozostałych badanych szczepów bakterii. Wszystkie badane szczepy, indukowały wydzielanie cytokin w sposób zależny od receptora Toll-podobnego 9 (TLR 9). Niższy poziom indukcji wydzielania cytokin przez szczep *B. breve* był spowodowany efektem hamowania wywoływanym przez receptor Toll-podobny 2 (TLR 2). Nie zaobserwowano zaś żadnego udziału receptorów Toll-podobnych 4 (TLR 4). Wszystkie te obserwacje pozwoliły stwierdzić, że receptory TLR i ich interakcje z komórkami związanymi ze stanem zapalnym, są zaangażowane w różnicowanie odpowiedzi zapalnej między szczepami

probiotycznymi używanymi jako suplementy diety. System reporterowy pNiFty2-Luc został w badaniach tych wykorzystany do wykrycia aktywności receptorów Toll-podobnych (Plantinga, Maren et al. 2011). Ponieważ receptory TLR mają kluczowe znaczenie w rozpoznawaniu czynników odpowiedzialnych za rozpoczęcie reakcji zapalnej aktywując szlak NF- κ B (Gołąb, 2013).

Liczne dane literaturowe wskazują, że ważnym czynnikiem wywołującym stan zapalny jest czynnik martwicy nowotworu TNF, nazywany główną cytokiną prozapalną. Jego podwyższony poziom jest charakterystyczny w przebiegu przewlekłych stanów zapalnych. TNF jest syntetyzowany przez komórki układu odpornościowego takie jak monocyty oraz komórki nie związane z układem odpornościowym. Cytokina ta, ma zdolność między innymi do modulowania metabolizmu innych komórek i wywoływania apoptozy komórek nowotworowych (Chu, 2012). Wszystkie wymienione wyżej cechy czynnika martwicy nowotworu sprawiają, że TNF wydaje się być dobrym związkami do naśladowania warunków stanu zapalnego w warunkach *in vitro*, co potwierdziły prezentowane w niniejszej pracy badania.

Jak dowiedziono LPS jest również dobrym związkami do naśladowania stanu zapalnego w warunkach *in vitro*. Związek ten jest w stanie wywoływać odpowiedź układu odpornościowego, która poprzez kaskadę reakcji prowadzi do aktywacji komórek biorących udział w reakcji zapalnej. Lipid A, będący częścią LPS, powoduje aktywację monocytów, makrofagów oraz komórek śródbłonna. Aktywacja tych komórek powoduje, że uwalniają one czynniki prozapalne między innymi TNF (Netea, Deuren et al. 2002). Jak wykazały przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań, potrzebnych do rozwijania w przyszłości układu eksperymentalnego do testowania właściwości przeciwzapalnych różnych związków, stymulacja aktywności szlaku NF- κ B przez LPS jest w większości badanych komórek mniejsza w porównaniu do efektów wywieranych przez TNF. Zatem, tworzony układ powinien bazować na stymulacji tej ścieżki przez dodanie TNF.

Wybór linii komórkowych do doświadczenia opisanego w tej pracy opierał się na ich wcześniejszym użyciu w badaniach nad stanem zapalnym lub nad procesem nowotworzenia, z którym jest on związany. Komórki linii A-431 są komórkami pochodzącymi z ludzkiego nowotworu naskórka (materiały informacyjne firmy ATCC), morfologicznie zbliżone do komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Jest to choroba zaczynająca się w komórkach płaskonabłonkowych, których wygląd można porównać do łusek ryb, znajdujących się w tkance, która tworzy między innymi powierzchnię skóry ale również wyściela drogi oddechowe i trawienne (Li, Zhou et al. 2016). Wykazano, że stan zapalny jest istotny w tworzeniu przerzutów tego nowotworu, oraz przekształcaniu w inne typy nowotworów skóry (Paulitschke, Gerner et al. 2015). Linia ta jest doskonałym modelem do badań odpowiedzi na bodźce zewnątrzkomórkowe, w postaci wzmożonej lub spowolnionej proliferacji i różnic w migracji po aktywacji różnych szlaków wewnątrzkomórkowych. Jedną z prac opisujących doświadczenie przeprowadzone na komórkach A-431 prezentuje wpływ enzymu p38 na regulację translacji białek istotnych dla odpowiedzi odpornościowej w sytuacji szoku osmotycznego oraz stresu wewnątrzkomórkowego. Enzym p38 okazał się w tych badaniach kluczowym w procesie powstawania nowotworu (Beausang, Leong et al. 2013). Zatem linia A-431 jest używana jako

model do badań różnorodnych ścieżek sygnałowych biorących udział w odpowiedzi układu odpornościowego oraz w nowotworzeniu.

Komórki Caco-2 są szeroko wykorzystywane do badań mających na celu zrozumienie i przeciwdziałanie stanom zapalnym jelit, zwalczaniu zaburzeń pracy przewodu pokarmowego, czy rozwoju nowotworów. W badaniach prowadzonych na tych komórkach, między innymi wykazano, że bakterie probiotyczne mają działanie przeciwzapalne oraz mogą przeciwdziałać kolonizacji jelit przez patogeny chorobotwórcze. Wskazuje to, że jest to dogodna linia komórkowa do badań nad interakcjami zachodzącymi w jelitach (Ren, Li et al. 2013).

Komórki linii EA.hy-926 były używane w badaniach nad cytostatykami, takimi jak Metotreksat, stosowanym między innymi w terapii ostrej białaczki limfatycznej, ostrej białaczki szpikowej czy nabłonka kosmówkowego. Kluczowym działaniem tego leku jest hamowanie reakcji zapalnej, istotnej w przebiegu reakcji nowotworowej (Summers, Hammons et al. 2013). Innym przykładem zastosowania tych komórek w badaniach było testowanie wpływu Talidomidu jako środka przeciwdziałającego między innymi angiogenezie, która towarzyszy rozwojowi guzów nowotworowych (Komorowski, Jerczynska et al. 2005).

Linia komórek T84 to komórki morfologicznie zbliżone do komórek nabłonka jelita, które w hodowli *in vitro* tworzą stosunkowo nieprzepuszczalną warstwę. Ta funkcja, tak zwanej bariery, jest utrzymywana przez zespół białek tworzących między nimi szczelne połączenia. Zakłócenie bariery nabłonkowej w jelicie jest cechą charakterystyczną przy zapaleniu jelit i przy infekcjach jelitowych. Nie dowiedziono, czy rozpad tej bariery jest zdarzeniem inicjującym, czy też następstwem zapalenia, jednak jest oczywiste, że utrata bariery przyczynia się do rozprzestrzeniania i zaostrzenia stanów zapalnych. Przerwanie bariery może zostać wywołane przez wiele czynników, w tym przez LPS, komórki układu odpornościowego i cytokiny prozapalne. Komórki nabłonka jelitowego człowieka T84, umożliwiają badanie rozwoju reakcji zapalnej, między innymi związanej z zaburzeniem wspomnianej bariery. Komórki T84 tworzą spolaryzowaną, nieprzepuszczalną pojedynczą warstwę, która posiada wiele właściwości charakterystycznych dla komórek jelitowych nabłonka występujących w warunkach *in vivo*, między innymi zdolność transportu substancji rozpuszczonych. Wykazują też one funkcję barierową, kluczową w rozwoju stanu zapalnego (Youakim, Ahdieh et al. 1999). Te cechy sprawiają, że komórki T84 są również świetnym materiałem do badań nad mechanizmami rozwoju reakcji zapalnej.

Dostępne dane literaturowe wskazują na występowanie zależności między przewlekłym zapaleniem jelit, a rozwojem raka jelita grubego, który jest ogromnym wyzwaniem współczesnej medycyny przedmiotem wielu badań. Jest to trzeci najczęściej powodujący śmierć nowotwór, którego rozwój i przyczyny nie są jeszcze dobrze poznane. Wiadomo, że stan zapalny w jelitach działa jak siła napędowa do transformacji zdrowych komórek w komórki nowotworowe. Wiadomo również, że w początkowych etapach tej choroby, zwiększona jest aktywność szlaku NF-κB, a jego zahamowanie zapobiega progresji nowotworu. Jak już wspomniano trwają poszukiwania naturalnych składników, które mają działanie przeciwzapalne, które mogłyby być podawane na wczesnych etapach rozwoju stanu zapalnego,

a w rezultacie zapobiegać rozwojowi nowotworu. W badaniach przeprowadzonych na linii komórkowej Caco-2, indukowano stan zapalny za pomocą TNF w stężeniu 10, 20 i 40 ng/ml przez 24 h, a następnie oceniano aktywność ścieżki sygnałowej NF-κB, za pomocą metody Western Blot. Kolejnym krokiem było podawanie kakao, ze względu na to, że jest bogatym źródłem składników biologicznie czynnych, których działanie przeciwzapalne wykryto w badaniach prowadzonych na szczurach z nowotworem jelita (Rodríguez-Ramiro, Ramos et al. 2011), (Rodríguez-Ramiro et al. 2013). Badania te wykazały, że zaindukowane podaniem TNF obniżenie poziomu markerów stanu zapalnego i hamowanie translokacji NF-κB jest możliwe dzięki składnikom zawartym w kakao. Ze względu na inną niż w niniejszej pracy metodę pomiaru aktywności ścieżki NF-κB, nie można porównać ze sobą określonych w obu przypadkach aktywności tej ścieżki. W pracy tej określono bowiem procentowe zmiany ilości białek wchodzących w skład szlaku NF-κB za pomocą metody Western Blot, zatem trudno jest porównać te wyniki z wynikami wyrażonymi w jednostkach RLU. Dla prowadzonej przeze mnie pracy doświadczalnej, publikacja ta jest jednak istotna, ponieważ wskazuje, że TNF jest bardzo dobrym czynnikiem do indukowania zmian aktywności ścieżki NF-κB oraz że linia Caco-2 jest dogodna do rozwijania układu eksperymentalnego z zastosowaniem komórek nabłonkowych.

W badaniach przeprowadzonych na linii komórkowej PC12, pochodzącej z guza chromochłonnego, a więc również o charakterze nowotworowym, sprawdzano związek między wzrostem mediatorów prozapalnych a wzmożoną apoptozą w chorobach neurodegeneracyjnych. Indukowano aktywność tych komórek, poprzez podanie LPS w stężeniu 4 µg/ml przez 24h i zaobserwowano, że indukcja apoptozy zachodzi głównie poprzez syntezę TNF. Doświadczenie to dowiodło również ochronnej i przeciwzapalnej funkcji diosminy, która jest naturalnie występującym flawonoidem między innymi w cytrusach, a jej działanie opiera się na hamowaniu wydzielania TNF. W doświadczeniu tym, podobnie jak w przeprowadzonym w mojej pracy stosowano podawanie LPS do 24 godzin, co dowodzi, że jest to dobry sposób indukowania aktywności ścieżki sygnałowej NF-κB w komórkach hodowanych w warunkach *in vitro* (Sanjay, Dholakiya et al. 2011). Jak już wspomniano na podstawie moich wyników badań do dalszej pracy nad naszym projektem, należy jednak wybrać TNF jako efektywniejszy stymulator ścieżki NF-κB.

Dane literaturowe, obejmujące badania na komórkach EA.hy926, użytych w celu zbadania możliwego działania hydroterapii na atopowe zapalenie skóry, wskazują na przydatność tej linii do rozwijania naszego układu eksperymentalnego. W badaniach tych traktowano komórki TNF w stężeniu 30 ng/ml aby aktywować ścieżkę NF-κB, zatem w wyższym niż miało to miejsce w moich doświadczeniach. Aktywacja tej ścieżki jest charakterystyczna dla tej choroby, a jak udało się wykazać w tej pracy TNF w warunkach *in vitro* skutecznie ją aktywuje. Catec-Rizzi i współpracownicy zaobserwowali również, że po stymulacji TNF komórek EA.hy-926, już po 30 minutach następuje gwałtowna aktywacja elementów NFκB, głównie białka RELA (p65) do jądra komórkowego. Zaś w obecności środka do hydroterapii (TSW, z ang. *Ave`ne Thermal Spring Water*), następuje hamowanie aktywacji tej podjednostki NFκB, wyrażającej się zmniejszeniem jego transportu do jądra komórkowego

(Castex-Rizzi, Charveron et al. 2011). W opisanym w niniejszej pracy doświadczeniu, w komórkach EA.hy926, duży wzrost aktywności ścieżki NF-κB, następował dopiero po 24h, a nie jak we wspomnianym doświadczeniu po 30 minutach, co prawdopodobnie związane jest z podaniem większego stężenia TNF, niż w opisanym w tej pracy doświadczeniu.

W literaturze można również znaleźć przykłady układów eksperymentalnych stosujących jednocześnie dwie linie komórkowe w tak zwanej kokulturze. W badaniu przeprowadzonym przez naukowców z Belgii, wykorzystano kokulturę składającą się z komórek linii Caco-2 i EA.hy-926, aby sprawdzić działanie przeciwzapalne składników wyizolowanych z czarnej marchwi (Kamiloglu, Grootaert et al. 2016). Czynnikiem wywołującym wzrost aktywności ścieżki NF-κB był TNF, podawany w stężeniu 1 ng/ml przez 3 godziny, zatem w stężeniu znacznie mniejszym niż tym, zastosowanym w przeprowadzonym przez mnie badaniu. Otrzymane przez tych naukowców wyniki wskazują, że związki zawarte w czarnej marchwi skutecznie zmniejszają ilość czynników prozapalnych, co dowodzi, że kokultura tych komórek jest również ciekawym układem eksperymentalnym. Co więcej, że skuteczną indukcję szlaku NF-κB można wywołać stosując bardzo niskie stężenia TNF.

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że zarówno LPS jak i TNF powodują wzrost aktywności szlaku NF-κB w badanych liniach komórkowych, jednak aktywacja komórek TNF powoduje większy wzrost aktywności tej ścieżki. Wszystkie cztery linie komórkowe użyte w badaniach są dobre do tworzenia modeli do badań związków o potencjale przeciwzapalnym, jednak linie Caco-2 i A-431 są najszybciej proliferującymi komórkami, co czyni je dogodnymi do tego typu badań.

Literatura

Aggarwal B.B. **Nuclear factor-κB: The enemy within**. Cancer Cell. 2004; 6(7): 203-208.

Beausang L. A., Leong K., Dickerson M., W., Saab A., Alderman E. M. **Novel discovery of P38 activation: Expression in A431 cells in vitro and in vivo models of cancer, measured by a novel assay for p-P38**. Molecular and Cellular Biology. 2013; 73(8).

Castex-Rizzi N.,*,† Charveron M.,† Merial-Kieny C.‡ † Fabre Dermo-Cosme 'tique P. **Inhibition of TNF-alpha induced-adhesion molecules by Ave`ne Thermal Spring Water in human endothelial cells**. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2011; 1:6-11.

Chu W. **Tumor necrosis factor**. Cancer Letters. 2012; 328(2).

da Silveira Cruz-Machado S., Pinato L., Koji Tamura E., Carvalho-Sousa C., Markus R. **Glia-Pinealocyte Network: The Paracrine Modulation of Melatonin Synthesis by Tumor Necrosis Factor (TNF)**. Plos one. 2012; 7 (40142).

Gilmore TD. *Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives*. „Oncogene”. 2006. 25(51):6680-4.

Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. **Immunologia**. Wydawnictwo Naukowe PWN. 143. ISBN 978-83-01-15154-6, 2007.

Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. **Immunologia**. Wydawnictwo Naukowe PWN. ISBN: 978-83-01-17108-7, 2013.

Hassa P., Hottiger M. **The functional role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 as novel coactivator of NF-κB in inflammatory disorders**. Cellular and Molecular Life Sciences. 2002; (59):1534-1553.

Hayden M., Ghosh S. **Shared Principles in NF-κB Signaling**. Cell. 2008; 132: 344-362.

- Hoesel B., Schmid J. **The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer.** *Molecular Cancer*. 2013; (2):12-86.
- Kamiloglu S., Grootaert C., Capanoglu E., Ozkan C., Smaghe G., Raes K., Van J. **Anti-inflammatory potential of black carrot (*Daucus carota* L.) polyphenols in a co-culture model of intestinal Caco-2 and endothelial EA.hy926 cells.** *Molecular Nutrition & Food Research*. 2016; (61):2.
- Komorowski J., Jerczynska H., Siejka A., Baranska P., Ławnicka H., Pawłowska Z., Stępień H. **Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells.** *Life Sciences*. 2006; (78):2558-2563.
- Kriegler M., Perez C., DeFay K., I A., Sd L. **A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF.** *Cell*. 1988; 53(1):45-53.
- Li H., Zhou F., Du W., Dou J., Xu Y., Gao W., Chen G., Zuo X., Sun L., Zhang X., Yang S. **Knockdown of asparagine synthetase by RNAi suppresses cell growth in human melanoma cells and epidermoid carcinoma cells.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2016; (63):3, 328-333.
- Lodowska J., Zięba A., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z. **Methods of lipopolysaccharide component derivation in evaluating their structures by chromatographic techniques.** *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2006; (60):113-128.
- Majewski P.M., Thurston R.D., Ramalingam R., Kiela P.R., Ghishan F.K. **Cooperative role of NF- κ B and Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in the TNF-induced inhibition of PheX expression in osteoblasts.** *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(45):34828-38.
- Markiewicz Z. **Struktura i funkcja osłon bakteryjnych.** PWN, Warszawa 1993.
- Matthew S. Hayden and Sankar Ghosh. **Signaling to NF- κ B.** *Genes & Development*. 2004; (18):2195-2224.
- Natoli G. **Specialized Chromatin Patterns in the Control of Inflammatory Gene Expression.** *NF- κ B in Health and Disease*. 2010.
- Netea M., Deuren M., Kullber B., Cavillon J., Meer J. **Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?.** *Trends in Immunology*. 2002; 23(3):135-9.
- Palladino M., Bahjat F., Theodorakis E., Moldawer L. **Anti-TNF- α therapies: the next generation.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2. 2003; 736-746.
- Paulitschke V., Gerner C., Hofstatter E., Mohr T., Mayer R. L., Pehamberger H., Kunstfeld R. **Proteome profiling of keratinocytes transforming to malignancy.** *Electrophoresis*. 2015; (36)4: 564-576.
- Piotrowska A., Iżykowska I., Podhorska-Okołów M., Zabel M., Dziegiel P. **Budowa białek z rodziny NF- κ B i ich rola w procesie apoptozy.** *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2008.
- Plantinga T. S., Maren W., Bergenhenegouwen J., Hameetman M., Nierkens S., Jacobs C., Jong D., Joosten L., Land B., Garssen J., Adema G., Netea M. **Differential Toll-Like Receptor Recognition and Induction of Cytokine Profile by Bifidobacterium breve and Lactobacillus Strains of Probiotics.** *Clinical and Vaccine Immunology* 2011; (18):4,621-628.
- Ren D., Li C., Qin Y., Yin R., Du S., Ye F., Liu H., Wang M., Sun Y., Li X., Tian M., Jin N. **Lactobacilli Reduce Chemokine IL-8 Production in Response to TNF- α and Salmonella Challenge of Caco-2 Cells.** *BioMed Research International*. 2013.
- Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Lo'pez-Oliva E, et al. **Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis.** *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011; (55):12,1895-1899.
- Rodríguez-Ramiro I, Ramos S., Lo'pez-Oliva E., Agis-Torres A., Bravo L., Goya L., Angeles Martí'n M. **Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF- α -stimulated Caco-2 cells.** *British Journal of Nutrition*. 2013; 110(2):206-15.

Sanjay L. Dholakiya, Kenza E. **Protective effect of diosmin on LPS-induced apoptosis in PC12 cells and inhibition of TNF-α expression.** *Toxicology in Vitro.* 2011; 25(5):1039-44.

Summers C. M., Hammons A. L., Arora J., Zhang S., Jochems J., Blair I. A., Whitehead A. S. **Methotrexate modulates folate phenotype and inflammatory profile in EA. hy 926 cells.** *European Journal of Pharmacology.* 2013; 732(2014):60-67.

Szołtysek K., Janus P., Widlak P. **Komórkowa ścieżka sygnałowa zależna od czynnika transkrypcyjnego NF-κB i jej współzależności ze szlakami p53 i HSF1.** *Postępy Biologii Komórki.* 2011; 38:159-175.

Xu X., Yin P., Wan C., Chong X., Liu M., Cheng P., Chen J., Liu F., Xu J. **Punicalagin Inhibits Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages via the Suppression of TLR4-Mediated MAPKs and NF-κB Activation.** *Inflammation.* 2014; (37):3, 956-965.

Xueling L., Min Zhu, Brasier A., Kudlicki A. **Inferring Genome-Wide Functional Modulatory Network: A Case Study on NF-κB/RelA Transcription Factor.** *Journal Of Computational Biology.* 2015; 22(4):300-312.

Youakim A., Ahdieh M. **Interferon-γ decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin.** *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology.* 1999; (276):5.

Zhou Y., Wang G. F., Yang L., Liu F., Kang J. Q., Wang R. L., Gu W., Wang C. Y. **Treatment with 1,25(OH)2D3 induced HDAC2 expression and reduced NF-κB p65 expression in a rat model of OVA-induced asthma.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2015; 00(00): 1-11.

Rola egzosomów wydzielanych przez mezenchymalne komórki macierzyste w interakcjach międzykomórkowych

Agnieszka Prusek*, Bartosz Sikora, Aleksandra Skubis, Urszula Mazurek
Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem
Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Autor korespondencyjny: agna96@vp.pl, Katedra Biologii Molekularnej, Zakład
Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z OML, SUM w Katowicach,
ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

Streszczenie

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, mesenchymal stem cells) są jednym z rodzajów somatycznych komórek macierzystych, które charakteryzują się zdolnością do samoodnowy i nieograniczonych podziałów. Wykazują one właściwości multipotentne, czyli różnicują się w kierunku komórek pochodzących z jednego listka zarodkowego. Jednakże komórki macierzyste oprócz możliwości różnicowania się w różne typy komórek wykazują właściwości parakryne. Wydzielają one czynniki, które odgrywają istotną rolę w reakcji przeciwzapalnej, immunomodulacji, angiogenezie, mitogenezie i apoptozie. Stąd też potencjalnie można wykorzystywać je m.in. w regeneracji uszkodzonych tkanek np. w okulistyce poprzez promowanie angiogenezy lub też hamowanie stanu zapalnego występującego w wielu stanach patologicznych. Czynniki wydzielane przez mezenchymalne komórki macierzyste mogą także wpływać na dyferencjację innych komórek macierzystych.

Komunikacja między komórkami jest możliwa m.in. dzięki egzosomom, które są także wydzielane przez komórki macierzyste. Egzosomy są to pozakomórkowe pęcherzyki (EV, extracellular vesicles) zdolne do przenoszenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych (fragmenty DNA, mRNA, miRNA), co istotnie wpływa na funkcje innych komórek wspomagając procesy fizjologiczne. Ich wielkość waha się od 40 do 100 nm. Ponadto posiadają charakterystyczne markery powierzchniowe m.in. CD9, CD63, CD81 i flotilinę-1. Niestety istnieje również ryzyko stymulacji stanów patologicznych poprzez egzosomy np. nadmiernej proliferacji lub działania immunogennego. Komórki produkują egzosomy o różnym składzie w zależności od warunków fizjologicznych oraz typu komórek.

Zakres pracy obejmuje przegląd literatury dotyczący parakrynych właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji egzosomów.

Abstract

Mesenchymal stem cells are one of somatic stem cells that are characterized by ability to self-renewal and endless divisions. They exhibit multipotent properties, i.e. differentiate towards cells that came from a single germ layer. However, stem cells have paracrine properties in addition to being able to differentiate into different cell types. They release factors that play an important role in the anti-inflammatory reaction, immunomodulation, angiogenesis, mitogenesis and apoptosis. Therefore, they can be potentially used in the regeneration of damaged tissues, e.g. in ophthalmology, by promoting angiogenesis or by inhibiting the inflammation that occurs in many pathological states. Factors that are released by mesenchymal stem cells may also affect differentiation of other stem cells.

Communication between cells is possible among others because of exosomes released by stem cells. Exosomes are extracellular vehicles (EVs) capable of transferring proteins, lipids and nucleic acids (fragments of DNA, mRNA, miRNA) which significantly affect the functions of other cells supporting the physiological processes. Their size ranges from 40 to 100 nm. In addition, they have characteristic surface markers, including CD9, CD63, CD81 and flotilin-1. Unfortunately, there is also a risk of stimulation of pathological conditions, e.g. by unwanted proliferation or immunogenic effects. Cells produce exosomes of different composition depending on physiological conditions and cell type.

The scope of this work includes a review of the literature on the paracrine properties of mesenchymal stem cells, with particular emphasis on the function of exosomes.

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC)

Mezenchymalne komórki macierzyste są jednym z rodzajów somatycznych komórek macierzystych, które mają zdolność do samoodnowy i różnicowania się w komórki tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej (Skubis, Gola et al. 2017; Skubis, Sikora et al. 2016). Migracja komórek przez naczynia krwionośne pozwala na doprowadzenie ich do miejsca uszkodzenia umożliwiając jego naprawę. Mezenchymalne komórki macierzyste są często wykorzystywane w badaniach dotyczących medycyny regeneracyjnej ze względu na łatwą dostępność, hodowlę i izolację z tkanki tłuszczowej, szpiku kostnego oraz krwi (Dominici, Le Blanc et al. 2006; Pistoia, Raffaghello 2017).

Identyfikację komórek umożliwiają markery komórkowe. W przypadku mezenchymalnych komórek macierzystych są to CD73, CD90, CD105. MSC charakteryzują się też brakiem ekspresji CD45, CD34, CD14 i HLA-DR, czyli ludzkich antygenów leukocytarnych (human leukocyte antigens), należących do głównego układu zgodności tkankowej (MHC) (Bollini 2013; Damnipolou, Rodin et al. 2016; Dominici, Le Blanc et al. 2006; Lavoie, Rosu-Myles 2013). Różnicowanie i zdolność do samoodnowy są możliwe dzięki oddziaływaniu komórek macierzystych w niszy ze składnikami jej mikrośrodowiska, która tworzy się w wielu narządach np. nisza komórek macierzystych w rąbku rogówki (Mielczarek-Palacz, Kubina et al. 2007). Na prawidłowe funkcjonowanie niszy wpływa jej odżywienie poprzez naczynia krwionośne dostarczające tlen oraz skład niszy m.in białka strukturalne: fibronektyna, laminina, wimentyna, kolagen i czynniki troficzne wydzielane przez komórki otoczone macierzą pozakomórkową (ECM) (Bużańska, Zychowicz et al. 2013; Ramaswamy, Lim et al. 2016). Komórki są uwalniane z niszy na skutek stresu organizmu wywołanego np. zawałem mięśnia sercowego lub działaniem toksyn (Kawiak, 2009). Mezenchymalne komórki macierzyste mają również wpływ na dyferencjację innych komórek zmieniając profil ekspresji markerów komórkowych (Galiando, Hreras et al. 2017).

Właściwości MSC

Immunomodulacja

Wpływ mezenchymalnych komórek macierzystych na układ odpornościowy może zachodzić poprzez kontakt komórka-komórka, pobudzenie limfocytów Treg regulujących układ odpornościowy oraz produkcję cząsteczek hamujących układ immunologiczny (Lavoie, Rosu-Myles 2013). Cząsteczkami tymi mogą być cytokiny prozapalne i przeciwzapalne, które wpływają na działanie komórek układu immunologicznego, ale także zwiększają migrację MSC. Istnieją również cytokiny nazywane chemokinami np. chemokina wiążąca receptor CXCR2 (np. IL-8), które pozwalają nie tylko na hamowanie reakcji immunologicznej, ale najnowsze badania donoszą również o przywracaniu odporności poprzez stymulację komórek odpornościowych. (Lunyak, Amaro-Ortiz et al. 2017). Mezenchymalne komórki macierzyste mogą także hamować proliferację i funkcje limfocytów T poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 (Kim, Jang et al. 2018). Jednym ze źródeł mezenchymalnych komórek macierzystych jest tkanka tłuszczowa stanowiąca rezerwuar komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (ADSC),

które są często wykorzystywane do badań ze względu na ich właściwości. ADSC stanowią nie tylko bogate źródło komórek, ale także metoda ich pobrania (poprzez lipoaspirację) jest mało inwazyjna (Skubis, Gola et al. 2017). Wybór izolacji z tej właśnie tkanki jest uzasadniony dużą dostępnością materiału, a także możliwością pozyskania go do przeszczepów autologicznych, których ryzyko odrzucenia jest mniejsze w porównaniu do przeszczepów allogenicznych. (Galiando, Hreras et al. 2017). Wystąpienie po przeszczepie choroby przeciwko gospodarzowi (GVHD) jest zmniejszone przez brak HLA-DR, co powoduje nasilenie immunosupresji i zwiększa potencjał wykorzystania MSC w leczeniu uszkodzonych tkanek (Lavoie, Rosu-Myles 2013).

Aktywność parakryнна

Zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej jest możliwe poprzez ich zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej, a także wydzielania białek prozapalnych i przeciwzapalnych oraz czynników wzrostu. Badania potwierdzające parakryнный wpływ MSC polegają m. in. na zastosowaniu medium kondycjonowanego (CM – ang. *conditioned medium*) zawierającego substancje wydzielone przez MSC, które mają istotny wpływ na procesy zachodzące w organizmie. Stanowi to możliwość zastąpienia terapii polegającej na wprowadzeniu mezenchymalnych komórek macierzystych, która wiąże się z ryzykiem wystąpienia wielu niepożądanych skutków tj. różnicowanie komórek w komórki nieprawidłowe lub odrzucenie przeszczepu (van Koppen, Joles et al. 2012; Waszak, Alphonse et al. 2012; Du, Wei et al. 2013; Timeers, Lim et al. 2007). Z tych powodów wykorzystanie medium kondycjonowanego zamiast bezpośredniego zastosowania komórek macierzystych jest korzystniejsze ze względu na zmniejszenie ryzyka związanego z obecnością komórek (Aboulkheir, El Tanawy et al. 2016).

Sekretom MSC

Czynniki wzrostu

Mezenchymalne komórki macierzyste biorą udział w procesie naprawy uszkodzonych tkanek poprzez zastępowanie uszkodzonych i martwych komórek. Jest to związane z ich zdolnością do różnicowania oraz wydzielaniem czynników wzrostu (Liu, 2012). Czynniki mitotyczne także pełnią istotną rolę w regeneracji uszkodzonych tkanek i zwiększaniu ilości naczyń krwionośnych. Wzrost tkanek zachodzi dzięki podziałom mitotycznym, które są stymulowane przez cytokiny tj. TGF- α (transformujący czynnik wzrostu alfa), TGF- β 1 (transformujący czynnik wzrostu beta 1) i anty-apoptyczne białka np. STC-1 (stanniocalcyna-1), SFRP2 (secreted frizzled related protein) (Olkowska-Truchanowicz, 2009; Szala, Wiśniewska et al. 2014). Czynniki HGF (*czynnik wzrostu hepatocytów*) i TGF- β 1 oraz VEGF (czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego) pełnią również istotną rolę w zapobieganiu degradacji komórek apoptycznych poprzez odwrócenie apoptozy komórek śródbłónka powstałej na skutek niedotlenienia (Murphy, Moncivais et al. 2013). Promowanie angiogenezy stymulowane jest przez wiele czynników wzrostu np. VEGF, FGF (*czynnik wzrostu fibroblastów*), TGF- β 1 oraz innym molekułom tj. angiotensynie II, która jest hormonem peptydowym pełniącym ważną rolę

w układzie RAA (układ renina-angiotensyna-aldosteron). VEGF jest najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za rozrost naczyń krwionośnych. Razem z TGF- β 1 utrzymuje prawidłowy stan komórek po regeneracji poprzez ich ochronę (Olkowska-Truchanowicz, 2009). Zwiększenie liczby naczyń krwionośnych jest istotne przede wszystkim w chorobach układu krwionośnego np. w zawałe serca. Mezenchymalne komórki macierzyste przyczyniają się do przeżycia niedotlenionych komórek serca po zawałe poprzez rozrost naczyń krwionośnych dostarczających tlen. Komórki te zmniejszają również włóknienie i obszar zawału, a także wpływają na intensywność pracy serca. Doniesienia wskazują na lepsze efekty terapeutyczne zastosowania mezenchymalnych komórek macierzystych traktowanych angiotensyną II, niż komórek nie poddanych działaniu tej substancji (Liu, Fan et al. 2015). Dostarczenie dużej ilości tlenu ma też znaczenie przy niewydolności innych narządów, gdyż często są one spowodowane ich niedokrwieniem. Wzrost naczyń krwionośnych odpowiada nie tylko za dostarczenie tlenu, ale także odprowadzenie zbędnych produktów przemiany materii oraz nadmiaru jonów wodorowych, które stwarzają środowisko kwasowe i mogą prowadzić do martwicy komórek.

Czynniki wzrostu promujące angiogenezę w celach leczniczych mogą również niekorzystnie wpływać na procesy zachodzące w organizmie. Rozrost naczyń krwionośnych odżywia komórki prawidłowe, ale także nowotworowe powodując progresję nowotworu poprzez zwiększenie guzów, co pogarsza stan chorego. Badania wykazały, że mezenchymalne komórki macierzyste oprócz wydzielania VEGF, FGF i TGF- β 1 wydzielają również interleukinę 8 (IL-8), która tak jak pozostałe czynniki stymuluje wzrost naczyń krwionośnych (Wang, Wang et al. 2015).

Cytokiny przeciwzapalne

Stan zapalny jest reakcją organizmu na czynniki zapoczątkowujące kaskadę reakcji prowadzących w skrajnych przypadkach do wstrząsu septycznego. Przykładem silnego czynnika aktywującego makrofagi jest LPS (lipopolisacharyd) powodujący stan zapalny poprzez łączenie się z białkami wiążącymi LPS (LBP – ang. *lipopolisaccharide binding proteins*). Duża ilość mediatorów pierwotnych zapalenia zwiększa intensywność kaskady zapalnej i pobudza układ dopełniacza, układ krzepnięcia, wytwarzanie prostaglandyn tj. PGI, PGE, PGF, peptydów wazoaktywnych, metabolitów kwasu arachidonowego oraz innych cytokin tj. IL-6, IL-2, IL-8 (Karpel, 2001; Martich, Boujoukos et al. 1993). Mezenchymalne komórki macierzyste mają istotny wpływ na łagodzenie reakcji zapalnej w organizmie, ponieważ w odpowiedzi na cząsteczki zapalne wydzielają czynniki przeciwzapalne np. interleukinę 10 (IL-10). IL-10 działa bezpośrednio na makrofagi i hamuje wytworzenie cytokin prozapalnych takich jak IL-1 i TNF- α (Lavoie, Rosu-Myles 2013; Murphy, Moncivais et al. 2013). Przewaga cytokin przeciwzapalnych hamuje reakcję zapalną. Najnowsze badania wskazują iż komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej wykazują bardziej nasilone właściwości przeciwzapalne i immunomodulujące w porównaniu do komórek macierzystych pochodzących z innych tkanek oraz zwiększoną migrację do tkanek objętych stanem zapalnym. (Galiando, Hreras et al. 2017).

Egzosomy – budowa i funkcje

Egzosomy to najliczniejsza grupa pozakomórkowych pęcherzyków (EV – *extra-cellular vesicles*) o wielkości 40 nm-100 nm wydzielanych przez różne typy komórek m.in. komórki macierzyste (Rani, Ryan et al. 2015; Wójtowicz, Baj-Krzyworzeka et al. 2014). Proces powstawania egzosomów rozpoczyna się od wpuklenia błony komórkowej do środka komórki. Wytworzone zostaje ciało wielopęcherzykowe (MVB-multivesicular body), którego fuzja pozwala na uwolnienie egzosomów w procesie egzocytozy na zewnątrz komórki (Shafei, Ali et al. 2017; Wójtowicz, Baj-Krzyworzeka et al. 2014). W uwalnianiu egzosomów biorą udział białka tj. SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), białka z rodziny Rab: Rab11, Rab27a i b, Rab35 oraz ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Wójtowicz, Baj-Krzyworzeka et al. 2014). Egzosomy pełnią istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej – są nośnikami białka, mRNA i miRNA przez co mają wpływ na funkcjonowanie innych komórek uczestnicząc w ich immunomodulacji, starzeniu i proliferacji. Skład biochemiczny egzosomów zależy od właściwości i rodzaju komórek z których pochodzą. Wzrost liczby egzosomów w organizmie występuje często podczas stanów patologicznych tj. choroby nowotworowej lub niedokrwienia narządu (Samanta, Rajasingh et al. 2017; Wójtowicz, Baj-Krzyworzeka et al. 2014). Egzosomy mają charakterystyczne markery tj. CD9, CD63, CD81 i flotilina-1 (De Jong, Van Balkom et al. 2014; Wójtowicz, Baj-Krzyworzeka et al. 2014). Pozostałe białka wchodzące w skład egzosomów to cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej MHC (major histocompatibility complex), białka ochronne, apoptyczne tj. AIP-1/Alix, ALG-2, TPxII, antyapoptyczne np. galaktyna 3 oraz białka cytoszkieletu- tubulina, aktyna i in. (Wójtowicz, Baj-Krzyworzeka et al. 2014).

Egzosomy mezenchymalnych komórek macierzystych

Skład i właściwości egzosomów zależą od komórek, z których one pochodzą. Zastosowanie w badaniach egzosomów mezenchymalnych komórek macierzystych wykazuje przeważnie lepsze efekty niż zastosowanie egzosomów pochodzących z innego rodzaju komórek. Przykładem może być porównanie działania egzosomów pochodzących z fibroblastów do działania egzosomów mezenchymalnych komórek macierzystych w leczeniu uszkodzenia wątroby. Egzosomy MSC wspomagają jej regenerację w odróżnieniu od egzosomów pochodzących z fibroblastów, które nie wykazały poprawy stanu wątroby. W doświadczeniu tym badano również zależność efektów regeneracyjnych wątroby od ilości wprowadzenia egzosomów metodą iniekcji (Tamura, Uemoto et al. 2016). Wykazano wyższy poziom czynników wzrostu tj. TGF, HGF i limfocytów Treg oraz zmniejszony poziom prozapalnej cytokiny IL-2 w grupach, gdzie zastosowano trzy wstrzyknięcia w porównaniu do grup, które otrzymały jedno (Tamura, Uemoto et al. 2016).

Xue i in. (2018) przeprowadzili badania, które dotyczyły promowania angiogenezy przez egzosomy mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej, które podzielono na dwie grupy. Jedną z nich stanowiła grupa pochodząca z niedotlenionych komórek (H-MSC), a drugą grupa z komórek o normalnych warunkach tlenowych (N-MSC). Porównanie obu tych grup wykazało

bardziej nasilone działanie proangiogenne egzosomów pochodzących z grupy H-MSC. Objawiało się to zwiększoną ekspresją genów *Angpt1* i *Flk1* stymulujących ten proces, zwiększoną ekspresją *VEGF* oraz zmniejszeniem ekspresji *Vash1*, który hamuje powstawanie naczyń krwionośnych (Xue, Shen et al. 2018). Wyniki te wskazują, że na nasilenie działania egzosomów mają wpływ również warunki, w jakich znajdują się komórki z których pochodzą. Przeważnie w warunkach niedotlenienia obserwuje się lepsze właściwości promujące angiogenezę.

Zhu i in. (2017) opublikowali kolejny przykład badań, który również potwierdza proangiogeny wpływ egzosomów MSC pochodzących z tkanki tłuszczowej. W składzie egzosomów wykryto miRNA tj. *miR-126*, *miR-130a* oraz *miR-132*, które były odpowiedzialne za powstawanie naczyń krwionośnych (Zhu, Huang et al. 2017).

Regulacja procesów fizjologicznych

Egzosomy pełnią istotną rolę w proliferacji, immunomodulacji, angiogenezie i zapaleniu. Proliferacja jest istotna w regeneracji narządów po uszkodzeniach i przebytych chorobach. Egzosomy w zależności od pochodzenia mają różne mechanizmy indukowania proliferacji. Przykładem mogą być egzosomy hepatocytów, które poprzez transport ceramidazy i kinazy sfingozyny 2 (*SK2*) powodują zwiększoną syntezę sfingozyno-1-fosforanu (*S1P*) w hepatocytach. Skutkiem tego jest zwiększona liczba komórek prowadząca do regeneracji wątroby (Nojima, Freeman et al. 2016). Narządy mogą być również narażone na niedokrwienie, co skutkuje brakiem dostarczenia wystarczającej ilości tlenu i obumieraniem tkanek. Zwiększenie liczby naczyń krwionośnych może zmniejszać objawy niedokrwienia. Dotychczas stosowano terapie genowe i terapie komórkami macierzystymi, które są zdolne do promowania angiogenezy, jednak w tych terapiach efekty nie utrzymywały się wystarczająco długo, dlatego zapoczątkowano badania wykorzystujące egzosomy wydzielane przez komórki (Manuel, Johnson et al. 2017). Natomiast najnowsze badania dotyczące właściwości immunomodulujących i przeciwzapalnych egzosomów pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych donoszą o słabszym działaniu egzosomów w porównaniu do zastosowania bezpośredniego komórek (Du, Zhuansun et al. 2017). W badaniach tych porównano działanie mezenchymalnych komórek macierzystych i egzosomów. Wykazano, że obie grupy biorą udział w wydzielaniu cytokin przeciwzapalnych tj. *IL-10*, *TGF-β1* i różnicowaniu limfocytów Treg regulujących odpowiedź immunologiczną. Zarówno badania dotyczące uwalniania cytokin jak i wpływu na różnicowanie limfocytów Treg wskazują na słabszą aktywność egzosomów (Du, Zhuansun et al. 2017). Oprócz cytokin przeciwzapalnych, na regulację stanu zapalnego ma wpływ *miR-146a*. Jest to cząsteczka miRNA przenoszona m.in. przez egzosomy komórek dendrytycznych, która bierze udział w regulacji ekspresji genów oraz pośredniczy w represji genu docelowego łagodząc reakcję zapalną. (Alexander, Hu et al. 2015).

Patologiczne oddziaływanie egzosomów

Egzosomy mogą wspomagać niekorzystne procesy zachodzące w organizmie. Ich główną rolą jest transport substancji pomiędzy komórkami, który w zależności od zawartych molekuł może brać udział w regeneracji lub mieć działanie szkodliwe. Czynniki, które mogą być niekorzystne dla organizmu są patogeny np. białka

wirusowe, które znajdują się w egzosomach pochodzących z komórek zakażonych wirusem (He, Zheng et al. 2018). Egzosomy oprócz łagodzącego wpływu na stan zapalny mogą także wspomagać ten proces. Stymulacja ta związana jest z cytokinami prozapalnymi i mikroRNA (miR-155) (Li, Wang et al. 2018).

Onkosomy

Egzosomy poprzez transport i wydzielanie czynników promujących angiogenezę np. czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) mogą wpływać na rozwój nowotworu powodując rozrost naczyń krwionośnych ułatwiający tworzenie przerzutów i powiększenie guza (Choi, Lee et al. 2017). Głównym tematem badań dotyczącym procesów patologicznych są egzosomy nowotworowe, czyli onkosomy. Mają one niekorzystny wpływ na organizm w różnych aspektach np. osłabiają działanie układu immunologicznego poprzez dostarczanie sygnałów do komórek odpornościowych, co skutkuje tolerowaniem komórek nowotworowych przez układ immunologiczny (He, Zheng et al. 2018).

Onkosomy zawierają markery komórek nowotworowych co daje możliwości wykorzystania ich w przyszłości w diagnostyce, rokowaniu oraz znalezieniu nowych metod leczenia chorych z zastosowaniem terapii celowanej (Wójtowicz, Baj-Krzyworzeka et al. 2014). Onkosomy posiadają onkogeny kodujące białka, onkoproteiny i onkogenny miRNA. Przyczyniają się do zezłośliwienia komórek transportując białka i kwasy nukleinowe z aktywnością supresora nowotworu np. miR-1. Badania wykazują również różnice między egzosomami wydzielanymi przez komórki nowotworowe, a egzosomami komórek prawidłowych. Onkosomy wykazują zmiany dotyczące uwalniania, wychwytu i aktywności tj. zwiększona ilość wytwarzanych egzosomów oraz zwiększenie białek w ich składzie (Choi, Lee et al. 2017). Udział onkosomów w tworzeniu przerzutów polega na zwiększeniu adhezji komórek raka do śródbłonna. Badania dowodzą, że onkosomy powodują oporność komórek nowotworowych na leki (Wójtowicz, Baj-Krzyworzeka et al. 2014).

Jednostki chorobowe o podłożu egzosomalnym

Najnowsze badania wskazują na istotną rolę egzosomów w powstawaniu chorób serca, chorobie Parkinsona czy rozprzestrzenianiu się wirusów.

Egzosomy odpowiadają za wzrost przepuszczalności naczyń prowadzący do dysfunkcji wielu narządów np. serca. Badania w tym zakresie były prowadzone na egzosomach pobranych od myszy chorujących na sepsę. Egzosomy zawierały wyższe reaktywne formy tlenu, czyli atomy tlenu z niesparowanym elektronem charakteryzujące się wysoką reaktywnością, których nadmierna ilość powoduje stres oksydacyjny, objawiający się m.in. zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych. Zjawisku temu sprzyjały gromadzące się skupiska podosomów-struktur odpowiedzialnych za adhezję i migrację komórek- powodując przeciekanie naczyń (Mu, Wang et al. 2017).

Przeprowadzono również badania odnoszące się do roli egzosomów w chorobie Parkinsona, które donoszą o rozprzestrzenianiu się toksycznej α -synukleiny przez egzosomy. Zwiększona ilość α -synukleiny prowadzi do stresu oksydacyjnego powodowanego jej akumulacją prowadząc do choroby Parkinsona, która dotyczy ośrodkowego układu nerwowego i objawia się głównie drżeniem oraz spowol-

nieniem ruchowym. Patomechanizm polega na nasilonym gromadzeniu się α -synukleiny przy pomocy 4-hydroksynonenal (HNE), czyli produktu peroksydacji lipidów, który indukuje transport cytotoksycznej formy α -synukleiny za pomocą egzosomów. Komunikacja między komórkami poprzez pęcherzyki powoduje degenerację zdrowych neuronów i prowadzi do rozprzestrzeniania procesu neurodegeneracyjnego (Zhang, Eitan et al. 2018).

Egzosomy komórek zakażonych wirusem mogą przenosić białka, mRNA, miRNA i oddziaływać na komórki biorecy. Przykładowo w wirusie Ebola białkiem tym jest VP40, które może zmniejszać żywotność komórek odpornościowych biorecy poprzez ich apoptozę. Osłabienie układu odpornościowego biorecy sprzyja replikacji wirusa w zainfekowanych komórkach i może skutkować pojawieniem się choroby EBOV (Pleet, DeMarino et al. 2017).

Wnioski

Rola egzosomów w interakcjach międzykomórkowych zależy od wielu czynników m.in. składu. Głównie są to białka apoptyczne, antyapoptyczne, cytokiny prozapalne i przeciwzapalne oraz miRNA, które wpływają na charakter procesu wspomaganego przez pęcherzyki.

Właściwości egzosomów są podobne do aktywności wykazywanych przez komórki, z których pochodzą. Zależności te są widoczne w porównaniu mezenchymalnych komórek macierzystych i ich egzosomów, które biorą udział w immunomodulacji, angiogenezie oraz łagodzeniu stanu zapalnego.

Istotny wpływ na nasilenie działania egzosomów mają również warunki, którym poddawane są komórki. Badania dotyczące wykorzystania egzosomów mezenchymalnych komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej mogą w przyszłości posłużyć jako innowacyjne terapie zastępujące bezpośrednie wykorzystanie komórek macierzystych.

Literatura

- Aboukheir M. , ElTantawy D. , Saad M. , Abdelrahman K. , Sobh M. , Lotfy A. , Sobh M. **Mesenchymal stem cells versus their conditioned medium in the treatment of cisplatin-induced acute kidney injury: evaluation of efficacy and cellular side effects.** International Journal of Clinical and Experimental Medicine. 2016;9 (12):23222-34.
- Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmachova T, Seabra M.C. , Round J.L. , Ward D.M. , O'Connel R.M. **Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin.** Nat Communications. 2015;6.
- Bollini S. **The regenerative role of the fetal and adult stem cell secretome.** Journal of Clinical Medicine. 2013;2(4):302-27.
- Bużańska L. , Zychowicz M. , Sarnowska A. , Domańska-Janik K. **Bioinżynieria niszy neutralnych komórek macierzystych.** Postępy Biochemii. 2013;2(59).
- Choi D. , Lee T.H. , Spinelli C. , Chennakrishnaiah S. , D'Asti E. , Rak J. **Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation.** Seminars in Cell and Developmental Biology. 2017;1084-9521.
- Damdimopoulou P. , Rodin S. , Stenfelt S. , Antonsson L. , Tryggvason K. , Hovatta O. **Human embryonic stem cells.** Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2016;31:2-12.
- De Jong O.G. , Van Balkom B.W. , Schiffelers R.M. , Bouten C.V.C. , Verhaar M.C. **Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine.** Frontiers in Immunology. 2014;5.
- Dominici M. , Le Blanc K. , Mueller I. , Slaper-Cortenbach I. , Marini F. , Krause D. , Deans R. , Keating A. , Prockop D.J. , Horwitz E. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal**

stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 2006;8(4):315-7.

Du Y.M. , Zhuansun Y.X. , Chen R. , Lin L. , Lin Y. , Li J.G. **Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma.** *Experimental Cell Research*. 2017;363(1):114-20.

Du Z. , Wei C. , Cheng K. , Han B. , Yan J. , Zhang M. , Peng C. , Liu Y. **Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation.** *Journal of Surgical Research*. 2013

Galiando S. , Hreras J. , López-Paniagua M. , Rey E. , de la Mata A. , Plata-Cordero M. , Calonge M. , Nieto-Miguel T. **Therapeutic Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Corneal Failure Due to Limbal Stem Cell Niche Damage.** *Stem Cells*. 2017;35(10):2160–74.

He C. , Zheng S. , Luo Y. , Wang B. **Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine.** *Theranostics*. 2018;8(1):237-55.

Karpel E. **Mediatory ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej – znaczenie w praktyce klinicznej intensywnej terapii.** *Borgis - Anestezjologia i Intensywna Terapija*. 2001;3:181-90.

Kawiak J. **Komórki macierzyste organizmu dorosłego w biologii i medycynie.** *Postępy biologii komórki*. 2009;36(25):99-110.

Kim D.S. , Jang I.K. , Lee M.W. , Ko Y.J. , Lee D.H. , Lee J.W. , Sung K.W. , Koo H.H. , Yoo K.H. **Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ .** *EBioMedicine*. 2018; 28; 261-273

Lavoie J.R. , Rosu-Myles M. **Uncovering the secreted of mesenchymal stem cells.** *Biochimie*. 2013;95(12):2212-2221.

Li J.J. , Wang B. , Kodali M.C. , Chen C. , Kim E. , Patters B.J. , Lan L. , Kumar S. , Wang X. , Yue J. , Liao F.F. **In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation.** *Journal of Neuroinflammation*. 2018;15(1).

Liu C. , Fan Y. , Zhou L. , Zhu H. , Song Y. , Hu L. , Wang Y. , Li QP. **Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin II enhances paracrine effects, angiogenesis, gap junction formation and therapeutic efficacy for myocardial infarction.** *International Journal of Cardiology*. 2015;188:22-32.

Liu W. **Cardiac differentiation and electrophysiology characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells.** *Chinese Medical Journal*. 2012;125(18):3318-24.

Lunyak V.V. , Amaro-Ortiz A. , Gaur M. **Mesenchymal Stem Cells Secretory Responses: Senescence Messaging Secretome and Immunomodulation Perspective.** *Frontiers in Genetics*. 2017; 8.

Manuel G.E. , Johnson T. , Liu D. **Therapeutic angiogenesis of exosomes for ischemic stroke.** *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. 2017;9(6):188-191.

Martich G. , Boujoukos A. , Suffredini A. **Response of man to endotoxin.** *Immunobiology*. 1993;187(3-5):403-16.

Murphy M.B. , Moncivais K. , Caplan A.I. **Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine.** *Experimental & Molecular Medicine*. 2013;45(11).

Mielczarek-Palacz A. , Kubina R. , Kondera-Anasz Z. , Sikora J. **Komórki macierzyste – rodzaje i właściwości.** *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy*. 2007;10.

Mu X. , Wang X. , Huang W. , Wang R.T. , Essandoh K. , Li Y. , Pugh A.M. , Peng J. , Deng S. , Wang Y. , Caldwell C.C. , Peng T. , Yu K.J. , Fan G.C. **Circulating Exosomes Isolated from Septic Mice Induce Cardiovascular Hyperpermeability Through Promoting Podosome Cluster Formation.** *Shock*. 2017;

Nojima H. , Freeman C.M. , Schuster R.M. , Japtok L. , Kleuser B. , Edwards M.J. , Gulbins E. , Lentsch A.B. **Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate.** *Journal of Hepatology*. 2016;64:60-8.

- Olkowska-Truchanowicz J. **Differentiation of adipose tissue-derived stem cells-novel possibilities for tissue engineering and cel-based therapy.** *Postępy Biologii Komórki.* 2009;36(2):217-31.
- Pistoia V. , Raffaghello L. **Mesenchymal stromal cells and autoimmunity.** *International Immunology.* 2017; 29(2); 49-58.
- Pleet M.L. , DeMarino C. , Lepene B. , Aman M.J. , Kashanchi F. **The Role of Exosomal VP40 in Ebola Virus Disease.** *DNA and Cell Biology.* 2017;36(4):243-8.
- Ramaswamy Y. , Lim K.S. , Hala Zreiqat, Zufu Lu. **Stem Cells for Bone Regeneration: Role of Trophic Factors.** *INTECH.* 2016;15:357-74.
- Rani S. , Ryan A.E. , Griffin M.D. , Ritter T. **Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles: Towards cell-free therapeutic applications.** *Molecular Therapy.* 2015;23(5).
- Samanta S. , Rajasingh S. , Drosos N. , Zhou Z. , Dawn B. , Rajasingh J. **Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment.** *Acta Pharmacologica Sinica.* 2017
- Shafei A.E.S. , Ali M.A. , Ghanem H.G. , Shehata A.I. , Abdelgawad, Handal H.R. , Talaat K.A. Ashaal A.E. , El-Shal A.S. **Mesenchymal stem cells therapy: a promising cell based therapy for treatment of myocardial infraction.** *The Journal of Gene Medicine.* 2017;19(12).
- Skubis A. , Gola J. , Sikora B. , Hybiak J. , Paul-Samojedny M. , Mazurek U. , Łos M.J. **Impact of Antibiotics on the Proliferation and Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;18(12).
- Skubis A. , Sikora B. , Zmarzły N. , Wojdas E. , Mazurek U. **Adipose-derived stem cells: a review of osteogenesis differentiation.** *Folia Biologica et Oecologica.* 2016;(12):38-47.
- Szala S. , Wiśniewska E. , Matuszczak S. , Czapla J. **Mesenchymal Stromal Cells.** *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2014;68:1287-98.
- Tamura R. , Uemoto S. , Tabata Y. **Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on a concanavalin A-induced liver injury model.** *Inflammation and Regeneration.* 2016;36(26).
- Timmers L. , Lim S.K. , Arslan F. , Armstrong J.S. , Hoefler I.E. , Doevendans P.A. , Piek J.J. , El Oakley R.M. , Choo A. , C.N. Lee. **Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium.** *Stem Cell Research.* 2007;1:129-37.
- van Koppen A. , Joles J.A. , van Balkom B.W. , Lim S.K. , de Kleijn D. , Giles R.H. , Verhaar M.C. **Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease.** *PLoS One.* 2012;7.
- Wang J. , Wang Y. , Wang S. , Cai J. , Shi J. , Sui X. , Cao Y. , Huang W. , Chen X. , Cai Z. , Li H. , A. Sameer A. Bardeesi, Zhang B. , Liu M. , Song W. , Wang M. , Xiang A.P. **Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer.** *Oncotarget.* 2015;6:42825-37.
- Waszak P. , Alphonse R. , Vadivel A. , Ionescu L. , Eaton F. , Thebaud B. **Preconditioning enhances the paracrine effect of mesenchymal stem cells in preventing oxygen-induced neonatal lung injury in rats.** *Stem Cells and Development.* 2012
- Wójtowicz A. , Baj-Krzyworzeka M. , Baran J. **Charakterystyka i znaczenie biologiczne mikropecherzyków błonowych.** *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2014;68:1421-32.
- Xue C. , Shen Y. , Li X.C. , Li B. , Zhao S. , Gu J.J. , Chen Y.F. , Ma B.T. , Wei J.J. , Han Q. , Zhao R.C. **Exosomes derived from hypoxia-treated human adipose mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through the PKA signaling pathway.** *Stem Cells and Development.* 2018;
- Zhang S. , Eitan E. , Wu T.Y. , Mattson M.P. **Intercellular transfer of pathogenic α -synuclein by extracellular vesicles is induced by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal.** *Neurobiology of Aging.* 2018;61:52-65.
- Zhu L.L. , Huang X. , Yu W. , Chen H. , Chen Y. , Dai Y.T. **Transplantation of adipose tissue-derived stem cell-derived exosomes ameliorates erectile function in diabetic rats.** *Andrologia.* 2017.

Lipotoksyczność oraz przewlekłe zapalenie jako powód dysfunkcji śródbłónka naczyniowego i zaburzenia procesu angiogenezy w zespole metabolicznym

Krzysztof Bartkowiak¹, Mateusz Bartkowiak¹, Magdalena Chudzik¹, Ewa Jankowska-Steifer², Justyna Niderla-Bielińska^{2*}

*opiekun pracy

¹Studenckie Koło Naukowe HESA, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Autor korespondencyjny:

Mateusz Bartkowiak, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,

Streszczenie

Niespełna połowa Polaków boryka się z nadwagą. Jest to poważny problem, szczególnie u mężczyzn z otyłością typu brzuszego, która jest jednym z kryteriów rozpoznawania zespołu metabolicznego. Ta jednostka chorobowa stanowi połączenie patologicznych procesów biochemicznych, nieprawidłowych przemian metabolicznych oraz charakterystycznego stanu klinicznego pacjenta, które sumarycznie predysponują do rozwoju cukrzycy czy progresji zmian miażdżycowych. W konsekwencji dochodzi do istotnego podwyższenia ryzyka zgonu z powodów sercowo-naczyniowych. Toksyczny wpływ wysokiego stężenia kwasów tłuszczowych oraz niewielki, ogólnoustrojowy, przewlekły stan zapalny są jednymi z czynników, które mogą być zaangażowane w patogenezę zespołu metabolicznego. Funkcje śródbłónka naczyniowego takie jak, zdolność do produkcji tlenu azotu, utrzymywanie prawidłowych połączeń pomiędzy komórkami wewnętrznej warstwy naczynia krwionośnego oraz angiogeneza są upośledzone w wyniku lipotoksyczności, działania molekuł prozapalnych oraz komórek układu immunologicznego. Dysfunkcja śródbłónka naczyniowego w zespole metabolicznym przyczynia się do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi, zmniejszenia wrażliwości komórek śródbłónka na insulinę oraz nieprawidłowego transportu glukozy do innych organów. Ponadto patologiczna angiogeneza jest jednym z czynników sprzyjającym zasiedlaniu przez komórki zapalne tkanki tłuszczowej i tworzeniu prozapalnego środowiska. Znajomość wpływu śródbłónka na patogenezę tej choroby jest istotna w zapobieganiu rozwinięcia u pacjentów niewydolności serca oraz ciężkich powikłań sercowo-naczyniowych. Dodatkowo poznanie mechanizmów, w wyniku których dochodzi do dysfunkcji komórek śródbłónka pozwalałoby na podejmowanie prób zastosowania terapii, która zapobiegałaby lub wspomagała leczenie pacjentów z zespołem metabolicznym.

Słowa kluczowe: lipotoksyczność, przewlekły stan zapalny, śródbłonek naczyniowy, zespół metaboliczny, angiogeneza

Abstract

In Poland almost half of the population is with overweighted. Problem is significant, especially in men with abdominal obesity, because it is a one of the criteria of metabolic syndrome. This illness is a connection of pathologic biochemical processes, inappropriate metabolism and characteristic symptoms, which are increased risk of of diabetes mellitus development or evolution of arteriosclerosis. In metabolic syndrome there is also observed elevated risk of cardio-vascular events. Toxic, high level of fat acids and low, systemic chronic inflammation are risk factors, that are important in pathogenesis of metabolic syndrome. Normal function of endothelium which includes production of nitric oxide, maintaining a correct endothelial cells connection and angiogenesis are impaired by lipotoxicity, proinflammatory molecules and inflammatory cells. Endothelial dysfunction causes increased blood pressure, insulin resistance and abnormal transport glucose to organs. Pathologic angiogenesis facilitates infiltration of inflammatory cells in adipose tissue and creates a proinflammatory environment. Knowledge about importance of endothelium in metabolic syndrome pathogenesis is important, because

it can help to prevent heart failure and cardio-vascular events. Mechanisms of endothelium dysfunction in metabolic syndrome, are crucial in research for therapy, that can help in patient treatment.

Keywords: lipotoxicity, chronic inflammation, vascular endothelium, metabolic syndrome, angiogenesis

Wstęp

Zespół metaboliczny to nie tylko charakterystyczny stan kliniczny pacjenta. Jest to również połączenie cech biochemicznych i metabolicznych, zaburzonych procesów fizjologicznych, które powodują zwiększone ryzyko rozwoju i progresji, między innymi miażdżycy oraz cukrzycy typu 2. W konsekwencji obserwowany jest istotny wzrost śmiertelności u tych pacjentów (Grundy, Cleeman et al., 2005; Wilson, D'Agostino et al., 2005). Do tej pory nie ma jednej, spójnej definicji tej jednostki chorobowej. Obecnie używane są opisy zaproponowane przez: World Health Organization (WHO), European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR), National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III), American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), International Diabetes Federation (IDF) (Hoffman, VonWald et al., 2015). Kryteria diagnostyczne zawarte w definicji WHO oraz EGIR są trudne w oznaczaniu w codziennej praktyce klinicznej, dlatego są one głównie używane w badaniach naukowych. Badania epidemiologiczne najczęściej opierają się na wytycznych NCEP-ATP III i AACE. Ze względu na prostotę oraz dostępność parametrów określanych w definicji IDF jest ona znakomitym narzędziem stosowanym podczas stawiania diagnozy zespołu metabolicznego u pacjentów w warunkach klinicznych (Pacholczyk, Ferenc et al., 2008).

Według niektórych badaczy zespołu metabolicznego nie należy traktować jako odrębnej jednostki chorobowej, gdyż parametry zawarte w różnych definicjach są tylko czynnikami zwiększającymi śmiertelność u pacjentów. (Kahn, Buse et al., 2005; Lopes, Correa-Giannella et al., 2016) Nie jest istotne jednak, według których kryteriów diagnostycznych został rozpoznany zespół metaboliczny, gdyż niezależnie od przyjętych wytycznych pacjenci mają podwyższone ryzyko sercowo-naczyniowe (Pucci, Alcidi et al., 2017). Czynniki genetyczne oraz środowiskowe powodujące powstanie insulinooporności, otyłości typu brzusznej, zaburzeń w gospodarce lipidowej, prowadzącej do rozwoju blaszki miażdżycowej, podwyższonego ciśnienia tętniczego krwi, stanu prozakrzepowego oraz dysfunkcji śródbłonna są zaangażowane w patogenezę tej choroby oraz sprzyjają rozwijaniu się przewlekłego, uogólnionego stanu zapalnego (Kaur, 2014).

Ciągłe uszkodzanie tkanki, które skutkuje jej zniszczeniem związane jest z trwającym przewlekłym stanem zapalnym. W takiej tkance dochodzi do nacieku komórek zapalnych oraz wydzielania przez nie między innymi interleukiny 1 (IL-1), interleukiny 6 (IL-6) oraz TNF- α (ang. *Tumor necrosis factor alpha*). (Sakai and Kobayashi, 2015) W przewlekłym stanie zapalnym obserwowany jest wzrost aktywności NF- κ B (ang. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), kinazy JN (ang. *Jun N-terminal kinase*) oraz inflamasomu, które w istotny sposób regulują proces zapalenia oraz rozwój insulinooporności w zespole metabolicznym (Baker, Hayden et al., 2011). Również śródbłonek naczyniowy jest w istotny sposób zaangażowany w ten proces.

Śródbłonek naczyniowy pełni nie tylko rolę błony filtrującej, ale jest odpowiedzialny za szereg procesów, takich jak utrzymanie odpowiedniego napięcia naczyń krwionośnych, regulacja procesu krzepnięcia, tworzenie nowych naczyń krwionośnych, czy udział w rekrutacji komórek zapalnych (Rajendran, Rengarajan et al., 2013; Persson, 2015). Bardzo istotną funkcją komórek śródbłonka jest też produkcja tlenku azotu (NO), który pełni rolę przeciwzapalną, przeciwwzkrzepową oraz powoduje rozkurcz naczyń czy migrację i proliferację miocytów gładkich znajdujących się w ścianie naczyń. NO, który jest produkowany przez eNOS (ang. *Endothelial nitric oxide synthase*), ma działanie proangiogenne oraz sprzyja regeneracji śródbłonka naczyniowego (Shaul, 2002).

Angiogeneza to proces, w efekcie którego z wcześniej istniejących naczyń powstają nowe struktury naczyniowe. Zachodzi on w warunkach fizjologicznych, jak dla przykładu w gojeniu się ran czy regeneracji oraz rozwoju błony śluzowej macicy. W patologicznych sytuacjach może ona prowadzić do znacznych komplikacji dla organizmu, co ma miejsce między innymi w wyniku zmian naczyniowych w cukrzycy, (Cheng and Ma, 2015), we wzroście guzów nowotworowych oraz tworzeniu przerzutów, w chorobach autoimmunologicznych takich jak choroba Crown'a oraz miażdżycy (Folkman, 2007). Angiogeneza jest regulowana poprzez różne cząsteczki. VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), IL-6, TNF- α , bFGF (ang. *Basic fibroblast growth factor*), PDGF (ang. *Platelet-derived growth factor*) są znanymi stymulatorami tego procesu, natomiast TGF- β (ang. *Transforming growth factor- β*), angiostatyna, interleukina 12 (IL-12), interferon hamują powstawanie nowych naczyń (Jaipersad, Lip et al., 2014). Powstawanie naczyń jest skomplikowanym procesem, na który mają wpływ nie tylko komórki śródbłonka czy ściany naczyń, ale również komórki zapalne (Noonan, De Lerma Barbaro et al., 2008).

Istotnym aspektem, dla którego zostało wykonane to podsumowanie jest fakt, iż według danych Głównego Urzędu Statystycznego niespełna połowa Polaków boryka się z nadwagą. Jest to poważny problem, szczególnie u mężczyzn z otyłością typu brzusznej, która jest jednym z kryteriów rozpoznawania zespołu metabolicznego (Hoffman, VonWald et al., 2015). Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego w zespole metabolicznym przyczynia się do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi, zmniejszenia wrażliwości komórek śródbłonka na insulinę oraz nieprawidłowego transportu glukozy do innych organów (Polovina and Potpara, 2014). Ponadto patologiczna angiogeneza jest jednym z czynników sprzyjającym zasiedlaniu przez komórki zapalne tkanki tłuszczowej i tworzeniu prozapalnego środowiska. Ten temat jest istotny z punktu widzenia naukowego, gdyż znajomość wpływu śródbłonka na patogenezę tej choroby jest ważna w zapobieganiu rozwinięcia u pacjentów niewydolności serca oraz ciężkich powikłań sercowo-naczyniowych. Dodatkowo poznanie mechanizmów w wyniku, których dochodzi do dysfunkcji komórek śródbłonka pozwalałoby na podejmowanie prób zastosowania terapii, która zapobiegałaby lub wspomagała leczenie pacjentów z zespołem metabolicznym (Polovina and Potpara, 2014).

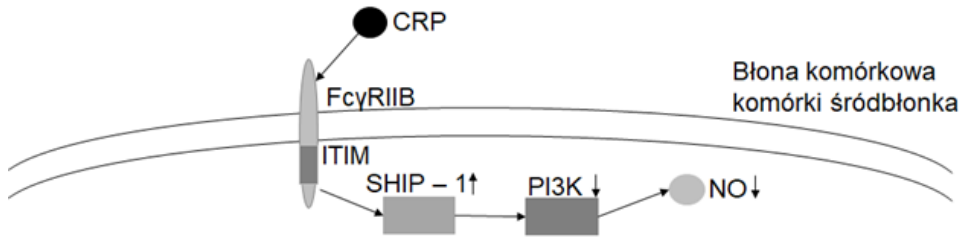
Celem pracy jest zebranie najważniejszych zagadnień w podsumowanie dotyczące lipotoksyczności oraz przewlekłego zapalenia, jako powodu dysfunkcji śródbłonka naczyniowego i zaburzenia procesu angiogenezy w zespole metabolicznym. Przegląd literatury został wykonany na podstawie artykułów związanych

z tematem pracy, które wybrano przy zastosowaniu wyszukiwarki PubMed używając haseł MeSH: Inflammation; Endothelium, Vascular; Metabolic Syndrome; Neovascularization, Pathologic; oraz haseł Angiogenesis i Lipotoxicity.

Rola TNF- α w dysfunkcji śródbłonna w zespole metabolicznym.

W zespole metabolicznym dochodzi do pobudzenia wielu szlaków regulujących proces zapalenia. Zbyt duże przyjmowanie pokarmów, hiperlipidemia, hiperglukemia powodują pobudzenie inflamasomu poprzez TLR (ang. *Toll-like receptor*). Utlenione kwasy tłuszczowe poprzez TLR4 oraz TLR2 sprzyjają aktywacji kinazy inhibitora κ B - IKK2 (ang. Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta), która fosforyluje białko inhibitorowe I κ B (ang. *inhibitor of kappa B*), w wyniku czego chodzi do jego ubikwitynacji. Dodatkowo, w wyniku aktywacji receptorów TLR dochodzi również do zmian w metabolizmie wolnych kwasów tłuszczowych. Zwiększa się poziom diacyloglicerolu oraz ceramidów, co powoduje aktywację kinazy białkowej C. Wysokie poziomy glukozy oraz lipidów powodują zmiany metabolicznie nasilające fosforylację oksydacyjną, w wyniku której dochodzi do powstawania wolnych rodników tlenowych. Ten proces wraz z łączeniem się przez receptor RAGE (ang. *Receptor for advanced glycation endproducts*) z zaawansowanymi końcowymi produktami glikacji, prowadzi do aktywacji NF- κ B (Baker, Hayden et al., 2011; Catrysse and van Loo, 2017). Stres siateczki śródplazmatycznej, związany z zbyt dużym przyjmowaniem pokarmów, również przyczynia się do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Szczególnie znacznie ma ten proces w podwzgórzu, gdzie jest jednym z czynników powodujących insulinooporność w strukturach regulujących przyjmowanie pokarmu. (Zhang, Zhang et al., 2008) U otyłych pacjentów jest obserwowana endotoksemia, gdyż w sposób znaczący u nich jest obniżona ekspresja połączeń zamykających pomiędzy enterocytami, w wyniku czego dochodzi do zwiększania przepuszczalności w jelitach. Bakterie symbiotyczne u osób otyłych produkują więcej lipopolisacharydu (LPS). Te dwie patologie powodują aktywację TLR4 poprzez zwiększone stężenie LPS (Cani, Bibiloni et al., 2008). Wszystkie wyżej opisane procesy prowadzą do aktywacji NF- κ B w wyniku czego zwiększa się produkcja cytokin prozapalnych takich jak IL-1, TNF- α oraz aktywacja komórek zapalnych, które poprzez sprzężenie zwrotne dodatkowo powodują dalszą aktywację NF- κ B (Catrysse and van Loo, 2017).

W wyniku aktywności kinaz i fosfataz białkowych dochodzi do fosforylacji seryny m.in. hS636, hS307 (Coppa and White, 2012) w IRS1/2 (ang. Insulin receptor substrate 1/2), która stanowi część cytoplazmatyczną receptora dla insuliny, powodując jego niewrażliwość na ligand, czyli powstanie insulinooporności w komórkach (Baker, Hayden et al., 2011; Catrysse and van Loo, 2017). Obniżenie poziomu NF- κ B w komórkach śródbłonna zapobiega rozwinięciu się oporności na insulinę (Hasegawa, Saito et al., 2012). W wyniku rozwinięcia się insulinooporności funkcje śródbłonna stają się upośledzone. Zostaje zaburzona zależna od insuliny dystrybucja krwi, poprzez zmniejszenie zdolności rozkurczu naczyń, przez co dostarczanie insuliny do odpowiednich komórek jest ograniczone (Kolka and Bergman, 2013).



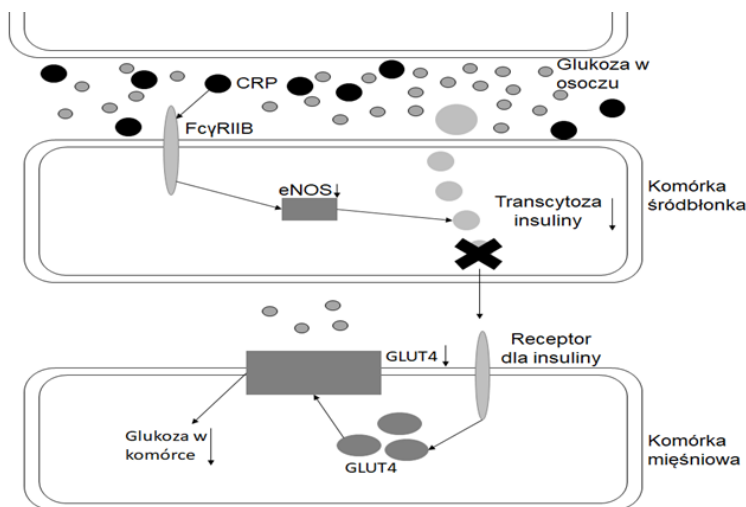
Rycina 1. Uproszczony schemat obniżania wydzielania NO przez CRP w komórkach śródbłonna opracowanie własne na podstawie (Tanigaki, Mineo et al., 2009)

Znaczenie CRP w patogenezie zespołu metabolicznego szczególnie uwzględniając aspekt śródbłonna naczyniowego.

W nadciśnieniu tętniczym oraz cukrzycy typu 2 obserwowany jest również podwyższony poziom innej cząsteczki prozapalnej – CRP (ang. **C-reactive protein**) (Firdous, 2014; Fronczyk, Moleda et al., 2014). Ta pentaksyna, której wydzielanie jest stymulowane m.in. poprzez IL-6 w hepatocytach, obniża zarówno transkrypcję genu eNOS jak i aktywację tej syntazy, przez co zostaje zahamowane jej fizjologiczne działanie. Błonowym receptorem dla CRP jest FcγRIIB (podtyp IIB receptora FcγR). W wyniku jego stymulacji dochodzi do aktywacji fosfatazy SHIP-1 (ang. *SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase-1*) poprzez ITIM (ang. *Immuno-receptor tyrosine-based inhibition motif*), która jest cytoplazmatyczną częścią receptora FcγRIIB. Poprzez aktywację fosfatazy SHIP-1 zostaje zahamowany sygnał przekazywany poprzez kinazę PI3 (ang. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), co powoduje sumarycznie zmniejszenie wydzielania NO przez komórki śródbłonna (Tanigaki, Mineo et al., 2009). Podsumowanie tego procesu zawarte jest na rycinie 1.

W stanie podwyższonego poziomu CRP zwiększa się sekrecja endoteliny-1 (ET-1), która ma działanie naczynioskurczowe (Xu, Morita et al., 2007). Również inna cytokina prozapalna – TNF-α poprzez szlak związany z MAPK (ang. *Mitogen-activated protein kinase*) powoduje zwiększanie wydzielania ET-1 (Sury, Frese-Schaper et al., 2006). W badaniach na gryzoniach pokazano, że CRP powoduje nadciśnienie, które ustępuje po obniżeniu poziomu tej pentaksyny. W ten efekt jest również zaangażowany receptor FcγRIIB, gdyż myszy z jego dysfunkcją nie rozwijają nadciśnienia zależnego od CRP. Nadciśnienie w stanie przewlekłego zapalenia jest także związane z rozregulowaniem układu RAA (ang. *Renin-angiotensin-aldosterone system*) poprzez zmniejszenie ekspresji naczyniowego receptora typu II dla angiotensyny (Vongpatanasin, Thomas et al., 2007). Ponadto podwyższony poziom CRP poprzez receptor FcγRIIB przyczyniają się do rozwinięcia insulinooporności, co wykazano na modelach zwierzęcych. Receptory te nie są obecne w miocytach mięśni szkieletowych, hepatocytach czy adipocytach, natomiast ich wysoka ekspresja jest stwierdzana w komórkach śródbłonna, szczególnie obecnego w naczyniach znajdujących się w mięśniach szkieletowych. W wyniku patologicznego wpływu hiperglikemii dochodzi do spadku prawie

o połowę dostarczania glukozy do komórek mięśni szkieletowych. Insulinooporność powodowana przez CRP poprzez receptor FcγRIIB jest związana z zahamowaniem aktywacji eNOS w komórkach śródbłonna (Tanigaki, Vongpatanasin et al., 2013). W efekcie tych zmian upośledzona zostaje transcytoza insuliny przez komórki śródbłonna do komórek mięśniowych. Z powodu braku liganda dla receptora insuliny w miocytach obniża się ekspresja transportera GLUT4 (ang. *Glucose transporter type 4*). Transport glukozy do komórek mięśniowych jest upośledzony mimo jej wysokiego poziomu w surowicy (Tanigaki, Chambliss et al., 2016). Sugeruje to, że CRP wpływa na rozwijanie się objawów insulinooporności, właśnie poprzez regulację transcytozy insuliny oraz transportu glukozy na poziomie śródbłonna naczyń mięśni poprzecznie prążkowanych (ryc. 2).



Rycina 2. Uproszczony schemat regulacji poziomu glukozy i transcytozy insuliny w komórkach śródbłonna oraz komórek mięśniowych, opracowanie własne na podstawie (Tanigaki, Vongpatanasin et al., 2013) oraz (Tanigaki, Chambliss et al., 2016)

W rozwój insulinooporności jest też zaangażowany TNF- α (Zhang, Wheatley et al., 2003), który działa poprzez zahamowanie zależnej od insuliny aktywacji eNOS poprzez PI3K/Akt (Muniyappa, Iantorno et al., 2008). Zmiany w śródbłonna naczyniowym obserwowane w insulinooporności skutkują skurczem naczyń, co może przyczyniać się do rozwoju nadciśnienia tętniczego. Produkty genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny FoxO (ang. Forkhead transcription factor), które są związane z aktywacją przez insulinę kinazy Akt (inaczej nazywaną PKB ang. Protein kinase B), w warunkach oporności na insulinę powodują zmniejszenie wydzielania NO oraz zwiększenie tworzenia reaktywnych form tlenu, aktywację NF- κ B, nadekspresję ICAM-1 (ang. *Intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (ang. *Vascular cell adhesion protein 1*) oraz cytokin prozapalnych. Mutacja powodująca stałą aktywację tego czynnika powoduje znaczące zahamowanie procesów miażdżycowych (Tsuchiya, Tanaka et al., 2012).

Powiązanie pomiędzy komórkami zapalnymi oraz śródbłonkiem naczyńnym w zespole metabolicznym

CRP zaburza sygnalizację insuliny w komórkach śródbłonka nie tylko poprzez hamowanie fosforylacji eNOS, ale również kinazy PI3 i Akt. Ponadto, zwiększa zdolność monocytów do adhezji do śródbłonka (Shaul, 2015). Zauważono zależną od NF- κ B zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonka (Hasegawa, Saito et al., 2012). Myszy ze zmutowanym receptorem dla insuliny w bardzo znaczący sposób wykazują nadekspresję VCAM-1, co sprzyja rekrutacji komórek zapalnych (Rask-Madsen, Li et al., 2010). Może to wyjaśniać, jak w warunkach niewrażliwości komórek na insulinę, dochodzi do zasiedlania tkanek przez komórki zapalne. W stanie insulinooporności w tych komórkach zmienia się ekspresja cząsteczek adhezyjnych m.in. wzrost CD49d (ang. *Cluster of Differentiation 49d*) w limfocytach, czy CD54 (ICAM – 1) w monocytach (Gomez Rosso, Benitez et al., 2008). Integryna α_4 (CD49d) odgrywa istotną rolę w zasiedlaniu przez komórki jednojądrzaste krwo obwodowej miejsc, w których toczy się zapalenie (Rose, Han et al., 2002), a ICAM – 1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*) odpowiada za interakcje pomiędzy leukocytami wiążąc się z Mac-1 (ang. *Macrophage-1 antigen*) (Gomez Rosso, Benitez et al., 2008).

W wyniku wyżej przedstawionych procesów stwarzają się szczególnie sprzyjające warunki do infiltracji monocytów do tkanek. Makrofagi są ważnym źródłem cytokin prozapalnych takich jak TNF- α , IL-6, IL-1 β (Chawla, Nguyen et al., 2011). Sprzyja to wcześniej opisanej aktywacji szlaków JNK oraz NF- κ B (Shoelson, Lee et al., 2006). W zasiedlonych przez makrofagi tkankach obserwuje się także przesunięcie równowagi pomiędzy makrofagami M1 a M2 w kierunku tych pierwszych, co wiąże się ze wzrostem insulinooporności w tkance tłuszczowej czy mięśniach (Esser, Legrand-Poels et al., 2014). Makrofagi M1 hamują podziały komórkowe, są odpowiedzialne za zniszczenie tkanek oraz stymulują odpowiedź immunologiczną typu komórkowego (Mills and Ley, 2014). W zespole metabolicznym obserwowana jest także podwyższona liczba limfocytów, szczególnie CD8⁺ oraz neutrofilii wraz ze wzrastającym BMI (ang. *Body mass index*). Zmniejszony jest za to procent komórek CD4⁺ oraz limfocytów T regulatorowych (Nishimura, Manabe et al., 2009; Bahadir, Baltaci et al., 2015). Istotne jest także zaangażowanie komórek NK (ang. *Natural killer's cells*) w tworzenie środowiska sprzyjającego powstawaniu przewlekłego procesu zapalnego (Fuentes, Fuentes et al., 2013).

Upośledzona angiogeneza w zespole metabolicznym.

U otyłych osób obserwowany jest zwiększony poziom VEGF-A (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor-A*), który przez receptor VEGF-R2 stymuluje powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Zbyt duże przyjmowanie pokarmów powoduje przerost oraz rozrost adipocytów m.in. w trzewnej tkance tłuszczowej (Halberg, Wernstedt-Asterholm et al., 2008). Zredukowane zostaje jej zaopatrzenie w substancje odżywcze oraz tlen (Cinti, Mitchell et al., 2005). Mimo warunków hipoksji nie dochodzi jednak do zwiększenia ilości naczyń krwionośnych. Wyjaśnienie tego paradoksu stanowi proces alternatywnego składowania VEGF-A165. Izofoma VEGF-A165a ma właściwości proangiogenne, natomiast VEGF-A165b

charakteryzuje się przeciwnymi właściwościami. Poziom tej drugiej izoformy jest szczególnie podwyższony w trzewnej tkance tłuszczowej, co prawdopodobnie wyjaśnia niski potencjał jej komórek śródbłonna do tworzenia nowych naczyń krwionośnych (Ngo, Farb et al., 2014). Hipoksja oraz upośledzona angiogeneza powodują duże zasiedlenie tkanki tłuszczowej przez makrofagi M1 (Antonopoulos and Tousoulis, 2017), które stwarzają środowisko dla rozwoju dalszych zmian w zespole metabolicznym. W większych ilościach wytwarzane są cytokiny zapalne oraz adipocytokiny, które wraz z pozostałymi wcześniej opisanymi zmianami powodują pojawianie się cech zespołu metabolicznego (Lau, Dhillon et al., 2005).

Oznaczanie w surowicy pacjentów różnych molekuł może w sposób pośredni określić zmiany w procesie angiogenezy, które mają miejsce u pacjentów z zespołem metabolicznym. W badaniu klinicznym, w którym brało udział około 1800 pacjentów zaobserwowano znaczące podwyższenie w surowicy VEGF, sVEGFR-1 oraz obniżenie sVEGFR-2 u pacjentów z rozpoznaniem zespołem metabolicznym (Jesmin, Akter et al., 2013). Natomiast w innych badaniach nie zaobserwowano istotnych zmian w stężeniu VEGF (Liu, Druta et al., 2014; Salord, Gasa et al., 2014), czy sVEGFR-1 czy sVEGFR-2 (Wada, Satoh et al., 2010). Poziom VEGF we krwi słabo pozytywnie koreluje ze stężeniem glukozy w surowicy, ciśnieniem tętniczym krwi oraz BMI. Tylko u kobiet zaobserwowano istotny wyższy poziom PIGF (ang. *Placenta growth factor*), który wykazuje cechy białka proangiogenne (Siervo, Ruggiero et al., 2010). Podobne wyniki uzyskano u pacjentów pediatrycznych (Pervanidou, Chouliaras et al., 2014). W grupie kobiet z zespołem metabolicznym w wieku menopauzalnym opisano nieistotne statystycznie podwyższenie stężenia angiopoetyny-2. Wyraźnie jest obniżony poziom uPA (ang. *Urokinase-type plasminogen activator*), co może sugerować uszkodzenie śródbłonna naczyniowego w tej grupie chorych. (Chedraui, Escobar et al., 2014). U pacjentów z zespołem metabolicznym jest też obniżony poziom NO (Barylski, Kowalczyk et al., 2009; Kowalski, Sliwczynska-Rodziewicz et al., 2011) oraz adropiny (ang. *adropin*), natomiast poziom ET-1 i eNOS są podwyższone. (Oruc, Akpinar et al., 2017). Mimo, że wyniki z mniejszych grup eksperymentalnych nie wskazują na istotne statystycznie różnice w stężeniach cząsteczek wpływających na angiogenezę w surowicy, to jednak badania w większych populacjach pacjentów je potwierdzają. Obserwacje te sugerują upośledzenie prawidłowych funkcji śródbłonna.

Opisano również obniżenie ekspresji takich białek, jak Notch2, Notch4, Jagged2, Ang1, eNOS, pFOX03, pP38 oraz HSP90. Białka te istotnie wpływają na regulację angiogenezy. Zauważono zwiększoną apoptozę kardiomiocytów w niedokrwionym mięśniu sercowym, na który działały czynniki charakterystyczne dla zespołu metabolicznego. Nie zaobserwowano różnicy w gęstości naczyń włosowatych oraz tętniczych w tych sercach (Elmadhun, Sabe et al., 2014). W komórkach śródbłonna naczyń serc myszy db/db, które uznawane są za zwierzęcy model do badań nad zespołem metabolicznym, obserwuje się podwyższony poziom mRNA dla CITED2. To białko ogranicza aktywację HIF (ang. *Hypoxia-inducible factor*) w komórkach śródbłonna w efekcie czego zahamowanie jest tworzenie się nowych naczyń krwionośnych (Wang, Lockhart et al., 2016). Zauważono również iż aktywność kinazy Pim1, która jest odpowiedzialna za fosforylację eNOS w pozycji Ser-632, jest

obniżona w sercu myszy rozwijających zespół metaboliczny. Dodatkowo ograniczone tworzenie nowych naczyń w krążkach aortalnych pobranych z tych zwierząt (Katare, Caporali et al., 2011; Chen, Yi et al., 2016). Odpowiednio przebiegający proces angiogenezy jest zaburzony u zwierząt rozwijających zespół metaboliczny.

Podsumowanie

Procesy wyżej opisane regulowane przez cytokiny prozapalne czy czynniki transkrypcyjne regulujące zapalenie przyczyniają się do obrazu klinicznego zespołu metabolicznego. Zaburzenia wydzielania NO oraz zwiększone wydzielanie ET-1 sprzyja nadciśnieniu. Zmiany z udziałem NF- κ B częściowo wiążą zmiany obserwowane w otyłości oraz insulinooporności. Istotne też jest działanie CRP oraz TNF- α . Zwiększenie ekspresji białek ułatwiających adhezję komórek zapalnych powoduje stały ich napływ oraz produkcję odpowiednich cytokin. Lipotoksyczność oraz przewlekłe zapalenie w istotny sposób przyczyniają się do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i zaburzenia procesu angiogenezy w zespole metabolicznym.

Znajomość wpływu śródbłonna na patogenezę tej choroby jest istotna w zapobieganiu rozwinięcia u pacjentów niewydolności serca, ciężkich powikłań sercowo-naczyniowych czy cukrzycy. Dodatkowo poznanie mechanizmów, w wyniku których dochodzi do dysfunkcji komórek śródbłonna pozwala na podejmowanie prób zastosowania terapii, które zapobiegałyby lub wspomagały leczenie pacjentów z zespołem metabolicznym.

Literatura

Tanigaki K., Mineo C., Yuhanna I. S., Chambliss K. L., Quon M. J., Bonvini E. and Shaul P. W. **C-reactive protein inhibits insulin activation of endothelial nitric oxide synthase via the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif of Fc γ RIIB and SHIP-1.** *Circ Res.* 2009; 104(11): 1275-1282.

Tanigaki K., Vongpatanasin W., Barrera J. A., Atochin D. N., Huang P. L., Bonvini E., Shaul P. W. and Mineo C. **C-reactive protein causes insulin resistance in mice through Fc γ RIIB-mediated inhibition of skeletal muscle glucose delivery.** *Diabetes.* 2013; 62(3): 721-731.

Tanigaki K., Chambliss K. L., Yuhanna I. S., Sacharidou A., Ahmed M., Atochin D. N., Huang P. L., Shaul P. W. and Mineo C. **Endothelial Fc γ RIIB Activation Blunts Insulin Delivery to Skeletal Muscle to Cause Insulin Resistance in Mice.** *Diabetes.* 2016; 65(7): 1996-2005.

Grundy S. M., Cleeman J. I., Daniels S. R., Donato K. A., Eckel R. H., Franklin B. A., Gordon D. J., Krauss R. M., Savage P. J., Smith S. C., Jr., Spertus J. A., Costa F., American Heart A., National Heart L. and Blood I. **Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement.** *Circulation.* 2005; 112(17): 2735-2752.

Wilson P. W., D'Agostino R. B., Parise H., Sullivan L. and Meigs J. B. **Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus.** *Circulation.* 2005; 112(20): 3066-3072.

Hoffman E. L., VonWald T. and Hansen K. **The metabolic syndrome.** *S D Med.* 2015; Spec No: 24-28.

Pacholczyk M., Ferenc T. and Kowalski J. **The metabolic syndrome. Part I: definitions and diagnostic criteria for its identification. Epidemiology and relationship with cardiovascular and type 2 diabetes risk.** *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008; 62: 530-542.

Kahn R., Buse J., Ferrannini E. and Stern M. **The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.** *Diabetes Care.* 2005; 28(9): 2289-2304.

Lopes H. F., Correa-Giannella M. L., Consolim-Colombo F. M. and Egan B. M. **Visceral adiposity syndrome.** *Diabetol Metab Syndr.* 2016; 8: 40.

- Pucci G., Alcidi R., Tap L., Battista F., Mattace-Raso F. and Schillaci G. **Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature.** *Pharmacol Res.* 2017; 120: 34-42.
- Kaur J. **A comprehensive review on metabolic syndrome.** *Cardiol Res Pract.* 2014; 2014: 943162.
- Sakai Y. and Kobayashi M. **Lymphocyte 'homing' and chronic inflammation.** *Pathol Int.* 2015; 65(7): 344-354.
- Baker R. G., Hayden M. S. and Ghosh S. **NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease.** *Cell Metab.* 2011; 13(1): 11-22.
- Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J., Nishigaki Y., Sakthisekaran D., Sethi G. and Nishigaki I. **The vascular endothelium and human diseases.** *Int J Biol Sci.* 2013; 9(10): 1057-1069.
- Persson P. B. **The multiple functions of the endothelium: more than just wallpaper.** *Acta Physiol (Oxf).* 2015; 213(4): 747-749.
- Shaul P. W. **Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location.** *Annu Rev Physiol.* 2002; 64: 749-774.
- Cheng R. and Ma J. X. **Angiogenesis in diabetes and obesity.** *Rev Endocr Metab Disord.* 2015; 16(1): 67-75.
- Folkman J. **Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?** *Nature Reviews. Drug Discovery.* 2007; 6(4): 273-286.
- Jaipresad A. S., Lip G. Y., Silverman S. and Shantsila E. **The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis.** *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63(1): 1-11.
- Noonan D. M., De Lerma Barbaro A., Vannini N., Mortara L. and Albin A. **Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions.** *Cancer Metastasis Rev.* 2008; 27(1): 31-40.
- Polovina M. M. and Potpara T. S. **Endothelial dysfunction in metabolic and vascular disorders.** *Postgrad Med.* 2014; 126(2): 38-53.
- Catrysse L. and van Loo G. **Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF-kappaB.** *Trends Cell Biol.* 2017; 27(6): 417-429.
- Zhang X., Zhang G., Zhang H., Karin M., Bai H. and Cai D. **Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity.** *Cell.* 2008; 135(1): 61-73.
- Cani P. D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A. M., Delzenne N. M. and Burcelin R. **Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice.** *Diabetes.* 2008; 57(6): 1470-1481.
- Copps K. D. and White M. F. **Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2.** *Diabetologia.* 2012; 55(10): 2565-2582.
- Hasegawa Y., Saito T., Ogihara T., Ishigaki Y., Yamada T., Imai J., Uno K., Gao J., Kaneko K., Shimozawa T., Asano T., Fujita T., Oka Y. and Katagiri H. **Blockade of the nuclear factor-kappaB pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans.** *Circulation.* 2012; 125(9): 1122-1133.
- Kolka C. M. and Bergman R. N. **The endothelium in diabetes: its role in insulin access and diabetic complications.** *Rev Endocr Metab Disord.* 2013; 14(1): 13-19.
- Firdous S. **Correlation of CRP, fasting serum triglycerides and obesity as cardiovascular risk factors.** *J Coll Physicians Surg Pak.* 2014; 24(5): 308-313.
- Fronczyk A., Moleda P., Safranow K., Piechota W. and Majkowska L. **Increased concentration of C-reactive protein in obese patients with type 2 diabetes is associated with obesity and presence of diabetes but not with macrovascular and microvascular complications or glycemic control.** *Inflammation.* 2014; 37(2): 349-357.
- Xu J. W., Morita I., Ikeda K., Miki T. and Yamori Y. **C-reactive protein suppresses insulin signaling in endothelial cells: role of spleen tyrosine kinase.** *Mol Endocrinol.* 2007; 21(2): 564-573.
- Sury M. D., Frese-Schaper M., Muhlemann M. K., Schulthess F. T., Blasig I. E., Tauber M. G., Shaw S. G. and Christen S. **Evidence that N-acetylcysteine inhibits TNF-alpha-induced cerebrovascular**

- endothelin-1 upregulation via inhibition of mitogen- and stress-activated protein kinase.** Free Radic Biol Med. 2006; 41(9): 1372-1383.
- Vongpatanasin W., Thomas G. D., Schwartz R., Cassis L. A., Osborne-Lawrence S., Hahner L., Gibson L. L., Black S., Samols D. and Shaul P. W. **C-reactive protein causes downregulation of vascular angiotensin subtype 2 receptors and systolic hypertension in mice.** Circulation. 2007; 115(8): 1020-1028.
- Zhang L., Wheatley C. M., Richards S. M., Barrett E. J., Clark M. G. and Rattigan S. **TNF-alpha acutely inhibits vascular effects of physiological but not high insulin or contraction.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003; 285(3): E654-660.
- Muniyappa R., Iantorno M. and Quon M. J. **An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction.** Endocrinol Metab Clin North Am. 2008; 37(3): 685-711, ix-x.
- Tsuchiya K., Tanaka J., Shuiqing Y., Welch C. L., DePinho R. A., Tabas I., Tall A. R., Goldberg I. J. and Accili D. **FoxOs integrate pleiotropic actions of insulin in vascular endothelium to protect mice from atherosclerosis.** Cell Metab. 2012; 15(3): 372-381.
- Shaul P. W. **Role of the endothelium in the metabolic syndrome: IIB or not IIB.** Am J Med Sci. 2015; 349(1): 3-5.
- Rask-Madsen C., Li Q., Freund B., Feather D., Abramov R., Wu I. H., Chen K., Yamamoto-Hiraoka J., Goldenbogen J., Sotiropoulos K. B., Clermont A., Geraldine P., Dall'Osso C., Wagers A. J., Huang P. L., Rekhter M., Scalia R., Kahn C. R. and King G. L. **Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice.** Cell Metab. 2010; 11(5): 379-389.
- Gomez Rosso L., Benitez M. B., Fornari M. C., Berardi V., Lynch S., Schreier L., Wikinski R., Cuniberti L. and Brites F. **Alterations in cell adhesion molecules and other biomarkers of cardiovascular disease in patients with metabolic syndrome.** Atherosclerosis. 2008; 199(2): 415-423.
- Rose D. M., Han J. and Ginsberg M. H. **Alpha4 integrins and the immune response.** Immunological Reviews. 2002; 186: 118-124.
- Chawla A., Nguyen K. D. and Goh Y. P. **Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease.** Nat Rev Immunol. 2011; 11(11): 738-749.
- Shoelson S. E., Lee J. and Goldfine A. B. **Inflammation and insulin resistance.** J Clin Invest. 2006; 116(7): 1793-1801.
- Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A. J. and Paquot N. **Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes.** Diabetes Res Clin Pract. 2014; 105(2): 141-150.
- Mills C. D. and Ley K. **M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity.** J Innate Immun. 2014; 6(6): 716-726.
- Nishimura S., Manabe I., Nagasaki M., Eto K., Yamashita H., Ohsugi M., Otsu M., Hara K., Ueki K., Sugiura S., Yoshimura K., Kadowaki T. and Nagai R. **CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity.** Nat Med. 2009; 15(8): 914-920.
- Bahadir A., Baltaci D., Turker Y., Turker Y., Iliev D., Ozturk S., Deler M. H. and Sariguzel Y. C. **Is the neutrophil-to-lymphocyte ratio indicative of inflammatory state in patients with obesity and metabolic syndrome?** Anatol J Cardiol. 2015; 15(10): 816-822.
- Fuentes E., Fuentes F., Vilahur G., Badimon L. and Palomo I. **Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome.** Mediators Inflamm. 2013; 2013: 136584.
- Halberg N., Wernstedt-Asterholm I. and Scherer P. E. **The adipocyte as an endocrine cell.** Endocrinol Metab Clin North Am. 2008; 37(3): 753-768, x-xi.
- Cinti S., Mitchell G., Barbatelli G., Murano I., Ceresi E., Faloia E., Wang S., Fortier M., Greenberg A. S. and Obin M. S. **Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans.** J Lipid Res. 2005; 46(11): 2347-2355.
- Ngo D. T., Farb M. G., Kikuchi R., Karki S., Tiwari S., Bigornia S. J., Bates D. O., LaValley M. P., Hamburg N. M., Vita J. A., Hess D. T., Walsh K. and Gokce N. **Antiangiogenic actions of vascular endothelial growth factor-A165b, an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor-A, in human obesity.** Circulation. 2014; 130(13): 1072-1080.

Antonopoulos A. S. and Tousoulis D. **The molecular mechanisms of obesity paradox.** Cardiovasc Res. 2017; 113(9): 1074-1086.

Lau D. C., Dhillon B., Yan H., Szmítko P. E. and Verma S. **Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 288(5): H2031-2041.

Jesmin S., Akter S., Rahman M. M., Islam M. M., Islam A. M., Sultana S. N., Mowa C. N., Yamaguchi N., Okazaki O., Satoru K., Kimura S., Hiroe M., Mizutani T. and Moroi M. **Disruption of components of vascular endothelial growth factor angiogenic signalling system in metabolic syndrome. Findings from a study conducted in rural Bangladeshi women.** Thromb Haemost. 2013; 109(4): 696-705.

Liu J. J., Druta M., Shibata D., Coppola D., Boler I., Elahi A., Reich R. R., Siegel E. and Extermann M. **Metabolic syndrome and colorectal cancer: is hyperinsulinemia/insulin receptor-mediated angiogenesis a critical process?** J Geriatr Oncol. 2014; 5(1): 40-48.

Salord N., Gasa M., Mayos M., Fortuna-Gutierrez A. M., Montserrat J. M., Sanchez-de-la-Torre M., Barcelo A., Barbe F., Vilarrasa N. and Monasterio C. **Impact of OSA on biological markers in morbid obesity and metabolic syndrome.** J Clin Sleep Med. 2014; 10(3): 263-270.

Wada H., Satoh N., Kitaoka S., Ono K., Morimoto T., Kawamura T., Nakano T., Fujita M., Kita T., Shimatsu A. and Hasegawa K. **Soluble VEGF receptor-2 is increased in sera of subjects with metabolic syndrome in association with insulin resistance.** Atherosclerosis. 2010; 208(2): 512-517.

Siervo M., Ruggiero D., Sorice R., Nutile T., Aversano M., Stephan B. C. and Ciullo M. **Angiogenesis and biomarkers of cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome.** J Intern Med. 2010; 268(4): 338-347.

Pervanidou P., Chouliaras G., Akalestos A., Bastaki D., Apostolakou F., Papassotiropoulos I. and Chrousos G. P. **Increased placental growth factor (PlGF) concentrations in children and adolescents with obesity and the metabolic syndrome.** Hormones (Athens). 2014; 13(3): 369-374.

Chedraui P., Escobar G. S., Perez-Lopez F. R., Palla G., Montt-Guevara M., Cecchi E., Genazzani A. R., Simoncini T. and Research Group for the Omega Women's Health P. **Angiogenesis, inflammation and endothelial function in postmenopausal women screened for the metabolic syndrome.** Maturitas. 2014; 77(4): 370-374.

Barylski M., Kowalczyk E., Banach M., Cieciewicz J., Pawlicki L. and Kowalski J. **Plasma total antioxidant activity in comparison with plasma NO and VEGF levels in patients with metabolic syndrome.** Angiology. 2009; 60(1): 87-92.

Kowalski J., Sliwczynska-Rodziewicz D., Kowalczyk E., Cieciewicz J., Irzmanski R., Pawlicki L., Mejer A. and Barylski M. **Plasma nitric oxide and vascular endothelial growth factor levels in patients with metabolic syndrome and co-existing vascular complications.** Pol Merkur Lekarski. 2011; 30(178): 249-252.

Oruc C. U., Akpınar Y. E., Dervisoglu E., Amikishiyev S., Salmaslioglu A., Gurdol F. and Omer B. **Low concentrations of adropin are associated with endothelial dysfunction as assessed by flow-mediated dilatation in patients with metabolic syndrome.** Clin Chem Lab Med. 2017; 55(1): 139-144.

Elmadhun N. Y., Sabe A. A., Lassaletta A. D., Chu L. M., Kondra K., Sturek M. and Sellke F. W. **Metabolic syndrome impairs notch signaling and promotes apoptosis in chronically ischemic myocardium.** J Thorac Cardiovasc Surg. 2014; 148(3): 1048-1055; discussion 1055.

Wang X., Lockhart S. M., Rathjen T., Albadawi H., Sorensen D., O'Neill B. T., Dwivedi N., Preil S. R., Beck H. C., Dunwoodie S. L., Watkins M. T., Rasmussen L. M. and Rask-Madsen C. **Insulin Downregulates the Transcriptional Coregulator CITED2, an Inhibitor of Proangiogenic Function in Endothelial Cells.** Diabetes. 2016; 65(12): 3680-3690.

Katare R., Caporali A., Zentilin L., Avolio E., Sala-Newby G., Oikawa A., Cesselli D., Beltrami A. P., Giacca M., Emanuelli C. and Madeddu P. **Intravenous gene therapy with PIM-1 via a cardiotropic viral vector halts the progression of diabetic cardiomyopathy through promotion of pro-survival signaling.** Circ Res. 2011; 108(10): 1238-1251.

Chen M., Yi B., Zhu N., Wei X., Zhang G. X., Huang S. and Sun J. **Pim1 kinase promotes angiogenesis through phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at Ser-633.** Cardiovasc Res. 2016; 109(1): 141-150.

Zróźnicowanie w budowie i funkcji naczyń limfatycznych; odniesienie do zespołu metabolicznego i chorób sercowo-naczyniowych

Magdalena Chudzik¹, Aleksandra Pendrasik, Krzysztof Bartkowiak¹, Mateusz Bartkowiak¹, Ewa Jankowska-Steifer²

¹Studenckie Koło Naukowe HESA, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Autor Korespondencyjny:

Ewa Jankowska-Steifer, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Streszczenie

Układ limfatyczny to nieodłączny element układu krążenia. Składa się on z narządów limfatycznych, tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową oraz naczyń limfatycznych. Naczynia limfatyczne stanowią system transportujący chłonkę z tkanek do układu żylnego. Ich funkcje to przede wszystkim aktywna regulacja ilości płynu śródmiąższowego w tkankach i narządach, absorpcja lipidów z przewodu pokarmowego, przenoszenie komórek prezentujących antygeny i limfocytów między przestrzeniami międzykomórkowymi, węzłami limfatycznymi a naczyniami krwionośnymi oraz udział w powstawaniu obrzęków czy zapaleń. Zmiany w ich obrębie mogą być przyczyną bądź towarzyszyć różnym stanom chorobowym, takim jak miażdżyca, otyłość, zespół metaboliczny, przerzuty nowotworowe, nadciśnienie tętnicze oraz zawał serca. Naczynia chłonne są zróźnicowane pod względem funkcji i hierarchii. Te o najmniejszej średnicy, naczynia limfatyczne włosowate (kapilary) rozpoczynają się ślepo w tkankach, są pozbawione błony podstawnej lub posiadają tylko niektóre z jej elementów. Specyficzna organizacja komórek śródbłonka umożliwia przedostawanie się płynu śródmiąższowego wraz z komórkami do naczyń włosowatego i formowanie chłonki. Kapilary przechodzą w naczynia przedzbiorcze, mające ciągłą błonę podstawną i zastawki, nie posiadają one jednak warstwy komórek mięśniowych gładkich. Najwyższym hierarchicznie rodzajem naczyń limfatycznych są naczynia zbiorcze, mające ciągłą błonę podstawną, zastawki i warstwę komórek mięśniowych gładkich. Naczynia przedzbiorcze transportują limfę do naczyń zbiorczych, a te przechodzą przez węzły chłonne i ostatecznie przewodem piersiowym dostarczają chłonkę do układu żylnego. Aby naczynia limfatyczne spełniały swoją funkcję, muszą być zarazem przepuszczalne, jak i zachowywać integralność umożliwiającą przepływ płynu. Takie cechy zapewniają im połączenia międzykomórkowe w śródbłonku kapilar i naczyń zbiorczych, które pomimo obecności podobnych białek znacznie różnią się od siebie. Śródbłonek kapilary charakteryzują tylko punktowo rozmieszczone połączenia "button-like junctions", przepuszczalne dla transportowanych płynów i komórek, natomiast w naczyniach zbiorczych komórki śródbłonka złączone są połączeniami ciągłymi "zipper-like junctions", warunkującymi zwartość i nieprzepuszczalność śródbłonka. Przez wiele lat nie doceniano roli naczyń limfatycznych w utrzymywaniu homeostazy organizmu. Było to spowodowane przede wszystkim brakiem odpowiednich markerów immunohistochemicznych, które umożliwiłyby skuteczną wizualizację naczyń limfatycznych. Sytuacja uległa zmianie w latach 90 XX. wieku, kiedy zidentyfikowano VEGFR-3 (ang. *Vascular endothelial growth factor receptor-3*), Prox-1 (ang. *Prospero homeobox protein 1*), PDPN (ang. *podoplanin*) i Lyve1 (ang. *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*), markery specyficzne dla naczyń limfatycznych. Dzięki temu zaczęto poznawać mechanizmy funkcjonowania tych naczyń w stanach chorobowych, co może okazać się istotne w opracowaniu sposobów leczenia wielu chorób i ograniczania śmiertelności spowodowanych schorzeniami takimi jak choroby układu sercowo-naczyniowego.

Słowa kluczowe: naczynia limfatyczne, zespół metaboliczny, choroby sercowo-naczyniowe

Abstract

Lymphatic system is the inseparable part of the circulatory system. It comprises of the lymphatic organs, lymphatic tissue related to the mucosa and the lymphatic vessels. Lymphatic vessels are the ducts transporting lymph from the tissues back again to the veins. Their function is mainly to actively

regulate the fluid balance in the tissues and organs, absorb lipids from the intestines, transport lymphocytes and antigen-presenting cells between intercellular matrix, lymph nodes and blood vessels and participate in the development of oedema and inflammation. Changes in the lymphatic vessels are either causes or results of diseases such as atherosclerosis, obesity, metabolic syndrome, metastases, hypertension or myocardial infarction. Lymphatic vessels are classified according to their functions and hierarchy. The smallest structures are the blind-ended capillaries. They have a discontinuous basal lamina and they provide a place where fluid and cells enter the lymphatic vessels and form lymph. When lymphatic vessels do have a continuous basal lamina and valves, they are called precollector vessels. Unlike the collector vessels they lack complete wall built of smooth muscle cells. Capillaries transport lymph to the precollectors, then to the collectors and throughout lymph nodes to the thoracic duct and eventually to the veins. To maintain their functions, lymphatic vessels have to be permeable but integrated in the same time, enough to provide the lymph flow. It is possible due to intercellular junctions which in spite of the content of the same protein in different size lymphatic vessels. Lymphatic endothelial cells (LECs) in capillaries are connected to each other by button-like junctions, discontinuous but permeable for fluid and (probably) cells. LECs in collectors are characterised by unpermeable and strongly integrated zipper-like junctions. Comparing to the blood vessels, the lymph vessels did not seem to be as interesting and were often ignored if thinking of the regulation of homeostasis. It was caused by the lack of the specific immunohistochemic marker which would make efficient visualisation of lymph vessels possible. Things changed in the 90s of the XX century when markers specific for LECs such as VEGFR-3, Prox-1, PDPN and Lyve1 were defined. Since then lymph vessels has become the subject matter of loads of studies. Even so, a lot about them still remains unknown. Exploring structure and functions of the lymphatic vessels, especially in the pathologies, should be priority and important because it can help with developing new therapies and reducing mortality due to diseases such as the cardiovascular diseases.

Keywords: lymphatic vessels, metabolic syndrome, cardiovascular diseases.

Wstęp

Naczynia limfatyczne tworzą rozbudowaną sieć, ważną dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Pełnią one kluczową rolę w utrzymywaniu równowagi płynu śródmiąższowego w tkankach i narządach, w przenoszeniu komórek układu odpornościowego między przestrzeniami międzykomórkowymi, węzłami limfatycznymi a naczyniami krwionośnymi, w tworzeniu się przerzutów nowotworowych oraz w transporcie lipidów (Schulte-Merker; Sabine et al. 2011). Naczynia limfatyczne po raz pierwszy zostały opisane w XVII wieku (Adamczyk, Gordon et al. 2016). W porównaniu z naczyniami krwionośnymi, są one znacznie słabiej poznane i scharakteryzowaną częścią układu krążenia. Identyfikacja markerów śródbłonna limfatycznego, takich jak Prox-1, podoplanina, Lyve1, znacznie przyspieszyła i ulepszyła badania nad naczyniami limfatycznymi w przeciągu ostatniej dekady.

Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy na temat naczyń limfatycznych, ich budowy w odniesieniu do prawidłowej funkcji oraz powiązanie dysfunkcyjnych naczyń limfatycznych z patogenezą zespołu metabolicznego oraz chorób sercowo-naczyniowych.

Materiał i metody

Analiza artykułów pochodzących z bazy PubMed (NCBI) z użyciem słów kluczowych: lymphatic capillaries, precollectors, collectors, Prox-1, Lyve1, metabolic syndrome, cardiovascular diseases, oedema oraz haseł MeSH: lymphatic capillaries, metabolic syndrome, cardiovascular diseases. Analizowano prace opublikowane do 2018 roku.

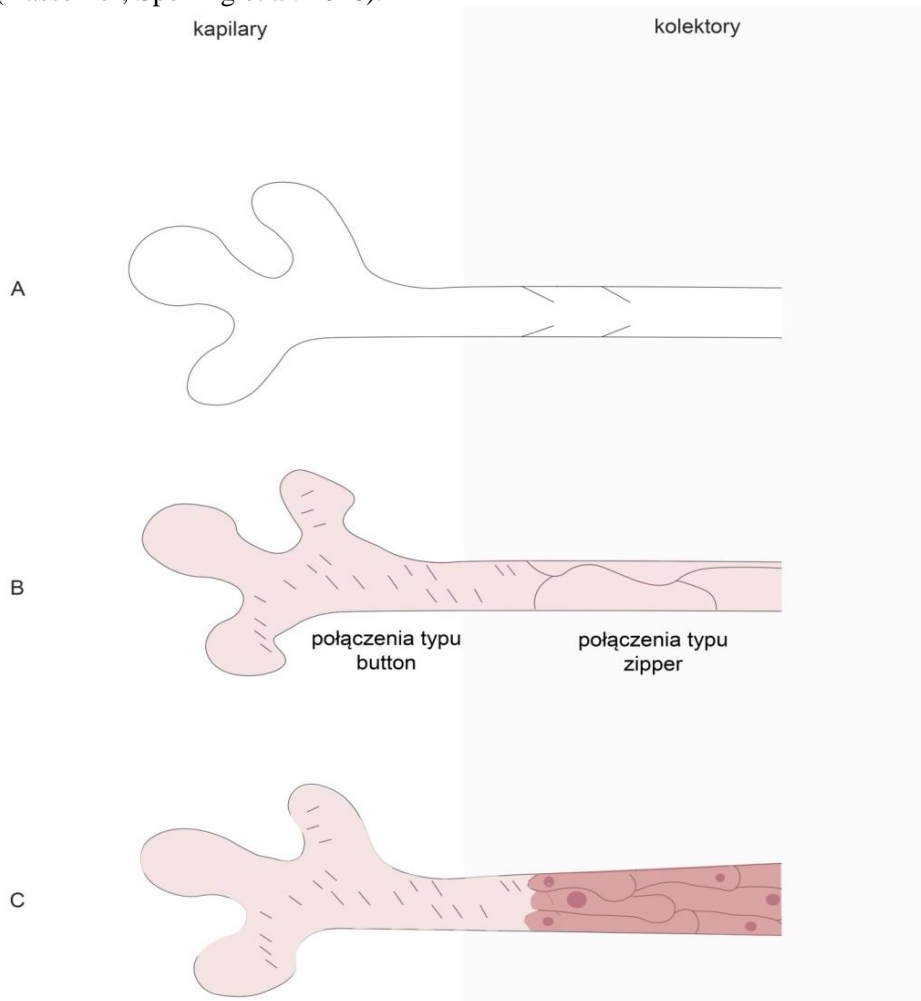
Budowa naczyń limfatycznych

Sieć limfatyczna występuje niemal w każdej unaczynionej strukturze, wyłączając szpik oraz ośrodkowy układ nerwowy (Aspelund et al. 2015). Naczynia limfatyczne kosmków jelitowych – naczynia limfatyczne centralne – spełniają także rolę w transporcie lipidów zawartych w spożywanym pokarmie i absorbowanych w jelicie cienkim (Alitalo 2011; Kesler, Liao et al. 2013). Ostatnio wykazano także rolę naczyń limfatycznych w przygotowaniu rozwijających się płuc płodu do wymiany gazowej po porodzie i zapobieganiu niewydolności oddechowej noworodków.

W trakcie filtracji zachodzącej w naczyniach krwionośnych włosowatych część osocza przedostaje się do przestrzeni międzykankowych. Podstawową funkcją naczyń limfatycznych jest transportowanie nadmiernej ilości płynu śródtkankowego z powrotem do krążenia ustrojowego i zapobieganie w ten sposób obrzękom oraz utrzymanie prawidłowego ciśnienia krwi. Płyn ten, zwany chłonką, jest zbierany przez kapilary limfatyczne i przenoszony poprzez naczynia przedzbiorcze do naczyń zbiorczych, a następnie transportowany do krążenia ustrojowego. Ściana naczyń zbiorczych zawiera warstwę komórek mięśniowych gładkich, które wraz z zastawkami zapewniają ciągły i jednostronny przepływ przez te naczynia. W trakcie powrotu do krążenia żylnego limfa, bogata w antygeny i komórki, trafia także do węzłów chłonnych, które są usytuowane na drodze naczyń limfatycznych, dzięki czemu możliwe jest sprawne funkcjonowanie układu odpornościowego. Antygeny są pobierane przez komórki dendrytyczne i prezentowane limfocytom w węzłach chłonnych. Błony śluzowe i skóra, miejsca mające duży kontakt z patogenami i antygenami obcego pochodzenia, mają bogatą sieć naczyń chłonnych, która umożliwia uruchomienie w szybki sposób procesów immunologicznych.

Naczynia limfatyczne są zróżnicowane pod względem budowy. Ściana naczyń limfatycznych włosowatych utworzona jest z komórek śródbłonna limfatycznego, LEC, (ang. *lymphatic endothelial cell*) kształtem przypominających liście dębu, czym w znaczący sposób różni się od budowy śródbłonna naczyń krwionośnych, BEC (ang. *blood endothelial cell*) (Dejana, Orsenigo et al. 2009). W przeciwieństwie do kapilar krwionośnych, naczynia włosowate limfatyczne pozbawione są perycytów, czyli komórek tkanki łącznej otaczającej naczynia krwionośne, oraz mają nieciągłą błonę podstawną umożliwiającą przechodzenie do światła naczynia komórek, takich jak komórki dendrytyczne. Komórki BEC charakteryzują się ciągłymi połączeniami typu „zipper”, natomiast komórki LEC łączą się ze sobą poprzez połączenia typu „button”, działające jak pierwotne zastawki (Yao L.-C, McDonald et al. 2014). Otwierając się i zamykając, przepuszczają one płyn śródmiąższowy oraz leukocyty do środka naczynia (ryc. 1B). W przeciwieństwie do naczyń krwionośnych, kapilary limfatyczne są mocno przytwierdzone do substancji międzykomórkowej za pomocą włókienek kotwiczących, które uczestniczą także w regulacji przepuszczalności śródbłonna. Limfa pojawiająca się w kapilarach jest transportowana do naczyń przedzbiorczych mających nieciągłą warstwę komórek mięśniowych gładkich, a następnie przechodzi do naczyń zbiorczych zawierających ciągłą warstwę miocytów gładkich, ciągłą błonę podstawną oraz połączenia typu „zipper” (ryc. 1C). Wraz z pojawieniem się naczyń przedzbiorczych i zbiorczych warstwa miocytów gładkich staje się coraz bardziej regularna, choć jej budowa jest

zaburzona w miejscach występowania zastawek. W ścianie naczyń można wyróżnić dwa rodzaje komórek mięśniowych gładkich, większość ma ciemną cytoplazmę, a jedynie część jasną (Hasselhof, Sperling et al. 2016). W ścianie dużych naczyń chłonnych znajdują się także komórki śródmiąższowe podobne do komórek Cajala, posiadające liczne rozgałęzienia i kaweole oraz elementy błony podstawnej (Hasselhof, Sperling et al. 2016; Briggs Boedtkjer, Rumessen et al. 2013). w ścianie większych naczyń zbiorczych występują także naczynia naczyń (vasa vasorum) (Hasselhof, Sperling et al. 2016).

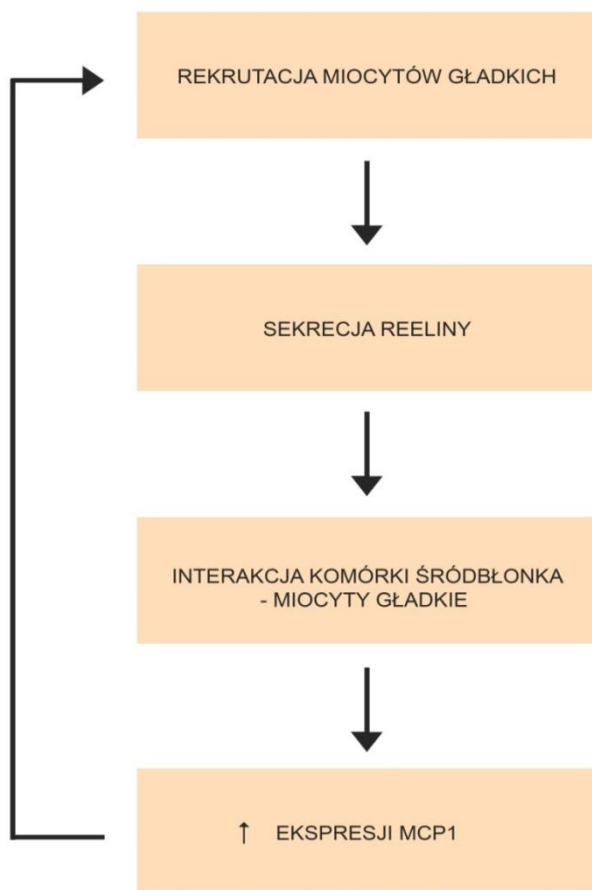


Rycina 1 Uproszczony schemat budowy naczyń limfatycznych. A. Naczynia limfatyczne dzielą się na kapilary, naczynia przedzbiorcze (niezaznaczone na rycinie) i naczynia zbiorcze. Na rycinie zaznaczone są zastawki w naczyniach zbiorczych. B. W kapilarach występują przepuszczalne połączenia typu „button”, w naczyniach zbiorczych ściśle połączenia typu „zipper”. C. Ściana kapilar- składa się tylko z LEC, natomiast ściana naczyń zbiorczych z LEC i komórek mięśniowych gładkich. Opracowanie własne.

Zróźnicowanie budowy naczyń limfatycznych umożliwia tworzenie i przepływ limfy. Połączenia typu „zipper” i „button” są zbudowane z VE-kadheryny, kludyny-5 oraz ZO-1 (ang. *Zonula occludens 1*) oraz ESAM (ang. *Endothelial cell-selective adhesion molecule*), JAM-A (ang. *Junctional adhesion molecule-A*), PECAM-1/CD31 (ang. *Platelet endothelial cell adhesion molecule*) oraz JAM-C (ang. *Junctional adhesion molecule-C*). Śródbłonek naczyń zbiorczych, których funkcją

jest transport chłonki na dużą odległość, posiada ścisłe połączenia typu „zipper”, które zbudowane są z tych samych białek, co połączenia typu „button”, jednak kluczowa różnica pomiędzy nimi dotyczy ułożenia przestrzennego tych białek i tym samym budowy morfologicznej połączenia (Baluk, Fuxe et al. 2007). Struktura i funkcja błony podstawnej naczyń limfatycznych jest ciągle badana ze względu na jej potencjalny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie naczyń chłonnych. Jednym z pierwszych dokładniej poznanych i specyficznych dla naczyń limfatycznych składników błony podstawnej jest reelina, białko macierzy pozakomórkowej, pierwotnie związane z rozwojem układu nerwowego. Reelina wykazuje ekspresję zarówno podczas rozwoju naczyń chłonnych jak i w już ukształtowanych naczyniach. Jest ona wytwarzana przez komórki LEC, zwłaszcza naczyń przedzbiorczych i zbiorczych. Wydzielanie i obróbka proteolityczna reeliny zachodzi dzięki obecnym w pobliżu naczynia komórkom mięśniowym gładkim. Wydaje się, że sygnalizacja za pomocą reeliny jest aktywowana przez oddziaływanie między dwoma typami komórek formujących naczynia zbiorcze. Komórki LEC w odpowiedzi na podwyższone stężenie reeliny w macierzy międzykomórkowej zwiększają wydzielanie MCP1 (ang. *Monocyte chemotactic protein 1*), czynnika stymulującego migrację i proliferację komórek mięśniowych gładkich. Zatem reelina wraz z komórkami mięśniowymi gładkimi jest istotnym czynnikiem wpływającym na tworzenie się ściany naczyń zbiorczych (ryc. 2) (Lutter, Xie et al. 2012).

Odróżnianie na podstawie morfologii naczyń limfatycznych w tkankach nie jest łatwe. Markery takie jak: CD31, CD34, czynnik von Willebrandta, lektyna, trombomodulina, endogлина i Fli-1 (ang. *Friend leukemia integration 1 transcription factor*) wykazują ekspresję we wszystkich śródbłonkach, limfatycznych i krwionośnych. Istnieje niewiele znaczników umożliwiających rozróżnienie typu naczynia. Kapilary można odróżnić od naczyń zbiorczych dzięki ich wysokiej ekspresji Lyve1 oraz chemokiny CCL21 (ang. *Chemokine (C-C motif) ligand 21*). Cechą charakterystyczną naczyń zbiorczych jest niższy poziom ekspresji Lyve1 oraz białka CCR7 (ang. *C-C chemokine receptor type 7*), gdyż w warunkach fizjologicznych śródbłonek tych naczyń nie przepuszczają komórek i płynu tkankowego. Podczas procesu zapalnego naczynia zbiorcze stają się przepuszczalne, przede wszystkim dla makrofagów związanych z tkanką tłuszczową oraz dla komórek dendrytycznym. Cechą charakterystyczną naczyń limfatycznych zbiorczych są zastawki, ułatwiające jednostronny ruch limfy. Komórki śródbłonek tworzące zastawki naczyń limfatycznych, podobnie jak i naczyń żylnych są wrzecionowate i wykazują ekspresję specyficznych cząsteczek, takich jak czynnik transkrypcyjny Foxc2 (ang. *Forkhead box protein C2*) i GATA2 (ang. *GATA binding protein 2*) oraz integryna-alfa9, które są niezbędne do powstania zastawek. Komórki zastawek wykazują również silną ekspresję Prox-1, koneksyny 37, aktywny szlak sygnałowy NFATc1/kalcyneuryna (NFATc1 ang. *Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*), natomiast ekspresja Lyve1 jest w nich niska.



Rycina 2 Schemat przedstawia szlak sygnalizacji związanej z reeliną, który ma wpływ na formowanie się naczyń zbiorczych. Reelina jest produkowana przez komórki LEC, i pod wpływem komórek mięśniowych gładkich wydzielana jest do przestrzeni międzykomórkowej. Reelina indukuje ekspresję MCP1 przez komórki LEC, czynnika, który wpływa na rekrutację miocytów gładkich (Lutter, Xie et al. 2012).

Opracowanie własne

Ponieważ brak jest wyraźnego rozgraniczenia między naczyniami limfatycznymi włosowatymi a zbiorczymi wyróżnia się znajdujące się między nimi, naczynia przedzbiorcze, posiadające zarówno cechy naczyń początkowych, jak i zbiorczych. Naczynia przedzbiorcze zawierają zastawki i wykazują ekspresję Lyve1. Liczba komórek mięśniowych gładkich w ich ścianie jest niewielka. Naczynia te wytwarzają niedużą ilość podoplaniny, ale znaczną ilość chemokin, oraz receptorów chemokinowych, takich jak CCL27 i nietypowy receptor DARC (ang. *Duffy antigen receptor for chemokines*) (Ulvmar, Mäkinen et al. 2016; Wick et al. 2007).

Naczynia limfatyczne i krwionośne opierają się na zupełnie innym mechanizmie działania. Układ krwionośny funkcjonuje pod wysokim ciśnieniem jako obieg zamknięty, który rozprowadza krew po całym organizmie, a napędzany jest przez

pracę serca, natomiast układ limfatyczny jest jednokierunkowym systemem działającym pod niskim ciśnieniem i pasywnie w stosunku do układu krwionośnego. Sieć chłonna rozpoczyna się ślepo w tkankach, by przywrócić ponownie do układu krwionośnego przesącz tkankowy bogaty w białka oraz lipidy. Tak jak naczynia krwionośne, większe naczynia limfatyczne charakteryzują się ciągłą błoną podstawną i zastawkami, które pomagają utrzymać jednokierunkowy przepływ krwi czy limfy, a w rozwoju i przebudowie obu typów naczyń, limfatycznych i krwionośnych, biorą udział podobne cząsteczki sygnałowe.

Istnieje wiele czynników, zarówno zewnętrznych, jak i wewnętrznych, warunkujących przepływ limfy w naczyniach chłonnych (Scallan, Zawieja et al. 2016). Są to: pulsacja wynikająca z przepływu tętniczego, skurcze mięśni szkieletowych, a w odcinku jelitowym także skurcze mięśni gładkich przewodu pokarmowego. Automatyzm przepływu chłonki jest utrzymywany także przez skurcze warstwy mięśniowej naczyń zbiorczych. Wszystkie te czynniki wpływają bezpośrednio na postępujący i jednostronny przepływ chłonki, natomiast zastawki działają w sposób pośredni, uniemożliwiając cofanie się limfy. Naczynia zbiorcze są złożone z wielu jednostek pompujących, zwanych limfangionami, z których każdy posiada zastawkę wpuszczającą i wypuszczającą limfę z poszczególnego segmentu. Wraz z warstwą miocytów gładkich stanowią one główny mechanizm jednostronnego przepływu limfy przez naczynia limfatyczne. Autonomiczne skurcze są zależne od czynników wewnętrznych i zewnętrznych, wśród których można wymienić tempo tworzenia się limfy, kompresję zależną od skurczu mięśni, ciśnienie płynu tkankowego, przepływ limfy oraz mediatory zapalne. Kluczową rolę w tej regulacji odgrywa tlenek azotu (NO, ang. *Nitric acid*) (Breslin 2014). Relaksacja komórek mięśniowych gładkich przez NO pozwala na wypełnienie limfangionu w fazie rozkurczowej, by przygotować każdy segment na następujący skurcz. Gdy brak gradientu ciśnienia między zastawkami związanymi z jednym limfangionem, zastawki pozostają zazwyczaj otwarte, natomiast w sytuacji, gdy ciśnienie odpływającej chłonki jest wyższe niż ciśnienie przyływającej chłonki do limfangionu, zastawki limfatyczne zamykają się w mechanizmie podobnym do mechanizmu działania zastawek w cyklu pracy serca. W naczyniach limfatycznych panuje niskie ciśnienie parcjalne tlenu cząsteczkowego w porównaniu do otaczających tkanek, co wskazuje na wysoką aktywność metaboliczną naczyń zbiorczych i sugeruje aktywną naturę wielu procesów w nich zachodzących.

Tlenek azotu jest produkowany przez trzy izoformy syntazy tlenu azotu. W naczyniach limfatycznych największa rola przypada na eNOS (ang. *Endothelial nitric oxide synthase*), podlegającą ekspresji w naczyniach zbiorczych i pełniącą również kluczową rolę w limfangiogenezie zależnej od mediatora VEGF-C (ang. *Vascular endothelial growth factor C*). Siła ścinająca spowodowana szybkim przepływem limfy indukuje eNOS w komórkach śródbłonna limfatycznego. Krótki okres półtrwania tego gazu sprawia, że tworzy się gradient stężeń NO, istotny dla procesu skurczu i rozkurczu naczyń limfatycznych. Mała siła ścinająca zmniejsza wydzielanie NO, miocyty się kurczą, i cały cykl ulega powtórzeniu. Miocyty naczyń limfatycznych myszy z zablokowanym genem dla eNOS kurczą się z mniejszą siłą, lecz większą częstotliwością, by skompensować mniej efektywny skurcz. Para-

doksalnie, inhibicja eNOS skutkuje większą średnicą naczyń limfatycznych, co sugeruje, że w procesie transportu limfy biorą udział również inne czynniki regulujące, między innymi produkty rozpadu kwasu arachidonowego, odpowiadające za spontaniczne skurcze miocytów, acetylocholina rozluźniająca błonę mięśniową, histamina zwiększająca częstość, ale zmniejszająca amplitudę skurczów oraz serotonina zmniejszająca częstość skurczów. Poprzez produkcję NO i prostaglandyn, aktywowane makrofagi również odgrywają rolę w pracy komórek mięśniowych gładkich. VEGF-C, działając poprzez receptor VEGFR3, nasila przemieszczanie limfy w naczyniach limfatycznych poprzez zwiększenie ilości jonów wapnia oraz indukcję eNOS. Kolejna izoforma syntazy tlenu azotu - iNOS (ang. *Inducible nitric oxide synthase*) – wykazuje ekspresję w otaczających naczynia limfatyczne komórkach układu immunologicznego, i w warunkach fizjologicznych nie występuje w komórkach LEC. W stanie zapalnym iNOS wpływa jednak miejscowo na kurczliwość błony mięśniowej naczyń poprzez obecność w przedostających się do objętej stanem zapalnej tkanki makrofagów, które produkują NO oraz poprzez ekspresję tego enzymu również w komórkach LEC. Zablokowanie iNOS powoduje utrzymanie działania naczyń limfatycznych poprzez działającą eNOS, jednak zapobiega miejscowemu rozluźnieniu błony mięśniowej, pomocnemu w stanie zapalnym.

Naczynia limfatyczne w sercu

Naczynia limfatyczne w sercu człowieka występują we wszystkich warstwach jego ściany: podnasierdziowo, w śródsierdziu oraz podwiersdziowo. Kapilary limfatyczne rozpoczynają się ślepo pod wsierdziem i transportują limfę do nasierdzia, gdzie znajduje się sieć naczyń zbiorczych, mających zdolność aktywnego transportu limfy do dalszej części naczyń limfatycznych. W sercu wyróżniamy dwa główne naczynia chłonne: jedno biegnie wzdłuż lewej żyły wieńcowej, do lewej części pnia płucnego i śródsierdzia, a drugie towarzyszy żyłom sercowej lewej (u ludzi żyłom marginalnej lewej), następnie zatoce wieńcowej, i lewemu przedsionkowi do śródpiersia. Zastawki naczyń limfatycznych w sercu, tak jak w pozostałych częściach układu limfatycznego w innych tkankach i narządach, zapewniają jednostronny przepływ limfy i zapobiegają cofaniu się jej w obrębie naczyń. Komory zawierają więcej naczyń limfatycznych w porównaniu z przedsionkami. Naczynia limfatyczne występują także w zastawkach sercowych i pełnią w nich potencjalnie ważną rolę. Gdy przepływ limfy w sercu jest upośledzony, pojawia się gęstsza sieć limfatyczna w zastawce mitralnej (w zastawce trójdzielnej brak naczyń limfatycznych u człowieka) (Huang, Lavine et al. 2017).

Od pewnego czasu uważa się, że naczynia limfatyczne w sercu są kluczowe dla jego prawidłowej funkcji, jednak dopiero od niedawna naczynia te zaczęto postrzegać jako przydatny cel w leczeniu chorób serca. Nowe badania sugerują, że bardziej rozwinięta sieć chłonna powstała w wyniku limfangiogenezy oraz ich większa sprawność znacznie ułatwiają naprawę uszkodzonej tkanki oraz zapobiegają przebudowie uszkodzonego serca (Huang, Lavine et al. 2017). Tak jak większość narządów, również serce wykorzystuje naczynia limfatyczne do zachowania równowagi płynu ustrojowego w przestrzeniach śródmiąższowych. Podczas rozkurczu komory serca napełniają się krwią, a wzrastające ciśnienie wewnątrz komór wypycha

limfę z naczyń znajdujących się pod wsierdziem do śródsierdzia, natomiast podczas skurczu chłonka jest przenoszona dalej do nasierdzia. Gdy spada siła skurczu serca, niewystarczające ciśnienie wewnątrzkomorowe powoduje obrzęk, który skutkuje zwiększonym ciśnieniem śródmiąższowym i zaburzoną pracą serca wynikającą z większej sztywności jego ścian. Nawet niewielka zmiana w ciśnieniu śródmiąższowym w sercu może skutkować znacznym obniżeniem jego sprawności.

Siły osmotyczne również biorą udział w utrzymaniu równowagi płynów ustrojowych w sercu. Podczas normalnej pracy serca, stężenie białek onkotycznych w płynie tkankowym jest znacznie mniejsze niż w osoczu, co powoduje przesunięcie wody do światła naczyń krwionośnych. W trakcie stanu zapalnego białka te przechodzą do tkanek co powoduje wzrost ciśnienia osmotycznego między komórkami serca i jeszcze bardziej zwiększa obrzęk wytworzony w tym narządzie.

Niedokrwienie mięśnia sercowego, brak wystarczającej ilości tlenu dostarczonego do kardiomiocytów, szybko skutkuje ich śmiercią. W międzyczasie w sercu tworzy się obrzęk, spowodowany zwiększoną przepuszczalnością i większym tempem filtracji osocza niż przepływu limfy oraz rozkurczem naczyń limfatycznych. (Aspelund, Robciu et al. 2016). Podobnie do obrzęku limfatycznego skóry, obrzęk sercowy prowadzi do zwłóknienia narządu, manifestowanego zwiększoną produkcją kolagenu typu I i III przez fibroblasty. W obszarze objętym przez zawał sygnały prozapalne rekrutują neutrofile w przeciągu jednego dnia, a następnie do mięśnia sercowego migrują monocyty/makrofagi. W ciągu 3 dni po uszkodzeniu zjawiają się makrofagi Ly6c^{hi}, usuwają nekrotyczne resztki komórkowe, i zamieniają się następnie w makrofagi Ly6c^{lo} biorące udział w zabliznianiu się rany. Produkują one cytokiny, między innymi te, które mają działanie przeciwzapalne (IL-10 i IL-13) oraz indukują wydzielanie kolagenu przez fibroblasty. Powstająca blizna łącznotkankowa kompensuje utratę kardiomiocytów i działa na zasadzie rusztowania dla mięśnia sercowego, ale ma także negatywne skutki – utrudnia odpływ płynu śródmiąższowego, zaburza pracę kardiomiocytów i przyczynia się do odwróconej przebudowy komór serca.

Układ limfatyczny pełni istotną rolę w przebiegu zawału mięśnia sercowego. Ostatnie badania wykazały znaczną przebudowę naczyń limfatycznych podczas schorzeń sercowo-naczyniowych. Podczas niedokrwienia serca naczynia limfatyczne stają się dysfunkcyjne, co prowadzi do przewlekłego obrzęku serca i pogarsza stan kardiomiocytów. Co prawda zauważona została limfangiogeneza zachodząca w konsekwencji przebytego zawału mięśnia sercowego, jednakże powstające naczynia chłonne tworzą poszerzoną, krętą i zdezorganizowaną sieć. Poprawa integralności ściany naczyń chłonnych pozostaje teraz nowym wyzwaniem dla biologii naczyniowo-sercowej. Zarówno VEGF-A, jak i VEGF-C okazały się nieskuteczne w poprawie funkcji naczyń limfatycznych po zawale serce. Fosforan sfingozyny 1, S1P (ang. *Sphingosine-1-phosphate*) stał się ostatnio czynnikiem uważanym za obiecujący w poprawie stanu sieci chłonnej w niedokrwionym sercu. Ponadto, ostatnie badania dowodzą, że peptyd apelina, APLN (ang. *apelin*) jest kluczowym czynnikiem wpływającym na układ limfatyczny w sercu. Jednym z dowodów potwierdzających jest fakt, że receptory APJ (ang. *apelin receptor*) dla apeliny pojawiają się na komórkach śródbłonka limfatycznego w niedokrwionym

sercu, podczas gdy nie znaleziono ich w komórkach LEC w prawidłowo funkcjonującym sercu. Apelina wykazuje plejotropowe działanie, ułatwiając kurczliwość kardiomiocytów, stymulując angiogenezę, obniżając ciśnienie krwi oraz redukując stan zapalny. Hipoksja indukuje produkcję apeliny przez komórki LEC i, być może, kardiomiocyty i mimo że destabilizuje połączenia komórek śródbłonka oraz zwiększa przepuszczalność, apelina kompensuje to działanie, poprawiając integralność tych komórek. Białko to reguluje również sekrecję S1P uszczelniającego połączenia zamykające. W związku z tym, terapia bazująca na wykorzystaniu apeliny w połączeniu z VEGF-C mogłaby służyć jako ciekawa strategia zachowania prawidłowego mikrośrodowiska serca (Tatin, Renaud-Gabardos et al. 2017).

Rozwój naczyń limfatycznych

Naczynia limfatyczne zaczynają się tworzyć w 6-7 tygodniu rozwoju płodowego u człowieka i w 9,5-10,5 dniu rozwoju płodowego u myszy, wkrótce po rozpoczęciu funkcjonalnego rozwoju układu sercowo-naczyniowego. Komórki tworzące naczynia limfatyczne częściowo rozwijają się z układu żylnego, lecz część z nich ma również inne, ciągle badane pochodzenie. Część komórek śródbłonka wywodzących się z żyły głównej przedniej nabywa ekspresję czynnika transkrypcyjnego Sox18 (ang. *SRY-related HMG-box 18*), mającego znaczący wpływ na rozwój naczyń krwionośnych i układu sercowo-naczyniowego. Następnie czynniki Sox18 i Prox-1 wspólnie inicjują proces różnicowania komórek śródbłonka limfatycznego. COUP-TFII (ang. *COUP transcription factor 2*) wspiera ekspresję genu Prox-1 (François et al. 2008, Srinivasan et al. 2010). Synteza Prox-1 w komórkach śródbłonka żylnego w 9.75 dniu rozwoju myszy jest kluczowa dla ich specyfikacji limfatycznej. Po rozpoczęciu ekspresji Prox-1 wybrane komórki śródbłonka zaczynają syntetyzować VEGFR-3, który wraz ze swoim ligandem, VEGF-C, umożliwia tworzenie woreczków limfatycznych, migrację, odgałęzianie się i przeżycie komórek LEC (Alitalo 2011; Karkkainen et al. 2004). Koreceptor VEGF-C, neuropilina-2 oraz ligand dla receptora o aktywności kinazy tyrozynowej, efryna-2, są istotne dla prawidłowego „odpączkowania” naczyń limfatycznych ze ściany woreczków (Alitalo 2011; Xu et al. 2010; Mäkinen et al. 2005). Powstawanie naczyń limfatycznych z woreczków jest zwane limfangiogenezą. Nowo utworzone naczynia limfatyczne wydłużają się i rozgałęziają, wytwarzając splot limfatyczny. W miarę rozwoju naczyń chłonnych ich połączenia z naczyniami krwionośnymi zanikają, z wyjątkiem tych, które umożliwiają chłonce powrót do naczyń żylnych. Dzieje się to dzięki okluzji spowodowanej agregatami płytkowymi, tworzącymi się w wyniku kontaktu krwi z podoplaniną wytwarzaną w komórkach LEC. Podoplanina, transbłonowa glikoproteina poprzez oddziaływanie z CLEC-2 (ang. *C-type lectin domain family 1*) na powierzchni trombocytów umożliwia ich agregację i przyczynia się do oddzielenia naczyń krwionośnych od naczyń żylnych (Uhrin et al. 2010).

Czynniki wpływające na naczynia limfatyczne

Liczne czynniki wzrostu wpływają na rozwój i funkcjonowanie naczyń limfatycznych. Odkryto wiele genów odpowiedzialnych za poszczególne etapy rozwoju naczyń chłonnych, na które składają się przynależność komórek śródbłonka do układu limfatycznego, migracja, proliferacja, separacja oraz przebudowa i dojrze-

wanie naczyń chłonnych. Genami takimi są FOXC2, FLT4 czy CCBE1 (ang. *Collagen And Calcium Binding EGF Domains 1*). Ostatnie badania *in vitro*, jak i *in vivo* wskazują także na rolę miRNA w regulacji różnicowania się komórek LEC z komórek śródbłonna żylnego.

Komórki śródbłonna chłonnego wykazują ekspresję specyficznych cząsteczek, takich jak Prox-1, Lyve1, Foxc2, angiopoetyna-1, VEGFR-3, podoplanina, neuropilina-2, CCL21, receptor D6, akwaporyna-1. Neuropilina-2, CCL21, Foxc2, receptor D6 i akwaporyna-2 nie są natomiast markerami charakterystycznymi wyłącznie dla śródbłonna. Innymi cząstkami charakterystycznymi dla LEC są wimentyna i CCBE-1.

Prox-1, podlegające ekspresji w komórkach śródbłonna pod wpływem Sox18, jest jednym z pierwszych czynników przynależności do naczyń limfatycznych, niezbędnym do ich dalszego rozwoju. Prox-1 jest kluczowy dla limfangiogenezy, gdyż kontroluje inne geny odpowiedzialne za rozwój naczyń chłonnych. Wraz z COUP-II, czynnik transkrypcyjny Prox-1 indukuje ekspresję wielu innych genów charakterystycznych dla układu chłonnego i jednocześnie hamując ekspresję markerów związanych z naczyniami krwionośnymi.

Glikoproteina Lyve1 również zapewnia komórkom śródbłonna nabycie kompetencji limfatycznej, choć jej obecność nie jest konieczna dla rozwoju naczyń limfatycznych. Marker ten podlega ekspresji także w aktywnych makrofagach.

Kolejnym białkiem ważnym dla rozwoju naczyń limfatycznych jest czynnik transkrypcyjny Foxc2, regulujący ekspresję licznych genów odpowiedzialnych za powstawanie naczyń włosowatych, przedzbiornych i zbiornych. Wraz z Prox-1, Foxc2 umożliwia formowanie się zastawek zapewniających jednokierunkowy przepływ limfy, ponadto w procesie powstawania zastawek dużą rolę odgrywa także sama chłonka przepływająca przez pierwotne naczynia. Delecja bądź mutacje genu Foxc2 skutkują nieregularnym rozmieszczeniem komórek mięśniowych gładkich oraz błony podstawnej w obrębie ściany naczyń zbiornych i uniemożliwiają rozwój zastawek limfatycznych. Zmniejszony poziom Foxc2 w obrębie naczyń limfatycznych, również w okolicy zastawek, wiąże się z powstawaniem koneksyny o nieprawidłowej budowie, co przekłada się na osłabienie funkcji naczyń limfatycznych (Kanady et al. 2011, Ferrell et al. 2010). Mutacje w obrębie Foxc2 są związane z zespołem obrzęk limfatyczny-podwójny rząd rzęs, charakteryzującym się nieprawidłową budową naczyń limfatycznych, obrzękiem limfatycznym kończyn i okolicy barkowej, a także podwójnym rzędem rzęs. Co więcej, u ludzi z defektem Foxc2 również zastawki żyłne mają nieprawidłową budowę, i mimo że za ich powstawanie odpowiada przede wszystkim Efryna-2, to w późniejszym okresie w zastawkach żylnych stwierdza się aktywność wielu czynników odpowiadających również za limfangiogenezę, co sugeruje podobne mechanizmy molekularne w rozwoju zastawek żylnych i limfatycznych (Mellor et al. 2007, Bazigou, Lyons et al. 2011).

Cząsteczki angiopoetyny-1 natomiast stymulują postnatalny rozwój, przebudowę i dojrzewanie naczyń chłonnych. Angiopoetyna-1 wpływa na odgałęzianie się naczyń limfatycznych, a brak angiopoetyny-2 w czasie rozwoju płodowego skutkuje

nieprawidłowym dojrzewaniem naczyń zbiorczych. Zahamowanie genu kodującego ten czynnik skutkuje jelitowym obrzękiem limfatycznym.

Cząsteczka Efryny-2 pełni ważną rolę podczas przebudowy pierwotnego splotu limfatycznego w naczynia chłonne o hierarchicznej budowie. Defekt Efryny-2 wywołuje niewłaściwy przebieg procesu przebudowy naczyń i tworzenia zastawek chłonnych.

Cząsteczki należące do rodziny VEGF silnie pobudzają limfangiogenezę i angiogenezę. W jej skład wchodzi PIGF (ang. Placenta growth factor), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i VEGF-E. VEGF-A, C i D stymulują limfangiogenezę: VEGF-A poprzez łączenie się z receptorem VEGFR-1 i VEGFR-2, natomiast VEGF-C i VEGF-D z receptorem VEGFR-3 i po obróbce również z VEGFR-2. Receptor VEGFR-1 występuje głównie w BEC i jego pobudzenie prowadzi do angiogenezy, zaś receptor VEGFR-3 obecny jest w LEC i uczestniczy w limfangiogenezie, a VEGFR-2 może występować w obu rodzajach komórek śródbłonna. VEGFR-3 jest receptorem kluczowym dla procesu limfangiogenezy. Pierwszym odkrytym ligandem wiążącym się z tym receptorem był VEGF-C. Myszy nieposiadające tego receptora umierają przed porodem z powodu niewykształconych naczyń limfatycznych. Kolejnym ligandem wiążącym się z VEGFR-3 jest VEGF-D. Nadekspresja VEGF-C i D u transgenicznych myszy prowadzi do zwiększonej limfangiogenezy. Wymienione czynniki wzrostu są również zaangażowane w utrzymanie prawidłowej budowy naczyń limfatycznych w życiu dorosłym (Jones 2011).

VEGF-A jest silnym induktorem procesu angiogenezy, lecz ostatnie badania wskazują na jego udział także w procesie limfangiogenezy (Jones 2011). Miejscowa iniekcja adenowirusów z VEGF-A do ucha myszy powodowała lokalny i ogólnoustrojowy rozrost naczyń limfatycznych (Nagy et al. 2002, Jones et al. 2010). W dodatku utrzymujący się stan zapalny indukował produkcję VEGF-A, co powodowało limfangiogenezę (Halin et al. 2007). Nie jest jasne, czy efekty te zachodzą w wyniku bezpośredniego oddziaływania VEGF-A z receptorem, czy też pośrednio poprzez rekrutację kolejnego typu komórek bądź zwiększenie ekspresji VEGF-C lub/i VEGF-D. Jednakże udokumentowano, że blokada VEGFR-2 bądź VEGF-A skutkowałą zahamowaniem zależnego od VEGF-A procesu tworzenia się naczyń limfatycznych (Hong et al. 2004). Badania wykazały również, że VEGF-A oddziałuje poprzez PLC γ (ang. *Phospholipase C γ*), a VEGF-C uruchamia ścieżkę sygnałową Akt (Jones 2011).

Oprócz dobrze scharakteryzowanej rodziny VEGF, wiele innych czynników również ma wpływ na proces limfangiogenezy. Cząsteczkami tymi są IGF (ang. *Insulin-like growth factor*)_{1, 2} (Bjorndahl et al. 2005), FGF2 (ang. *Fibroblast growth factor 2*) (Chang et al. 2004), PDGF (ang. *Platelet-derived growth factor*) (Cao et al. 2004), HGF (ang. *Hepatocyte growth factor*) (Cao et al. 2006), Ang1 (ang. *Angiopoietin 1*) (Morisada et al. 2005). Dodatkowo czynniki, takie jak TNF- α (ang. *Tumor necrosis factor alfa*) (Tammela et al. 2005) i LT- α (ang. *Lymphotoxin alfa*) również wykazują działanie limfangiogenne (Baluk et al. 2009). Ponadto wpływ na limfangiogenezę mają nietypowe cząsteczki, takie jak netryna-4 (Mounzer et al. 2010), odpowiedzialna za rozgałęzianie się aksonów, adrenomedulina (Larrieu-

Lahargue et al. 2010) i endotelina (Fritz-Six et al. 2008), regulatory ciśnienia krwi czy hormony, takie jak LH (ang. *Luteinizing hormone*), FSH (ang. *Follicle-stimulating hormone*) (Spinella et al. 2009) i GH (ang. *Growth hormone*). Niektóre z nich wywołują określony efekt bezpośrednio, a inne pośrednio, przykładowo poprzez zwiększenie ekspresji VEGF-C. IFN- γ (ang. *Interferon gamma*), TGF- β (ang. *Transforming growth factor β*) (Avraham et al. 2010, Clavin et al. 2008, Oka et al. 2008) i trombospondyna-1 (Cursiefen et al. 2011) hamują limfangiogenezę. Mechanizm molekularny działania TGF- β pozostaje nieznany, natomiast IFN- γ hamuje ekspresję Prox-1 i innych genów odpowiedzialnych za limfangiogenę, natomiast trombospondyna-1, wiążąc się z receptorem CD36 na monocytach, hamuje wydzielanie VEGF-C/D.

Obrzęki

Zmiany w obrębie naczyń limfatycznych prowadzą do trwałych obrzęków, wynikających z gromadzenia się nadmiernej ilości płynu śródmiąższowego w tkankach. Wraz z upływem czasu obrzęki te skutkują obniżoną odpowiedzią immunologiczną organizmu. Wrodzone choroby, infekcje pasożytnicze, limfadenektomia i pooperacyjna radioterapia pacjentów onkologicznych są główną przyczyną zaburzonego funkcjonowania naczyń limfatycznych. Ponadto, guzy złośliwe mogą oddziaływać na lokalne węzły chłonne, umożliwiając w ten sposób inwazję i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych.

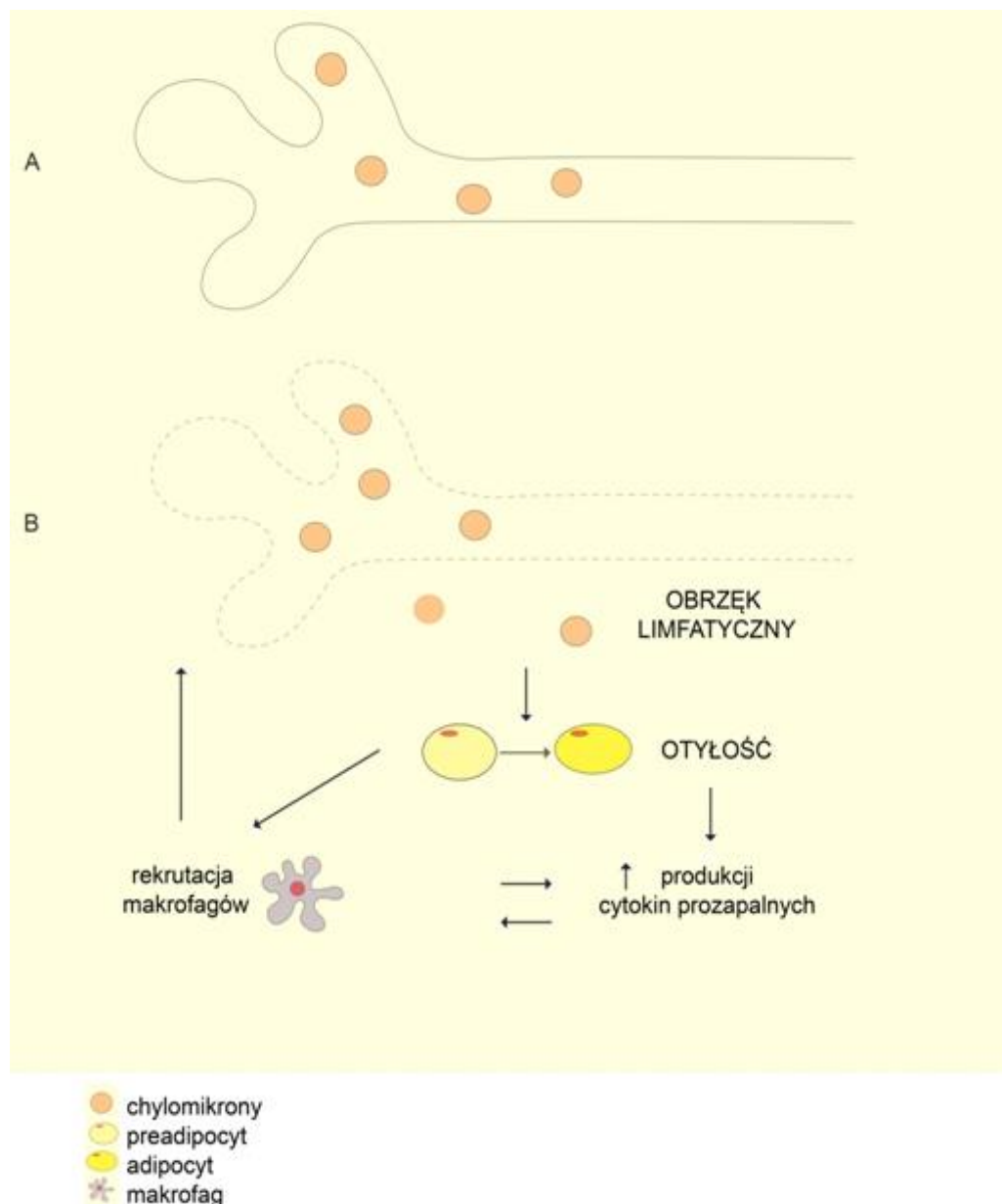
Obrzęk limfatyczny możemy podzielić na pierwotny i wtórny (Jones 2011). Obrzęki pierwotne są związane z dysfunkcjami genetycznymi skutkującymi nieprawidłową budową naczyń limfatycznych. Najstarszym znanym zaburzeniem zakwalifikowanym do obrzęku limfatycznego pierwotnego jest choroba Milroya, spowodowana mutacją w genie dla VEGFR-3. Myszy z taką mutacją wykazują nieprawidłową budowę naczyń limfatycznych skóry i objawy charakterystyczne dla obrzęku limfatycznego. Obrzęk wtórny występuje znacznie częściej. Jest on spowodowany usunięciem węzłów chłonnych bądź uszkodzeniem naczyń limfatycznych. Obecnie nie ma skutecznej metody leczenia obrzęku limfatycznego, natomiast ćwiczenia, masaże, ograniczenie spożywania tłuszczów, stosowanie kompresów, liposukcja i dbanie o skórę mogą jedynie pomóc w jego zwalczaniu. Terapia czynnikami wzrostu może być przydatna w leczeniu obrzęku limfatycznego wtórnego spowodowanego uszkodzeniem naczyń w wyniku operacji, infekcji czy radioterapii. Badania przedkliniczne wykorzystujące adenowirusy, wirusy związane z adenowirusami bądź nagie plazmidy zawierające VEGF, jak i samą cząsteczkę VEGF-C wykazały powstawanie nowych naczyń limfatycznych a po pewnym czasie redukcję obrzęku. Połączenie terapii VEGF-C z transplantacją węzłów chłonnych w mysim modelu obrzęku limfatycznego kończyn dolnych doprowadziło do tworzenia nowych połączeń węzłów limfatycznych z istniejącymi wcześniej naczyniami limfatycznymi, zarówno aferentnymi, jak i eferentnymi (Alitalo 2011). Zgodnie z założeniem, że do prawidłowego funkcjonowania naczynia limfatyczne potrzebują ciągłego przepływu limfy, sama transplantacja węzłów chłonnych bez terapii czynnikami wzrostu VEGF-C i D prowadziła do inwolucji węzłów chłonnych i zastępowania grudek limfatycznych tkanką łączną i tłuszczową. Nowoczesne terapie wykorzystujące VEGF-C i VEGF-D wydają się być obiecujące

w leczeniu obrzęku limfatycznego, potrzebne są jeszcze jednak dalsze badania potwierdzające skuteczność takiej terapii.

U dorosłych limfangiogeneza pojawia się przede wszystkim podczas ostrego bądź przewlekłego zapalenia, rozwoju guzów nowotworowych bądź podczas procesu regeneracji tkanek.

Zespół metaboliczny i choroby sercowo-naczyniowe a naczynia limfatyczne

Wykazano związek pomiędzy nieprawidłowościami w budowie sieci limfatycznej a patogenezą otyłości, chorób sercowo-naczyniowych i miażdżycy, które są najczęstszymi schorzeniami i przyczyną śmierci w wysoko rozwiniętych krajach (Blum, Karaman et al. 2014, Dixon et al. 2010). Naczynia limfatyczne uczestniczą w metabolizmie lipidów. Węzły chłonne i naczynia zbiorcze są pokryte podskórnym bądź trzewnym tłuszczem, a okołowężłowa tkanka tłuszczowa ulega dynamicznym zmianom w odpowiedzi na stan zapalny o niewielkim nasileniu, z którym jest powiązany mający związek z otyłością zespół metaboliczny, cukrzyca typu 2, insulinooporność oraz choroby sercowo-naczyniowe (Alitalo 2011, Harvey et al. 2007). Powiązanie między dysfunkcją naczyń limfatycznych, zapaleniem a adipogenezą jest potwierdzone rozwojem ekotopowej podskórnej tkanki tłuszczowej w obszarze objętym obrzękiem u mutantów myszy z przewlekłymi obrzękami. Molekularne podłoże tego zjawiska nie zostało jeszcze poznane (Zawieja, Wang et al. 2012). Myszy z mutacją inaktywującą gen *Prox1* posiadały nieszczelne naczynia limfatyczne, a także rozwijały stany zapalne oraz otyłość charakterystyczne dla późnej postaci otyłości – z podwyższonym poziomem insuliny, leptyny oraz stłuszczeniem wątroby (Harvey et al. 2005)). U myszy z defektem genu *Vegfr3* występowały obrzęki limfatyczne z towarzyszącym nieprawidłowym gromadzeniem tłuszczu. Naczynia limfatyczne towarzyszą także miażdżycy, związanej z gromadzeniem lipidów oraz stanem zapalnym w ścianie tętnic. Miocyty gładkie ścian tętnicznych konstytutywnie produkują prolimfangiogenne czynniki, a naczynia chłonne występują w warstwie dodatkowej ściany tętnic, towarzysząc *vasa vasorum*. Myszy z brakiem apolipoproteiny E posiadają nie tylko złogi miażdżycowe i trzeciorzędowe narządy limfatyczne, ale także dysfunkcyjne naczynia limfatyczne. Teoretycznie naczynia chłonne mogłyby pomagać w odpływie komórek odpornościowych i lipidów z obszarów dotkniętych zapaleniem, co hamowałoby rozwój blaszek miażdżycowych. Dalsze badania powinny pomóc odpowiedzieć na pytanie, czy wpływ na limfangiogenezę może spowolnić gromadzenie się tłuszczów oraz występowanie zapaleń towarzyszących rozwojowi miażdżycy.



Rycina 3 Rola naczyń limfatycznych w rozwoju zespołu metabolicznego. A. Prawidłowo funkcjonujące naczynie limfatyczne. B. Dysfunkcyjne naczynie limfatyczne przepuszczalne dla limfy wraz z chylomikronami, które powodują powstawanie złogów tkanki tłuszczowej i powstawanie obrzęku limfatycznego. Adipocyty wytwarzają czynniki prozapalne, które działają chemotaktycznie na makrofagi, które również wytwarzają czynniki prozapalne, takie jak IL-6, a także czynniki prolimfangiogenne, co prowadzi do powstawania nowych naczyń limfatycznych, które również ulegają uszkodzeniu i cały proces się powtarza. Opracowanie własne

Zespół metaboliczny to zbiór czynników zwiększających ryzyko rozwoju cukrzycy typu II i chorób układu sercowo-naczyniowego. Czynniki te są otyłość brzuszna, dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze, insulinooporność i skłonności pozakrzepowo-prozapalne. Otyłość jest uważana za kluczową przyczynę warunkującą występowanie zespołu metabolicznego. Czynniki środowiskowe, w tym dieta, wydają się być kluczową etiologiczną przyczyną zespołu metabolicznego. Jedną z cech zespołu metabolicznego jest nieefektywny transport chłonki w naczyniach limfatycznych, spowodowany obniżoną ilością eNOS. Przyczyny niewielkiej produkcji tego enzymu są na razie nieznanymi, prawdopodobnie odpowiedzialne za to są cytokiny prozapalne i insulinooporność (Zawieja, Gasheva et al. 2016). Obniżony poziom NO prowadzi także do uszkodzenia śródbłonna, i, konsekwentnie, upośledzenia ich funkcji jako bariery (Scallan, Hill et al. 2015). Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że flora jelitowa i bakterie mogą mieć wpływ na schorzenia związane ze stanami zapalnymi, w tym na zespół metaboliczny. Transport endotoksyn zależnych od diety jest ściśle związany z chylomikronami, transportowanymi przez naczynia limfatyczne. Komórki LEC oraz mięśniowe gładkie zawierają wiele receptorów Toll-podobnych, reagują na obecność toksyn i w ten sposób mogłyby potencjalnie aktywować swoją prozapalną funkcję. Mechanizm rozwoju zespołu metabolicznego przedstawia **rycina 3**. Nieprawidłowo działające naczynia limfatyczne nie są w stanie odprowadzać w prawidłowy sposób chłonki z zawartymi w niej chylomikronami, strukturami zbudowanymi z trójglicerydów, fosfolipidów, cholesterolu i apolipoprotein. Nieprawidłowa absorpcja bądź upośledzony transport tłuszczu może uruchomić kaskadę objawów charakterystycznych dla zespołu metabolicznego. Limfa w nieznanym sposobie stymuluje także różnicowanie się preadipocytów w adipocyty, wskazując na to, że niefunkcjonalne naczynia limfatyczne mogą w bezpośredni sposób wpływać na akumulację tłuszczu. Wiadomo, że tkanka tłuszczowa może funkcjonować jako narząd endokryny, nie wspominając o jej roli magazynującej trójglicerydy. Adipokiny, takie jak adiponektyna i leptyna, oddziałują lokalnie i ogólnoustrojowo na homeostazę organizmu. Myszy z mutacją Prox-1 charakteryzują się zwiększoną sekrecją leptyny, hormonu, który poprzez swoje działanie na podwzgórze hamuje łaknienie. Badania sugerują, że wzrost akumulacji tłuszczu jest ściśle związany ze wzrostem odpowiedzi zapalnej, nie wiadomo jednak, czy zapalenie jest skutkiem, czy przyczyną otyłości (Jones 2011). Lipoproteiny pochodzące z pożywienia mogą stymulować ekspresję cząsteczek adhezyjnych w śródbłoku, co wpływa na chemotaksję komórek odpornościowych do miejsc objętych stanem zapalnym. U myszy z mutacją genu Prox-1 zauważono gromadzenie się makrofagów w obszarach związanych z zapaleniem, a także w naczyniach zbiorczych, których komórki wspólnie z adipocytami wytwarzają czynniki prozapalne, takie jak IFN- α czy IL-6 (Zawieja, Wang et al. 2016, Dalmas et al. 2011). Oprócz czynników prozapalnych wytwarzanych przez makrofagi, komórki te wydzielają także czynniki angiogenne, takie jak VEGF. Bardzo możliwe, że makrofagi stymulują limfangiogenezę poprzez produkcję VEGF-C i VEGF-D. Stymulacja limfangiogenezy prowadziłaby do zwiększonego transportu lipidów. Naczynia chłonne podczas stanów zapalnych wykazują nieprawidłową budowę, co sugeruje, że w niektórych chorobach zapalnych funkcja naczyń limfatycznych może

być zaburzona i po dłuższym czasie prowadzić do obrzęku, zapalenia i otyłości. Krążące lipidy gromadzą się zarówno w adipocytach, jak i makrofagach. Kumulacja tłuszczu w makrofagach powoduje ich transformację w komórki piankowate, mające silny związek z powstawaniem blaszek miażdżycowych (Woollard et al. 2010). Zwiększony poziom chylomikronów poprzez swój wpływ na rozwój stanu zapalnego i dysfunkcję naczyń limfatycznych, może być uważany za istotny czynnik zwiększający prawdopodobieństwo występowania chorób sercowo-naczyniowych.

Naczynia limfatyczne biorą także udział w transporcie zwrotnym cholesterolu, RCT (ang. *Reverse cholesterol transport*), pobierając go między innymi pod postacią estrów za pomocą receptora SR-BI (ang. *Scavenger receptor class B, type I*) znajdującego się na komórkach śródbłonna. Chociaż powiązanie między gromadzeniem cholesterolu a stanem zapalnym prowadzącym do rozwoju miażdżycy nie jest jeszcze w pełni zrozumiałe, wykazano, że usunięcie cholesterolu ze ściany tętnic powoduje regresję blaszki miażdżycowej (Small et al. 1984). Tym samym, naczynia limfatyczne mogłyby być uważane za ważny element przeciwdziałający miażdżycy jako wpływające na RCT i odpowiedź zapalną. Hipoteza ta została potwierdzona badaniami przeprowadzonymi *in vivo* na zwierzętach. Myszy z hipoplazją limfatyczną spowodowaną mutacją w genie kodującym *Vegfr3* charakteryzowały się większą ilością krążących lipoprotein oraz szybciej rozwijały się u nich zmiany miażdżycowe. Warto zauważyć, że naczynia chłonne rzadko sięgają do warstwy środkowej naczynia krwionośnego, gdzie rozwijają się blaszki miażdżycowe, a znajdują się przede wszystkim w warstwie zewnętrznej, dlatego konieczne są dalsze badania wyjaśniające rolę naczyń limfatycznych w procesie rozwoju miażdżycy.

Nadciśnienie tętnicze jest również uważane za jeden z istotnych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Badania wskazują, że nadmiar spożywanej soli akumuluje się w przestrzeniach międzykomórkowych, prowadząc do stanu hipertonii. Makrofagi są wrażliwe na zmiany stężenia soli w środowisku i pod wpływem, wrażliwego na stres osmolarny, czynnika transkrypcyjnego TonEBP (ang. *Tonicity-responsive enhancer binding protein*) produkują VEGF-C (Machnik et al. 2009, Titze et al. 2003). Wyniki tych badań wskazują, że makrofagi regulują równowagę wodno-elektrolitową poprzez ekspresję czynnika limfangiogennego.

Powyższe zmiany patologiczne mają również pośredni wpływ na serce. Układ limfatyczny serca odpowiada za utrzymanie homeostazy płynu śródmiąższowego i zabezpiecza serce przed obrzękiem oraz jego dysfunkcją, która może pojawić się już po niewielkim nagromadzeniu płynu śródtkankowego. Niewłaściwy odpływ chłonki w sercu może powodować wiele chorób tego narządu. Modele dużych zwierząt są wykorzystywane do badań wpływu zaburzonej funkcji naczyń chłonnych na działanie serca. W modelu ostrego upośledzenia przepływu chłonki zwierzęta rozwijały obrzęk i krwotoki (Sun et al. 1977), a w przewlekłej dysfunkcji obrzęki, krwotoki, a także rozrost tkanki łącznej i obniżoną sprawność serca (Miller et al. 2011).

Prawdopodobnie, zaburzona funkcja naczyń limfatycznych, wynikająca z ich uszkodzenia podczas transplantacji, może przyczyniać się do odrzucenia przeszczepu serca i pooperacyjnego zgonu. Pacjenci z co najmniej jednym odrzuceniem przeszczepu w historii choroby mieli obniżony poziom VEGFR-3 po transplantacji (Geissler et al. 2006). Inaczej, po przeszczepie nerki, rogowki i płuc, poziom Prox-1 wzrasta wprost proporcjonalnie do odrzutu przeszczepu, należy jednak zauważyć, że

sprawnie działające naczynia limfatyczne ułatwiają prezentację antygenów i prowadzą do odrzucenia przeszczepu, ale nieprawidłowo funkcjonujące naczynia limfatyczne prowadzą do obrzęku i tym samym również do ostrego odrzucenia przeszczepu. Zatem, konieczne są dalsze badania określające rolę naczyń limfatycznych w odrzucaniu narządów, tak aby móc właściwie zastosować stymulację limfangiogenezy po transplantacji serca. Nie wiadomo również, jak cienka jest granica pomiędzy zbyt dużą, a zbyt małą ilością naczyń chłonnych. Badania pokazują, że naczynia limfatyczne w wielu stanach chorobowych są zdolne do przebudowy. Zapalenie wsierdzia skutkowało zwiększeniem ilości naczyń limfatycznych, lecz nie krwionośnych. Limfangiogeneza towarzyszy także takim chorobom, jak ostre i przewlekłe niedokrwienie serca, postępująca miażdżycza, zapalenie śródsierdzia, hipertrofia mięśnia sercowego czy choroba Kawasaki (Schulte-Merker, Sabine et al. 2011). Bardzo możliwe, że w stanach patologicznych limfangiogeneza jest kompensacyjnym mechanizmem służącym do zachowania fizjologicznego funkcjonowania narządu i usunięcia obrzęku, jednak naczynia limfatyczne mogą zostać także uszkodzone w wyniku działania cytokin wytwarzanych w miejscu zapalenia.

Podsumowanie

Obecnie naczynia limfatyczne są przedmiotem wielu badań, mimo, że niepozorne to w bezpośredni sposób wpływają na równowagę płynów ustrojowych, obronność organizmu i transport lipidów. Występują one prawie we wszystkich unaczynionych tkankach i narządach. Poznawane są geny, kodujące czynniki regulujące ich rozwój i dojrzewanie, zaś mutacje w tych genach skutkują dysfunkcyjnymi naczyniami chłonnymi, i, co za tym idzie, obrzękami limfatycznymi. Naczynia limfatyczne są zaangażowane w patogenezę wielu chorób, ich nieprawidłowa funkcja związana jest z zespołem metabolicznym i chorobami sercowo-naczyniowymi. Mimo coraz bardziej obszernej wiedzy na temat naczyń limfatycznych, nadal jest wiele niewiadomych związanych z ich powstawaniem, funkcjonowaniem, i przebudową w różnych stanach chorobowych. Dalsze poznawanie naczyń chłonnych pozwoli zrozumieć patogenezę chorób z nimi związanymi i być może umożliwi opracowanie nowych terapii skutecznie przeciwdziałających wielu chorobom, a także pozwalających walczyć z rozwojem chorób sercowo-naczyniowych, będących przyczyną zgonów znacznej części ludności na całym świecie, a szczególnie krajów wysoko rozwiniętych.

Literatura

- Adamczyk L. A., Gordon K., Kholová, I., Meijer-Jorna L. B., Telinius N., Gallagher, P. J., van der Wal AC., Baandrup U. (2016). **Lymph vessels: the forgotten second circulation in health and disease.** *Virchows Archiv*, 469, 3-17.
- Alitalo K. **The lymphatic vasculature in disease.** *Nature Med.* **17**, 1371–1380 (2011).
- Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, Wiig H, Alitalo K. **A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules.** *J Exp Med.* 2015;212:991-999.
- Aspelund A, Robciuc MR, Karaman S, Makinen T, Alitalo K. **Lymphatic system in cardiovascular medicine.** *Circ Res.* 2016;118(3):515-530.
- Avraham T, Daluoy S, Zampell J, Yan A, Haviv YS, Rockson SG, et al. **Blockade of transforming growth factor-beta1 accelerates lymphatic regeneration during wound repair.** *Am J Pathol* 2010;177:3202-14.

- Baluk P., Fuxe J., Hashizume H., Romano T., Lashnits E., Butz S., Vestweber D., Corada M., Molendini C., Dejana E., McDonald, D. M. (2007). **Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels.** *The Journal of Experimental Medicine*, 204(10), 2349-2362.
- Baluk P, Yao LC, Feng J, Romano T, Jung SS, Schreiter JL, et al. **Tnf-alpha drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice.** *J Clin Invest* 2009;119:2954-64.
- Bazigou E. Lyons OTA. Smith A. et al. **Genes regulating lymphangiogenesis control venous valve formation and maintenance in mice.** *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(8):2984-2992.
- Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, et al. **Insulinlike growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15593-8.
- Bertozzi CC, Schmaier AA, Mericko P, et al. **Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling.** *Blood*. 2010;116(4):661-670.
- Blum K. S., Karaman S., Proulx S. T., Ochsenbein A. M., Luciani P., Leroux J.-C., Wolfrum C., Detmar, M. (2014). **Chronic High-Fat Diet Impairs Collecting Lymphatic Vessel Function in Mice.** *PLoS ONE*, 9(4).
- Breslin J. W. (2014). **Mechanical Forces and Lymphatic Transport.** *Microvascular Research*, 0, 46-54.
- Briggs Boedtker D, Rumessen J, Baandrup U, Skov Mikkelsen M, Telinius N, Pilegaard H, Aalkjaer C, Hjorddal V. **Identification of Interstitial Cajal-Like Cells in the Human Thoracic Duct.** *Cells Tissues Organs* 2013;197:145-158
- Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. **Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease.** *The Journal of Cell Biology*. 2011;193(4):607-618.
- Cao R, Bjorndahl MA, Gallego MI, Chen S, Religa P, Hansen AJ, et al. **Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action.** *Blood* 2006;107:3531-6.
- Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, et al. **Pdgf-bb induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis.** *Cancer Cell* 2004;6:333-45.
- Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F, Fannon M, Chen EJ, Butterfield C, et al. **Dose-dependent response of fgf-2 for lymphangiogenesis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11658-63.
- Clavin NW, Avraham T, Fernandez J, Daluvoy SV, Soares MA, Chaudhry A, et al. **Tgf-beta1 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H2113-27.
- Cursiefen C, Maruyama K, Bock F, et al. **Thrombospondin 1 inhibits inflammatory lymphangiogenesis by CD36 ligation on monocytes.** *The Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(5):1083-1092.
- Dalmas E, Clement K, Guerre-Millo M. **Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue.** *Trends Immunol* 2011;32:307-14
- Dejana E., Orsenigo F., Molendini C., Baluk P., McDonald D. M. (2009). **Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees.** *Cell and Tissue Research*, 335(1), 17-25.
- Ferrell, R.E. et al. **GJC2 missense mutations cause human lymphedema.** *Am. J. Hum. Genet.* 86, 943-948 (2010).
- François M. et al. **Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice.** *Nature* 456, 643-647 (2008).
- Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM. **Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development.** *J Clin Invest* 2008;118:40-50.
- Geissler HJ, Dashkevich A, Fischer UM, Fries JW, Kuhn-Regnier F, Addicks K, et al. **First year changes of myocardial lymphatic endothelial markers in heart transplant recipients.** *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:767-71.
- Halin C, Tobler NE, Vigil B, Brown LF, Detmar M. **Vegf-a produced by chronically inflamed tissue induces lymphangiogenesis in draining lymph nodes.** *Blood* 2007;110:3158-67

- Harvey, N.L. **The link between lymphatic function and adipose biology.** Ann. NY Acad. Sci. 1131, 82-88 (2008).
- Harvey, N.L. et al. **Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity.** Nat. Genet. 37, 1072-1081 (2005)
- Dixon, J.B. **Lymphatic lipid transport: sewer or subway?** Trends Endocrinol. Metab. 21, 480-487 (2010).
- Hasselhof V., Sperling A., Buttler K., Ströbel P., Becker J., Aung T., Felmerer G., Wilting J. (2016). **Morphological and Molecular Characterization of Human Dermal Lymphatic Collectors.** PLoS ONE, 11(10), e0164964.
- Huang L.-H., Lavine K. J., Randolph, G. J. (2017). **Cardiac Lymphatic Vessels, Transport, and Healing of the Infarcted Heart.** JACC: Basic to Translational Science, 2(4), 477-483.
- Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, et al. **Vegf-a promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via vegfr-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins.** FASEB J 2004;18:1111-3.
- Jones D. Min. W. (2011). **An overview of lymphatic vessels and their emerging role in cardiovascular disease.** Journal of Cardiovascular Disease Research, 2(3), 141-152.
- Jones D, Xu Z, Zhang H, He Y, Kluger MS, Chen H, et al. **Functional analyses of the bone marrow kinase in the x chromosome in vascular endothelial growth factor-induced lymphangiogenesis.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30:2553-61.
- Kanady, J.D., Dellinger, M.T., Munger, S.J., Witte, M.H. & Simon, A.M. **Connexin37 and Connexin43 deficiencies in mice disrupt lymphatic valve development and result in lymphatic disorders including lymphedema and chylothorax.** Dev. Biol. 354, 253-266 (2011).
- Karkkainen M.J. et al. **Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins.** Nat. Immunol. 5, 74-80 (2004)
- Kesler C. T., Liao S., Munn L. L., Padera T. P. (2013). **LYMPHATIC VESSELS IN HEALTH AND DISEASE.** Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine, 5(1), 111-24.
- Lutter S., Xie S., Tatin F., Makinen T. (2012). **Smooth muscle–endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation.** The Journal of Cell Biology, 197(6), 837-849.
- Machnik, A. et al. **Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C–dependent buffering mechanism.** Nat. Med. 15, 545-552 (2009).
- Mäkinen T. et al. **PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature.** Genes Dev. 19, 397-410 (2005).
- Meir G, Ben-Dor S, Harmelin A, et al. **Gonadotropin-regulated lymphangiogenesis in ovarian cancer is mediated by ledgf-induced expression of vegf-c.** Cancer Res 2009;69:9306-14.
- Mellor, R.H. et al. **Mutations in FOXC2 are strongly associated with primary valve failure in veins of the lower limb.** Circulation 115, 1912-1920 (2007).
- Miller AJ. **The grossly invisible and generally ignored lymphatics of the mammalian heart.** Med Hypotheses 2011;76:604-6.
- Morisada T, Oike Y, Yamada Y, Urano T, Akao M, Kubota Y, et al. **Angiopoietin-1 promotes lyve-1-positive lymphatic vessel formation.** Blood 2005;105:4649-56.
- Mounzer RH, Svendsen OS, Baluk P, Bergman CM, Padera TP, Wiig H, et al. **Lymphotoxin-alpha contributes to lymphangiogenesis.** Blood 2010;116:2173-82.
- Larriou-Lahargue F, Welm AL, Thomas KR, Li DY. **Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo.** Blood 2010;115:5418-26.
- Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Manseau EJ, et al. **Vegf-a induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2002;67:227-37.

Oka M, Iwata C, Suzuki HI, Kiyono K, Morishita Y, Watabe T, et al. **Inhibition of endogenous tgf-beta signaling enhances lymphangiogenesis.** *Blood* 2008;111:4571-9.

Scallan J. P., Hill M. A., Davis M. J. (2015). **Lymphatic vascular integrity is disrupted in type 2 diabetes due to impaired nitric oxide signalling.** *Cardiovascular Research*, 107(1), 89-97.

Scallan J. P., Zawieja S. D., Castorena - Gonzalez J. A., Davis M. J. (2016). **Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction.** *The Journal of Physiology*, 594(20), 5749-5768.

Small DM, Bond MG, Waugh D, Prack M, Sawyer JK. **Physicochemical and histological changes in the arterial wall of nonhuman primates during progression and regression of atherosclerosis.** *J Clin Invest.* 1984;73:1590-1605.

Spinella F, Garrafa E, Di Castro V, Rosano L, Nicotra MR, Caruso A, et al. **Endothelin-1 stimulates lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels to grow and invade.** *Cancer Res* 2009;69:2669-76. 69.

Sapoznik S, Cohen B, Tzuman Y, Srinivasan R.S. et al. **The nuclear hormone receptor Coup-TFII is required for the initiation and early maintenance of Prox1 expression in lymphatic endothelial cells.** *Genes Dev.* 24, 696–707 (2010)

Sun SC, Lie JT. **Cardiac lymphatic obstruction: Ultrastructure of acute-phase myocardial injury in dogs.** *Mayo Clin Proc* 1977;52:785-92.

Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tornberg J, Norrmen C, et al. **Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia.** *Blood* 2005;105:4642-8.

Tatin F., Renaud-Gabardos E., Godet A.-C., Hantelvs F., Pujol F., Morfoisse F., Calise D., Viars F., Valet P., Masri B., Prats A.-C., Garmy-Susini B. (2017). **Apelin modulates pathological remodeling of lymphatic endothelium after myocardial infarction.** *JCI Insight*, 2(12), e93887.

Titze J, Lang R, Ilies C, Schwind KH, Kirsch KA, Dietsch P, et al. **Osmotically inactive skin na+ storage in rats.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F1108-17. Uhrin P. et al. **Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation.** *Blood* 115, 3997-4005 (2010).

Ulvmar M. H., Mäkinen. T. (2016). **Heterogeneity in the lymphatic vascular system and its origin.** *Cardiovascular Research*, 111(4), 310-321.

Wick N, Haluza D, Gurnhofer E, Raab I, Kasimir MT, Prinz M, Steiner CW, Reinisch C, Howorka A, Giovanoli P, Buchsbaum S, Krieger S, Tschachler E, Petzelbauer P, Kerjaschki D. **Lymphatic precursors contain a novel, specialized subpopulation of podoplanin low, CCL27-expressing lymphatic endothelial cells.** *Am J Pathol* 2008;

Woollard KJ, Geissmann F. **Monocytes in atherosclerosis: Subsets and functions.** *Nat Rev Cardiol* 2010;7:77-86.

Xu Y. et al. **Neuropilin-2 mediates VEGF-C–induced lymphatic sprouting together with VEGFR3.** *J. Cell Biol.* 188, 115-130 (2010).

Yao L.-C., McDonald. D. M. (2014). **Plasticity of Airway Lymphatics in Development and Disease.** *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 214, 41-54.

Zawieja S. D., Gasheva O., Zawieja D. C., Muthuchamy M. (2016). **Blunted flow-mediated responses and diminished nitric oxide synthase expression in lymphatic thoracic ducts of a rat model of metabolic syndrome.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 310(3), H385-H393.

Zawieja S. D., Wang W., Chakraborty S., Zawieja D. C., Muthuchamy M. (2016). **Macrophage alterations within the mesenteric lymphatic tissue are associated with impairment of lymphatic pump in metabolic syndrome.** *Microcirculation* (New York, N.Y. : 1994), 23(7), 558-570.

Zawieja S. D., Wang W., Wu X., Nepiyushchikh Z. V., Zawieja D. C., Muthuchamy M. (2012). **Impairments in the intrinsic contractility of mesenteric collecting lymphatics in a rat model of metabolic syndrome.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 302(3), H643-H653.

Rola śródbłonka hemogenego w hematopoezie zarodkowej i płodowej

Mateusz Bartkowiak¹, Krzysztof Bartkowiak¹, Magdalena Chudzik¹, Justyna Niderla-Bielińska², Ewa Jankowska-Steifer^{2*}

*opiekun pracy

¹Studenckie Koło Naukowe HESA, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Autor Korespondencyjny:

Krzysztof Bartkowiak, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Streszczenie

Układ krwiotwórczy, jest jednym z najwcześniej powstających podczas rozwoju zarodkowego. W jego tworzenie zaangażowane są różne typy komórek pochodzące z czasowo i przestrzennie oddzielnych miejsc anatomicznych.

Proces powstawania pierwszych elementów morfotycznych krwi jest podzielony na dwa etapy. Początkowo, w pęcherzyku żółtkowym powstaje przejściowa, krótko funkcjonująca populacja komórek hematopoetycznych, umożliwiającą przeżycie i rozwój zarodka do czasu powstania komórek posiadających zdolność do samoodnawiania się. Proces ten określany, jako hematopoeza pierwotna, prowadzi do powstania erytroblastów, monocytów i megakariocytów. Szybko zastępowany jest on przez hematopoezę wtórną, umożliwiającą wytworzenie wszystkich typów komórek krwi, w tym także komórek macierzystych hematopoezy.

Hematopoeza wtórna ściśle powiązana jest ze śródbłonkiem naczyńnowym, który zyskuje potencjał hematopoetyczny. Komórki śródbłonka wykazujące ekspresję zarówno typowych dla niego markerów jak i markerów hematopoetycznych określa się jako śródbłonek hemogeny. Jego obecność została stwierdzona w pęcherzyku żółtkowym, łożysku, tętnicy żółtkowej, tętnicach pepkowych, w somitach, w sercu i tętnicach mózgowych. W brzusznej części fragmentu ściany aorty grzbietowej rejonu aortagonada-śródnercze ze śródbłonka hemogenego różnicują się komórki macierzyste hematopoezy, które z krążeniem docierają do płodowej wątroby, śledziony a następnie zasiedlają szpik kostny. Komórki krwi powstają ze śródbłonka hemogenego na drodze przekształcenia śródbłonkowo-hematopoetycznego. Proces specyfikacji śródbłonka i samo przekształcenie zależą od aktywności określonych czynników transkrypcyjnych, takich jak Notch1, Sox17, Runx1. Zależności pomiędzy powyższymi czynnikami są intensywnie badane.

Zrozumienie procesu powstawania pierwszych komórek krwi pozwala na pogłębienie wiedzy dotyczącej patogenezy chorób hematologicznych, onkologicznych, jak i immunologicznych. Dokładna analiza mechanizmów kontrolujących hematopoezę może przyczynić się do wykorzystania komórek śródbłonkowych w celach terapeutycznych.

Słowa kluczowe: śródbłonek hemogeny, EHT, Runx1

Abstract

Hematopoietic system is one of the earliest systems which emerges during embryonic development. The first blood cells develop in a distinct spatial and temporal anatomical areas and are generated from various precursors.

Hematopoiesis is subdivided in two stages. The first step of blood development, the primitive hematopoiesis, takes place in the yolk sac, where transitional, briefly functioning population of hematopoietic cells is generated. It is necessary for existence and growth of the embryo till the time when the first self-renewing cells are generated. In primitive hematopoiesis only erythroblasts, monocytes and megakaryocytes differentiate. Primitive hematopoiesis is rapidly replaced by the definitive hematopoiesis, the process leading to the creation of all blood cell types, including hematopoietic stem cells (HSCs).

Blood cells generated in definitive hematopoiesis arise from population of vascular endothelial cells which gain a hematopoietic potential, as a result of endothelial to hematopoietic transition (EHT). This endothelium which expresses vascular and hematopoietic markers is called hemogenic endothelium. The hemogenic endothelium occurs in yolk sac, placenta, vitelline and umbilical arteries, somites, heart and aorta-gonad-mesonephros region, where for the first time HSC differentiate. These HSC enter the circulation and colonize the fetal liver, spleen and eventually bone marrow. Specific transcription factors, such as Notch1, Sox17 and Runx1, are essential for hemogenic endothelium formation. Relationships between these transcription factors are intensively studied.

The knowledge of primitive and definitive hematopoiesis enables a better understating of hematological, oncological and immunological clinical problems. The precise analysis of mechanisms that control hematopoiesis could contribute to use of the endothelial cells in therapeutic treatment.

Keywords: hemogenic endothelium, EHT, Runx1

Wstęp

Układ krwiotwórczy powstaje bardzo wcześnie w czasie rozwoju zarodka. Pochodzenie pierwszych komórek krwi nie jest jeszcze do końca poznane. W powstawanie układu hematopoetycznego są zaangażowane zarówno tkanki zarodkowe jak i pozazarodkowe. W czasie tworzenia układu krwiotwórczego, w ściśle określonym czasie i przestrzeni, generowane są różne typy komórek. Powstające komórki ostatecznie stanowią pulę komórek, która zasiedli szpik kostny oraz grasnicę w dorosłym życiu.

Proces powstawanie pierwszych elementów morfotycznych krwi dzieli się na dwa etapy: hematopoezę pierwotną oraz hematopoezę wtórną (ostateczną). W hematopoezie pierwotnej powstaje przejściowa generacja komórek hematopoetycznych, natomiast podczas hematopoezy wtórnej powstają komórki macierzyste hematopoezy (HSC, ang. Hematopoietic Stem Cell), które zdolne są do samoodnowy (Bigas et al., 2016). W czasie dorosłego życia erytrocyty, płytki krwi, monocyty oraz inne komórki krwi powstają dzięki obecności komórki macierzystej hematopoezy (McGrath et al., 2015).

W literaturze opisywane są trzy fale hematopoezy. Pierwsza fala występuje w pęcherzyku żółtkowym, u myszy w 7.25 ED (ang. embryonic days), u człowieka natomiast pierwsze komórki hematopoetyczne obserwowane są od 16. dnia rozwoju. Pierwsza fala komórek hematopoetycznych odpowiada hematopoezie pierwotnej (Palis et al., 1999; Tober et al., 2007; Julien et al., 2016). Druga fala hematopoezy, również zachodząca w pęcherzyku żółtkowym u myszy w 8.25 ED, natomiast u człowieka między czwartym a piątym tygodniem rozwoju, charakteryzuje się wytwarzaniem ukierunkowanych ostatecznych komórek progenitorowych, które poprzedzają wytworzenie komórki macierzystej hematopoezy. Obecnie wiadomo, że komórki hematopoetyczne drugiej fali generowane są ze śródbłonna hemogenego jako erytro-mieloidalne komórki progenitorowe (ang. erythro-myeloid progenitor, EMP) i są uwalniane do krążenia. Podczas drugiej fali hematopoezy ze śródbłonna hemogenego powstają także komórki progenitorowe linii limfoidalnej (Gritz et al., 2016; Julien et al., 2016; Lacaud et al., 2017). Trzecia fala hematopoezy odpowiada za wytworzenie komórek macierzystych HSC, które powstają ze śródbłonna hemogenego, u myszy w okresie między 10.5-11.5 ED, a u człowieka od piątego tygodnia rozwoju. Druga i trzecia fala hematopoezy reprezentuje hematopoezę wtórną (Gritz et al., 2016; Julien et al., 2016).

Cel pracy

Celem pracy jest przybliżenie aktualnej wiedzy na temat powstawania pierwszych komórek krwi oraz mechanizmów, które kontrolują hematopoezę, dzięki czemu możliwe będzie precyzyjniejsze zrozumienie patogenezy chorób hematologicznych, onkologicznych, jak i immunologicznych.

Materialy i metody

Analiza artykułów pochodzących z bazy PubMed (NCBI) z użyciem słów kluczowych: EHT, Runx1 hemogenic endothelium, blood development, Gata2, Notch, Sox17 oraz haseł MeSH: hemogenic endothelium, Runx1, hematopoietic system. Analizowano prace opublikowane do 2018 roku.

Hematopoeza pierwotna

Proces hematopoezy pierwotnej oraz powstawanie komórek śródbłonka są ściśle ze sobą powiązane. Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające powstawanie komórek prekursorowych dla komórek śródbłonkowych oraz hematopoetycznych. Pierwsza zakłada, że komórki krwi oraz komórki śródbłonka powstają z niezależnych od siebie komórek progenitorowych, natomiast druga sugeruje, że w mezodermie pozazarodkowej pęcherzyka żółtkowego występuje bipotencjalna komórka nazwana hemangioblastem, która stanowi źródło komórek prekursorowych zarówno dla procesu angiogenezy jak i hematopoezy. Hemangioblast jest opisywany jak komórka, którą cechuje ekspresja markera mezodermalnego Brachury (Bry) oraz ekspresja podtypu drugiego receptora dla czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor 2*) (VEGFR2/Flk-1) (Dzierzak et al., 2016; Gritz et al., 2016).

U myszy pierwsze komórki hematopoetyczne rozwijają się w mezodermie ściany pęcherzyka żółtkowego w 7.25 ED. Dominującą pod względem liczebności linią komórkową są zarodkowe erytroblasty, które są wykrywane jedynie w bardzo wąskim przedziale czasowym, a następnie zanikają. Różnią się one od erytrocytów dojrzałego organizmu większym rozmiarem, obecnością jądra komórkowego oraz ekspresją β H1 globiny (Palis et al., 1999; Stefanska et al., 2017). Powstawaniu pierwotnych erytroidalnych komórek progenitorowych towarzyszy wytwarzanie linii makrofagalnej i megakariocytalnej. Powstające megakariocyty są diploidalne (Potts et al., 2014). Pierwotne erytroidalne i mieloidalne komórki prekursorowe powstają także w omoczni (Zeigler et al., 2006; Corbel et al., 2007) oraz w splanchnopleurze (warstwa trzewna mezodermy blaszki bocznej) okolicy aortalnej między 7,5-8.0 ED (Cumano et al., 1996; Cumano et al., 2001). Powstające w procesie hematopoezy pierwotnej komórki pełnią istotną rolę warunkując przeżycie zarodka do czasu wystąpienia hematopoezy wtórnej. Pierwotne komórki prekursorowe znajdują się w wyspach krwiotwórczych, strukturach składających się też z obwodowo umieszczonych komórek, wykazujących ekspresję markerów śródbłonkowych (Peault et al., 1988; Julien et al., 2016).

Hematopoeza wtórna (ostateczna)

W krótkim odstępie czasowym od rozpoczęcia hematopoezy pierwotnej w pęcherzyku żółtkowym myszy, w 8.25 ED powstaje druga, bardziej złożona populacja erytro-mieloidalnych komórek prekursorowych (EMP, ang. erythromyeloid progenitors)(McGrath et al., 2015). EMP występują również w niewielkiej

ilości w rozwijającym się płodowym sercu (Palis et al., 1999; Nakano et al., 2013; McGrath et al., 2015). Z EMP powstają w pełni zróżnicowane erytrocyty oraz komórki linii mieloidalnej, które są wykrywane również w życiu dorosłym (Gomez Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2015; Frame et al., 2016). Pierwsze komórki, które zdolne są do różnicowania w linię limfocytarną powstają w pęcherzyku żółtkowym oraz w splachnopleurze między 9.0-9.5 ED. Z wczesnych komórek progenitorowych dla procesu limfocytopeny powstają wszystkie typy płodowych oraz dorosłych limfocytów T, natomiast populację limfocytów B stanowią tylko komórki B1 – będące elementem wrodzonym układu immunologicznego i komórki B strefy brzeżnej (Lacaud et al., 2017).

Jednocześnie z pojawianiem się drugiej fali komórek hematopoetycznych rozpoczyna się pulsacyjny przepływ krwi, co umożliwi zasiedlanie komórkami hematopoetycznymi innych narządów (Gritz et al., 2016). Bardziej złożone komórki progenitorowe, które posiadają możliwość różnicowania zarówno w linię erytro-mieloidalną jak i limfocytarną wykrywane są w regionie aorta-gonada-śródniercze (AGM, ang. aorta-gonad-mesonephros), pęcherzyku żółtkowym, łożysku, tętnicy żółtkowej oraz w tętnicach pępkowych (Tober et al., 2016).

Podczas trzeciej fali hematopoезы, u myszy w okresie od 10.5 ED, u człowieka w 5 tygodniu rozwoju, powstają pierwsze komórki macierzyste hematopoезы. Rozwijają się one w rejonie AGM (Muller et al., 1994; Medvinsky et al., 1996). HSC obserwowane są w świetle aorty grzbietowej przy części brzusznej jej ściany oraz w świetle dużych naczyń tętnicznych – tętnicy żółtkowej, tętnic pępkowych (de Bruijn et al., 2000).

HSC i EMP zasiedlają płodową wątrobę w 11.0 – 12.0 ED, oraz szpik kostny w 16,5 ED. HSC tworzą pulę samoodnawialnych komórek krwi w dorosłym życiu (Dzierzak et al., 2008; Gritz et al., 2016; Gao et al., 2018).



Rycina 3. Uproszczony schemat przedstawiający powiązania czasowe, miejscowe oraz rodzaj powstających komórek w czasie hematopoезы zarodkowej i płodowej myszy. Na czerwono zaznaczono proces hematopoезы pierwotnej, na szaro zaznaczono proces hematopoезы wtórnej. Opracowanie własne na podstawie (Swiers et al., 2013; Dzierzak et al., 2016; Gritz et al., 2016; Julien et al., 2016).

Śródbłonek hemogeny

Powiązanie hematopoezy ze śródbłonkiem po raz pierwszy miało miejsce w XIX wieku. W 1899 roku M.V.d. Stricht zaobserwował, badając rozwój nietoperzy, że powstawaniu komórek krwi towarzyszy jednoczesny rozwój naczyń krwionośnych (Adamo et al., 2012). Podobne obserwacje zostały przeprowadzone podczas badania różnych gatunków zwierząt: kura (1907), królik (1909), człowiek (1912), świnia (1916). W 1917 roku Florence Sabin, opisała powstawanie krwinek czerwonych z śródbłonna naczynia krwionośnego kury (Sabin, 2002). W latach trzydziestych P. D. F. Murray wprowadził nazwę hemangioblast, dla określenia komórek prekursorowych zarówno krwi jak i śródbłonna. W latach sześćdziesiątych Moore i Owen stwierdzili, że głównym miejscem hematopoezy są tkanki pozazarodkowe, zaś komórki krwi znajdujące się w późniejszym okresie w zarodku pochodzą z migrujących tam z tkanek pozazarodkowych komórek prekursorowych krwi. Dopiero badania Dieterlen-Lièver i współautorów (1975) wykazały, że komórki krwi powstają również wewnątrz zarodkowo (Adamo et al., 2012; Gritz et al., 2016).

Obecnie wiadomo, że hematopoeza wtórna jest ściśle związana ze śródbłonkiem hemogenym (HE, ang. *hemogenic endothelium*). Proces wytwarzania komórek krwi ze śródbłonna hemogenego określa się przekształceniem śródbłonkowo-hematopoetycznym (EHT, ang. *endothelial-to-hematopoietic transition*) (Dejana et al., 2017). Zatem, powstające w tkankach pozazarodkowych myszy (8.25 ED) komórki EMP (Frame et al., 2016) oraz komórki progenitorowe dla procesu limfopoezy (9.5 ED) (Yoshimoto et al., 2011; Yoshimoto et al., 2012) rozwijają się ze śródbłonna hemogenego. Komórki HE pęcherzyka żółtkowego myszy można opisać jako Flk-1⁺ c-Kit⁺ CD45⁻ i SP (side population, komórki, które pozbywają się barwnika Hoechst) (Marcelo et al., 2013).

Pierwszym miejscem, występowania HE w tkankach zarodka jest rejon AGM w okresie pomiędzy 10.0-11.5 ED. Powstają tam komórki prekursorowe dla linii erytroidalnej i mieloidalnej oraz komórki macierzyste hematopoezy. EHT zachodzi *in vivo* w śródbłonku aorty mysiej w tym samym czasie, kiedy powstają pierwsze HSC (Godin et al., 1993; Medvinsky et al., 1993; Garcia-Porrero et al., 1995; Cumano et al., 1996; Medvinsky et al., 1996; Dzierzak et al., 2016; Gritz et al., 2016; Lacaud et al., 2017). Podczas EHT na luminalnej stronie ściany aorty tworzą się grupy komórek hematopoetycznych. Powstające komórki cechuje ekspresja charakterystycznego dla HSC receptora dla czynnika wzrostu komórek macierzystych – CD117 (c-Kit) (Taylor et al., 2010).

Śródbłonek hemogeny występuje w takich miejscach rozwijającego się płodu jak pęcherzyk żółtkowy, łożysko, tętnica żółtkowa oraz tętnice pępkowe, AGM oraz endokardium (Gritz et al., 2016; Gao et al., 2018).

Charakterystyka śródbłonna hemogenego opiera się na wykazaniu ekspresji określonych markerów powierzchniowych oraz czynników transkrypcyjnych, które umożliwiają odróżnienie jego od śródbłonna typowo naczyniowego. Nie istnieje jeden marker jednoznacznie cechujący tylko komórki HE. Podczas obserwacji *in vivo* komórek zarodków myszy wykazano, że HSC, które kolonizują szpik kostny, śledzionę, grasice, pochodzą ze śródbłonna aorty grzbietowej, który wykazuje ekspresję VE-kadheryny (Zovein et al., 2008).

W 1997 roku Kabrun opisał komórki śródbłonka Flk1 pozytywne, zdolne do generowania HSPC (ang. hematopoietic stem and progenitor cell) (Kabrun et al., 1997). W 1998 roku Nishikawa izolował komórki VE-kadheryna⁺/CD45⁻/Ter199⁻ z pęcherzyka żółtkowego oraz z części ogonowej zarodków mysich pochodzących z okresu 9.5 ED. Badania te pokazały, że wyizolowane komórki są zdolne do tworzenia komórek linii limfohematopoetycznej. Komórki posiadające markery charakterystyczne dla śródbłonka: CD31, CD34, Flk1, pochodzące z ludzkiego albo mysiego pęcherzyka żółtkowego oraz z AGM, hodowane w odpowiednich warunkach, posiadają potencjał do różnicowania w kierunku komórek limfatycznych jak i komórek limfomieloidalnych (Nishikawa et al., 1998; Oberlin et al., 2002; Marcelo et al., 2013). Dalsze badania nad komórkami VE-kadheryna⁺/CD45⁻ prowadzone przez Fraser'a potwierdziły powstawanie komórek limfohematopoetycznych zdolnych do zasiedlenia i przeżycia w napromieniowanych subletalną dawką noworodkach mysich (Fraser et al., 2002).

Komórki śródbłonka hemogenne mogą być odróżnione od komórek śródbłonka naczyniowego również poprzez odmienną aktywność promotora/wzmacniacza dla genu Flk1 (Flk-1 p/e). Analiza aktywności Flk-1 p/e podczas różnicowania embrionalnych komórek macierzystych wykazała, że jest on nieaktywny w komórkach posiadających potencjał hemogenne (Hirai et al., 2003).

Innym markerem, który pozwala na różnicowanie populacji komórek śródbłonka jest α -4 integryna. Obecność na komórkach α 4-integryny podczas hodowli embrionalnych komórek macierzystych w odpowiednich warunkach promuje rozwój komórek wykazujących ekspresję markerów hematopoetycznych (Ogawa et al., 1999).

Proces powstawania komórek hematopoetycznych ze śródbłonka hemogenne regulowany jest poprzez ekspresję specyficznych czynników transkrypcyjnych. Istotne dla tego zjawiska są między innymi białka Runx1 i Gata2. Brak ich ekspresji w czasie rozwoju zarodka uniemożliwia wytwarzanie charakterystycznych dla procesu hematopoezy grup komórek posiadających markery śródbłonkowe i hematopoetyczne oraz HSC (Chen et al., 2009; Lim et al., 2012; Ruiz-Herguido et al., 2012; de Pater et al., 2013).

Komórki śródbłonka hemogenne oraz komórki śródbłonka naczyniowego występującego w aorcie grzbietowej w okresie 10,5 ED stanowią przenikające się populacje komórek śródbłonkowych (de Bruijn et al., 2002; Solaimani Kartalaei et al., 2015). Komórki HE są w pełni funkcjonalnymi komórkami śródbłonka, ale posiadają odmienny profil ekspresji białek, który odróżnia je od komórek śródbłonka naczyniowego (Swiers et al., 2013; Solaimani Kartalaei et al., 2015).

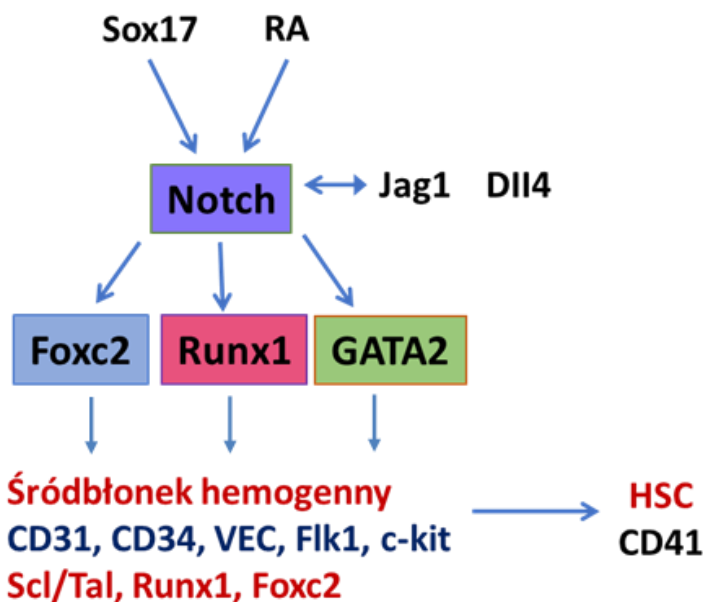
Kolejnym białkiem zaangażowanym w rozwój śródbłonka hemogenne jest Notch1. Obecność Notch1 jest istotna do rozwoju zarówno śródbłonka naczyniowego jak i hemogenne, jednak najważniejsza jest oddziaływanie Notch1 z jego ligandem Jagged1, ponieważ umożliwia to powstawanie HSC (Robert-Moreno et al., 2005; Robert-Moreno et al., 2008; Guiu et al., 2014).

Specyfikacja komórek śródbłonka w kierunku hemogennym podlega kaskadowej regulacji poprzez określone czynniki transkrypcyjne. Jednym z najwcześniej działających jest SCL/TAL1 (ang. *Stem Cell Leukemia/T-cell Acute Lymphocytic Leukemia Protein*). Czynniki ten istotny jest także dla normalnej funkcji dojrziałych

HSC oraz podczas końcowego dojrzewania określonych linii komórek krwi. Ektopowa jego ekspresja związana jest z patofizjologią T-ALL (ang. *T-cell Acute Lymphocytic Leukemia*).

Dla procesu rozwoju śródbłonna hemogenego w AGM ważne jest umiejscowienie HE w otaczających tkankach. Jednoczesna hodowla fragmentu AGM i brzusznej części jelita umożliwia pojawienie się komórek HSC, natomiast hodowla z tkankami leżącymi grzbietowo od AGM powoduje zahamowanie powstawania HSC (Peeters et al., 2009). Uwarunkowane jest to między innymi ekspresją BMP4 (ang. Bone Morphogenetic Factor 4), którego zwiększona ilość występuje w części brzusznej zarodka (Durand et al., 2007; Dzierzak et al., 2016).

Charakterystyka ważniejszych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w wytwarzanie komórek hematopoetycznych ze śródbłonna hemogenego



Rycina 4 Specyfikacja śródbłonna hemogenego odbywa się poprzez oddziaływanie Notch z ligandem Jag1. Kwas retinowy oraz czynnik transkrypcyjny Sox17 aktywują transkrypcję Notch. Ligand Dll4 jest konieczny dla utrzymania charakteru tętniczego komórek śródbłonna. Następnym etapem aktywacji ścieżki Notch-Jag1 jest ekspresja czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla HE: Foxc2, Runx1 oraz Gata2. Komórki śródbłonna hemogenego cechuje ekspresja m.in. CD31, CD34, VE-kadheryny, Flk1, c-kit. Pierwszym z markerów pojawiających się podczas EHT i tworzenia komórki macierzystej hematopoezy jest CD41.

Opracowanie własne na podstawie (Swiers et al., 2013; Dzierzak et al., 2016; Gritz et al., 2016; Julien et al., 2016).

Notch

Sygnalizacja poprzez ścieżkę Notch jest konserwowana ewolucyjnie. Podczas rozwoju organizmu receptor Notch zaangażowany jest w wiele procesów, w tym w powstawanie naczyń oraz serca. U ssaków występuje czterech przedstawicieli

rodziny receptorów Notch (Notch1-4) oraz pięć ligandów – Delta-like (DLL 1,3,4) i Jagged (Jag 1,2). Oddziaływanie pomiędzy receptorami oraz ligandami powoduje przekazanie sygnału pomiędzy sąsiadującymi komórkami, co prowadzi do uwolnienia domeny wewnątrzkomórkowej Notch (NICD, ang. Notch intracellular domain). Działający wewnątrzkomórkowo kompleks γ -sekreazy powoduje ostateczne uwolnienie NICD do cytoplazmy, skąd dociera on do jądra komórkowego, gdzie wraz z czynnikiem wiążącym DNA-RBPJ i ko-aktywatorem Mastermind-like (MAML) tworzy aktywny kompleks transkrypcyjny. Szlak ten jest regulowany na wielu etapach poprzez sprzężenia negatywne i pozytywne (High et al., 2008).

Ścieżka Notch pełni istotną rolę w różnicowaniu się komórek oraz determinacji ich losu, szczególnie dotyczy to komórek śródbłonkowych oraz komórek krwi. Coraz więcej dowodów wskazuje na szczególne znaczenie Notch w nabywaniu przez komórki śródbłonka cech hemogennych. Ekspresja Notch1 pokrywa się z miejscem występowania śródbłonka hemogennego (Jang et al., 2015). Zarodki, które nie posiadają, charakterystycznych tylko dla komórek śródbłonkowych, receptorów Notch1 albo Notch1 i Notch4 (Uyttendaele et al., 1996; Liu et al., 2006) wykazują podobne zaburzenia rozwoju naczyń jak myszy transgeniczne *Raldh2*^{-/-} (ang. *retinaldehyde dehydrogenase 2*) (Krebs et al., 2000; Lai et al., 2003; Limbourg et al., 2005). Brak ekspresji Notch uniemożliwia aktywację podlegających mu genów *HES1* i *HEY1*, które zaangażowane są w regulację hematopoезы (Schwanbeck et al., 2008). Potwierdzeniem udziału szlaku sygnalizacyjnego Notch w procesie hematopoезы jest zahamowanie rozwoju komórek śródbłonka hemogennego poprzez chemiczną inaktywację γ -sekreazy w 8.0 ED pęcherzyku żółtkowym zarodków mysich (Marcelo et al., 2013). Wykazano również, że w mutantach Notch1^{-/-} w regionie AGM następuje spadek aktywność hematopoetycznej (Kumano et al., 2003; Zape et al., 2011). Natomiast indukcja Notch1 w mysich komórkach macierzystych prowadzi do rozwoju komórek śródbłonka hemogennego ze wzmocnionym potencjałem hematopoetycznym (Jang et al., 2015). Doświadczenia te sugerują, że receptor Notch1 jest bardzo istotnym czynnikiem regulującym różnicowanie komórek w kierunku śródbłonka hemogennego (Gritz et al., 2016).

Szlak sygnalizacyjny Notch pełni ważną rolę podczas różnicowania się komórek śródbłonka hemogennego w HSC (Kumano et al., 2003; Hadland et al., 2004; Bigas et al., 2010). Wydaje się, że sygnalizacja Notch pośredniczy w rozwoju HSC poprzez EHT dzięki interakcji pomiędzy pojawiającymi się HSPC, które wykazują ekspresję receptora dla Notch oraz znajdujących się w okolicy komórek śródbłonka i komórek zrębowych (Bigas et al., 2012; Hadland et al., 2015). Receptory dla Notch1 oraz Notch4 ulegają specyficznej ekspresji w komórkach śródbłonka wyściełających aortę grzbietową oraz przekazują informację kolejnym elementom szlaku sygnalizacyjnego, w który zaangażowane są DLL4, Jag1, Jag2, HES1, HRT1, HRT2 oraz GATA2, które znajdują się zarówno w komórkach śródbłonkowych aorty grzbietowej jak i w grupach komórek, które różnicują się w komórki hematopoetyczne, w okresie pomiędzy 9.5 ED - 10.5 ED (Robert-Moreno et al., 2005; Robert-Moreno et al., 2008; Bigas et al., 2013). Myszy oraz danio przęgowany, które nie posiadają szlaku sygnalizacyjnego Notch wykazują istotny defekt w różnicowaniu się komórek hematopoetycznych w tkankach wewnątrzzarodkowych oraz nie są w stanie

wygenerować populacji komórek HSC zdolnych do samoodnowy (Bigas et al., 2013; Marcelo et al., 2013). Zablokowanie aktywności Notch hamuje proces EHT w hodowli *in vitro* mysich komórek pochodzących z około aortalnej splanchopleury oraz AGM (9.5 ED), natomiast pobudzenie szlaku Notch w komórkach pochodzących z tej samej lokalizacji z okresu 11.0 ED powoduje tworzenie komórek HSC zdolnych do samoodnowy (Hadland et al., 2015). Doświadczenia te potwierdzają udział Notch1 w procesie różnicowania komórek śródbłonna hemogennego jak i w powstawanie HSC (Gritz et al., 2016).

Rola Notch w specyfikacji śródbłonna hemogennego opiera się na jego oddziaływaniu z różnymi ligandami. Sygnalizacja Dll4-Notch1 utrzymuje specyfikację śródbłonna naczyniowego/tętniczego. Przypuszczalnie komórki prekursorowe śródbłonna hemogennego w odpowiedzi na Jag1 osłabiają/hamują silną sygnalizację Dll4-Notch1, zastępując ją niską sygnalizacją Notch1, konieczną i wystarczającą do aktywacji genów hemogennych, takich jak Gata2 (Robert-Moreno et al., 2008). Ponadto Jag1 indukuje aktywację transkrypcyjną kilku mRNA, które mogą wyciszać różnicowanie śródbłonna naczyniowego (Gama-Norton et al., 2015). Promotor genu Gata2 posiada dwa miejsca wiążące RBPJ (Guiu et al., 2013). Delecja RBPJ uniemożliwia powstawanie HSPC. Czynniki transkrypcyjne Gata2 jest zaangażowany w istotny sposób w różnicowanie komórek krwiotwórczych, m.in. kierując ekspresją czynnika transkrypcyjnego RUNX1 (Oka et al., 1995; Robert-Moreno et al., 2005).

RUNX1

RUNX1 (ang. *Runt-related transcription factor 1*; AML1, ang. *acute myeloid leukemia 1 protein*) jest jednym z czynników transkrypcyjnych należących do rodziny Core binding factors (CBF). RUNX1 jest białkiem konserwowanym ewolucyjnie, podlegającym ekspresji we wszystkich miejscach rozwijającego się zarodka, w których występuje proces hematopoezy ostatecznej (Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996; Cai et al., 2000). Jego obecność stwierdza się w komórkach śródbłonna aorty grzbietowej rejonu AGM oraz w grupach komórek hematopoetycznych przylegających do brzusznej części aorty grzbietowej, jak i w łożysku, w tętnicach żółtkowych i pępkowych oraz w sercu (North et al., 1999; North et al., 2002; Swiers et al., 2010; Nakano et al., 2013). Ekspresja Runx1 jest konieczna do powstawania HSC z komórek śródbłonna hemogennego na drodze EHT (Yokomizo et al., 2001; Lacaud et al., 2002; Chen et al., 2009; Lancrin et al., 2009; Swiers et al., 2010). Brak ekspresji RUNX1 powoduje zarówno zahamowanie powstawania erytromieloidalnych komórek progenitorowych jak i HSC, co prowadzi do ciężkiej anemii i śmierci myszy przed 12.5 ED (Cai et al., 2000). Ekspresja RUNX1 jest wymagana i kluczowa dla hematopoezy ostatecznej, jednak szybko ustaje po zajściu procesu EHT (Chen et al., 2009). Mimo iż powszechnie uznaje się, że ekspresja Runx1 nie jest konieczna dla zaistnienia hematopoezy pierwotnej (Lacaud et al., 2002; Lancrin et al., 2009), to szczegółowe badanie ujawniły, że ekspresja Runx1 jest wymagana do rozwoju pierwotnych makrofagów oraz dla prawidłowego rozwoju pierwotnych erytroblastów i megakariocytów. W przypadku delecji Runx1, powstają dwie pierwotne linie hematopoetyczne, erytrocyty i megakariocyty, jednak ich prawidłowy rozwój jest niepełny, wykazują one niski poziom ekspresji antygenu Ter119 oraz czynników transkrypcyjnych KLF1 i GATA1 (Castilla et al., 1996; Yokomizo et al.,

2008). Około 30% pierwotnych erytrocytów rozwijających się u zarodków *Runx1*^{-/-} wykazuje nieprawidłowy kształt, z punktowo chropowatą powierzchnią (Yokomizo et al., 2008). Ponieważ powstawanie tych komórek nie jest zaburzone zarodki dożywają do 12.5 ED, czyli dłużej niż zarodki z delecją *GATA1*, które umierają do 10,5 ED, z powodu całkowitej utraty pierwotnych erytrocytów (Fujiwara et al., 1996; Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996; Yokomizo et al., 2008). *Runx1* nie jest także konieczny do rozwoju pierwotnych megakariocytów, chociaż w mysich zarodkach *Runx1*^{-/-} ich liczba jest mniejsza (Potts et al., 2014). Komórkami, których powstanie zależy od *Runx1* są pierwotne makrofagi, ich brak obserwuje się zarówno w zarodkach *Runx1*^{-/-}, jak i hodowlach różnicujących się z zarodkowych komórek macierzystych (Lacaud et al., 2002; Liu et al., 2006).

Z licznych badań wynika, że podczas EHT ekspresja *RUNX1* powoduje zahamowanie ścieżki różnicowania śródbłonna naczyniowego na korzyść rozwoju komórek hematopoetycznych. Przekształcenie śródbłonkowo-hematopoetyczne można opisać poprzez co najmniej trzy następujące po sobie stadia dojrzewania komórek, charakteryzujące się ciągłą ekspresją *VE*-*kadheryny* i sekwencyjnym pojawianiem się ekspresji markerów hematopoetycznych, pierwszego *CD41* (pre-HSC Type I: *VE*-*kadheryna*⁺*CD41*⁺*CD45*⁻) i następnie *CD45* (pre-HSC Type II: *VE*-*kadheryna*⁺*CD45*⁺), co poprzedza powstanie w pełni funkcjonalnych HSCs (Taoudi et al., 2008; Rybtsov et al., 2011). Delecja genu *RUNX1* nie uniemożliwia powstawania komórek *VE*-*kadheryna*⁺ *CD45*⁻*CD41*⁺, które są fenotypowym odpowiednikiem prekursorów dojrzałych komórek macierzystych hematopoezy, ale hamuje przekształcenie ich w kolejne stadium *CD45*⁺ (pre-HSC) (Liakhovitskaia et al., 2014).

Transkrypcja *Runx1* jest kontrolowana przez dwa alternatywne promotory, które odpowiadają za powstanie dwóch transkryptów kodujących dwie główne izoformy *RUNX1* (Miyoshi et al., 1995). Promotor P1, czyli dalszy kontroluje ekspresję dalszej izoformy *RUNX1* – *RUNX1C*, zaś promotor P2, czyli bliższy kontroluje izoformę bliższą – *RUNX1B* (Sroczyńska et al., 2009; Lie et al., 2014). Na poziomie białka te dwie izoformy są prawie identyczne i różnią się jedynie sekwencją aminokwasową ich rejonów N-terminalnych (Miyoshi et al., 1995; Fujita et al., 2001). Występowanie dwóch promotorów i różnice w rejonie N-terminalnym charakteryzują wszystkie geny *Runx*, u różnych gatunków zwierząt i człowieka (Levanon et al., 2004).

Aktywność promotora P2 jest wykrywana w śródbłonku hemogennym, u myszy jest to jedyny aktywny w tym okresie promotor *Runx1* (Bee et al., 2009; Sroczyńska et al., 2009), wskazując, że powstająca izoforma *RUNX1B* jest odpowiedzialna za rozpoczęcie EHT (Lie et al., 2018). Aktywacja promotora P1 następuje w późniejszym rozwoju, podczas EHT, w komórkach *CD41* pozytywnych (Bee et al., 2009; Sroczyńska et al., 2009). W dojrzałym układzie hematopoetycznym dominującym promotorem jest P1 (Bee et al., 2009; Draper et al., 2016).

Analiza transkryptomu *RUNX1b* wykazała, że aktywuje on geny zaangażowane w wiele procesów, między innymi w adhezję komórek, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, sygnalizację z udziałem integryn oraz w początkowe etapy migracji komórek śródbłonkowych w czasie EHT (Lie et al., 2014). *RUNX1*

powoduje aktywację takich białek, jak GFI1/GFI1B (ang. *Growth factor independence 1*), których ekspresja prowadzi do zmniejszenia ilości białek odpowiedzialnych za śródbłonkowy charakter komórek, co przejawia się zmianą ich morfologii ze spłaszczonej, charakterystycznej dla śródbłonka, na bardziej okrągłą (Lancrin et al., 2012). Brak białka GFI1B w rozwijającym się zarodku powoduje utratę możliwości uwolnienia się komórek hematopoetycznych powstających w pęcherzyku żółtkowym do naczyń krążenia (Lancrin et al., 2012). RUNX1c jest zaangażowany w powstawanie HSPC z komórek śródbłonka homogenego tylko w określonym czasie rozwoju zarodka. Obie izoformy RUNX1 posiadają taką samą funkcję w czasie tworzenia HSPC w dojrzałym szpiku kostnym oraz w wątrobie (Challen et al., 2010).

Wiadomo, że Runx1 jest niezbędnym czynnikiem transkrypcyjnym dla inicjacji i zakończenia procesu EHT. Na wczesnym etapie różnicowania śródbłonka homogenego obecne jest białko RUNX1B, ale jego aktywność jest nieznaczna, ułatwia to dojrzewanie HE, natomiast zwiększenie aktywności RUNX1B odpowiada za rozpoczęcie i progresję EHT. Zbyt wczesny wzrost poziomu RUNX1B prawdopodobnie powoduje zaburzenia hematopoezy (Lie et al., 2018).

Ekspresja RUNX1 jest regulowana przez białka Sox17 i Notch1. Obniżenie ekspresji Notch1 i wzrost ekspresji RUNX1 występuje w komórkach hematopoetycznych CD41 i CD45 (Richard et al., 2013). Ekspresja Sox17 jest konieczna do regulacji Notch1 w czasie tworzenia się komórek hematopoetycznych ze śródbłonka homogenego (Saito et al., 2018).

Sox17

Czynniki transkrypcyjne Sox (SRY-related HMG-box) są zaangażowane w różne procesy zachodzące podczas rozwoju zarodkowego. Zostały one podzielone, na podstawie aminokwasowej struktury domeny HMG, na 9 grup od A do H (Kamachi et al., 2013). Grupa F składa się z trzech czynników transkrypcyjnych: Sox7, Sox17, Sox18, które różnie regulują powstawanie układu sercowo-naczyniowego. Sox18 jest jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w proces limfangiogenezy, ekspresja Sox7 jest istotna w procesie hematopoezy pierwotnej. Czynnikiem transkrypcyjnym Sox17 jest konieczny dla wzrostu i różnicowania dojrzałych komórek endodermalnych i remodelowania komórek śródbłonka. Podlega on ekspresji w naczyniach tętniczych oraz w śródbłonku homogenym powstającym z zarodkowych komórek embrionalnych oraz w HSC powstających w płodowej wątrobie (Kim et al., 2007; Clarke et al., 2013; Nobuhisa et al., 2014; Clarke et al., 2015).

Płody myszy z nokautem genu Sox 17 charakteryzują liczne krwotoki oraz brak widocznej hematopoezy, ilość powstających komórek śródbłonka homogenego oraz HSC ulega istotnemu zmniejszeniu. Płody te dożywają tylko do 13.5 ED (Clarke et al., 2013). Mysie zarodkowe komórki macierzyste z nokautem Sox17 posiadają zachowany potencjał do różnicowania w pierwotne komórki mieloidalne i erytrocytarne powstające podczas hematopoezy pierwotnej, natomiast ich zdolność do różnicowania w limfocyty T oraz HSC jest znacznie osłabiona (Clarke et al., 2013).

Podsumowanie

Zrozumienie procesu hematopoezy oraz roli śródbłonka hemogennego w procesie powstawania krwi pozwala na pogłębienie wiedzy dotyczącej patogenezy chorób hematologicznych, onkologicznych, jak i autoimmunologicznych. Śródbłonek hemogeny jest strukturą niezwykle trudną do badania. Składa się na to kilka aspektów. Po pierwsze, ilość komórek po izolacji jest niezwykle mała i oscyluje w granicach 1-3 % z całej puli komórek śródbłonkowych pochodzących z mysiego pęcherzyka żółtkowego oraz z regionu aorta-gonda-śródnercze. Po drugie jego występowanie jest ograniczone do kilku lokalizacji zaś wykrycie śródbłonka hemogennego jest możliwe w bardzo ograniczonym przedziale czasowym. Po trzecie nie ma jednego swoistego markera tylko dla komórek śródbłonka hemogennego, co utrudnia jego określenie (Gritz et al., 2016). Dokładna analiza mechanizmów kontrolujących hematopoezę oraz roli śródbłonka hemogennego w procesie powstawania krwi ciągle jest badana. Wyniki takich prac mogą przyczynić się do wykorzystania komórek śródbłonkowych w celach terapeutycznych.

Literatura

- Adamo, L. and G. Garcia-Cardena. **The vascular origin of hematopoietic cells.** *Dev Biol.* 2012; 362(1): 1-10.
- Bee, T., E. L. Ashley, S. R. Bickley, A. Jarratt, P. S. Li, J. Sloane-Stanley, B. Gottgens and M. F. de Bruijn. **The mouse Runx1 +23 hematopoietic stem cell enhancer confers hematopoietic specificity to both Runx1 promoters.** *Blood.* 2009; 113(21): 5121-5124.
- Bigas, A. and C. Waskow. **Blood stem cells: from beginning to end.** *Development.* 2016; 143(19): 3429-3433.
- Bigas, A., J. Guiu and L. Gama-Norton. **Notch and Wnt signaling in the emergence of hematopoietic stem cells.** *Blood Cells Mol Dis.* 2013; 51(4): 264-270.
- Bigas, A., T. D'Altri and L. Espinosa. **The Notch pathway in hematopoietic stem cells.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012; 360: 1-18.
- Bigas, A., A. Robert-Moreno and L. Espinosa. **The Notch pathway in the developing hematopoietic system.** *Int J Dev Biol.* 2010; 54(6-7): 1175-1188.
- Cai, Z., M. de Bruijn, X. Ma, B. Dortland, T. Luteijn, R. J. Downing and E. Dzierzak. **Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo.** *Immunity.* 2000; 13(4): 423-431.
- Castilla, L. H., C. Wijmenga, Q. Wang, T. Stacy, N. A. Speck, M. Eckhaus, M. Marin-Padilla, F. S. Collins, A. Wynshaw-Boris and P. P. Liu. **Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CFBF-MYH11.** *Cell.* 1996; 87(4): 687-696.
- Challen, G. A. and M. A. Goodell. **Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells.** *Exp Hematol.* 2010; 38(5): 403-416.
- Chen, M. J., T. Yokomizo, B. M. Zeigler, E. Dzierzak and N. A. Speck. **Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter.** *Nature.* 2009; 457(7231): 887-891.
- Clarke, R. L., A. M. Robitaille, R. T. Moon and G. Keller. **A Quantitative Proteomic Analysis of Hemogenic Endothelium Reveals Differential Regulation of Hematopoiesis by SOX17.** *Stem Cell Reports.* 2015; 5(2): 291-304.

- Clarke, R. L., A. D. Yzaguirre, Y. Yashiro-Ohtani, A. Bondue, C. Blanpain, W. S. Pear, N. A. Speck and G. Keller. **The expression of Sox17 identifies and regulates haemogenic endothelium.** Nat Cell Biol. 2013; 15(5): 502-510.
- Corbel, C., J. Salaun, P. Belo-Diabangouaya and F. Dieterlen-Lievre. **Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois.** Dev Biol. 2007; 301(2): 478-488.
- Cumano, A., F. Dieterlen-Lievre and I. Godin. **Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura.** Cell. 1996; 86(6): 907-916.
- Cumano, A., J. C. Ferraz, M. Klaine, J. P. Di Santo and I. Godin. **Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution.** Immunity. 2001; 15(3): 477-485.
- de Bruijn, M. F., X. Ma, C. Robin, K. Ottersbach, M. J. Sanchez and E. Dzierzak. **Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta.** Immunity. 2002; 16(5): 673-683.
- de Bruijn, M. F., N. A. Speck, M. C. Peeters and E. Dzierzak. **Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo.** EMBO J. 2000; 19(11): 2465-2474.
- de Pater, E., P. Kaimakis, C. S. Vink, T. Yokomizo, T. Yamada-Inagawa, R. van der Linden, P. S. Kartalaei, S. A. Camper, N. Speck and E. Dzierzak. **Gata2 is required for HSC generation and survival.** J Exp Med. 2013; 210(13): 2843-2850.
- Dejana, E., K. K. Hirschi and M. Simons. **The molecular basis of endothelial cell plasticity.** Nat Commun. 2017; 8: 14361.
- Draper, J. E., P. Sroczyńska, O. Tsoulaki, H. S. Leong, M. Z. Fadlullah, C. Miller, V. Kouskoff and G. Lacaud. **RUNX1B Expression Is Highly Heterogeneous and Distinguishes Megakaryocytic and Erythroid Lineage Fate in Adult Mouse Hematopoiesis.** PLoS Genet. 2016; 12(1): e1005814.
- Durand, C., C. Robin, K. Bollerot, M. H. Baron, K. Ottersbach and E. Dzierzak. **Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(52): 20838-20843.
- Dzierzak, E. and E. de Pater. **Regulation of Blood Stem Cell Development.** Curr Top Dev Biol. 2016; 118: 1-20.
- Dzierzak, E. and N. A. Speck. **Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells.** Nat Immunol. 2008; 9(2): 129-136.
- Frame, J. M., K. H. Fegan, S. J. Conway, K. E. McGrath and J. Palis. **Definitive Hematopoiesis in the Yolk Sac Emerges from Wnt-Responsive Hemogenic Endothelium Independently of Circulation and Arterial Identity.** Stem Cells. 2016; 34(2): 431-444.
- Fraser, S. T., M. Ogawa, R. T. Yu, S. Nishikawa, M. C. Yoder and S. Nishikawa. **Definitive hematopoietic commitment within the embryonic vascular endothelial-cadherin(+) population.** Exp Hematol. 2002; 30(9): 1070-1078.
- Fujita, Y., M. Nishimura, M. Taniwaki, T. Abe and T. Okuda. **Identification of an alternatively spliced form of the mouse AML1/RUNX1 gene transcript AML1c and its expression in early hematopoietic development.** Biochem Biophys Res Commun. 2001; 281(5): 1248-1255.
- Fujiwara, Y., C. P. Browne, K. Cunniff, S. C. Goff and S. H. Orkin. **Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(22): 12355-12358.
- Gama-Norton, L., E. Ferrando, C. Ruiz-Herguido, Z. Liu, J. Guiu, A. B. Islam, S. U. Lee, M. Yan, C. J. Gidos, N. Lopez-Bigas, T. Maeda, L. Espinosa, R. Kopan and A. Bigas. **Notch signal strength controls cell fate in the haemogenic endothelium.** Nat Commun. 2015; 6: 8510.

- Gao, X., C. Xu, N. Asada and P. S. Frenette. **The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult.** *Development.* 2018; 145(2).
- Garcia-Porrero, J. A., I. E. Godin and F. Dieterlen-Lievre. **Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse.** *Anat Embryol (Berl).* 1995; 192(5): 425-435.
- Godin, I. E., J. A. Garcia-Porrero, A. Coutinho, F. Dieterlen-Lievre and M. A. Marcos. **Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors.** *Nature.* 1993; 364(6432): 67-70.
- Gomez Perdiguero, E., K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, E. Azzoni, L. Crozet, H. Garner, C. Trouillet, M. F. de Bruijn, F. Geissmann and H. R. Rodewald. **Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors.** *Nature.* 2015; 518(7540): 547-551.
- Gritz, E. and K. K. Hirschi. **Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis.** *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(8): 1547-1567.
- Guiu, J., R. Shimizu, T. D'Altri, S. T. Fraser, J. Hatakeyama, E. H. Bresnick, R. Kageyama, E. Dzierzak, M. Yamamoto, L. Espinosa and A. Bigas. **Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling.** *J Exp Med.* 2013; 210(1): 71-84.
- Guiu, J., D. J. Bergen, E. De Pater, A. B. Islam, V. Ayllon, L. Gama-Norton, C. Ruiz-Herguido, J. Gonzalez, N. Lopez-Bigas, P. Menendez, E. Dzierzak, L. Espinosa and A. Bigas. **Identification of Cdc47 as a novel Notch transcriptional target involved in hematopoietic stem cell emergence.** *J Exp Med.* 2014; 211(12): 2411-2423.
- Hadland, B. K., B. Varnum-Finney, M. G. Poulos, R. T. Moon, J. M. Butler, S. Rafii and I. D. Bernstein. **Endothelium and NOTCH specify and amplify aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells.** *J Clin Invest.* 2015; 125(5): 2032-2045.
- Hadland, B. K., S. S. Huppert, J. Kanungo, Y. Xue, R. Jiang, T. Gridley, R. A. Conlon, A. M. Cheng, R. Kopan and G. D. Longmore. **A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development.** *Blood.* 2004; 104(10): 3097-3105.
- High, F. A. and J. A. Epstein. **The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease.** *Nat Rev Genet.* 2008; 9(1): 49-61.
- Hirai, H., M. Ogawa, N. Suzuki, M. Yamamoto, G. Breier, O. Mazda, J. Imanishi and S. Nishikawa. **Hemogenic and nonhemogenic endothelium can be distinguished by the activity of fetal liver kinase (Flk)-1 promoter/enhancer during mouse embryogenesis.** *Blood.* 2003; 101(3): 886-893.
- Hoeffel, G., J. Chen, Y. Lavin, D. Low, F. F. Almeida, P. See, A. E. Beaudin, J. Lum, I. Low, E. C. Forsberg, M. Poidinger, F. Zolezzi, A. Larbi, L. G. Ng, J. K. Chan, M. Greter, B. Becher, I. M. Samokhvalov, M. Merad and F. Ginhoux. **C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages.** *Immunity.* 2015; 42(4): 665-678.
- Jang, I. H., Y. F. Lu, L. Zhao, P. L. Wenzel, T. Kume, S. M. Datta, N. Arora, J. Guiu, M. Lagha, P. G. Kim, E. K. Do, J. H. Kim, T. M. Schlaeger, L. I. Zon, A. Bigas, C. E. Burns and G. Q. Daley. **Notch1 acts via Foxc2 to promote definitive hematopoiesis via effects on hemogenic endothelium.** *Blood.* 2015; 125(9): 1418-1426.
- Julien, E., R. El Omar and M. Tavian. **Origin of the hematopoietic system in the human embryo.** *FEBS Lett.* 2016; 590(22): 3987-4001.
- Kabrun, N., H. J. Buhning, K. Choi, A. Ullrich, W. Risau and G. Keller. **Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors.** *Development.* 1997; 124(10): 2039-2048.
- Kamachi, Y. and H. Kondoh. **Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation.** *Development.* 2013; 140(20): 4129-4144.
- Kim, I., T. L. Saunders and S. J. Morrison. **Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells.** *Cell.* 2007; 130(3): 470-483.

Krebs, L. T., Y. Xue, C. R. Norton, J. R. Shutter, M. Maguire, J. P. Sundberg, D. Gallahan, V. Closson, J. Kitajewski, R. Callahan, G. H. Smith, K. L. Stark and T. Gridley. **Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice.** *Genes Dev.* 2000; 14(11): 1343-1352.

Kumano, K., S. Chiba, A. Kunisato, M. Sata, T. Saito, E. Nakagami-Yamaguchi, T. Yamaguchi, S. Masuda, K. Shimizu, T. Takahashi, S. Ogawa, Y. Hamada and H. Hirai. **Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells.** *Immunity.* 2003; 18(5): 699-711.

Lacaud, G. and V. Kouskoff. **Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis.** *Exp Hematol.* 2017; 49: 19-24.

Lacaud, G., L. Gore, M. Kennedy, V. Kouskoff, P. Kingsley, C. Hogan, L. Carlsson, N. Speck, J. Palis and G. Keller. **Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro.** *Blood.* 2002; 100(2): 458-466.

Lai, L., B. L. Bohnsack, K. Niederreither and K. K. Hirschi. **Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis.** *Development.* 2003; 130(26): 6465-6474.

Lancrin, C., P. Sroczynska, C. Stephenson, T. Allen, V. Kouskoff and G. Lacaud. **The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage.** *Nature.* 2009; 457(7231): 892-895.

Lancrin, C., M. Mazan, M. Stefanska, R. Patel, M. Lichtinger, G. Costa, O. Vargel, N. K. Wilson, T. Moroy, C. Bonifer, B. Gottgens, V. Kouskoff and G. Lacaud. **GFI1 and GFI1B control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment.** *Blood.* 2012; 120(2): 314-322.

Levanon, D. and Y. Groner. **Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes.** *Oncogene.* 2004; 23(24): 4211-4219.

Liakhovitskaia, A., S. Rybtsov, T. Smith, A. Batsivari, N. Rybtsova, C. Rode, M. de Bruijn, F. Buchholz, S. Gordon-Keylock, S. Zhao and A. Medvinsky. **Runx1 is required for progression of CD41+ embryonic precursors into HSCs but not prior to this.** *Development.* 2014; 141(17): 3319-3323.

Lie, A. L. M., E. Marinopoulou, Y. Li, R. Patel, M. Stefanska, C. Bonifer, C. Miller, V. Kouskoff and G. Lacaud. **RUNX1 positively regulates a cell adhesion and migration program in murine hemogenic endothelium prior to blood emergence.** *Blood.* 2014; 124(11): e11-20.

Lie, A. L. M., E. Marinopoulou, A. J. Lilly, M. Challinor, R. Patel, C. Lancrin, V. Kouskoff and G. Lacaud. **Regulation of RUNX1 dosage is crucial for efficient blood formation from hemogenic endothelium.** *Development.* 2018; 145(5).

Lim, K. C., T. Hosoya, W. Brandt, C. J. Ku, S. Hosoya-Ohmura, S. A. Camper, M. Yamamoto and J. D. Engel. **Conditional Gata2 inactivation results in HSC loss and lymphatic mispatterning.** *J Clin Invest.* 2012; 122(10): 3705-3717.

Limbourg, F. P., K. Takeshita, F. Radtke, R. T. Bronson, M. T. Chin and J. K. Liao. **Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis.** *Circulation.* 2005; 111(14): 1826-1832.

Liu, Z. J., M. Xiao, K. Balint, A. Soma, C. C. Pinnix, A. J. Capobianco, O. C. Velazquez and M. Herlyn. **Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1.** *FASEB J.* 2006; 20(7): 1009-1011.

Marcelo, K. L., T. M. Sills, S. Coskun, H. Vasavada, S. Sanglikar, L. C. Goldie and K. K. Hirschi. **Hemogenic endothelial cell specification requires c-Kit, Notch signaling, and p27-mediated cell-cycle control.** *Dev Cell.* 2013; 27(5): 504-515.

Marcelo, K. L., L. C. Goldie and K. K. Hirschi. **Regulation of endothelial cell differentiation and specification.** *Circ Res.* 2013; 112(9): 1272-1287.

- McGrath, K. E., J. M. Frame and J. Palis. **Early hematopoiesis and macrophage development.** *Semin Immunol.* 2015; 27(6): 379-387.
- McGrath, K. E., J. M. Frame, K. H. Fegan, J. R. Bowen, S. J. Conway, S. C. Catherman, P. D. Kingsley, A. D. Koniski and J. Palis. **Distinct Sources of Hematopoietic Progenitors Emerge before HSCs and Provide Functional Blood Cells in the Mammalian Embryo.** *Cell Rep.* 2015; 11(12): 1892-1904.
- Medvinsky, A. and E. Dzierzak. **Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region.** *Cell.* 1996; 86(6): 897-906.
- Medvinsky, A. L., N. L. Samoylina, A. M. Muller and E. A. Dzierzak. **An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse.** *Nature.* 1993; 364(6432): 64-67.
- Miyoshi, H., M. Ohira, K. Shimizu, K. Mitani, H. Hirai, T. Imai, K. Yokoyama, E. Soeda and M. Ohki. **Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia.** *Nucleic Acids Res.* 1995; 23(14): 2762-2769.
- Muller, A. M., A. Medvinsky, J. Strouboulis, F. Grosveld and E. Dzierzak. **Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo.** *Immunity.* 1994; 1(4): 291-301.
- Nakano, H., X. Liu, A. Arshi, Y. Nakashima, B. van Handel, R. Sasidharan, A. W. Harmon, J. H. Shin, R. J. Schwartz, S. J. Conway, R. P. Harvey, M. Pashmforoush, H. K. Mikkola and A. Nakano. **Haemogenic endocardium contributes to transient definitive haematopoiesis.** *Nat Commun.* 2013; 4: 1564.
- Nishikawa, S. I., S. Nishikawa, H. Kawamoto, H. Yoshida, M. Kizumoto, H. Kataoka and Y. Katsura. **In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos.** *Immunity.* 1998; 8(6): 761-769.
- Nobuhisa, I., M. Osawa, M. Uemura, Y. Kishikawa, M. Anani, K. Harada, H. Takagi, K. Saito, M. Kanai-Azuma, Y. Kanai, A. Iwama and T. Taga. **Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters.** *Mol Cell Biol.* 2014; 34(11): 1976-1990.
- North, T., T. L. Gu, T. Stacy, Q. Wang, L. Howard, M. Binder, M. Marin-Padilla and N. A. Speck. **Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters.** *Development.* 1999; 126(11): 2563-2575.
- North, T. E., M. F. de Bruijn, T. Stacy, L. Talebian, E. Lind, C. Robin, M. Binder, E. Dzierzak and N. A. Speck. **Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo.** *Immunity.* 2002; 16(5): 661-672.
- Oberlin, E., M. Tavian, I. Blazsek and B. Peault. **Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo.** *Development.* 2002; 129(17): 4147-4157.
- Ogawa, M., M. Kizumoto, S. Nishikawa, T. Fujimoto, H. Kodama and S. I. Nishikawa. **Expression of alpha4-integrin defines the earliest precursor of hematopoietic cell lineage diverged from endothelial cells.** *Blood.* 1999; 93(4): 1168-1177.
- Oka, C., T. Nakano, A. Wakeham, J. L. de la Pompa, C. Mori, T. Sakai, S. Okazaki, M. Kawaichi, K. Shiota, T. W. Mak and T. Honjo. **Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death.** *Development.* 1995; 121(10): 3291-3301.
- Okuda, T., J. van Deursen, S. W. Hiebert, G. Grosveld and J. R. Downing. **AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis.** *Cell.* 1996; 84(2): 321-330.
- Palis, J., S. Robertson, M. Kennedy, C. Wall and G. Keller. **Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse.** *Development.* 1999; 126(22): 5073-5084.
- Peault, B., M. Coltey and N. M. Le Douarin. **Ontogenic emergence of a quail leukocyte/endothelium cell surface antigen.** *Cell Differ.* 1988; 23(3): 165-174.

- Peeters, M., K. Ottersbach, K. Bollerot, C. Orelia, M. de Bruijn, M. Wijgerde and E. Dzierzak. **Ventral embryonic tissues and Hedgehog proteins induce early AGM hematopoietic stem cell development.** *Development.* 2009; 136(15): 2613-2621.
- Potts, K. S., T. J. Sargeant, J. F. Markham, W. Shi, C. Biben, E. C. Josefsson, L. W. Whitehead, K. L. Rogers, A. Liakhovitskaia, G. K. Smyth, B. T. Kile, A. Medvinsky, W. S. Alexander, D. J. Hilton and S. Taoudi. **A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo.** *Blood.* 2014; 124(17): 2725-2729.
- Richard, C., C. Drevon, P. Y. Canto, G. Villain, K. Bollerot, A. Lempereur, M. A. Teillet, C. Vincent, C. Rossello Castillo, M. Torres, E. Piwarzyk, N. A. Speck, M. Souyri and T. Jaffredo. **Endothelium-mesenchymal interaction controls runx1 expression and modulates the notch pathway to initiate aortic hematopoiesis.** *Dev Cell.* 2013; 24(6): 600-611.
- Robert-Moreno, A., L. Espinosa, J. L. de la Pompa and A. Bigas. **RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells.** *Development.* 2005; 132(5): 1117-1126.
- Robert-Moreno, A., J. Guiu, C. Ruiz-Herguido, M. E. Lopez, J. Ingles-Esteve, L. Riera, A. Tipping, T. Enver, E. Dzierzak, T. Gridley, L. Espinosa and A. Bigas. **Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1.** *EMBO J.* 2008; 27(13): 1886-1895.
- Ruiz-Herguido, C., J. Guiu, T. D'Altri, J. Ingles-Esteve, E. Dzierzak, L. Espinosa and A. Bigas. **Hematopoietic stem cell development requires transient Wnt/beta-catenin activity.** *J Exp Med.* 2012; 209(8): 1457-1468.
- Rybtsov, S., M. Sobiesiak, S. Taoudi, C. Souilhol, J. Senserrich, A. Liakhovitskaia, A. Ivanovs, J. Frampton, S. Zhao and A. Medvinsky. **Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region.** *J Exp Med.* 2011; 208(6): 1305-1315.
- Sabin, F. R. **Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. 1917.** *J Hematother Stem Cell Res.* 2002; 11(1): 5-7.
- Saito, K., I. Nobuhisa, K. Harada, S. Takahashi, M. Anani, H. Lickert, M. Kanai-Azuma, Y. Kanai and T. Taga. **Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells in fetal intra-aortic hematopoietic clusters by the Sox17-Notch1-Hes1 axis.** *Exp Cell Res.* 2018; 365(1): 145-155.
- Schwanbeck, R., T. Schroeder, K. Henning, H. Kohlhof, N. Rieber, M. L. Erfurth and U. Just. **Notch signaling in embryonic and adult myelopoiesis.** *Cells Tissues Organs.* 2008; 188(1-2): 91-102.
- Solaimani Kartalaei, P., T. Yamada-Inagawa, C. S. Vink, E. de Pater, R. van der Linden, J. Marks-Bluth, A. van der Sloot, M. van den Hout, T. Yokomizo, M. L. van Schaick-Solerno, R. Delwel, J. E. Pimanda, I. W. F. van and E. Dzierzak. **Whole-transcriptome analysis of endothelial to hematopoietic stem cell transition reveals a requirement for Gpr56 in HSC generation.** *J Exp Med.* 2015; 212(1): 93-106.
- Sroczynska, P., C. Lancrin, V. Kouskoff and G. Lacaud. **The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic hematopoiesis.** *Blood.* 2009; 114(26): 5279-5289.
- Stefanska, M., K. Batta, R. Patel, M. Florkowska, V. Kouskoff and G. Lacaud. **Primitive erythrocytes are generated from hemogenic endothelial cells.** *Sci Rep.* 2017; 7(1): 6401.
- Swiers, G., C. Rode, E. Azzoni and M. F. de Bruijn. **A short history of hemogenic endothelium.** *Blood Cells Mol Dis.* 2013; 51(4): 206-212.
- Swiers, G., C. Baumann, J. O'Rourke, E. Giannoulatou, S. Taylor, A. Joshi, V. Moignard, C. Pina, T. Bee, K. D. Kokkalis, M. Yoshimoto, M. C. Yoder, J. Frampton, T. Schroeder, T. Enver, B. Gottgens and M. de Bruijn. **Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level.** *Nat Commun.* 2013; 4: 2924.

- Swiers, G., M. de Bruijn and N. A. Speck. **Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1**. *Int J Dev Biol*. 2010; 54(6-7): 1151-1163.
- Taoudi, S., C. Gonneau, K. Moore, J. M. Sheridan, C. C. Blackburn, E. Taylor and A. Medvinsky. **Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs**. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(1): 99-108.
- Taylor, E., S. Taoudi and A. Medvinsky. **Hematopoietic stem cell activity in the aorta-gonad-mesonephros region enhances after mid-day 11 of mouse development**. *Int J Dev Biol*. 2010; 54(6-7): 1055-1060.
- Tober, J., A. Koniski, K. E. McGrath, R. Vemishetti, R. Emerson, K. K. de Mesy-Bentley, R. Waugh and J. Palis. **The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis**. *Blood*. 2007; 109(4): 1433-1441.
- Tober, J., M. W. Maijenburg and N. A. Speck. **Taking the Leap: Runx1 in the Formation of Blood from Endothelium**. *Curr Top Dev Biol*. 2016; 118: 113-162.
- Uyttendaele, H., G. Marazzi, G. Wu, Q. Yan, D. Sassoon and J. Kitajewski. **Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene**. *Development*. 1996; 122(7): 2251-2259.
- Wang, Q., T. Stacy, J. D. Miller, A. F. Lewis, T. L. Gu, X. Huang, J. H. Bushweller, J. C. Bories, F. W. Alt, G. Ryan, P. P. Liu, A. Wynshaw-Boris, M. Binder, M. Marin-Padilla, A. H. Sharpe and N. A. Speck. **The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo**. *Cell*. 1996; 87(4): 697-708.
- Yokomizo, T., K. Hasegawa, H. Ishitobi, M. Osato, M. Ema, Y. Ito, M. Yamamoto and S. Takahashi. **Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse**. *Blood*. 2008; 111(8): 4075-4080.
- Yokomizo, T., M. Ogawa, M. Osato, T. Kanno, H. Yoshida, T. Fujimoto, S. Fraser, S. Nishikawa, H. Okada, M. Satake, T. Noda, S. Nishikawa and Y. Ito. **Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells**. *Genes Cells*. 2001; 6(1): 13-23.
- Yoshimoto, M., P. Porayette, N. L. Glosson, S. J. Conway, N. Carlesso, A. A. Cardoso, M. H. Kaplan and M. C. Yoder. **Autonomous murine T-cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac before HSC emergence**. *Blood*. 2012; 119(24): 5706-5714.
- Yoshimoto, M., E. Montecino-Rodriguez, M. J. Ferkowicz, P. Porayette, W. C. Shelley, S. J. Conway, K. Dorshkind and M. C. Yoder. **Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(4): 1468-1473.
- Zape, J. P. and A. C. Zovein. **Hemogenic endothelium: origins, regulation, and implications for vascular biology**. *Semin Cell Dev Biol*. 2011; 22(9): 1036-1047.
- Zeigler, B. M., D. Sugiyama, M. Chen, Y. Guo, K. M. Downs and N. A. Speck. **The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential**. *Development*. 2006; 133(21): 4183-4192.
- Zovein, A. C., J. J. Hofmann, M. Lynch, W. J. French, K. A. Turlo, Y. Yang, M. S. Becker, L. Zanetta, E. Dejana, J. C. Gasson, M. D. Tallquist and M. L. Iruela-Arispe. **Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells**. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(6): 625-636.

Melatonina i jej rola w procesie różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych

Małgorzata Zawrzykraj*, Piotr Małyś, Aleksandra Skubis, Bartosz Sikora, Urszula Mazurek

Katedra Biologii Molekularnej, Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Autor korespondencyjny: zawrzykrajmagosia6@gmail.com, Katedra Biologii Molekularnej, Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z OML, SUM w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

Streszczenie

Komórki macierzyste (SC, ang. *stem cells*) to komórki pierwotne, wykazujące potencjalnie nieograniczoną liczbę podziałów, a także posiadające zdolności do różnicowania się w komórki różnych rodzajów tkanek. Wśród nich rozróżniamy komórki o właściwościach totipotencjalnych zdolnych do różnicowania się w każdą komórkę organizmu. Komórki pluripotencjalne potrafią zróżnicować się w każdy typ komórek dorosłego organizmu za wyjątkiem trofoblastu. Multipotencjalne komórki macierzyste różnicują się wyłącznie w kierunku komórek listka zarodkowego, z którego same się wywodzą, natomiast unipotencjalne komórki macierzyste dają początek tylko ściśle określonym komórkom.

Ponadto, w zależności od źródła pobrania komórek macierzystych można wyszczególnić: MSC, HSC oraz ESC. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, ang. *mesenchymal stem cells*), izolowane są głównie z tkanki tłuszczowej, szpiku kostnego czy krwi pępowinowej i mają właściwości multipotentne. Hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC, ang. *hematopoietic stem cells*), pozyskiwane są z krwi obwodowej, pępowinowej oraz szpiku kostnego. Natomiast embrionalne komórki macierzyste (ESC ang. *embryonic stem cells*), mają właściwości pluripotencjalne, ale ograniczenia etyczne uniemożliwiają ich pozyskiwanie do celów medycznych.

Różnicowanie komórek macierzystych jest przedmiotem wielu badań na całym świecie. Terapia komórkami macierzystymi umożliwiłaby uzyskanie komórek pożądanego typu i ich autologiczny przeszczep do organizmu dawcy. Przykładowo standardowymi czynnikami w procesie różnicowania komórek macierzystych w kierunku osteoblastów są deksametazon, β -glicerofosforan, oraz kwas askorbinowy. Jednakże ze względu na zmienną wydajność tego procesu, związaną z wieloma czynnikami takimi jak wiek czy choroby dawcy, sposób pobrania oraz warunki hodowli poszukiwane są nowe czynniki zdolne do promowania rozwoju komórek tkanki kostnej.

Wydaje się, że czynnikiem takim może być melatonina. Hormon ten pełni istotną funkcję między innymi w procesach tworzenia i mineralizacji kości. Reguluje także homeostazę wapnia poprzez łączenie się z kalmoduliną i prawdopodobnie bierze udział w syntezie kolagenu typu I.

Udoskonalenie procesu różnicowania komórek macierzystych w kierunku komórek wielu typów tkanek z pozwoli na wykorzystanie ich w medycynie regeneracyjnej do leczenia przewlekłych chorób oraz uszkodzeń wielu typów tkanek.

Celem pracy jest przegląd literatury obejmującej tematykę komórek macierzystych, melatoniny oraz jej znaczenia w różnicowaniu komórek macierzystych.

Abstract

Stem cells (SCs) are primary cells, that have potentially unlimited number of divisions and ability to differentiate into cells of different types of tissue. Among them, we distinguish cells with totipotential properties capable of differentiating into each cell of the organism. Pluripotent cells can differentiate into all types of cells in the adult organism, with the exception of trophoblast cells. Multipotent stem cells differentiate only towards the cells of the germ layer from which they originate, while unipotent stem cells give rise to only specific cells.

In addition, depending on the source of stem cells collection, you can specify: MSC, HSC and ESC. Mesenchymal stem cells (MSCs) are mainly isolated from adipose tissue, bone marrow or umbilical

cord blood and have multipotent properties. Hematopoietic stem cells (HSCs) are obtained from peripheral blood, umbilical cord and bone marrow. In contrast, embryonic stem cells (ESCs) have pluripotent properties, but ethical restrictions prevent them from being obtained for medical purposes. Stem cell differentiation is the subject of many studies around the world. Stem cell therapy would make it possible to obtain the cells of the desired type and their autologous transplant into the donor's body. For example, standard factors in the process of stem cell differentiation towards osteoblasts are dexamethasone, β -glycerophosphate and ascorbic acid. However, due to the variable performance of this process, associated with many factors such as age or diseases of the donor, the method of collection and the conditions of cultivation are sought for new agents capable of promoting the development of bone tissue cells.

It seems that melatonin may be one of these factors. This hormone plays an important role in the processes of bone formation and mineralization. It also regulates calcium homeostasis by combining with calmodulin and is probably involved in the synthesis of type I collagen.

Improving the process of differentiation of stem cells towards cells of many types of tissues will allow them to be used in regenerative medicine to treat chronic diseases and damage to many types of tissues. The aim of the study is to review the literature covering the subject of stem cells, melatonin and its role in stem cell differentiation.

Komórki macierzyste

Komórki macierzyste charakteryzują się potencjalnie nieograniczoną proliferacją oraz są prekursorami różnicowania się ponad 200 typów komórek (Fрати, Scopetti et al. 2017). Można sklasyfikować je na podstawie ich pochodzenia, wyróżniamy tutaj embrionalne komórki macierzyste – ESC (ang. *embryonic stem cells*) oraz komórki macierzyste, które nie są izolowane z węzła zarodkowego blastocysty między innymi HSC (ang. *hematopoietic stem cells*) i MSC (ang. *mesenchymal stem cells*) (Singh, Singh et al. 2016).

ESC mają charakter pluripotentyjny, który daje dużą przewagę nad somatycznymi komórkami macierzystymi, mającymi ograniczony potencjał różnicowania się. Niestety ich zastosowanie kliniczne jest znacznie ograniczone, gdyż wykazują cechy niestabilności genetycznej, właściwości kancerogenne i immunogenne, a ze względu na źródło ich izolacji, którym jest węzeł zarodkowy blastocysty, ESC są trudno dostępne i wykorzystanie ich budzi kontrowersje etyczne (Dixit, Katare 2015).

Komórki macierzyste hemopoety (HSC) można znaleźć głównie w szpiku kostnym w charakterystycznej niszy HSC lub w krwi pępowinowej. Mają one właściwości multipotentyjne, a w organizmie człowieka różnicują się w komórki krwi. Jednakże ich hodowla w warunkach *in vitro* jest trudna ze względu na problemy utrzymania ich w stanie niezróżnicowanym (Hirata, Furuhashi et al. 2018; Singh, Singh et al. 2016; Wang, Saijo et al. 2018).

MSC są obiecującym źródłem terapii komórkowej ze względu na właściwości multipotentyjne, co warunkuje różnicowanie się w adipocyty, osteoblasty oraz chondrocyty (Singh, Singh et al. 2016). Najczęstszym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych są tkanki takie, jak szpik kostny czy tkanka tłuszczowa, popularnym źródłem ich izolacji jest również krew pępowinowa. Ich główną zaletą jest mała inwazyjność w sposobie pobrania tkanki, z której są one pozyskiwane. Jednak liposukcja czy lipoaspiracja w przypadku pobrania tkanki tłuszczowej jest dużo mniej niebezpieczna dla pacjenta niż nakłucie kośćca w przypadku komórek pozyskiwanych ze szpiku kostnego (Dixit, Katare 2015; Fernandes, Valente et al. 2018). MSC różnicują się w komórki linii mezodermalnej, a ich łatwość proliferacji *in vitro* bez utraty ich funkcji biologicznych czyni je doskonałym materiałem

badawczym. Dodatkowo, ich zastosowanie nie budzi kontrowersji etycznych, jak w przypadku chociażby ESC (Dixit, Katare 2015; Fernandes, Valente et al. 2018; Marofi, Vahedi et al. 2017; Singh, Singh et al. 2016).

Mezenchymalne komórki macierzyste

Mezenchymalne komórki macierzyste występują w różnego rodzaju tkankach, takich jak tkanka tłuszczowa, szpik kostny, mózg, skóra oraz posiadają zdolność do różnicowania się w kierunku konkretnych fenotypów, zastępując uszkodzone komórki, co zwiększa potencjał do wykorzystania ich w terapii regeneracyjnej (Dixit, Katare 2015; Maioli, Basoli et al. 2016). MSC są adherentne do podłoża oraz wykazują ekspresję markerów powierzchniowych, takich jak: ekto-5' nukleotydaza (CD73 ang. *ecto 5' nucleotidase*), endoglina (CD105. ang. *endoglin*) i marker różnicowania tymocytów (CD90, ang. *Thy-1*) w powyżej 95% populacji komórek. Obserwuje się jednoczesny braku ekspresji między innymi glikoproteiny transbłonowej CD34 (ang. *transmembrane phosphoglycoprotein*) i antygeny wszystkich grup leukocytów CD45 (ang. *lymphocyte common antigen*) w poniżej 2% populacji komórek. Brak u nich także cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej – MHC (ang. *major histocompatibility complex*) klasy II oraz ekspresji antygeny różnicowania komórkowego – CD80; dlatego są w stanie uniknąć reakcji odpornościowej organizmu, co umożliwi przeszczep nieautologiczny u pacjentów, ponieważ ryzyko odrzucenia implantacji jest niwelowane. Zakwalifikowanie danej populacji komórek do grupy MSC musi wiązać się z zróżnicowaniem ich w warunkach *in vitro* do osteoblastów, adipocytów i chondroblastów, co należy potwierdzić określonymi barwieniami histochemicznymi (Dixit, Katare 2015; Dominici, Le Blanc et al. 2006; Hu, Yin et al. 2018; Nazari-Shafti, Kempfert et al. 2017;).

Komórki macierzyste szpiku kostnego (BM-MSC, ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) są jednymi z najczęściej stosowanych MSC. Komórki macierzyste szpiku kostnego mogą różnicować się w adipocyty, chondrocyty i osteoblasty. Zostały one głównie szeroko przebadane w zakresie regeneracji i naprawy kości, ze względu na łatwy dostęp oraz wysoką zdolność do dyferencjacji w osteoblasty, które odgrywają ważną rolę w utrzymywaniu stabilności kośćca. Badania na modelach zwierzęcych wykazują, że zarówno autologiczne jak i allogeniczne przeszczepy BM-MSC mają zastosowanie w leczeniu osteoporozy (Hu, Yin et al. 2018).

Wykazano, że zmieniona proliferacja i różnicowanie BM-MSC jest jedną z głównych przyczyn osteoporozy. Moerman i wsp. przeprowadzili badania odnośnie wpływu starzenia się na potencjał różnicowania BM-MSC w kierunku osteoblastów, które miały potwierdzić tezę zwiększenia potencjału adipogenego, względem osteogenego komórek macierzystych wraz z wiekiem (Moerman, Teng et al. 2004). Naukowcy donoszą, że u starszych myszy zwiększa się liczba adipocytów, a zmniejsza liczba osteoblastów, czemu towarzyszy zmniejszenie gęstości mineralnej kości (Moerman, Teng et al. 2004). Dalsze badania nad potencjałem różnicowania izolowanych MSC od starszych myszy (26-miesięcznych) wykazały wysoką zdolność do różnicowania się w adipocyty, a nie osteoblasty. Shen wraz zespołem zasugerowali natomiast, że niska gęstość mineralna kości może być spowodowana

przesunięciem preferencji różnicowania MSC w kierunku adipocytów (Shen, Chen et al. 2012). Badania te ukazują, że zmiana kierunku dyferencjacji mezenchymalnych komórek macierzystych może przyczyniać się do osteoporozy (Hu, Yin et al. 2018; Moerman, Teng et al. 2004; Shen, Chen et al. 2012).

Popularnym źródłem komórek MSC jest również tkanka tłuszczowa, z której izolowane są komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (ADSC ang. *adipose-derived stem cells*). Ich zaletą jest łatwość izolacji oraz wysoka zawartość w tkance. Wykazano, że proliferacja i różnicowanie osteogenne ADSC jest w mniejszym stopniu zależne od wieku i ilości przeprowadzonych pasaży, co czyni je potencjalnie lepszym źródłem terapii komórkowych niż BM-MSC (Hu, Yin et al. 2018; Singh, Singh et al. 2016). Badania przedkliniczne na modelach zwierzęcych wykazały, że BM-MSC oraz ADSC są skuteczne m.in. w leczeniu osteoporozy, natomiast badania kliniczne w tym kierunku wciąż trwają (Hu, Yin et al. 2018).

Różnicowanie MSC *in vitro*

Różnicowanie MSC jest ściśle regulowane przez działanie sygnałów fizycznych i chemicznych, które mogą być sztucznie indukowane w warunkach *in vitro*. Obecnie dużą wadą MSC w hodowli *in vitro* jest utrata właściwości komórek macierzystych po długotrwałym pasażowaniu czyli procesie przeniesienia komórek z jednego naczynia hodowlanego do drugiego, zawierającego świeżą pożywkę, po osiągnięciu 70-80% konfluencji. Skutkiem takiego stanu rzeczy jest niepowodzenie terapii z ich wykorzystaniem. Przyczyną tego zjawiska jest między innymi utrata niszy fizjologicznej podczas pasaży. Stosowane są różnego rodzaju czynniki, aby zapobiec utracie właściwości MSC, takie jak hodowla w warunkach niedoboru tlenu (hipoksji) czy fizjologicznego stężenia tlenu (Shuai, Liao et al. 2016), hodowla na odpowiedniej macierzy pozakomórkowej, stosowanie w hodowli egzogennych białek sygnałowych takich jak: czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *fibroblast growth factor*), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, ang. *platelet derived growth factor*) i naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*) (Shuai, Liao et al. 2016); czy modyfikacja genetyczna MSC. Park i wsp. wykazali, że do wywołania pluripotencji w MSC wystarczy za pomocą wektora retrowirusowego wywołać ektopową ekspresję czynników transkrypcyjnych: OCT4 (ang. *octamer-binding transcription factor 4*) i SOX2 (ang. *SRY -sex determining region Y-box 2*), które są odpowiedzialne za indukowanie właściwości pluripotentnych. Powstają w ten sposób indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste – iPSC (ang. *induced pluripotent stem cells*) (Park, Zhao et al. 2008). Są to jednak metody, które generują wysokie koszty oraz działania niepożądane, takie jak niska wydajność hodowli czy ryzyko mutacji lub zniekształcenia, podczas stosowania metod modulacji genetycznej (Chen, Xu et al. 2016; Park, Zhao et al. 2008; Shuai, Liao et al. 2016).

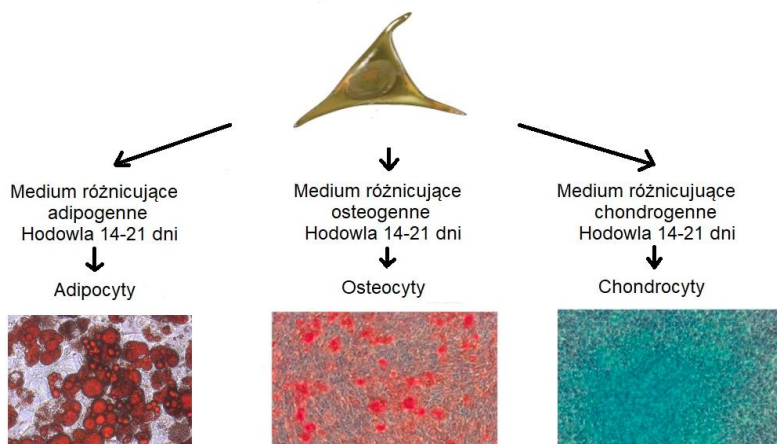
Deksametazon, β -glicerofosforan, oraz kwas askorbinowy są czynnikami powszechnie wykorzystywanymi do indukowania osteogenezy (Olkowska-Truchanowicz 2009). Aktywacja kinazy ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*), a następnie kinazy JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases*), które aktywowane są poprzez mitogeny, promuje osteogenezę, jednocześnie hamując adipogenezę (Olkowska-Truchanowicz, 2009). Melatonina została również opisana, jako promotor osteogenezy z komórek macierzystych szpiku kostnego, hamując adipogenezę (Maioli, Basoli et al. 2016). Do identyfikacji poprawności różnicowania MSC w kierunku osteoblastów wykorzystuje się czerwień alizarynową (Ryc. 1.),

która na kolor intensywnie czerwony barwi żłogi wapnia występujące w komórkach tkanki kostnej (Maioli, Basoli et al. 2016; Olkowska-Truchanowicz, 2009; Shuai, Liao et al. 2016).

Podczas różnicowania MSC w kierunku adipocytów wykorzystywane są insulina, izobutylometryloksantyna (IBMX), deksametazon, rozyglitazon oraz indometacyna (Olkowska-Truchanowicz, 2009). MSC poddane działaniu tych czynników wykazują specyficzne cechy adipocytów: zdolność lipolityczną po stymulacji katecholaminami, sekrecję adiponektyny i leptyny oraz aktywność antylipolityczną przez $\alpha 2$ -adrenoreceptory (Hu, Yin et al. 2018; Olkowska-Truchanowicz, 2009; Ranjbaran, Abediankenari et al. 2018). Różnicowanie MSC do adipocytów można potwierdzić stosując barwienie czerwienią oleistą (Ryc. 1.), która rozpuszcza się w lipidach wybarwiając na czerwono krople tłuszczu znajdujące się w adipocytach.

MSC można również różnicować *in vitro* w kierunku chondrocytów (Chen, Xu et al. 2016; Olkowska-Truchanowicz, 2009). W tym przypadku do pożywki dodaje się białka morfogenetyczne kości: BMP-6, BMP-7 (ang. BMP – *bone morphogenetic protein*), które należą do cytokin i odpowiedzialne są za promowanie osteogenezy i chondrogenyzy. Stosuje się ponadto FGF-2, który jest podstawowym czynnikiem wzrostu komórek; transformujące czynniki wzrostu: TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$ (ang. TGF- β – *transforming growth factor β*), które kontrolują proliferację i proces dyferencjacji; deksametazon oraz insulinopodobny czynnik wzrostowy (ang. IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*) inaczej zwany somatomedyną C (Olkowska-Truchanowicz, 2009). Czynniki te stymulują różnicowanie chondrocytów oraz proliferację komórek macierzystych. Ta właściwość MSC może być wykorzystana w leczeniu uszkodzeń chrząstki wywołanych urazem lub chorobą zwyrodnieniową. Taki kierunek różnicowania można zidentyfikować barwiąc komórki błękitem alcjańskim (Ryc. 1.), który wykrywa charakterystyczne dla chondrocytów mukopolisacharydy i glikozaminoglikany (GAG) (Desancé, Contentin et al. 2018; Olkowska-Truchanowicz, 2009; Yin, Wu et al. 2018).

Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste



Barwienie czerwienią oleistą Barwienie czerwienią alizarynową Barwienie błękitem alcjańskim

Rycina 1 Różnicowanie ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych .

Rycina wykonana na podstawie artykułu (Desancé, Contentin et al. 2018; Mesenchymal Stem Cell Identification Kits: R&D Systems 2018; Placencio, Li et al. 2010; Rhee, Ahn 2016).

Melatonina

Melatonina jest neuroendokrynnym hormonem, który produkowany jest głównie przez szyszynkę (Chu, Li et al. 2017). Jej wydzielanie następuje także w innych tkankach i narządach, w tym grasicy, śledzionie, sercu, mięśniu szkieletowym, wątrobie, żołądku, jelicie, łożysku, jądrach, jajnikach, korze mózgowej i prądkowiu. Immunocytochemicznie zidentyfikowano obecność melatoniny w komórkach enterochromafinowych błony śluzowej jelit oraz wykazano jej zawartość w przewodzie pokarmowym w przybliżeniu 400 razy większą niż w szyszynce (Acuña-Castroviejo, Escames et al. 2014). Hormon uczestniczy w regulacji rytmu biologicznego, poprawia jakość snu i odporność organizmu. Działa antyoksydacyjnie oraz przeciwnowotworowo. Poziom melatoniny jest 2-krotnie wyższy w osoczu w czasie nocy. Hamująco na jej wydzielanie wpływają inhibitory receptora β -adrenergicznego oraz sztuczne światło, co koreluje z malejącym stężeniem wapnia we krwi (Chu, Li et al. 2017).

Rola melatoniny w różnicowaniu osteocytów

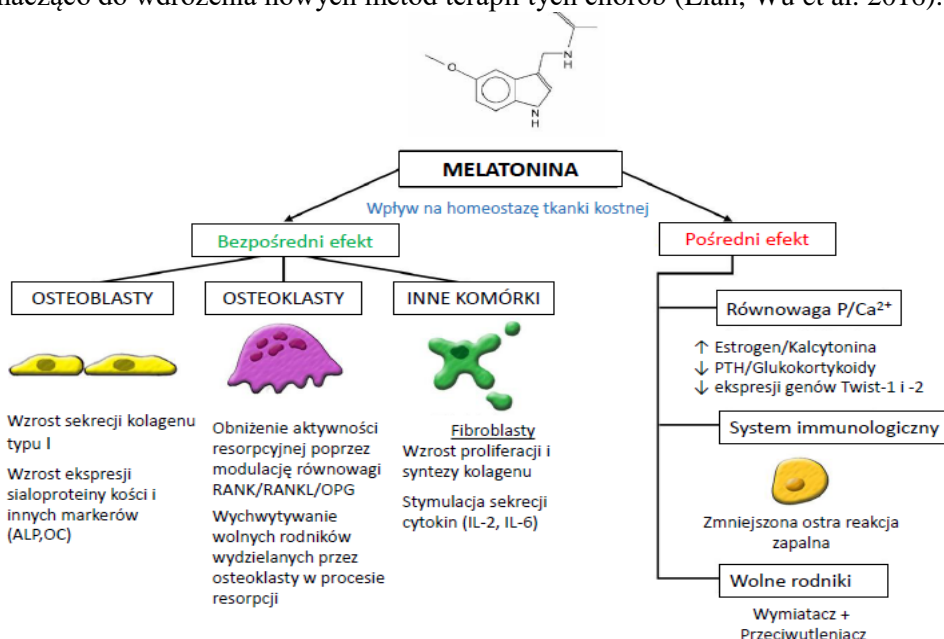
Melatonina wpływa na zmiany ilości osteoblastów i osteoklastów. Han i inni wykazują, że w fizjologicznej dawce tj. 1 μ M, melatonina stymuluje różnicowanie osteoblastów w komórkach linii komórkowej unieśmiertnionych mioblastów myszy C2C12, poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego Osterix, wzrost ekspresji fosfatazy alkaicznej, sialoproteiny oraz osteokalcyny (Ghareghani, Scavo et al. 2017; Han, Kim et al. 2017). Wpływa także promująco na osteogenezę z mezenchymalnych komórek macierzystych i preosteoblastów stymulując szlaki sygnałowe MEK/ERK2/1 oraz Wnt, czynnik transkrypcyjny RUNX2, białko morfogenetyczne kości – 2 i 4 (BMP-2, BMP-4, ang. *bone morphogenetic protein*). W ten sposób wzmacnia proliferację komórek tkanki kostnej, zwiększa masę kości i indukuje wzrost nowych narządów w różnych modelach badawczych na przykład u gryzoni (Maria, Samsonraj et al. 2018). Natomiast Zhou z współpracownikami wykazał, że stężenie 1-100 μ M hormonu inhibuje tworzenie osteocytów w MSC (Ghareghani, Scavo et al. 2017) poprzez modulację ekspresji osteoprotegeryny (OPG, ang. *osteoprotegerin*), rozpuszczalnego receptora dla liganda aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (RANKL, ang. *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*) oraz zahamowaniu tworzenia osteoklastów z udziałem RANKL. Dodatkowo kompleks melatonina-aktywowana sirtuina 1 może hamować proces różnicowania osteoklastów (Zhou, Chen et al. 2017).

Ponadto hormon wpływa na syntezę kolagenu typu I, który jest głównym wyznacznikiem wytrzymałości mechanicznej kości (Clafshenkel, Rutkowski et al. 2012). Oddziałuje on także z kalmoduliną. Jest to białko aktywowane przez związanie czterech jonów wapnia wewnątrz siateczki śródplazmatycznej. Wpływa na pompy jonowe – Ca^{2+} ATP-aza, oraz stymuluje działanie enzymów. Odpowiedni poziom tego pierwiastka jest niezbędny do tworzenia tkanki kostnej (Brzęczek, Słonka et al. 2016).

Shuai oraz Liao ze współpracownikami wykazali, że melatonina pozytywnie wpływa na zachowanie właściwości samoodnawiających się i różnicujących MSC szpiku kostnego u szczurów, szczególnie komórek hodowanych po 15 pasażu (Shuai,

Liao et al. 2016). Z kolei zespół badawczy z Sun Yat-sen University potwierdził poprawę poziomu ekspresji osteogennych markerów na poziomie mRNA w hodowli komórek MSC z dodatkiem melatoniny, w tym fosfatazy alkaicznej (ALP, ang. *alkaline phosphatase*), osteopontyny, osteokalcyny i RUNX2 (Chen, Xu et al. 2016).

Melatonina znosi również hamujący wpływ czynnika martwicy nowotworu (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor α*). TNF- α uczestniczy w promowaniu tworzenia osteoklastów i odgrywa kluczową rolę w osteoporozie oraz chorobach zapalnych związanych z resorpcją kości, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów. Melatonina poprzez przywrócenie prawidłowej osteogenezy może przyczynić się znacząco do wdrożenia nowych metod terapii tych chorób (Lian, Wu et al. 2016).



Rycina 2 Wpływ melatoniny na tkankę kostną. (ALP-alkaiczna fosfataza; OC-osteokalcyna).
Rycina wykonana na podstawie artykułu (Clafshenkel, Rutkowski et al. 2012).

Rola melatoniny w różnicowaniu chondrocytów

Melatonina promuje różnicowanie m.in. MSC w kierunku chondrocytów poprzez zwiększenie ekspresji agrekanu (ACAN, ang. *aggrecan*), kolagenu typu II (COL2A1, ang. *collagen type II alpha 1 chain*), kolagenu typu X (COL10A1, ang. *collagen type X alpha 1 chain*) oraz czynnika transkrypcyjnego SOX9 (Shuai, Liao et al. 2016). Zmniejsza także poziom wolnych rodników inicjowanych przez cytokiny zapalne wspomagając aktywność peroksydazy glutationowej (GPx ang. *Glutathione peroxidase*) w eliminacji nadtlenu wodoru (H₂O₂). Przyczynia się do obniżenia ilości metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*) i opóźnienia degradacji chrząstki (Luchetti, Canonico et al. 2014).

Leczenie melatoniną w połączeniu z interwencją nefarmakologiczną polegającą głównie na wzroście aktywności fizycznej zapobiega uszkodzeniu chrząstki indukowanemu przez kolagenazę, wywierając działanie przeciwzapalne i przeciw-

apoptotyczne. Działa także ochronnie na ludzkie chondrocyty poprzez hamowanie szlaku Sirt1 zaangażowanego w stan zapalny (Guo, Li et al. 2017).

Zhong i inni wykazali, że melatonina stosowana w wysokich dawkach (10 i 100 µg / ml) znacząco hamuje proliferację i różnicowanie chondrocytów VBGP (ang. *vertebral body growth plate*), w porównaniu do niskiego stężenia hormonu (0,1 i 1 µg/ml) (Wang, Man et al. 2014; Zhong, Li et al. 2013).

Rola melatoniny w różnicowaniu adipocytów

MSC różnicują się w adipoblasty, preadipocyty, a następnie dojrzałe komórki tkanki tłuszczowej (Adamczyk-Sowa, Sowa et al. 2014). Liczne czynniki transkrypcyjne uczestniczą w tym procesie. Należą do nich: białko wiążące sekwencję CCAAT/białko b (C/EBPb, ang. *CCAAT enhancer binding protein beta*), białko wiążące sekwencję CCAAT/wzmacniacz d (C/EBPd, ang. *CCAAT enhancer binding protein delta*), receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (PPAR- γ , ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), białko wiążące sekwencję CCAAT/białko a (C/EBPa, ang. *CCAAT enhancer binding protein alpha*) i białko wiążące element odpowiedzi na cAMP (CREB, ang. *cAMP response element-binding protein*) (Adamczyk-Sowa, Sowa et al. 2014). Niektóre badania wykazują, że melatonina stymuluje adipogenezę w preadipocytach 3T3-L1 poprzez zwiększenie ekspresji PPAR- γ i C/EBPa. Udowodniono, że receptor 2 dla melatoniny (MT2, ang. *melatonin receptor type 2*) pośredniczy w jej fizjologicznej roli w różnicowaniu, lipolizie i statusie redoks w bydlęcych preadipocytach BIP. Porównując, inni naukowcy wykazali iż hormon hamuje różnicowanie adipocytów poprzez obniżenie poziomu czynnika transkrypcyjnego C/EBP- β , który reguluje ekspresję PPAR- γ i C/EBP- α oraz późnych markerów różnicowania adipocytów, tj. adiponektyny i perilipiny. W związku z tym udział melatoniny w adipogenezie jest obecnie dyskusyjny (Adamczyk-Sowa, Sowa et al. 2014; Kato, Tanaka et al. 2015; Yang, Tang et al. 2017).

Rola melatoniny w różnicowaniu komórek neuronalnych

Zauważono również znaczący udział melatoniny w rozwoju komórek neuronalnych (Mendivil-Perez, Soto- Mercado et al. 2017). Udowodniono, że melatonina promuje neurogenezę strefy częściowej ośrodkowego układu nerwowego (SVZ-NSC, ang. *subventricular zone-neural stem cells*) poprzez zwiększenie ekspresji dojrzałych markerów neuronów, takich jak β -III-tubulina (ang. *neuron-specific class III beta-tubulin*) i hydroksylaza tyrozynowa (ang. *tyrosine hydroxylase*), oraz poprzez zmniejszenie produkcji kwaśnego białka włóknikowego (ang. *Glial fibrillary acidic protein*). Niektóre badania wykazują, że hormon ten oddziałuje głównie z mitochondriami wewnątrz komórki. Jest on uznawany za możliwy regulator funkcji mitochondriów poprzez utrzymywanie wydajności oksydacyjnej fosforylacji, syntezę ATP oraz zwiększenie aktywności kompleksów oddechowych. Melatonina w niskich dawkach (1 µM) promuje proliferację neuronalnych komórek macierzystych. Zastosowana w stężeniach farmakologicznych (25-100 µM), zmniejsza namnażanie NSC (Fu, Zhao et al. 2011; Moriya, Horie et al. 2007; Mendivil-Perez, Soto- Mercado et al. 2017).

Wnioski

Do tej pory wykazano, że melatonina może tłumić bądź stymulować podziały komórkowe, w zależności od jej stężenia lub typów komórek. W stężeniach fizjologicznych i farmakologicznych stymuluje prawidłową proliferację komórek takich jak, mysie splenocyty, szczurze komórki zakrętu zębatego hipokampa, ludzkie keratynocyty i fibroblasty skóry oraz mezenchymalne komórki macierzyste i nerwowe komórki macierzyste. Z drugiej strony istnieją doniesienia o hamującym wpływie melatoniny na komórki pochodzące z homogenatów szczurzej grasicy, mózgu, płuc i nerek. Wiele badań wskazuje na jej korzystny wpływ wobec metabolizmu kości. Dzięki swojemu zaangażowaniu w proces przebudowy kości może zostać wykorzystana jako czynnik różnicujący promujący proces osteogenezy. Właściwość ta prawdopodobnie mogła by udoskonalić metody regeneracji kośćca w medycynie regeneracyjnej (Adamczyk-Sowa, Sowa et al. 2014; Son, Cho et al. 2014).

Literatura

- Acuña-Castroviejo D., Escames G., Venegas C., Díaz-Casado M. E., Lima-Cabello E., López L. C., Rosales-Corral S., Tan D. X., Reiter R. J. **Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions.** Cellular and Molecular Life Sciences. 2014; 71(16): 2997-3025.
- Adamczyk-Sowa M., Sowa P., Zwirska-Korczała K., Pierzchała K. **Labeled [3 H]-thymidine incorporation in the DNA of 3T3-L1 preadipocytes due to MT 2-and not MT 3-melatonin receptor.** Journal of Physiology and Pharmacology. 2014; 65:135-143.
- Brzęczek M., Słonka K., Hyla-Klekot L. **Melatonin – a pleiotropic hormone.** *Pediatrics i Medycyna Rodzinna.* 2016; 30(12):127-133.
- Chen C., Xu C., Zhou T., Gao B., Zhou H., Chen C., Zhang C., Huang D., Su P. **Abnormal osteogenic and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from patients with adolescent idiopathic scoliosis in response to melatonin.** Molecular Medicine Reports. 2016; 14: 1201-1209.
- Chu Z. M., Li H. B., Sun S. X., Jiang Y. C., Wang B., Dong Y. F. **Melatonin promotes osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in aged rats.** European review for medical and pharmacological sciences. 2017; 21:4446-4456.
- Clafshenkel W. P., Rutkowski J. L., Palchesko R. N., Romeo J. D., McGowan K. A., Gawalt E. S., Witt-Enderby P. A. **A novel calcium aluminate-melatonin scaffold enhances bone regeneration within a calvarial defect.** Journal of Pineal Research. 2012; 1(53):206-218.
- Desancé M., Contentin R., Bertoni L., Gomez-Leduc T., Branly T., Jacquet S., Betsch J. M., Batho A., Legendre F., Audigié F., Galéra P., Demoor M. **Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy.** International Journal of Molecular Sciences. 2018; 19(2):1-33.
- Dixit P., Katare R. **Challenges in identifying the best source of stem cells for cardiac regeneration therapy.** Stem Cell Research & Therapy. 2015; 6(1):1-12.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D. S., Deans R. J., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. M. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.** The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8:315-317.
- Fernandes M., Valente S., Sabongi R., Gomes dos Santos J., Leite V., Ulrich H., Nery A., da Silva Fernandes M. J. **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration.** Neural Regeneration Research. 2018; 13(1):100-104.
- Frati P., Scopetti M., Santurro A., Gatto V., Fineschi V. **Stem Cell Research and Clinical Translation: A Roadmap about Good Clinical Practice and Patient Care.** Stem Cells International [Internet]. 2017 [cited 2018 January 9];2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5635281/>

- Fu J., Zhao S. D., Liu H. J., Yuan Q. H., Liu S. M., Zhang Y. M., Ling E. A., Hao A. J. **Melatonin promotes proliferation and differentiation of neural stem cells subjected to hypoxia in vitro.** *Journal of Pineal Research.* 2011; 1(51): 104-112.
- Ghareghani M., Scavo L., Arnoult D., Zibara K., Farhadi N. **Melatonin therapy reduces the risk of osteoporosis and normalizes bone formation in multiple sclerosis.** *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2018; 32(2):181-187.
- Guo J. Y., Li F., Wen Y. B., Cui H. X., Guo M. L., Zhang L., Zhang Y. F., Guo Y. J., Guo Y. X. **Melatonin inhibits Sirt1-dependent NAMPT and NFAT5 signaling in chondrocytes to attenuate osteoarthritis.** *Oncotarget.* 2017; 3(8):55967-55983.
- Han Y., Kim Y.M., Kim H.S., Lee K.Y. **Melatonin promotes osteoblast differentiation by regulating Osterix protein stability and expression.** *Scientific Reports.* 2017; 7(1):1-11.
- Hirata Y., Furuhashi K., Ishii H., Li H. W., Pinho S., Ding L., Robson S. C., Frenette P. S., Fujisaki J. **CD150 high Bone Marrow Tregs Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Immune Privilege via Adenosine.** *Cell Stem Cell.* 2018; 22(3):445-453.
- Hu L., Yin C., Zhao F., Ali A., Ma J., Qian A. **Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2018; 25(19):360.
- Kato H., Tanaka G., Masuda S., Ogasawara J., Sakurai T., Kizaki T., Ohno H., Izawa T. **Melatonin promotes adipogenesis and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 preadipocytes.** *Journal of Pineal Research.* 2015; 59(2):267-275.
- Lian C., Wu Z., Gao B., Peng Y., Liang A., Xu C., Liu L., Qiu X., Huang J., Zhou H., Cai Y., Su P., Huang D. **Melatonin reversed tumor necrosis factor- α -inhibited osteogenesis of human mesenchymal stem cells by stabilizing SMAD1 protein.** *Journal of Pineal Research.* 2016; 61(3):317-327.
- Luchetti F., Canonico B., Bartolini D., Arcangeletti M., Ciffolilli S., Murdolo G., Piroddi M., Papa S., Reiter R. J., Galli F. **Melatonin regulates mesenchymal stem cell differentiation: a review.** *Journal of Pineal Research.* 2014; 56:382-397.
- Maioli M., Basoli V., Santaniello S., Cruciani S., Delitala A. P., Pinna R., Milia E., Grillari-Voglauer R., Fontani V., Rinaldi S., Muggironi R., Pigliaru G., Ventura C. **Osteogenesis from Dental Pulp Derived Stem Cells: A Novel Conditioned Medium Including Melatonin within a Mixture of Hyaluronic, Butyric, and Retinoic Acids.** *Stem Cells International.* 2016; 2016:2056416.
- Maria S., Samsonraj R. M., Munmun F., Glas J., Silvestros M., Kotlarczyk M. P., Rylands R., Dudakovic A., van Wijnen A. J., Enderby L. T., Lassila H., Dodda B., Davis V. L., Balk J., Burow M., Bunnell B. A., Witt-Enderby P. A. **Biological effects of melatonin on osteoblast/osteoclast cocultures, bone, and quality of life: Implications of a role for MT2 melatonin receptors, MEK1/2, and MEK5 in melatonin-mediated osteoblastogenesis.** *Journal of Pineal Research.* 2018; 64(3).
- Marofi F., Vahedi G., Biglari A., Esmaeilzadeh A., Athari S. S. **Mesenchymal Stromal/Stem Cells: A New Era in the Cell-Based Targeted Gene Therapy of Cancer.** *Frontiers in Immunology.* 2017; 8:1770.
- Mendivil-Perez M., Soto-Mercado V., Guerra-Librero A., Fernandez-Gil B. I., Florido J., Shen Y. Q., Tejada M. A., Capilla-Gonzalez V., Rusanova I., Garcia-Verdugo J. M., Acuña-Castroviejo D., López L. C., Velez-Pardo C., Jimenez-Del-Rio M., Ferrer J. M., Escames G. **Melatonin enhances neural stem cell differentiation and engraftment by increasing mitochondrial function.** *Journal of Pineal Research.* 2017; 63(2):1-18.
- Mesenchymal Stem Cell Identification Kits: R&D Systems.** [cited 2018 February 21]. Available from: <https://www.rndsystems.com/products/mesenchymal-stem-cell-identification-kits>
- Moerman E. J., Teng K., Lipschitz D. A., Lecka-Czernik B. **Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- γ 2 transcription factor and TGF- β /BMP signaling pathways.** *Aging cell.* 2004; 3(6):379-389.
- Moriya T., Horie N., Mitome M., Shinohara K. **Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells.** *Journal of Pineal Research.* 2007; 42(4):411-418.

- Nazari-Shafti T., Kempfert J., Falk V., Röhl W., Stamm C. **Regenerative Medicine/Cardiac Cell Therapy: Adult/Somatic Progenitor Cells.** *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon.* 2017; 66(1):42-52.
- Olkowska-Truchanowicz J. **Różnicowanie komórek prekursorowych izolowanych z tkanki tłuszczowej—nowe możliwości dla inżynierii tkankowej i terapii komórkowej.** *Postępy Biologii Komórki.* 2009; 36(2): 217-231.
- Park I. H., Zhao R., West J. A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T. A., Lerou P. H., Lensch M. W., Daley G. Q. **Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors.** *Nature.* 2008; 451(7175):141-146.
- Placencio V. R., Li X., Sherrill T. P., Fritz G., Bhowmick N. A. **Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Incorporate into the Prostate during Regrowth.** *PLoS ONE.* 2010; 5(9):12920.
- Ranjbaran H., Abediankenari S., Mohammadi M., Jafari N., Khalilian A., Rahmani Z., Momeninezhad Amiri M., Ebrahimi P. **Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization.** *Acta Medica Iranica.* 2018; 56(1):28-33.
- Rhee Y. H., Ahn J. C. **Melatonin attenuated adipogenesis through reduction of the CCAAT/enhancer binding protein beta by regulating the glycogen synthase 3 beta in human mesenchymal stem cells.** *Journal of Physiology and Biochemistry.* 2016; 72(2):145-155.
- Shen W., Chen J., Gantz M., Punyanitya M., Heymsfield S. B., Gallagher D., Albu J., Engelson E., Kotler D., Pi-Sunyer X., Gilsanz V. **MRI-measured pelvic bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured bone mineral in younger and older adults.** *European Journal of Clinical Nutrition.* 2012; 66(9):983-988.
- Shuai Y., Liao L., Su X., Yu Y., Shao B., Jing H., Zhang X., Deng Z., Jin Y. **Melatonin Treatment Improves Mesenchymal Stem Cells Therapy by Preserving Stemness during Long-term In Vitro Expansion.** *Theranostics.* 2016; 6(11):1899-1917.
- Singh A., Singh A., Sen D. **Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015).** *Stem Cell Research & Therapy.* 2016; 7(1):82.
- Son J. H., Cho Y. C., Sung I. Y., Kim I. R., Park B. S., Kim Y. D. **Melatonin promotes osteoblast differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells under hypoxic conditions through activation of PKD/p38 pathways.** *Journal of Pineal Research.* 2014; 57(4):385-392.
- Wang J., Saijo K., Skola D., Jin C., Ma Q., Merkurjev D., Glass C. K., Rosenfeld M. G. **Histone demethylase LSD1 regulates hematopoietic stem cells homeostasis and protects from death by endotoxic shock.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2018; 115(2):244-252.
- Wang W. W., Man G. C., Wong J. H., Ng T. B., Lee K. M., Ng B. K., Yeung H. Y., Qiu Y., Cheng J. C. **Abnormal Response of the Proliferation and Differentiation of Growth Plate Chondrocytes to Melatonin in Adolescent Idiopathic Scoliosis.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2014; 15(9):17100-17114.
- Yang W., Tang K., Wang Y., Zhang Y., Zan L. **Melatonin promotes triacylglycerol accumulation via MT2 receptor during differentiation in bovine intramuscular preadipocytes.** *Scientific Reports.* 2017; 7(1):1-12.
- Yin L., Wu Y., Yang Z., Tee C. A., Denslin V., Lai Z., Lim C. T., Lee E. H., Han J. **Microfluidic label-free selection of mesenchymal stem cell subpopulation during culture expansion extends the chondrogenic potential in vitro.** *Lab on a Chip.* 2018; 18(6):878-889.
- Zhong Z.M., Li T., Xu Z.X., Meng T.T., Zeng J.H., Zheng S., Ye W.B., Wu Q., Chen J.T. **Effect of melatonin on the proliferation and differentiation of chondrocytes from rat vertebral body growth plate in vitro.** *International Journal of Medical Sciences.* 2013; 10:1392-1398.
- Zhou L., Chen X., Yan J., Li M., Liu T., Zhu C., Pan G., Guo Q., Yang H., Pei M., He F. **Melatonin at pharmacological concentrations suppresses osteoclastogenesis via the attenuation of intracellular ROS.** *Osteoporosis International.* 2017; 28(12):3325-3337.

Zastosowanie komórek macierzystych miazgi zęba w regeneracji tkanki nerwowej

*Natalia Bryniarska^{1,2}

¹Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej, Instytut Farmakologii, Polska Akademia Nauk, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków, Polska

²Katedra Neurologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Botaniczna 3, 31-503 Kraków, Polska

*Autor korespondencyjny:

Natalia Bryniarska, natalia.bryniarska@outlook.com

Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej, Instytut Farmakologii, Polska Akademia Nauk, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków, Polska

Ryciny zawarte w monografii modyfikowano i wykonano przy użyciu grafik, z których korzystano na podstawie licencji Creative Commons Attribution 3.0 Unported License przez – Servier Medical Art by Servier (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Streszczenie

Komórki macierzyste miazgi zęba (*ang. dental pulp stem cells; DPSCs*) stanowią populację komórek rezydujących w kanałach zębowych ssaków. Są to komórki o charakterze multipotencjalnym, wykazujące morfologię i ekspresję markerów powierzchniowych mezenchymalnych komórek macierzystych: CD29, CD44, CD90, CD73. Dodatkowo są negatywne dla antygenów charakterystycznych dla hematopoetycznych komórek macierzystych takich jak: CD45, czy CD34. Ich zaletami są nieinwazyjna procedura pobrania oraz wysoki potencjał proliferacyjny. Dodatkowo komórki DPSCs ulegają różnicowaniu osteogennemu, chondrogennemu i adipogennemu, a dzięki ich ektodermalnemu pochodzeniu mogą również zostać wykorzystane w regeneracji tkanki nerwowej. Celem pracy jest przegląd literatury dotyczącej możliwości zastosowania komórek macierzystych miazgi zęba w regeneracji tkanki nerwowej.

Komórki macierzyste miazgi zęba mogą zostać wykorzystane w regeneracji tkanki nerwowej w niezróżnicowanej formie poprzez oddziaływanie parakryne lub też po zróżnicowaniu w neurony. Proces ten zachodzi dwustopniowo, z wykorzystaniem stadium neurosfer. Komórki DPSCs po zróżnicowaniu wykazują zwiększoną ekspresję markerów, typowych dla komórki nerwowej i zmniejszoną ekspresję nestyny, białka charakterystycznego dla neuralnych komórek macierzystych, co potwierdza ich zróżnicowanie.

Zastosowanie komórek macierzystych daje nadzieję na zmniejszenie skutków choroby dla osób po przebyciu udarze niedokrwinnym mózgu jak i również dla pacjentów cierpiących na choroby neurodegeneracyjne. Komórki macierzyste miazgi zęba dzięki swojemu ektodermalnemu pochodzeniu stają się atrakcyjną alternatywą dla innych typów komórek macierzystych takich jak komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego, czy komórki macierzyste ze sznura pępowinowego w wykorzystaniu ich w regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej.

Abstract

Dental pulp stem cells (DPSCs) are a population of cells residing in mammalian dental canals. These multipotent cells show the morphology and expression of surface markers of mesenchymal stem cells: CD29, CD44, CD90, CD73. In addition, they are negative for antigens characteristic for hematopoietic stem cells such as CD45 or CD34. Their advantages are the non-invasive collection procedure and high proliferative potential. In addition, DPSCs undergo osteogenic, chondrogenic, adipogenic differentiation and due to their ectodermal origin they can also be used in the regeneration of nervous tissue. The aim of the study is to review of literature addressing possibilities of using dental pulp stem cells in the regeneration of nervous tissue.

Dental pulp stem cells can be used in the regeneration of nervous tissue in both undifferentiated state through paracrine effects and also after differentiation into neurons. This process takes place in two stages with the neurospheres stage. DPSCs after differentiation show increased expression of neural cell markers and reduced expression of nestin – protein characteristic of neural stem cells, what confirms their differentiation.

Using stem cells gives hope for reducing the effects of the disease for people after ischemic stroke as well as for patients suffering from neurodegenerative diseases. Dental pulp stem cells due to their ectodermal origin become an attractive alternative to other types of stem cells, such as stem cells derived from the bone marrow or umbilical cord stem cells in their use in the regeneration of damaged nervous tissue.

Komórki macierzyste

Komórki macierzyste (KM) są to komórki mające zdolność do nieograniczonej proliferacji m.in. dzięki telomerazie umożliwiającej zwiększanie liczby podziałów oraz do różnicowania się w inne typy komórek (Hiyama, Hiyama 2007). Ze względu na swój potencjał proliferacyjny i zdolność do różnicowania komórki macierzyste stanowią potencjalne źródło w regeneracji różnych tkanek (Kim, Cho, 2013). Komórki macierzyste dzieli się w zależności od pochodzenia – w tej grupie wyróżnia się komórki macierzyste embrionalne, płodowe, z tkanek dojrzałych i reprogramowane oraz w zależności od zdolności do różnicowania – komórki macierzyste totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne oraz unipotencjalne (Zychowicz, 2012).

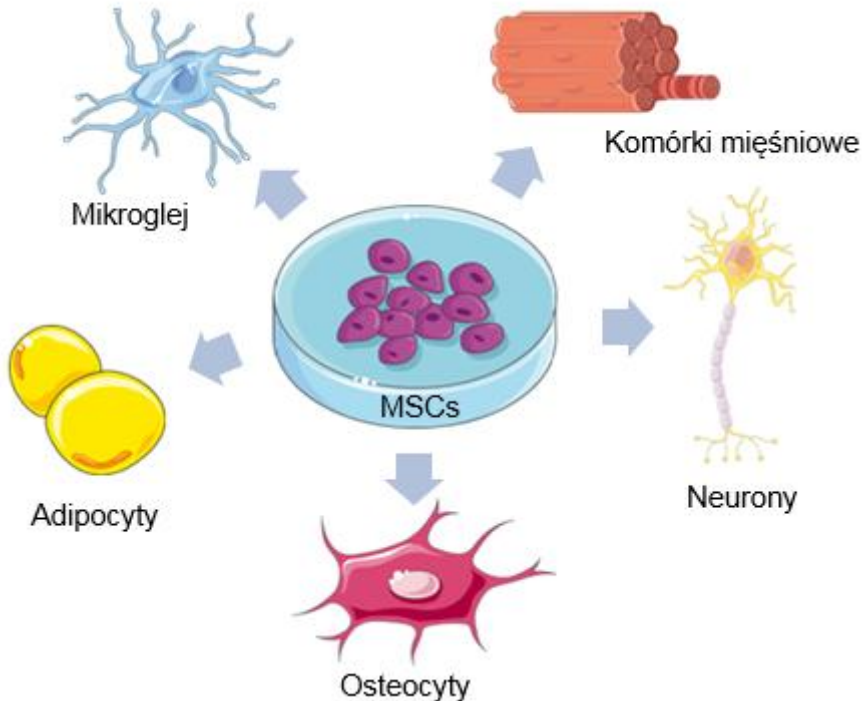
Jednym z wyzwań, które spotyka się na drodze do zastosowania KM w terapii jest zlokalizowanie optymalnego rezerwuaru tych komórek w dorosłym organizmie człowieka (d'Aquino, De Rosa, 2009). Optymalnym źródłem komórek wykorzystywanych w celach regeneracyjnych wydają się być komórki totipotencjalne i pluripotencjalne, ze względu na ich potencjał do różnicowania (Nishikawa, Jakt, 2007). Jednak mogą one stwarzać kontrowersje etyczne ze względu na sposób ich otrzymywania. Dlatego też alternatywą dla tych komórek stały się indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (*ang. induced pluripotent stem cells – iPSCs*). Po raz pierwszy zostały one pozyskane w 2006 roku z fibroblastów myszy i w 2007 roku z ludzkich fibroblastów (Takahashi, Tanabe, 2007; Takahashi, Yamanaka, 2006). iPSCs otrzymano przez potraktowanie komórek fibroblastów czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za pluripotencję to jest: Oct-3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc (Takahashi, Yamanaka, 2006). Jednak główną wadą komórek iPSCs jest zdolność do tworzenia potworników (Takahashi, Tanabe, 2007; Takahashi, Yamanaka, 2006). Kolejnym źródłem komórek macierzystych o pluripotencjalnych cechach są tzw. bardzo małe komórki macierzyste podobne do embrionalnych (*ang. Very Small Embryonic - Like SCs - VSELs*). Komórki VSELs rezydują w dorosłych tkankach takich jak szpik kostny, nerki, płuca, mózg czy trzustka i inne dojrzałe tkanki (Zuba-Surma, Kucia, 2008). Są to komórki o bardzo małych rozmiarach: 2-4 μm u myszy i 7 μm u ludzi. Komórki te zawierają duże jądra otoczone niewielką ilością cytoplazmy oraz charakteryzują się fenotypem: Sca-1+Lin-CD45- (u myszy) oraz CD133+Lin-CD45- (u ludzi) (Wojakowski, Tendera, 2009). Komórki VSELs tak jak iPSCs wykazują ekspresję wielu markerów pluripotencji np. Oct-4 czy Nanog, mogą różnicować się także we wszystkie komórki trzech listków

zarodkowych, jednak ich największą zaletą jest brak zdolności tworzenia teratom (Kucia, Halasa, 2007).

Kolejnym źródłem komórek, które mogą zostać wykorzystywane w regeneracji są multipotencjalne komórki macierzyste, które można wyizolować z różnych dorosłych tkanek organizmu na przykład ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej czy miazgi zęba (Zychowicz, 2012; Sobhani, Khanlarkhani, 2017). Mogą one różnicować się w komórki w obrębie jednego listka zarodkowego, dlatego też stanowią ważne źródło komórek, które można wykorzystać w transplantacji, regeneracji uszkodzenia rdzenia kręgowego, złamaniu kości, leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, ale również w monitorowaniu leków (Sobhani, Khanlarkhani, 2017).

Do grupy komórek unipotentjalnych zalicza się komórki, które są zdolne do różnicowanie w jeden typ komórek (Zychowicz, 2012). Populacje tych komórek można znaleźć w większości w dojrzałych tkankach takich jak m.in. serce, jelito, wątroba czy mózg (Furuyama, Kawaguchi, 2011; Seaberg, Van Der Kooy, 2003).

Mezenchymalne komórki macierzyste (*ang. Mesenchymal stem cells – MSCs*) zostały pierwszy raz opisane przez Friedensteina i współpracowników jako komórki o charakterze multipotencjalnym, które wykazują dużą zdolność do różnicowania, przez co są postrzegane jako bardzo ważne w zastosowaniu w inżynierii tkankowej (Jin, Bae, 2013; Lin, Gronthos, 2008)



Ryc. 1 Schemat przedstawiający potencjał do różnicowania komórek MSCs (opracowanie własne na podstawie: Dreła, 2015); [55].

Mezenchymalne komórki macierzyste charakteryzują się adhezją do plastiku oraz wykazują ekspresję markerów CD105, CD73 i CD90, a także są negatywne dla CD45, CD34, CD11b, CD14, HLA-DR (Dominici, Le Blanc, 2006). Komórki te mogą również wydzielać wiele czynników wzrostu takich jak TGF- α , TGF- β , IGF-1, EGF, FGF, VEGF indukujących proliferację i angiogenezę w innych komórkach, a także wykazywać działanie przeciwzapalne i immunomodulacyjne (Sobhani, Khanlarkhani, 2017).

MSCs pochodzące z dorosłych tkanek ludzkich wykazują natomiast ekspresję cząsteczek kompleksu zgodności tkankowej klasy I (MHC I) na ich powierzchni komórkowej, ale nie głównych cząsteczek kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC II), co sprzyja ich przeszczepianiu, także w układzie allogenicznym (Williams, Hare, 2011). Syntezują także czynniki wzrostu i cytokiny, które uczestniczą w regulacji hematopoezy, sygnalizacji komórkowej i modulacji odpowiedzi immunologicznej wyciszając stan zapalny (Dalous, Larghero, 2012). Głównymi źródłami MSCs jest szpik kostny oraz tkanka tłuszczowa, jednak procedura pozyskania tych komórek jest często inwazyjna oraz ograniczona wiekiem pacjenta, gdyż komórki od osób starszych mogą być nieefektywne klinicznie (Jin, Bae, 2013). Ważnym źródłem tych komórek macierzystych jest także pępownina oraz miazga zęba, z których pozyskanie komórek jest nieinwazyjne, bezbolesne dla pacjenta oraz nie stwarzające kontrowersji etycznych (Dalous, Larghero, 2012).

Komórki macierzyste miazgi zęba

Komórki macierzyste miazgi zęba (*ang. dental pulp stem cells – DPSCs*) wywodzą się z ektodermy i podczas embriogenezy migrują z grzebienia nerwowego tworząc załazek zęba (D'aquino, Papaccio, 2008). DPSCs wykazują również ekspresję GFAP, HNK-1, Nestin, P75 i S-100, które są markerami komórek macierzystych grzebienia nerwowego, co potwierdza ich pochodzenie (Potdar, Jethmalani Pravin, 2015). Ze względu na proces odontogenezy, gdzie zęby wyrastają z dwóch warstw embrionalnych: ektomezenchmy grzebienia nerwowego oraz ektodermy blaszki zębowej, przypuszcza się, że istnieją dwie różne linie DPSCs w obrębie miazgi zębów (Suchánek, Soukup, 2007). Populacje rozróżniono pod względem obecności markeru powierzchniowego CD34 i wyróżniono subpopulację DPSCs o fenotypie: STRO-1+/c-Kit+/CD34+, która wykazywała niższą proliferację, wczesne starzenie się komórek i wyższy poziom apoptozy oraz subpopulację STRO-1+/c-Kit+/CD34-, która wykazywała wyższą proliferację i nie wykazywała wczesnej apoptozy (Pisciotta, Carnevale, 2015).

DPSCs po pierwszy zostały one opisane w 2000 roku przez Profesora Stana Gronthosa, który wyizolował komórki z ludzkich trzecich trzonowców (Gronthos, Mankani, 2000). Natomiast w 2003 roku zostały przedstawione badania, w których miazgę pobrano z zębów mlecznych i wyizolowane komórki nazwano komórkami SHED (*ang. stem cells from human exfoliated deciduous teeth*), które ze względu na swoją dostępność oraz dużą zdolność do regeneracji stanowią również alternatywę dla innych mezenchymalnych komórek macierzystych (Suchánek, Soukup, 2007; Wang, Sha, 2012). Komórki SHED posiadają również wyższą niż DPSCs zdolność do proliferacji oraz mogą różnicować się w wiele typów komórek, w tym

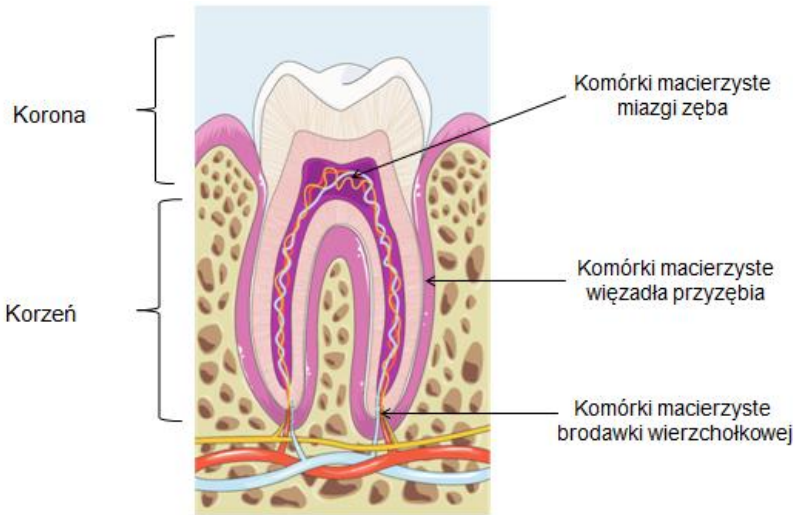
w adipocyty czy też w neurony, dlatego według badaczy SHED stanowią bardziej niedojrzałą populację multipotentnych komórek macierzystych (Zhang, Chen, 2005).

DPSCs posiadają również właściwości immunoregulujące i są zdolne do indukowania apoptozy komórek T *in vitro* i łagodzenia uszkodzenia tkanki związanej z zapaleniem (Cui, Chen, 2014). Mogą one zostać zatem potencjalnie wykorzystane do przyszłych terapii regeneracyjnych w takich chorobach jak cukrzyca typu 1, choroby neurologiczne, choroby niedoboru odporności i choroby kości i chrząstek (Potdar, Jethmalani Pravin, 2015). DPSCs charakteryzują się typowym fenotypem mezenchymalnych KM, a zatem wykazują ekspresję antygenów powierzchniowych takich jak: CD105, CD73, CD90, CD29 (Hilkens, Gervois, 2013; Alsulaimani, Ajlan, 2016) nie posiadają natomiast ekspresji markerów charakterystycznych dla hematopoetycznych komórek macierzystych: CD45, CD11b, HLA-DR (Gimble, Guilak, 2008).

Miazga zęba, z której pochodzą komórki DPSCs, jest dobrze wyodrębniona od pozostałych tkanek zęba oraz zachowuje unikalną strukturę histologiczną (Ryc. 1). Utrzymuje ona swoją pierwotną strukturę, która przypomina żelatynową tkankę pępowinową, a także pozostaje niszą komórek macierzystych (Suchánek, Soukup, 2007). Jest ona miękką tkanką znajdującą się w rdzeniu zęba, która składa się głównie z tkanki łącznej, układu kapilarnego krwi, nerwów, fibroblastów, odontoblastów i komórek odpornościowych. Podstawową funkcją miazgi jest tworzenie zębiny poprzez działanie odontoblastów, ale także funkcje odżywcze zęba, obrona immunologiczna oraz funkcja sensoryczna. Dziś przyjmuje się, że miazga stanowi główną i największą niszę komórek macierzystych zęba (Martens, Bronckaers, 2013).

W 2004 roku wyizolowano kolejną nową subpopulację komórek zęba z ludzkich trzonowców, które zlokalizowano w przestrzeni międzykomorowej oraz nazwano multipotentnymi komórkami macierzystymi więzadła przyzębia (PDLSCs) (Zhu, Liang, 2015). Ludzkie komórki macierzyste więzadła przyzębia mogą różnicować się w komórki podobne do cementoblastów (Wada, Menicanin, 2009; Potdar, Jethmalani Pravin, 2015). Mają także zdolność do tworzenia tkanki łącznej, która jest bogata we włókna kolagenu typu I (Seo, Miura, 2004). PDLSCs po wysianiu na rusztowaniach w hodowlach 3D takich jak na przykład gąbka fibrynowa, mogą wytwarzać kość w warunkach *in vivo* i zachowują właściwości komórek macierzystych oraz zdolność regeneracji tkanek (Potdar, Jethmalani Pravin, 2015).

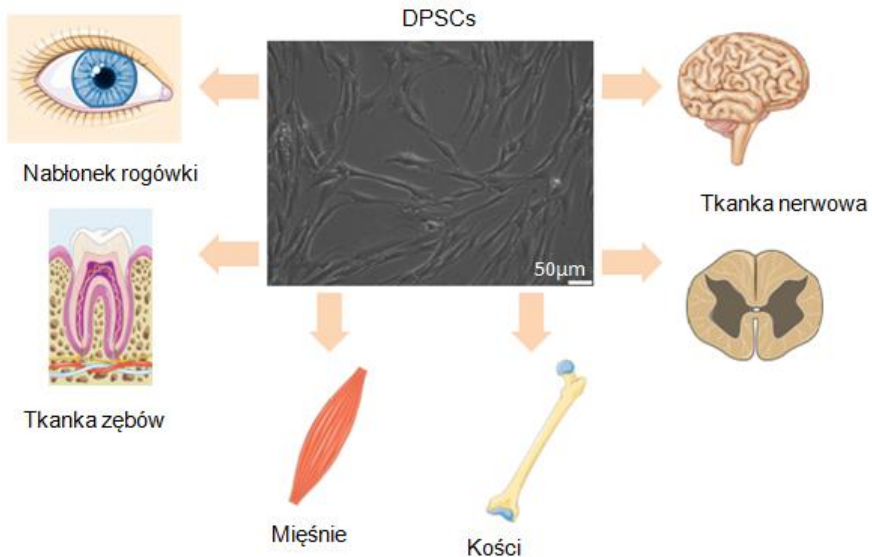
Kolejną niszą komórek macierzystych zęba jest brodawka wierzchołkowa, będąca źródłem komórek tzw. SCAP, które ze względu na swój wysoki potencjał proliferacyjny mogą zostać wykorzystane do inżynierii korzeni biologicznych i również pełnić funkcję regeneracyjną w zastosowaniach klinicznych, ponieważ są zdolne do różnicowania komórek odontoblastycznych i produkcji zębiny *in vivo* (Potdar, Jethmalani Pravin, 2015). Ze względu na liczbę oraz dostępność materiału najczęściej izolowana i badana populacja KM pochodzenia zębowego są jednak DPSCs (Martens, Bronckaers, 2013).



Ryc. 2 Przekrój przez zęba trzonowego – umiejscowienie miążgi oraz subpopulacji KM zidentyfikowanych w strukturach tkanek zębów ludzkich (opracowanie własne); [55].

Różnicowanie komórek macierzystych miążgi zęba

Z doniesień literaturowych wynika, że DPSCs można różnicować przez modulowanie czynnikami wzrostu, czynnikami transkrypcyjnymi, białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i cząsteczkami receptora do różnych typów komórek, takich jak odontoblasty, osteoblasty, chondrocyty, komórki neuralne, adipocyty, komórki nabłonka rogówki (Young, Sloan, 2013).



Ryc. 3 Schemat przedstawiający zdolność do różnicowania DPSCs w kierunku różnych tkanek (opracowanie własne na podstawie: Young, Sloan, 2015); [55].

Wykazano, że podobnie jak osteoblasty, komórki miazgi zęba wykazują ekspresję markerów charakterystycznych dla tkanki kostnej, takich jak sialoproteina kości, fosfataza alkaliczna, kolagen typu I i osteokalcyna. Ich zróżnicowanie regulują różne markery biorące udział w tworzeniu kości, w tym rodzina czynników TGF- β (Seo, Miura, 2004).

Wykazano również, że po przeszczepie ludzkich DPSCs (ang. *human DPSCs* – hDPSCs) do serca wykazują one parakryne efekty takie jak wydzielanie m.in. VEGF, które mogą pobudzić regenerację serca po zawale oraz indukować angiogenezę. Efekt taki zauważono po przeszczepie hDPSCs do zwierzęcego modelu zawału serca (Gandia, Armiñan, 2008).

DPSCs mogą również różnicować się w neurony przez stadium neurosfer, a następnie poprzez neuronalne dojrzewanie, oparte na sygnalizacji cAMP i neurotrofyny-3 (NT-3) (Gervois, Struys, 2015). Na poziomie ultrastrukturalnym wykazano, że mikrośrodowisko wewnątrz sfer wspomagało komunikację między komórkami, a różnicowane hDPSCs charakteryzowały się zwiększoną ekspresją markerów neuronalnych (Gervois, Struys, 2015).

Zastosowanie komórek macierzystych stanowi bardzo innowacyjną oraz obiecującą metodę terapii uszkodzeń układu nerwowego. W przypadku komórek macierzystych miazgi zęba, ich ektodermalne pochodzenie sprawia, że wykorzystanie tych komórek pozwala na zwalczenie nie tylko objawów lub skutków choroby, ale również w dużym stopniu przywraca funkcjonalność uszkodzonych tkanek, co jest kluczowe dla tkanki nerwowej.

Celem pracy jest przegląd literatury dotyczącej możliwości zastosowania komórek macierzystych miazgi zęba w regeneracji tkanki nerwowej.

Strategia wyszukiwania oraz kryteria selekcji

Praca miała na celu ocenę potencjału komórek macierzystych miazgi zęba do jej zastosowania w regeneracji uszkodzeń tkanki nerwowej. Do przeprowadzenia wyszukiwania w bazach danych: PubMed (NCBI), Google Scholar, Web of Science oraz Scopus zostały użyte następujące terminy: „komórki macierzyste”, „mezenchymalne komórki macierzyste”, „komórki macierzyste miazgi zęba”, jak również „neuralne komórki macierzyste”, „indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste”, „różnicowanie komórek macierzystych miazgi zęba” oraz „choroby neurodegeneracyjne”, „udar niedokrwienny mózgu”, „choroba Parkinsona” i „choroba Alzheimera”. Przeszukiwano artykuły naukowe opublikowane w latach: 2000 do 2018r. Wyniki wyszukiwania ograniczały się do zastosowania komórek macierzystych, ze szczególnym uwzględnieniem komórek macierzystych miazgi zęba w często występujących chorobach układu nerwowego takich jak udar niedokrwienny mózgu, choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera.

Udar niedokrwienny mózgu

Udar jest główną przyczyną zgonów i długotrwałej niepełnosprawności u ludzi. Aż ponad 80% udarów pochodzi z niedotlenienia spowodowanego zmniejszeniem dopływu krwi do mózgu. Przeprowadzone badania pokazały, że jeżeli nie zostanie wprowadzone odpowiednie leczenie w reakcji na niedotlenienie to co minutę obumiera, aż 1,8 miliona neuronów (El-Koussy, Schroth, 2014).

Powszechnie używana terapia poudarowa to podawanie pacjentowi rekombinowanego tkankowo aktywatora plazminogenu. Jest to metoda, która może zostać wykorzystana w okresie tylko do 4,5 godzin od pojawienia się pierwszych objawów. Jednak u większości pacjentów występują przeciwwskazania do leczenia trombolitycznego, nie tylko ze względu na przekroczenie wspomnianych 4,5 godzin, ale również ze względu na odbyte w niedalekiej przeszłości operacje (Prabhakaran, Ruff, 2015).

Wykazano również pozytywną korelację występowania udaru wraz ze zwiększającym się wiekiem. Zaobserwowano, że zjawisko wystąpienia tej choroby jest częstsze w przypadku mężczyzn oraz rasy czarnej i Latynosów (Strepikowska, 2009). Starzenie się nie tylko sprawia, że pacjenci są bardziej podatni na tą chorobę, ale także zostają u nich osłabione zdolności do samodzielnej naprawy tkanki objętej udarem. Dlatego terapię komórkami macierzystymi, które charakteryzują się plastycznością komórkową i zdolnością do samoodnowy – mogą być obiecującą strategią dla regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej (Wanga, Ji, 2017).

Zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych, w tym komórek DPSCs w terapii po udarze niedokrwiennym mózgu

Mezenchymalne komórki macierzyste mogą pochodzić z różnych tkanek takich jak: szpik kostny, łożysko, mięśnie, skóra, miazga zęba, tkanka tłuszczowa, pępowina oraz galareta Whartona (Marei, Hasan, 2018).

Potencjał terapeutyczny mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (BM-MSCs) w przypadku udaru był szeroko oceniany zarówno na etapie badań przedklinicznych, jak i badań klinicznych. W modelu zwierzęcym udaru przeszczepienie BM-MSCs skutkowało poprawą funkcji sensomotorycznych, promowaniem synaptogenezy, stymulacją regeneracji nerwów, a także pośredniczyło w efektach immunomodulujących. Badania nad BM-MSCs wykazały, że komórki te mogą bezpiecznie zostać wykorzystane w praktyce klinicznej. Stąd też BM-MSCs stanowią atrakcyjną alternatywę, która pozwala uniknąć problemów etycznych związanych z wykorzystywaniem komórek płodowych (Marei, Hasan, 2018).

Przeszczep komórek DPSCs w zwierzęcym modelu niedokrwiennym udaru mózgu również prowadził do polepszenia żywotności i powstawania komórek neuronalnych i glejowych. Jednocześnie skutkowało poprawą wydajności ocenianą w testach behawioralnych. Po użyciu komórek SHED, czyli komórek macierzystych pochodzących z miazgi zębów mlecznych, w zwierzęcym modelu niedotlenienia mózgu, stwierdzono, że ich przeszczep poprawia funkcje neurologiczne przy jednoczesnym zapobieganiu atrofii tkanek i zmniejszeniu się liczby endogennych komórek apoptotycznych (Mead, Logan, 2016).

Co ciekawe, nie stwierdzono różnicowania się komórek DPSCs w neurony lub komórki glejowe. Wskazuje to na fakt, iż neuroprotekcyjna działalność DPSCs skutkująca poprawą cech funkcjonalnych i behawioralnych jak również regeneracją uszkodzonej tkanki dokonuje się dzięki parakrynnym oddziaływaniom komórek macierzystych miazgi zęba (Mead, Logan, 2016).

Inne badania z zastosowaniem komórek DPSCs, które zostały wstępnie zróżnicowane za pomocą czynników wzrostu EGF i bFGF oraz kwasu retinowego w komórki podobne do neuronów (tzw. neuron-like cells) wykazują, że po przeszczepie

komórek do płynu mózgowo-rdzeniowego szczurów z mechanicznym uszkodzeniem mózgu, komórki DPSCs migrowały do różnych regionów mózgu, w tym w miejsca uszkodzenia i tam przyjmowały fenotyp komórek neuralnych (Mead, Logan, 2016).

Choroby neurodegeneracyjne – choroba Parkinsona i choroba Alzheimera

Choroba Parkinsona (PD) jest jedną z najczęściej występujących chorób neurodegeneracyjnych i dotyka około 1% ludzkiej populacji w wieku powyżej 50 lat. (Gibson, Gao, 2012). Wśród jej przyczyn można wyróżnić przyczyny środowiskowe, które stanowią około 90% przypadków zachorowań oraz genetyczne stanowiące około 10% przypadków (Sułkowski, 2014). Wśród najistotniejszych czynników środowiskowych wyróżnia się: stres oksydacyjny, stany zapalne, a także zaburzenia związane z działaniem mitochondriów (Gibson, Gao, 2012). W chorobie Parkinsona degeneracji ulegają neurony dopaminergiczne, których główna populacja znajduje się w istocie czarnej śródmózgowia (Longstaff, 2005). Inne neuroprzekazniki, które mogą być związane z chorobą Parkinsona to acetylocholina, serotonina i noradrenalina, jednak rola tych substancji nie jest jeszcze do końca poznana (Macphee, Stewart, 2006). W preparatach sekcyjnych u pacjentów chorych na chorobę Parkinsona występują ciała Lewy'ego. Są to złożone α - synukleiny otoczonej ubikwityną (Longstaff, 2005). Ciała Lewy'ego nie mogą być jednak stosowane jako kryterium diagnozy choroby Parkinsona, ponieważ dostęp do nich możliwy jest post-mortem. Stąd też diagnostyka opiera się na objawach przedmiotowych, które określa anglojęzyczny akronim TRAP: drżenie spoczynkowe, sztywność, akinezyja, niestabilność postawy (Jankovic, 2008). Obecnie stosowane leczenie pozwala na ograniczenie objawów, bez możliwości całkowitego wyleczenia choroby Parkinsona (Longstaff, 2005). Obok leczenia farmakologicznego wprowadzane są próby głębokiej stymulacji mózgu pozwalająca na poprawianie zdolności ruchowej u pacjentów (Deuschl i inni, 2006). Dlatego też zastosowanie komórek macierzystych stanowi dobrze rokującą perspektywę w leczeniu choroby Parkinsona.

Choroba Alzheimera (AD) jest najczęstszą przyczyną otępienia, występującą u pacjentów powyżej 65 roku życia (Daneschvar, Aronson 2015). Płytki starcze i splątki neurofibrylarne są cechami charakterystycznymi, które zaobserwowano u pacjentów z chorobą Alzheimera. W przypadku płytek starczych są one złożone białka beta-amyloidu, który powoduje cytotoksyczność neuronów, natomiast splątki neurofibrylarne stanowią nieprawidłowe struktury, które powstały w wyniku zmian białka tau wewnątrz ciała komórki nerwowej. Dlatego neurony osób chorych na chorobę Alzheimera stopniowo kurczą się oraz obumierają. Śmierć komórek nerwowych występuje początkowo w strukturach odpowiedzialnych za pamięć, czyli w hipokampie, a następnie rozprzestrzenia się na cały obszar mózgu (Choi, Lee 2014). Mechanizm tej choroby jest często przedmiotem badań, ze względu na brak terapii modyfikujących przebieg choroby oraz na skutki jakie za sobą niesie tj. zaburzenia funkcji poznawczych, czy skrócenie długości życia. Bardzo wiele terapii takich jak: terapie przeciwzapalne, hormonalne, zastosowanie statyn lub chelatorów, nie wykazywały pożądanego rezultatu (Waite, 2015).

Wykorzystanie komórek macierzystych miazgi zęba w regeneracji chorób neurodegeneracyjnych

Neuralne komórki macierzyste mogą brać udział w regeneracji tkanki nerwowej. Uzyskanie tych komórek wiąże się z wykorzystaniem embrionalnych komórek macierzystych, które charakteryzują się pluripotencją i mogą różnicować się we wszystkie tkanki organizmu. Jednak wykorzystanie ich stwarza kontrowersje etyczne. Innym sposobem jest reprogramowanie komórek somatycznych w indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, a następnie przekształcenie ich w neurony dopaminergiczne, które mogą być przeszczepione do mózgu osoby chorej na chorobę Parkinsona. Innym sposobem wykorzystania komórek macierzystych jest wykorzystanie ich jako model *in vitro* w chorobach neurodegeneracyjnych. Zwierzęce modele choroby Parkinsona wykazały poprawę zachowań ruchowych po wprowadzeniu neuralnych komórek macierzystych do mózgu gryzoni. Jednak główną wadą komórek iPSCs jest możliwość tworzenia przez nie potworników (Sułkowski, 2014).

Dlatego najbardziej rozpowszechnioną metodą w zwierzęcych modelach jest wszczepienie mezenchymalnych komórek macierzystych do zdegenerowanych struktur mózgu, które powodują odbudowę uszkodzonego regionu na bazie interakcji dwustronnej komórek mózgu i komórek wszczepionych. Komórki mezenchymalne (pochodzące np. ze szpiku kostnego lub krwi pępowinowej) wydzielają substancje pobudzające neuralne komórki macierzyste do proliferacji i różnicowania. Jeżeli w przeszczepie znajdują się komórki o odpowiednim fenotypie (np. komórki macierzyste miazgi zęba) to mogą one w zróżnicować się w neuralne komórki macierzyste pod wpływem endogennych substancji wzrostowych znajdujących się w mózgu (Young, Sloan, 2013).

Komórki macierzyste miazgi zęba zostały wykorzystane również w terapii chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera (AD) i choroba Parkinsona (PD), które charakteryzują się stopniową i trwałą utratą neuronów (Mead, Logan, 2016). Wykorzystanie modeli *in vitro* choroby Alzheimera i choroby Parkinsona, polegało na hodowli komórek macierzystych miazgi zęba wraz z neuronami pochodzącymi ze śródmózgowia oraz z hipokampa. Neurony te traktowane były peptydem beta-amyloidu w przypadku choroby Alzheimera lub 6-hydroksydopaminą (6-OHDA) w przypadku choroby Parkinsona. Wykorzystanie komórek macierzystych miazgi zęba znacząco zmniejszyło toksyczność i śmierć neuronów, co mogło być związane z wydzielaniem przez komórki DPSCs czynników wzrostu charakterystycznych dla neuronów, w tym NGF, GDNF i BDNF (Mead, Logan, 2016).

Wykazano również, że komórki macierzyste miazgi zęba mogą różnicować się do neuronów dopaminergicznych *in vitro*, jednak stwierdzenie czy mają one zdolność utrzymywania fenotypu neuronów dopaminergicznych i zastępowania utraconych neuronów w modelu choroby Parkinsona *in vivo* wymaga dalszych badań (Mead, Logan, 2016).

Podsumowanie

Zastosowanie komórek macierzystych jest bardzo dobrą metodą, która pozwala stworzyć nowe perspektywy w leczeniu chorób układu nerwowego w tym udaru niedokrwienego mózgu, choroby Parkinsona czy choroby Alzheimerera. Odkrycie w 2006 r. indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych i ich dużego potencjału do różnicowania w każdy typ komórek, w tym komórki nerwowe, pokazało jeszcze większe możliwości wykorzystania somatycznych komórek macierzystych w terapii, która nie stwarzała kontrowersji etycznych (Takahashi, Yamanaka, 2006). Jedną z największych korzyści używania komórek iPSCs jest to, że mogą one być wykorzystywane w personalizowanej kuracji w chorobie Parkinsona. Kolejnym obiecującym aspektem jest wykorzystanie neuronów dopaminergicznych uzyskanych z komórek iPS jako modelu *in vitro* choroby Parkinsona. Pozwala to na poznanie mechanizmu choroby, testowanie leków oraz poznania innych metod wspomagających terapię (Torrent, De Angelis Rigotti, 2015). Jednak z drugiej strony istnieją również pewne ograniczenia takie jak zwiększone ryzyko do powstania potworniaków (Zychowicz, 2012). Dlatego też komórki macierzyste miazgi zęba ze względu na swoje ektodermalne pochodzenie stanowią populację komórek, która z powodzeniem może zostać wykorzystana w regeneracji tkanki nerwowej. Ich multipotencjalny charakter umożliwia komórkom DPSCs na różnicowanie się w komórki typu neuron-like cells, natomiast ich zdolności do parakrynnego oddziaływania na uszkodzoną tkankę, pozwalają im na udział w regeneracji tkanek bez konieczności różnicowania. Kolejną ich zaletą jest to, że ze względu na brak cząsteczek kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC II), komórki DPSC są nieimmunogenne, co daje możliwości ich allogenicznych przeszczepów.

Badania nad wykorzystaniem komórek macierzystych, a w szczególności komórek macierzystych pochodzących z miazgi zęba mogą odgrywać kluczową rolę w regeneracji uszkodzonych tkanek, a przede wszystkim w regeneracji układu nerwowego, w tym w terapii udaru niedokrwienego, a także chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona, czy choroba Alzheimerera.

Literatura

Alsulaimani, R. S., Ajlan, S. A., Aldahmash, A. M., Alnabaheen, M. S. & Ashri, N. Y. **Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation.** *Saudi Medical Journal* 37, 551-560,(2016).

Choi, S. S., Lee, S.-R., Kim, S. U. and Lee, H. J., **Alzheimer's disease and stem cell therapy.** *Experimental neurobiology*, 23(1), pp. 45-52, (2014)

Cui X, Chen L, Xue T, Yu J, Liu J, Ji Y, Cheng L. **Human umbilical cord and dental pulp-derived mesenchymal stem cells: Biological characteristics and potential roles in vitro and in vivo.** *Molecular Medicine Report*, 3269-3278 (2014).

Dalous, J., Larghero, J. & Baud, O. **Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel strategy to protect the central nervous system: technical aspects, preclinical studies, and clinical perspectives.** *Pediatric Research* 71, 482-490 (2012).

Daneschvar, HL., Aronson, MD., Smetana, GW., **Do statins prevent Alzheimer's disease? A narrative review,** *European Journal of Internal Medicine* 26 (9), 666-669, 2015

d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G. **Human dental pulp stem cells: From biology to clinical applications.** *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 312, 408-415 (2009).

D 'aquino, R., Papaccio, G., Laino, G. & Graziano, A. **Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration.** *Stem Cells Reviews* 4, 21-26 (2008).

Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schäfer H, Bötzel K, Daniels C, Deuschländer A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M, Kupsch A, Lorenz D, Lorenz S, Mehdorn HM, Moringlane JR, Oertel W, Pinsker MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier V, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J; **Randomized Trial of Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease.** *The New England Journal of Medicine* 355, 896-908, (2006).

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E.. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 8, 315-317, (2006).

Drela, K **Ocena potencjału neurogenego ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł: krwi i sznura pępowinowego oraz szpiku kostnego.** *Rozprawa doktorska*, (2015)

El-Koussy, M., Schroth, G., Brekenfeld, C. and Arnold, M. **Imaging of acute ischemic stroke,** *European Neurology*, 72(5-6), (2014)

Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, Hosokawa S, Elbahrawy A, Soeda T, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi M, Takaori K, Doi R, Nishi E, Kakinoki R, Deng JM, Behringer RR, Nakamura T, Uemoto S. **Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine.** *Nature. Genetics* 43, 34-41 (2011).

Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, Sanchez-Torrijos J, Payá R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepúlveda P. **Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction.** *Stem Cells* 26, 638-45 (2008).

Gervois P, Struys T, Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Politis C, Brône B, Lambrichts I, Martens W. **Neurogenic Maturation of Human Dental Pulp Stem Cells Following Neurosphere Generation Induces Morphological and Electrophysiological Characteristics of Functional Neurons.** *Stem Cells and Development* 24, 296-311 (2015).

Gibson, S. A., Gao, G.-D., McDonagh, K., & Shen, S. **Progress on stem cell research towards the treatment of Parkinson's disease.** *Stem Cell Research & Therapy* 3(2), 11, (2012).

Gimble J.M., Guilak F., Nuttall M.E., Sathishkumar S., Vidal M., and Bunnell B.A. **In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 35, 228-238 (2008).

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. **Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.** *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 97, 13625-13630 (2000).

Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrichts I, Bronckaers A. **Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells.** *Cellular and Tissue Research* 353, 65-78 (2013).

Hiyama, E. & Hiyama, K. **Telomere, telomerase and stem cells.** *British Journal of Cancer* 96, 1020-1024 (2007).

Jankovic, J. **Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79(4), 368-376, (2008).

- Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. **Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy.** *International Journal of Molecular Science* 14, 17986-18001 (2013).
- Kim, N. & Cho, S.-G. **Clinical applications of mesenchymal stem cells.** *Korean Journal of Internal Medicine* 28, 387-402 (2013).
- Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, Czajka R, Wojakowski W, Machalinski B, Ratajczak MZ. **Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood – preliminary report.**, *Leukemia* 21, 297-303 (2007).
- Lin, N. H., Gronthos, S. & Bartold, P. M. **Stem cells and periodontal regeneration.** *Australian Dental Journal* 53, 108-121 (2008).
- Longstaf A. „**Neurobiologia. Krótkie Wykłady.**”, Wydawnictwo Naukowe PWN, 520-526, (2005).
- Macphee, G. J., & Stewart, D. a. **Parkinson’s disease.** *Reviews in Clinical Gerontology* 16(01), 1, (2006).
- Marei, H. E., Hasan, A., Rizzi, R., Althani, A., Afifi, N., Cenciarelli, C., Caceci, T. and Shuaib, A., **Potential of stem cell-based therapy for ischemic stroke,** *Frontiers in Neurology*, (2018)
- Martens, W., Bronckaers, a., Politis, C., Jacobs, R. & Lambrichts, I. **Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: An update.** *Clinical Oral Investigation* 17, 1969-1983 (2013).
- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., Schven, BA., **Concise Review: Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair,** *Stem Cells* 35 (1), 61-67, 2016
- Nishikawa, S.-I., Jakt, L. M. & Era, T. **Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 502-507 (2007).
- Prabhakaran, S., Ruff, I. and Bernstein, R. A., **Acute stroke intervention: A systematic review,** *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 313(14), 1451-1462, (2015)
- Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, Riccio M, De Biasi S, Gibellini L, Ferrari A, Bruzzesi G, De Pol A. **Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two subpopulations.** , *BMC Developmental Biology* (2015)
- Potdar, P. D., Jethmalani Pravin D Potdar, Y. D. & Jethmalani, Y. D. **Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine.** *World Journal of Stem Cells* 7, 839851 (2015).
- Seaberg, R. M. & Van Der Kooy, D. **Stem and progenitor cells: The premature desertion of rigoros definitions.** *Trends in Neuroscience* 26, 125-131 (2003).
- Seo B.M., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahim J., Young M., Robey P.G., Wang C.Y., Shi S.. **Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.** *Lancet* 364, 149-155 (2004).
- Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadani S, Sargolzaei Aval F. **Multipotent Stem Cell and Current Application.** *Acta Medica Iranica* 55, 6-23 (2017).
- Strepikowska, A., **Udar mózgu – czynniki ryzyka i profilaktyka,** *Postępy Farmakoterapii* 65 (1), 46-50, (2009)
- Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, Kucerová L **Human Dental Pulp Stem Cells – Isolation and Long Term.** *Acta Medica Cordoba* 50, 195-201 (2007).
- Sułkowski, M. **Zastosowanie ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w terapii chorób neurodegeneracyjnych na przykładzie zwierzęcego modelu choroby Parkinsona.** *Rozprawa doktorska*, 1-195, (2014).

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** *Cell* 131, 861-72 (2007).
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.** *Cell* 126, 663-676 (2006).
- Torrent, R., De Angelis Rigotti, F., Dell’Era, P., Memo, M., Raya, A., Consiglio, A., **Using iPS Cells toward the Understanding of Parkinson's Disease.** *Journal of Clinical Medicine* 4(4), 548-566 (2015).
- Wada, N., Menicanin, D., Shi, S., Mark Bartold, P. & Gronthos, S. **Immunomodulatory Properties of Human Periodontal Ligament Stem Cells.** *Journal of Cellular Physiology* 219, 667-676 (2009).
- Waite, L. M., **Treatment for Alzheimer’s disease: Has anything changed?**, *Australian Prescriber*, 38(2), 60-63, (2015)
- Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K. **Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells.** *Archives of Oral Biology* 57, 1231-1240 (2012).
- Wanga, Y., Ji, X., Leak, RK., Chen, F., Cao, G., **Stem cell therapies in age-related neurodegenerative diseases and stroke,** *Ageing Research Review* 34, 39-50, (2017)
- Williams, A. R. & Hare, J. M. **Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease.** *Circulation Research* 109, 923-940 (2011).
- Wojakowski W, Tendra M, Kucia M, Zuba-Surma E, Paczkowska E, Ciosek J, Hałasa M, Król M, Kazmierski M, Buszman P, Ochała A, Ratajczak J, Machaliński B, Ratajczak MZ. **Mobilization of Bone Marrow-Derived Oct-4+ SSEA-4+ Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction.** *Journal of American College of Cardiology* 53, 1-9 (2009).
- Young, F., Sloan, A. & Song, B. **Dental pulp stem cells and their potential roles in central nervous system regeneration and repair.** *Journal of Neuroscience Research* 91, 1383-1393 (2013).
- Zhang, Y. D., Chen, Z., Song, Y. Q., Liu, C. & Chen, Y. P. **Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells.** *Cell Research* 15, 301-16 (2005).
- Zhu, W. & Liang, M. **Periodontal ligament stem cells: Current status, concerns, and future prospects.** *Stem Cells International* 2015, (2015).
- Zuba-Surma EK, Kucia M, Wu W, Klich I, Lillard JW Jr, Ratajczak J, Ratajczak MZ. **Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: ImageStream-based morphological analysis and distribution studies.** *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry, Cytometry Part A* 73, 1116-1127 (2008).
- Zychowicz, M. **Kontrola decyzji rozwojowych neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej (HUCB-NSC): zastosowanie powierzchni biofunkcjonalnych** Rozprawa doktorska, (2012).
- Ryciny zawarte w monografii modyfikowano i wykonano przy użyciu grafik, z których korzystano na podstawie licencji **Creative Commons Attribution 3.0 Unported License** przez – **Servier Medical Art by Servier** (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Rola kalprotektyny w diagnostyce zakażeń układu pokarmowego

Role of calprotectin in the diagnosis of gastrointestinal infections

Monika Kabała, Gajane Martirosian

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Lekarski w Katowicach,
ul. Medyków 18, 40-752 Katowice

Autor do korespondencji:

Monika Kabała, mkabala@sum.edu.pl

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WLK SUM, ul. Medyków 18, 40-752
Katowice

Streszczenie

Zapalenie jest procesem, który mobilizuje wiele komórek organizmu, w tym neutrofile oraz monocyty, które należą do układu odpornościowego. Neutrofile są komórkami, które neutralizują czynniki uszkadzające (w tym drobnoustroje) głównie na drodze fagocytozy i Net-ozy. W ziarnistościach neutrofilów znajduje się między innymi kalprotektyna, proteina, należąca do rodziny białek S100, która ma zdolność do wiązania jonów Ca^{2+} , Zn^{2+} oraz Mn^{2+} . Jony tych pierwiastków są niezbędne do przeżycia i wzrostu drobnoustrojów. Stany zapalne jelit to duża grupa schorzeń, wśród których znajdują się nieswoiste zapalenia jelit (IBD) oraz choroby infekcyjne takie jak: zakażenia bakteryjne (w tym *Clostridium difficile*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.), czy wirusowe (rotawirusy, adenowirusy). Choroby te przebiegają z masywnym naciekiem leukocytarnym, w związku z tym stężenie frakcji kałowej kalprotektyny (FC) powinno korelować z ciężkością zapalenia.

W przebiegu nieswoistych zapaleń jelit, kalprotektyna jest dobrym markerem, korelującym ze stopniem zaawansowania choroby. Różnicuje ona również IBD od zespołu jelita drażliwego (IBS). W przebiegu zakażenia *C. difficile* (CDI); gdzie głównym markerem diagnostycznym jest GDH oraz toksyny A i B wykrywane w kale pacjentów, kalprotektyna może być również pomocna w szacowaniu stopnia ciężkości zakażenia oraz prognozowaniu rozwoju choroby. Większość badaczy obserwuje wyraźny wzrost kalprotektyny w bakteryjnych zakażeniach układu pokarmowego. Znaczny wzrost wartości kalprotektyny w kale opisano w ciężkim zakażeniu *C. difficile*, zwłaszcza szczepami hiperwirulentnymi. W przebiegu zakażeń wirusowych jednak nie obserwuje się takiego wzrostu. W większości przypadków infekcyjnych chorób układu pokarmowego obserwuje się wysokie wartości kalprotektyny korelujące z ciężkością zakażenia.

Abstract

Inflammation is a process that mobilizes many of the body's cells, including neutrophils and monocytes that come under to the immune system. Neutrophils are cells that neutralize damaging factors (including microorganisms) mainly by phagocytosis and NETs. In neutrophil granules are located many proteins, including, calprotectin, a protein belonging to the S100 family of proteins that has the ability to bind Ca^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} ions. The ions of these elements are necessary for the growth and survival of microorganisms. Inflammation of intestinal is a result of a large group of diseases, including inflammatory bowel diseases (IBD) and infectious diseases of bacterial (*Clostridium difficile*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and others), or viral infections (rotavirus, adenovirus). These diseases occur with massive infiltration of leukocytes, therefore the concentration of fecal calprotectin fraction (FC) should correlate with the severity of inflammation.

In the course of IBD, calprotectin is a good marker, correlating with the severity of the disease. It also differentiates IBD from Irritable Bowel Syndrome (IBS). In the course of *C. difficile* infection (CDI); where the main diagnostic marker is GDH and toxins A and B detected in the stools of patients, calprotectin may also be helpful in estimating the severity of infection and prognosing disease development. Most researchers observe a significant increase of calprotectin level in severe *C. difficile* infection (CDI), especially caused by hypervirulent strains. During others gastrointestinal bacterial infections a significant increase of calprotectin level in feces also is observed, whereas in the course of viral infections there is no such increase. In the majority of bacterial infectious diseases of the digestive system, high values of calprotectin correlate with the severity of infection.

Wstęp

Reakcja zapalna, rozwijająca się w organizmie, powstaje na skutek zadziałania czynnika uszkodzającego, który niszczy tkanki ustroju. Może ona mieć charakter miejscowy i ogólnoustrojowy, kończyć się na fazie ostrej, lub przechodzić w postać przewlekłą. Czynniki uszkodzające można podzielić na fizyczne (np.: mechaniczne, promieniowanie jonizujące); chemiczne (np.: kwasy, zasady); biologiczne (np.: bakterie i ich toksyny, wirusy, grzyby, pasożyty) (Całoksiński, Dobrzyński et al. 2009). Układ odpornościowy człowieka, to sprawnie działający mechanizm, który ma za zadanie rozpoznawać obce antygeny, martwe komórki, komórki nowotworowe i je eliminować. Układ immunologiczny tworzą narządy, takie jak np.: śledziona, węzły chłonne oraz komórki, wśród których ważną rolę odgrywają leukocyty. Neutrofile (granulocyty obojętnochłonne) są pierwszymi komórkami, które pojawiają się w ognisku zapalenia. W swoich ziarnistościach posiadają one szereg substancji, które mają działanie przeciwdrobnoustrojowe; jedną z nich jest kalprotektyna (Brinkmann, Reichard et al. 2004). Główną funkcją granulocytów obojętnochłonnych jest fagocytoza oraz NET-oza, czyli wytwarzania charakterystycznej sieci (*Neutrophil Extracellular Trap*). W sieci tej znajduje się histonowe DNA oraz substancje pochodzące z ziarnistości neutrofilów, w tym kalprotektyna. Mobilizacja neutrofilów doprowadza do powstania nacieku zapalnego, który najczęściej koreluje z wielkością obszaru zapalnego. W przebiegu niektórych chorób istnieje możliwość dokonania pomiaru poziomu kalprotektyny wydzielanej miejscowo (plwocina, stolec), której stężenie powinno korelować z zaawansowaniem stanu zapalnego (Szymt, Kasprzak 2011).

Kalprotektyna, (nazywana również kalgranuliną A i B, kompleksem białek MRP8 i MRP14 (*migration inhibitory factor-related protein*); jest białkiem należącym do grupy białek S100, wiążących jony wapnia (Ca^{2+}), dodatkowo jest zdolna do wiązania jonów cynku (Zn^{2+}) i manganu (Mn^{2+}). Zbudowana jest z kompleksu dwóch podjednostek S100A8/S100A9, które tworzą heterodimer. (Yui, Nakatani et al. 2003). Grupa białek S100, to małe cząsteczki o masie 10-12 kDa, składają się z 25 przedstawicieli; wiążą one jony wapnia (Ca^{2+}) ale także miedzi (Cu^{2+}), cynku (Zn^{2+}). Białka te posiadają charakterystyczny motyw EF-hands (*helix E-loop-helix F*), a ich nazwa pochodzi od tego, że są rozpuszczalne w 100% nasyconym roztworze siarczanu amonu przy obojętnym pH (Sedeghat, Notopoulos, 2008, Donato, 1999). W strukturze białek S100 znajdują się zazwyczaj dwa miejsca wiązania Ca^{2+} , które są umiejscowione w pętli pomiędzy dwoma α -helisami, co graficznie przypomina dłoń z kciukiem i palcem wskazującym ułożonymi do siebie pod kątem prostym (Lewit-Bentley, Rety, 2000), po związaniu jonów wapnia białko zmienia swoją konformację przestrzenną (Donato, Cannon et al. 2013).

Cele i metodyka

Celem pracy była próba uzyskania odpowiedzi na pytanie czy kalprotektyna może być przydatnym markerem diagnostycznym w chorobach zakaźnych układu pokarmowego, szczególnie zakażeń wywołanych *C. difficile*.

Do osiągnięcia powyższego celu przeprowadzono przegląd piśmiennictwa w bazach Pubmed, Medline, Google Scholar, wyszukując publikacji w języku

angielskim, zawierających w tytule lub abstrakcie słowa „calprotectin, Clostridium difficile infection, IBD – inflammatory bowel diseases, neutrophil”.

Uzyskano kompletne artykuły w oparciu o wcześniej włączone abstrakty. Krytycznie oceniono źródła artykułów, selekcjonując prace z czasopism o wysokiej referencyjności, zwłaszcza z ostatnich lat. Przeanalizowano budowę i funkcję kalprotektyny oraz przypadki jej zastosowania w celach diagnostycznych w różnych grupach pacjentów.

Funkcje kalprotektyny

Kalprotektyna jest produkowana głównie przez neutrofile, stanowi ona ponad 40% białek znajdujących się w granulocytach obojętnochłonnych, jest również ważnym składnikiem sieci tworzonej w procesie NET-ozy. Sieć ta ma na celu unieruchomienie i neutralizację drobnoustrojów (Brinkmann, Reichard et al. 2004, Urban, Ermert et al. 2009). Oprócz neutrofilów, kalprotektynę mogą również produkować makrofagi, keratynocyty oraz komórki śródbłonka, a jej obecność stwierdzono w surowicy, moczu, siarce oraz kale. Podwyższone stężenie kalprotektyny oznaczano u pacjentów z zapaleniem płuc (w tym w gruźlicy płuc), chorobami nowotworowymi skóry, reumatoidalnym zapaleniem stawów, po transplantacjach narządów i zabiegach chirurgicznych, zainfekowanych wirusem HIV, z mukowiscydozą oraz z chorobami nowotworowymi jelit (Stříž, Trebichavský, 2004, Yui, Nakatani et al. 2003).

Kalprotektyna wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, które nie jest związane z bezpośrednim działaniem bójącym, ale z pozbawianiem drobnoustrojów składników odżywczych poprzez sekwestrację jonów cynku i manganu. Niedobór Zn^{2+} wpływa na zależne od tego pierwiastka metaloproteinazy drobnoustrojów, dzięki czemu dochodzi do inhibicji wzrostu drobnoustrojów takich jak: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritica* serowar *Typhimurium*, *Shigella flexneri* (Gaddy, Radin et al. 2014, Liu, Jellbauer et al. 2012). Sekwestracja jonów Mn^{2+} wpływa na obniżenie aktywności manganozależnej dysmutazy nadtlenkowej, zwiększając wrażliwość *Staphylococcus aureus* na stres oksydacyjny. Mangan jest również kofaktorem wielu białek bakteryjnych (Kehl- Fie, Chitayat et al. 2011, Diaz- Ochoa, Lam et al. 2016). Kalprotektyna bierze również udział w procesach immunoregulacyjnych: jest aktywatorem TLR4, indukuje produkcję NO w makrofagach, reguluje aktywność limfocytów T CD8+, zwiększa aktywność prozapalną śródbłonka, indukuje proces apoptozy, hamuje wzrost komórek nowotworowych, nasila migrację neutrofilów do miejsca zapalenia (Donato, Cannon et al. 2013).

Zakażenia układu pokarmowego przebiegają zazwyczaj z dużym naciekiem leukocytarnym w obrębie jelit. Kalprotektyna wydzielana z leukocytów obojętnochłonnych, które uległy aktywacji bądź apoptozie, dostaje się do kału, gdzie można dokonać jej pomiaru. Służą do tego proste testy immunoenzymatyczne ELISA. Przeciwciała skierowane przeciwko kalprotektynie, są umieszczone na fazie stałej i jeżeli kalprotektyna jest obecna w materiale, to zostaje przez przeciwciała związana. Następnie do kompleksu przeciwciało-kalprotektyna przyłącza się przeciwciało sprzężone z enzymem, który po rozłożeniu substratu powoduje

powstanie barwnego produktu. Natężenie zabarwienia mierzone przy odpowiedniej długości fali jest wprost proporcjonalne do stężenia kalprotektyny w kale (Calprest, Eurospital, Włochy – instrukcja wykonania testu).

Dzięki wiązaniu jonów wapnia przez kalprotektynę, pozostaje ona oporna na rozkład przez enzymy proteolityczne i stabilna w próbce do 7 dni przy przechowywaniu w temperaturze pokojowej. Stężenie frakcji kałowej kalprotektyny jest uzależnione od wieku i tak u dzieci od 1 do 6 miesiąca życia za wartość prawidłową uznaje się 538 mg/kg kału, od 6 m.ż. do 3 lat 214 mg/kg, od 3 do 4 lat 75 mg/kg. Powyżej 4 roku życia i u osób dorosłych za wartość prawidłową przyjmuje się stężenie <50 mg/kg (Oord, Hornung, 2014, Walshman, Sherwood, 2016).

Przewlekłe zapalenie jelit (*inflammatory bowel disease IBD*) i zespół jelita drażliwego (*irritable bowle syndrome IBS*)

IBD występuje najczęściej w dwóch postaciach: wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby Leśniowskiego-Crohn'a. Obydwie postaci przebiegają z dużym odczynem zapalnym, z nieswoistymi objawami takimi jak: bóle brzucha, biegunki, czasami krwawe, wzdęcia. Żadna z tych chorób nie ma ustalonej przyczyny, obserwuje się występowanie rodzinne, charakterystyczna jest nawrotowość, a w skrajnych przypadkach konieczna jest interwencja chirurgiczna bądź może nastąpić rozwój choroby nowotworowej. Zespół jelita drażliwego manifestuje się podobnymi objawami jak przewlekłe zapalenie jelit, klasyfikowane jest natomiast jako zespół zaburzeń jelitowych, które nie mają ustalonej przyczyny. IBS nie przebiega z odczynem zapalnym i ogólnie jest uważany za łagodne zaburzenie funkcji układu pokarmowego (Walshman, Sherwood, 2016).

Kalprotektyna jest czułym markerem różnicującym IBD od IBS. Wysokie stężenie kalprotektyny kałowej (*fecal calprotectin FC*) obserwuje się w przewlekłym zapaleniu jelit, natomiast na podstawie zmierzonych wartości nie da się zróżnicować w obrębie IBD czy jest to wrzodziejące zapalenie jelit czy jest to choroba Leśniowskiego-Cohn'a (Walshman, Sherwood, 2016, Kotze, Nisihara et al. 2015). Wysokie wartości FC korelują ze stopniem zaawansowania choroby lepiej niż białko C-reaktywne – CRP, dlatego też FC, może być użyteczna w monitorowaniu terapii, jest dość czułym markerem wskazującym na gojenie się śluzówki w leczeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, jednak nie używa się kalprotektyny jako markera prognostycznego (Kristensen, Røseth et al. 2017, Sipponem, Kolho 2015).

Choroby infekcyjne jelit.

Frakcja kałowa kalprotektyny znacznie wzrasta w chorobach infekcyjnych jelit o etiologii bakteryjnej a słabiej w chorobach o etiologii wirusowej. Zakażenia wirusowe są wywoływane głównie przez adenowirusy, norowirusy, rotawirusy i astrowirusy, a bakteryjne przez: *Salmonella enteritica.*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. oraz *Clostridium difficile*. We wszystkich tych stanach obserwuje się wzrost frakcji kałowej kalprotektyny, ale w zakażeniach bakteryjnych (zwłaszcza spowodowanych przez *Salmonella* spp.), ten wzrost jest bardzo wyraźny (wartości >500 mg/kg). W infekcjach wirusowych, gdzie dominującą rolę w odpowiedzi immunologicznej odgrywają limfocyty, wzrost ten nie jest jednak tak spektakularny. Badacze są również zgodni, że wysoki poziom kalprotektyny koreluje z ciężkością

zakażenia oraz ze stopniem nasilenia objawów takich jak biegunka, wymioty, odwodnienie i gorączka (Duman, Gencipar et al. 2015, Chen, Huang et al. 2012, van de Ven, Janssen et al. 2014, Nielsen, Engberg et al. 2013).

C. difficile jest obecnie uważana za główną przyczynę biegunek poantybiotykowych, zwłaszcza wśród pacjentów hospitalizowanych. Toksyny A i B wytwarzane przez *C. difficile*, są odpowiedzialne za powstawanie objawów w przebiegu zakażenia. Toksyny *C. difficile* A i B wykazują działanie synergistyczne prowadzące do nagromadzenia płynów w świetle jelit, zniszczenia komórek nabłonka jelitowego, są także czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilów. Zakażenie toksynotwórczymi szczepami *C. difficile*, daje bardzo szerokie spektrum objawów, takich jak wspomniane już biegunki, bóle brzucha, ale również ciężkie postaci jak rzekomobłoniaste zapalenia jelit, perforacja jelit, powstanie okrzężnicy olbrzymiej czy śmierć. Dużym problemem jest występowanie szczepu hiperwirulentnego NAP1/B1/027, który charakteryzuje się nadprodukcją toksyn A i B oraz wytwarzaniem toksyny binarnej, a także opornością na fluorochinolony i dużą zdolnością do rozprzestrzeniania się w środowisku szpitalnym przez sporulację (Swale, Miyajima et al. 2014, El. Feghaly, Stauber et al. 2013). W celu zdiagnozowania zakażeń *C. difficile* poszukuje się w kale antygenu GDH oraz toksyn A i B. Obecność toksyn w kale świadczy o objawowym zakażeniu i odpowiada obrazowi klinicznemu choroby. Oznaczanie leukocytów we krwi obwodowej, kreatyniny, albumin lub innych markerów zapalenia, wspomaga diagnozę; zaznaczyć należy jednak, że stężenie frakcji kałowej kalprotektyny jest także znacznie podwyższone również u pacjentów, bezobjawowych (Darkoh, Turnwald et al. 2014). Wyższe wartości kalprotektyny obserwowano u pacjentów zakażonych szczepem NAP1/B1/027, z wysoką leukocytozą krwi obwodowej (Peretz, Tkhawkho et al. 2016). Między badaczami nie ma natomiast zgody co do korelacji ciężkości zakażenia ze śmiertelnością czy nawrotowością choroby a poziomem kalprotektyny kałowej. Część prac donosi, że wysokie wartości kalprotektyny obserwowano u pacjentów z ciężkimi postaciami choroby oraz były one negatywnymi wskaźnikami prognostycznymi (Rao, Santhosh et al. 2016, Kim, Kim et al. 2016). Są też prace mówiące, że tylko na podstawie wartości kalprotektyny nie da się ocenić ciężkości zakażenia, skłonności do nawrotów choroby oraz przewidzieć śmiertelności (Peretz, Tkhawkho et al. 2016, Swale, Miyajima et al. 2014).

Dyskusja

Kalprotektyna, (białko należące do grupy białek S100), jest głównie produkowana przez neutrofile i inne komórki, które jako pierwsze przedostają się do ogniska zapalenia (Yui, Nakatani et al. 2003). Jest ona ważnym elementem odporności wrodzonej poprzez swoją zdolność do wiązania jonów wapnia, cynku i manganu bierze udział w procesie „odporności pokarmowej”, na skutek czego doprowadza do inhibicji wzrostu bakterii i grzybów (Juttukonda, Chazin et al. 2016). Kalprotektyna występuje w wielu płynach ustrojowych, takich jak mocz, kał, płwocina, siara; jej podwyższone stężenie we krwi może być również oznaczane w takich jednostkach chorobowych jak np.: reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie płuc, czy po operacjach chirurgicznych (Stříž, Trebichavský, 2004).

Choroby zapalne, toczące się w obrębie układu pokarmowego mogą mieć różną etiologię (wirusową, bakteryjną, bez ustalonego czynnika), ale najczęściej przebiegają z dużym naciekiem leukocytarnym, w związku z tym kalprotektyna jest wydzielana do kału gdzie może być mierzona, a wielkość jej stężenia powinna być wprost proporcjonalna do stopnia zaawansowania stanu zapalnego (Wohlwend, Tiermann et al. 2016).

Fracja kałowa kalprotektyny może być użyteczna w diagnostyce wielu chorób toczących się w obrębie układu pokarmowego. Jej pomiaru dokonuje się z zastosowaniem nieskomplikowanych i czułych testów immunoenzymatycznych ELISA, które wykorzystują reakcję antygen-przeciwciała. Wiązanie jonów wapnia przez kalprotektynę sprawia, że jest ona stabilna w kale do 7 dni przy przechowywaniu materiału badanego w temperaturze pokojowej; co zwiększa dostępność badania i ma znaczenie w czasie transportu do laboratorium oraz przy przedłużającym się czasie zbierania próbek (Walshman, Sherwood 2016). Oznaczenie kalprotektyny w kale jest badaniem czułym, szybkim i nieinwazyjnym, obniża w związku z tym stres i dyskomfort pacjenta oraz koszty hospitalizacji (NICE – Diagnostics guidance, 2013). Na podstawie stężenia kalprotektyny można odróżnić przewlekłe zapalenie jelit od zespołu jelita drażliwego, zakażenie jelit o etiologii bakteryjnej od wirusowej, można również szacować ciężkość zakażenia oraz prognozować powrót do zdrowia (Kristensen, Røseth et al. 2017, Duman, Gencipar et al. 2015). Spektrum objawów w przebiegu zakażenia *C. difficile* jest bardzo szerokie: od biegunek czy bólów brzucha; do poważnych powikłań jak rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego, dlatego ważne jest ustalenie stopnia ciężkości choroby oraz możliwość przewidzenia jej nawrotów. Frakcja kałowa kalprotektyny jest znacznie podwyższona w większości przypadków zakażenia *C. difficile*, wyższe wartości obserwuje się również u pacjentów zakażonych szczepami hiperwirulentnym NAP1/B1/027 (Swale, Miyajima et al. 2014). Niektórzy badacze zaobserwowali wyraźną korelację pomiędzy wysokimi wartościami kalprotektyny (>2000 µg/g) a ciężkimi postaciami zakażeń *C. difficile*, nie da się natomiast na podstawie stężenia kalprotektyny przewidzieć nawrotów choroby (Kim, Kim et al. 2017).

Podsumowując, oznaczenie frakcji kałowej kalprotektyny jest badaniem dającym wiele możliwości diagnostycznych. Kraje takie jak Wielka Brytania czy Szwajcaria wprowadziły je do swoich standardów diagnostycznych i algorytmów postępowania w przypadku diagnostyki przewlekłego zapalenia jelit (Walsham, Sherwood 2016, NICE – Diagnostics guidance, 2013). Jako marker tak czuły, powinien być używany pomocniczo w diagnostyce zakażeń spowodowanych przez *C. difficile*, co usprawniłoby podejmowanie decyzji terapeutycznych.

Literatura

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science (New York)*. 2004; 303(5663):1532-1535.

Całkosiński I., Dobrzyński M., Całkosińska M., Seweryn E., Bronowicka-Szydełko A., Dzierżba K., Ceremuga I., Gamian A. **Charakterystyka odczynu zapalnego.** *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2009; 63: 395-408.

- Chen C. C., Huang J. L., Chang C. J., Kong M. S. **Fecal calprotectin as a correlative marker in clinical severity of infectious diarrhea and usefulness in evaluating bacterial or viral pathogens in children.** *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2012; 55(5): 541-547.
- Darkoh C., Turnwald B. P., Koo H. L., Garey K. W., Jiang Z. D., Aitken S. L., DuPont H. L. **Colonic immunopathogenesis of Clostridium difficile infections.** *Clinical and Vaccine Immunology.* 2014; 21(4): 509-517.
- Diaz-Ochoa V. E., Lam D., Lee C. S., Klaus S., Behnsen J., Liu J. Z., Chim N., Nuccio S. P., Rathi S. G., Mastroianni J. R., Edwards R. A., Jacobo C. M., Cerasi M., Battistoni A., Ouellette A. J., Goulding C. W., Chazin W. J., Skaar E. P., Raffatellu M. **Salmonella Mitigates Oxidative Stress and Thrives in the Inflamed Gut by Evading Calprotectin-Mediated Manganese Sequestration.** *Cell host & microbe.* 2016; 19(6): 814-825.
- Donato R., Cannon B. R., Sorci G., Riuuzzi F., Hsu K., Weber D.J., Geczy C.L. **Functions of S100 proteins.** *Current molecular medicine.* 2013; 13(1): 24-57.
- Duman M., Gencpinar P., Biçmen M., Arslan N., Özden Ö., Üzümlü Ö., Çelik D., Sayiner A. A., Gülay Z. **Fecal calprotectin: can be used to distinguish between bacterial and viral gastroenteritis in children?** *The American Journal of Emergency Medicine.* 2015; 33(10): 1436-1439.
- El Feghaly R. E., Stauber J. E., Deych E., Gonzalez C., Tarr P. I., Haslam D., B. **Markers of intestinal inflammation, not bacterial burden, correlate with clinical outcomes in Clostridium difficile infection.** *Clinical Infectious Diseases.* 2013; 56(12): 1713–1721.
- Gaddy J. A., Radin J. N., Loh J. T., Piazuolo M. B., Kehl-Fie T. E., Delgado A. G., Ilca F. T., Peek R. M., Cover T. L., Chazin W. J., Skaar E.P., Scott Algood H. M. **The host protein calprotectin modulates the Helicobacter pylori cag type IV secretion system via zinc sequestration.** *PLoS Pathogens.* 2014; 10(10): e1004450.
- Isaksen B., Fagerhol M. K. **Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc.** *Molecular pathology.* 2001; 54(5): 289-292.
- Juttukonda L. J., Chazin W. J., Skaar E. P. **Acinetobacter baumannii coordinates urea metabolism with metal import to resist host-mediated metal limitation.** *MBio.* 2016; 7(5): 0,1475-16.
- Kehl-Fie T. E., Chitayat S., Hood M. I., Damo S., Restrepo N., Garcia C., Munro K. A., Chazin W. J., Skaar E. P. **Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of Staphylococcus aureus.** *Cell host & microbe.* 2011; 10(2): 158-164.
- Kim J., Kim H., Oh H. J., Kim H. S., Hwang Y. J., Yong D., Jeong S. H., Lee K. **Fecal calprotectin level reflects the severity of Clostridium difficile infection.** *Annals of Laboratory Medicine.* 2017; 37(1): 53-57.
- Kotze L. M., Nisihara R. M., Marion S. B., Cavassani M. F., Kotze P. G. **Fecal Calprotectin: levels for the ethiological diagnosis in Brazilian patients with gastrointestinal symptoms.** *Arquivos de Gastroenterologia.* 2015; 52(1): 50-54.
- Kristensen V., Røseth A., Ahmad T., Skar V., Moum B. **Fecal calprotectin: a reliable predictor of mucosal healing after treatment for active ulcerative colitis.** *Gastroenterology Research and Practice.* 2017.
- Lewit-Bentley A., Réty S. **EF-hand calcium-binding proteins. 2000;** *Current Opinion in Structural Biology.* 2000; 10(6): 637-643.
- Liu J. Z., Jellbauer S., Poe A. J., Ton V., Pesciaroli M., Kehl-Fie T. E., Restrepo N. A., Hosking M. P., Edwards R. A., Battistoni A., Pasquali P., Lane T. E., Chazin W. J., Vogl T., Roth J., Skaar E. P., Raffatellu M. **Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances Salmonella growth in the inflamed gut.** *Cell host & microbe.* 2012; 11(3): 227-239.

- Nielsen H. L., Engberg J., Ejlersen T, Nielsen H. **Evaluation of fecal calprotectin in *Campylobacter concisus* and *Campylobacter jejuni/coli* gastroenteritis.** Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2013; 48 (5): 633-635.
- Oord T., Hornung N. **Fecal calprotectin in healthy children.** Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 2014; 74(3): 254-258.
- Peretz A., Tkhawkho I., Pastukh N., Brodsky D., Halevi C. N., Nitzan O. **Correlation between fecal calprotectin levels, disease severity and the hypervirulent ribotype 027 strain in patients with *Clostridium difficile* infection.** Bio Med Central Infectious Diseases. 2016; 16: 309.
- Rao K., Santhosh K., Mogle J. A., Higgins P. D., Young V. B. **Elevated fecal calprotectin associates with adverse outcomes from *Clostridium difficile* infection in older adults.** Infectious diseases (London, England). 2016; 48(9): 663-669.
- Sedaghat F., Notopoulos A. **S100 protein family and its application in clinical practice.** Hippokratia. 2008; 12(4): 198-204.
- Sipponen T., Kolho K. L. **Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease.** Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2015; 50(1): 74-80.
- Stríz I., Trebichavský I. **Calprotectin – a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation.** Physiological research. 2004; 53(3): 245-253.
- Swale A., Miyajima F., Roberts P., Hall A., Little M., Beadsworth M. B., Beeching N. J., Kolamunnage-Dona R., Parry C. M., Pirmohamed M. **Calprotectin and lactoferrin faecal levels in patients with *Clostridium difficile* infection (CDI): a prospective cohort study.** Plos One. 2014; 9(8): e106118.
- Szmyt M., Kasprzak A. **Białka z rodziny S100 w patogenezie kamicy pęcherzyka żółciowego.** Nowiny Lekarskie. 2011; 80(3): 213-218.
- Urban C. F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A. **Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*.** PLoS Pathogens. 2009; 5(10): e1000639.
- van de Ven A. A., Janssen W. J., Schulz L. S., van Loon A. M., Voorkamp K., Sanders E. A., Kusters J. G., Nierkens S., Boes M., Wensing A.M., van Montfrans J. M. **Increased prevalence of gastrointestinal viruses and diminished secretory immunoglobulin A levels in antibody deficiencies.** Journal of clinical immunology. 2014; 34(8): 962-970.
- Walsham N. E., Sherwood R. A. **Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease.** Clinical and Experimental Gastroenterology. 2016; 9: 21-29.
- Wohlwend N., Tiermann S., Risch L., Risch M., Bodmer T. **Evaluation of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Detecting Major Bacterial Enteric Pathogens in Fecal Specimens: Intestinal Inflammation and Bacterial Load Are Correlated in *Campylobacter* Infections.** Journal of Clinical Microbiology. 2016; 54(9): 2262-2266.
- Yui S., Nakatani Y., Mikami M. **Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity.** Biological & pharmaceutical bulletin. 2003; 26(6): 753-760.
- NICE National Institute for Health and Care Excellence. **Diagnostics guidance.** 2013. www.nice.org.uk/guidance/dg11
- Calprest, Eurospital, Włochy. <http://eurolambda.sk/shared/files/Calprest.pdf>

Fenotypowa i genetyczna ocena oporności na antybiotyki aminoglikozydowe klinicznych szczepów *Staphylococcus epidermidis*

Denis Swolana^a, Małgorzata Kępa^a, Danuta Idzik^a, Tomasz J. Wąsik^a, Robert D. Wojtyczka^{a*}

^aKatedra i Zakład Mikrobiologii i Wirusologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

*adres e-mail: rwojtyczka@sum.edu.pl

Streszczenie

Wśród wszystkich zakażeń bakteryjnych, infekcje wywoływane przez patogeny z rodzaju *Staphylococcus* spp. mają duży wpływ na zdrowie człowieka. Wynika to z ich obecności na całej skórze oraz błonach śluzowych człowieka.

Celem pracy była identyfikacja genetycznych determinant oporności na antybiotyki aminoglikozydowe poprzez analizę obecności genów: *aac(6)/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* oraz *ant(4')-Ia*, za pomocą techniki PCR oraz ocena lekowrażliwości szczepów *Staphylococcus epidermidis* na antybiotyki aminoglikozydowe metodą krążkowo-dyfuzyjną.

Spśród badanych szczepów *S. epidermidis*, 57,14% bakterii posiadało co najmniej jeden z trzech analizowanych genów oporności na antybiotyki aminoglikozydowe. U ponad połowy szczepów wykazano obecność genu *ant(4')-Ia* (51,43% szczepów). Stwierdzono także wysoki odsetek gronkowców naskórkowych opornych na tobramycynę (57,14% szczepów) i gentamycynę (51,43% szczepów).

Oporność na antybiotyki aminoglikozydowe, jak również obecność genów ją determinujących, występuje z różną częstością, na którą mają wpływ wielorakie czynniki. Do najistotniejszych należą: rodzaj materiału klinicznego, z którego szczep został wyizolowany, typ szpitala, rejon geograficzny, czy sytuacja epidemiologiczna.

Słowa kluczowe: aminoglikozydy, biofilm gronkowcowy, lekooporność, *Staphylococcus epidermidis*

Abstract

Phenotype and genetic evaluation of resistance to aminoglycoside antibiotics of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains

Among all of the bacteria, due to ability of colonizing skin and all mucous membranes, Staphylococci pose the greatest influence to the human health.

The aim of presented study was to evaluate genetic determinants of the resistance to the aminoglycoside antibiotics by the analysis of: *aac(6)/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, and *ant(4')-Ia* genes structure, with the use of PCR method. The microbial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to antibiotics was also analyzed by the disc diffusion method.

Fifty seven percent from all tested strains of *S. epidermidis* had at least one of the three relevant genes resistant to aminoglycoside antibiotics. The most frequent gene was *ant(4')-Ia* (51,43% of tested strains). Among all tested strains of *S. epidermidis*, the majority showed resistance to tobramycin and gentamicin (57,14%, 51,43%, respectively).

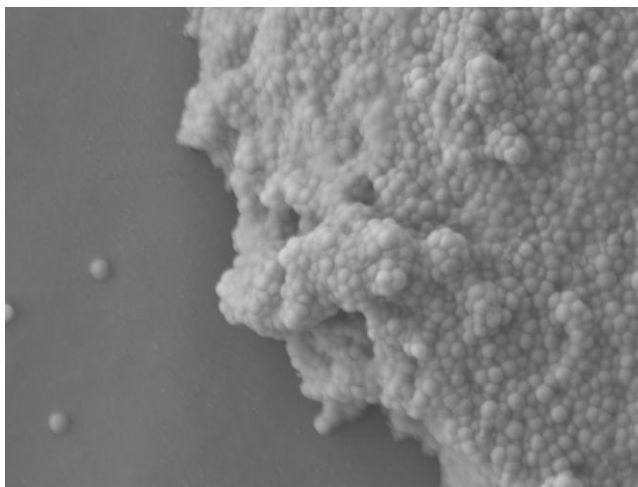
The resistance to aminoglycoside antibiotics as well as the presence of the resistance associated genes occur with varying frequency depending on the type of clinical material of the tested strains, geographical region, hospital classification, or the group of patients taking part in the test.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, aminoglycosides, drug resistance, staphylococcal biofilm, drug susceptibility

Wstęp

Staphylococcus epidermidis, gronkowiec naskórkowy, stanowi naturalną florę fizjologiczną człowieka, najliczniej występując na skórze oraz w układzie oddechowym i przewodzie pokarmowym człowieka. Jest najczęściej izolowanym gatunkiem wśród gronkowców koagulazoujemnych (CoNS ang. *Coagulase Negative Staphylococci*). W ciągu ostatnich lat został uznany za ważny czynnik etiologiczny, głównie zakażeń szpitalnych oraz zakażeń związanych z układem sercowo-naczyniowym. Infekcje dotyczą szczególnie pacjentów z obniżoną odpornością oraz osób posiadających wszczepione protezy z materiałów sztucznych (Budzyńska, Kaczmarek et al. 2007).

Gronkowce koagulazoujemne, w odróżnieniu od *Staphylococcus aureus*, nie wytwarzają dużej liczby toksyn i enzymów. Najbardziej znaczącym czynnikiem, odpowiedzialnym za zjadliwość CoNS, pozostaje zdolność do produkcji biofilmu – Ryc. 1. (Delińska-Gawlińska, Arłukowicz et al. 2008, Dzierżanowska 2009). Bakterie te odkładają na powierzchni cewników lub innych biomateriałów substancje polimerowe (śluz egzopolisacharydowy, adhezyny, białko wiążące kolagen), które stanowią podstawę do tworzenia biofilmu (Bartoszewicz 2013). Biofilm jest populacją bakterii, która stanowi od 10 do 15% jego objętości, rosnącą na określonej powierzchni (biotycznej – np. tkanki lub abiotycznej – np. cewnik), otoczoną przez macierz zewnątrzkomórkową, składającą się z cukrów, białek oraz zewnątrzkomórkowego DNA (eDNA – ang. *extracellular DNA*), tworzących pozostałe 85-90% macierzy (El-Baky 2012). Zakażenia szczepami gronkowców produkujących biofilm są trudne do wyleczenia, ponieważ bakterie tam żyjące potrafią być do 1000 razy bardziej odporne na antybiotyki, niż te same patogeny rosnące w formie planktonicznej (Becker, Heilmann et al. 2014, Gomes, Teixeira et al. 2012).



Ryc. 1. Biofilm *Staphylococcus epidermidis* [SEM x 3700] – zdjęcie z kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Wirusologii SUM

Podczas tworzenia biofilmu główną rolę w jego strukturze odgrywa polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa PIA (ang. *Polysaccharide Intercellular Adhesin*), w której skład wchodzi przede wszystkim polimer β -1,6-N-acetyloglukozaminy PNAG (ang. *Poly-N-acetylglucosamine*). Jest wytwarzana przez enzymy kodowane przez operon *icaADBC*, kryjący w swoim składzie cztery geny: *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*, ruchomy element *IS 256* oraz gen regulatorowy *icaR* (Diemond-Hernández, Solórzano-Santos et al. 2010, Līduma, Tračevska et al. 2012, Papadimitriou-Oliveri, Giormezis et al. 2016, Su Mi, Seung-Han et al. 2003). Ekspresja genów zawartych w operonie *icaADBC* jest zależna od wielu czynników, zarówno środowiskowych, jak i genetycznych. U bakterii nieposiadających operonu *icaADBC*, lub wykazujących jego zmniejszoną ekspresję, wykryto inne mechanizmy kompensujące zdolność wytwarzania biofilmu. Udowodniono w tym przypadku wytwarzanie czynników o charakterze białkowym, czy produkcję zewnątrzkomórkowego DNA (eDNA), będącego polianionem, łączącym dodatnio naładowane fragmenty PIA (Campoccia, Montanaro et al. 2011, Stevens, Greene et al. 2009). Zakażenie gronkowcem naskórkowym, oprócz wspomnianych już zakażeń łożyska naczyniowego czy endoprotez, może być również powodem infekcyjnego zapalenia wsierdza. W tym przypadku jedną z opcji terapeutycznych jest stosowanie rifampicyny z antybiotykami aminoglikozydowymi (Polewczyk, Janion et al. 2014).

Aminoglikozydy wykazują efekt bakteriobójczy w stosunku do bakterii tlenowych, jednak w terapii są często stosowane w leczeniu skojarzonym z β -laktamami i glikopeptydami, pomimo niejednokrotnie występujących podczas leczenia działań niepożądanych (Meszaros, Kwiatkowski et al. 2007). W cząsteczce aminoglikozydu charakterystyczna jest obecność aminocukru, połączonego wiązaniem glikozydowym z aminocyklitolem – streptaminą (w cząsteczce streptomycyny) lub 2-deoksystreptaminą (w przypadku gentamycyny i pozostałych aminoglikozydów) (Campoccia, Montanaro et al. 2011). Aminoglikozydy to polikationy, zawierające w swej strukturze grupy aminowe i hydroksylowe, odpowiedzialne za ich działanie farmakologiczne (Heczko, Wróblewska et al. 2014). Wykazują działanie bakteriobójcze poprzez hamowanie syntezy białek. Efekt działania tych antybiotyków jest uzależniony od stężenia leku w otoczeniu drobnoustroju. Wśród działań niepożądanych aminoglikozydów, najczęściej odwracalnych, najważniejszą rolę odgrywa działanie nefrotoksyczne, ototoksyczne i neurotoksyczne (Mączyńska 2015).

Oporność bakterii na aminoglikozydy to proces postępujący i zróżnicowany w zależności od rodzaju i gatunku bakterii, ale także różny dla poszczególnych antybiotyków z tej grupy. Zjawisko oporności dotyczy szczególnie drobnoustrojów izolowanych z powikłań septycznych (Meszaros, Kwiatkowski et al. 2007). Najbardziej powszechnym mechanizmem oporności jest inaktywacja aminoglikozydu przez rodzinę enzymów AME (ang. *Aminoglycoside Modifying Enzyme*). Zjawisko oporności może zachodzić również w wyniku mutacji w obrębie rybosomu oraz, coraz częściej, wskutek reorganizacji rybosomu przez rodzinę metylotransferaz rybosomalnych. Mutacje rybosomalne dotyczą najczęściej genu *rrs*, kodującego część A 16S rRNA. Zmiana ta utrudnia wiązanie aminoglikozydu z rybosomem i w konsekwencji hamowanie syntezy białka. Innym występującym zjawiskiem jest mutacja w genie *rspL*, kodującym białko S12 odpowiedzialne za wiązanie

aminoglikozydów z grupy streptomycyny, co powoduje wystąpienie wysokiej oporności bakterii na te antybiotyki (Garneau-Tsodikova, Labby et al. 2016).

Rosnąca antybiotykooporność infekujących szczepów bakteryjnych, czy też zdolność wytwarzania biofilmu, taka jak na przykład obserwowana u *S. epidermidis*, są przyczyną różnego typu niepowodzeń w zwalczaniu zakażeń. Dlatego celem podjętych badań była ocena fenotypowej i genetycznej oporności na antybiotyki aminoglikozydowe wśród klinicznych szczepów *S. epidermidis*, w zależności od ich zdolności do tworzenia biofilmu. Analizie poddano również korelację pomiędzy obecnością analizowanych genów, a profilem lekooporności na badane antybiotyki aminoglikozydowe.

Material i metody

W badaniach użyto 70 szczepów bakterii *Staphylococcus epidermidis* wyizolowanych z zakażeń łożyska naczyniowego z różnymi zdolnościami tworzenia biofilmu. Ze szczepów tych w obrębie grupy badanej (B) wyłoniono dwie podgrupy: grupę szczepów nietworzących biofilmu (B1) oraz grupę szczepów tworzących biofilm (B2).

Badania zdolności tworzenia biofilmu wykonano zmodyfikowaną metodą Christensena (Christensen, Simpson et al. 1985, Wojtyczka, Orlewska et al. 2014). W badaniach użyto także dwóch szczepów wzorcowych: *S. epidermidis* ATCC 12228 jako szczepu nieprodukującego biofilmu oraz szczepu *S. epidermidis* ATCC 35983 jako szczepu produkującego biofilm.

Oznaczenie lekowrażliwości dla czterech wybranych antybiotyków aminoglikozydowych: gentamycyny, netylmycyny, tobramycyny i amikacyny przeprowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną, zgodnie z rekomendacjami EUCAST (KORLD 2010).

Z badanych szczepów przygotowano zawiesiny 0,5 w skali McFarlanda w roztworze 0,9% NaCl. Następnie dokonano posiewu na podłoże Mueller-Hinton (MHA). W kolejnym etapie nałożone zostały krążki z następującymi antybiotykami aminoglikozydowymi: gentamycyna 10µg, netylmycyna 10µg, tobramycyna 10µg oraz amikacyna 30µg (OXOID). Posiewy inkubowano w temperaturze 35°C przez 18 godzin, w warunkach tlenowych, a następnie dokonano odczytu wielkości stref zahamowania wzrostu i oceniono wrażliwość badanych szczepów na podstawie rekomendacji EUCAST, przedstawionych w tabeli I. Oznaczanie oporności na wymienione antybiotyki wykonano w dwóch powtórzeniach.

Tabela I. Kryteria klasyfikacji szczepów gronkowców koagulazoujemnych na podstawie wyników oznaczania lekowrażliwości wg EUCAST (EUCAST 2016)

Antybiotyk	Zawartość antybiotyku w krążku [µg]	Klasyfikacja w zależności od wartości granicznej strefy zahamowania wzrostu [mm]		
		Oporny	Średniowrażliwy	Wrażliwy
Gentamycyna	10	<22	-	≥22
Netylmycyna	10	<22	-	≥22
Tobramycyna	10	<22	-	≥22
Amikacyna	30	≤19	20-21	≥22

W celu wykonania badań molekularnych przeprowadzono izolację genomowego DNA bakterii przy pomocy zestawu Gene MATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx Gdańsk).

Występowanie genów oporności na antybiotyki aminoglikozydowe u szczepów *S. epidermidis* przeprowadzono za pomocą techniki multiplex-PCR. Do tego celu wykorzystano zestaw diagnostyczny 10xPCR *Hypernova*-RED (BLIRT S.A. Gdańsk). W badaniach użyto starterów przedstawionych w tabeli II. Reakcje multiplex-PCR przeprowadzono w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (BIO-RAD), według następujących parametrów: denaturacja wstępna 95°C – 5 minut, następnie 30 cykli w układzie: denaturacja 95°C – 120 sekund, przyłączanie starterów 58°C – 30 sekund, wydłużanie starterów 72°C – przez 30 sekund. Wydłużanie końcowe 72°C – 10 minut (Murugan, Usha et al. 2010).

Produkty amplifikacji wizualizowano poprzez elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (Wojtyczka, Orlewska et al. 2014). Analizę elektroforegramów dokonano w programie GenSys.

Tabela II. Sekwencje starterów dla genów użytych w reakcji multiplex PCR (Murugan, Usha et al. 2010)

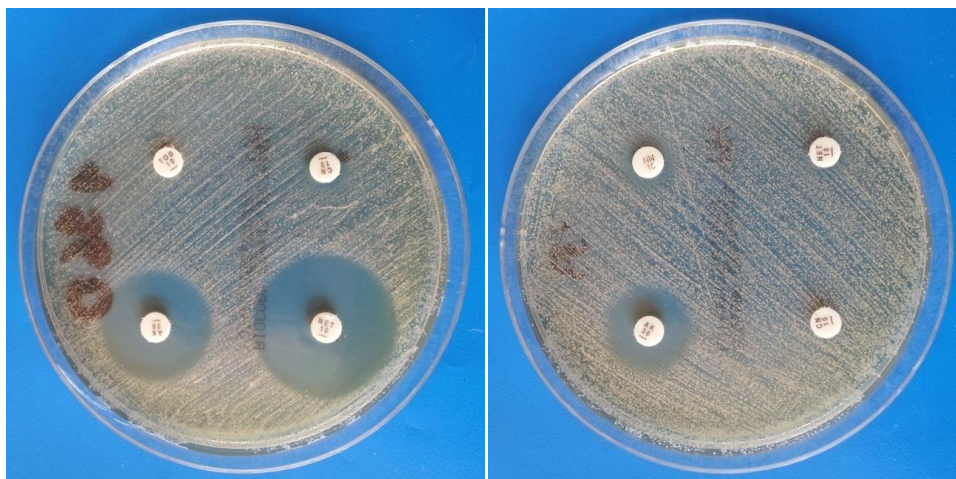
Nazwa genu	Sekwencje starterów (5'-3')	Wielkość produktu (pz)
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	r: 5'GAAGTACGCAGAAGAGA-3' f: 5'-ACATGGCAAGCTCTAGGA-3'	491
<i>aph(3')-IIIa</i>	r: 5'-AAATACCGCTGCGTA-3' f: 5'-CATACTCTCCGAGCAA-3'	242
<i>ant(4')-Ia</i>	r: 5'-AATCGGTAGAAGCCCAA-3' f: 5'-GCACCTGCCATTGCTA-3'	135

Analizę statystyczną otrzymanych wyników badań przeprowadzono w programie STATISTICA 12. Istotność statystyczną sprawdzono przy pomocy testu chi-kwadrat lub testu chi-kwadrat z poprawką Yatesa (w przypadku, gdy liczebności oczekiwane były mniejsze od 5). Przyjęty poziom istotności wynosił $p < 0,05$.

Wyniki

W pierwszym etapie badań dokonano oceny zdolności tworzenia biofilmu u 70 szczepów *S. epidermidis*. Wśród badanych szczepów – 22 (31%) wykazywały zdolność do tworzenia biofilmu. Brak zdolności tworzenia biofilmu stwierdzono w przypadku 48 szczepów (69%).

W kolejnym etapie dokonano oceny lekowrażliwości szczepów *S. epidermidis* na antybiotyki aminoglikozydowe (Ryc. 2).



Ryc. 2. Wynik oznaczania metodą dyfuzyjno-krążkową lekowrażliwości na antybiotyki aminoglikozydowe wybranych szczepów *S. epidermidis* (od lewej szczepy wg numeracji SUM: 413, 1960) – fotografie własne.

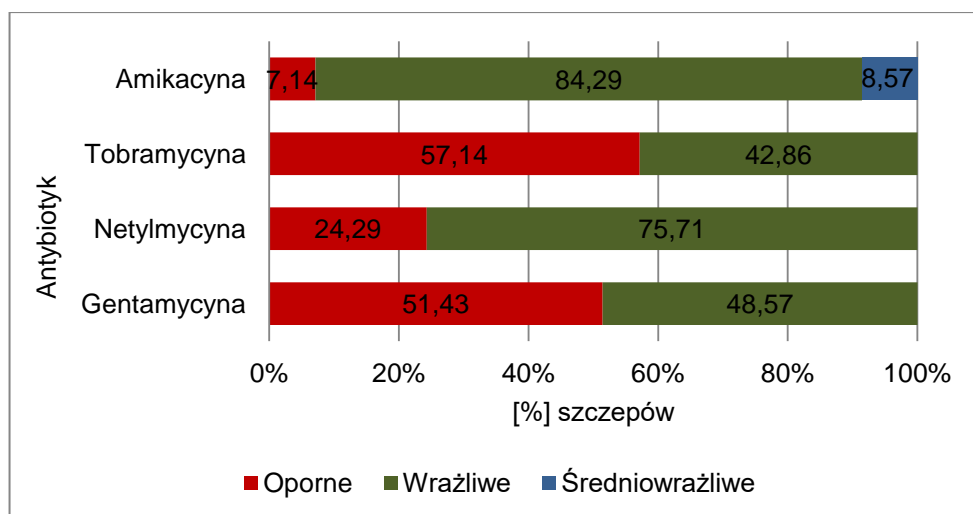
Oporność w stosunku do badanych antybiotyków dla całej grupy badanej z podziałem na szczepy odporne, wrażliwe i średniowrażliwe przedstawiono w tabeli III.

Tabela III. Liczba szczepów opornych, wrażliwych oraz średniowrażliwych w badaniu lekowrażliwości

Badany antybiotyk	Liczba szczepów opornych	Liczba szczepów wrażliwych	Liczba szczepów średniowrażliwych
Amikacyna	5	59	6
Gentamycyna	36	34	0
Netylmycyna	17	53	0
Tobramycyna	40	30	0

Porównując otrzymane wyniki do oznaczeń dla szczepów wzorcowych – oba szczepy wzorcowe: ATCC 12228 oraz ATCC 35983 wykazywały wrażliwość w stosunku do wszystkich oznaczanych antybiotyków.

Oceniając zjawisko wielolekooporności na antybiotyki aminoglikozydowe stwierdzono, że oporność na co najmniej jeden z badanych antybiotyków występowała wśród 44 szczepów *S. epidermidis*, co stanowiło 62,86% całej grupy badanej. Lekowrażliwość na badane antybiotyki aminoglikozydowe przedstawiono graficznie na rycinie 3.



Ryc. 3. Lekooporność szczepów klinicznych *S. epidermidis* na antybiotyki aminoglikozydowe.

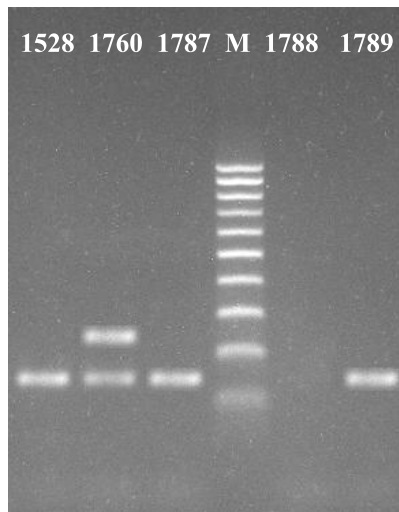
Zestawienie wyników z uwzględnieniem podziału grupy badanej na szczepy posiadające i nieposiadające zdolności do tworzenia biofilmu przedstawiono w tabeli IV.

Tabela IV. Wyniki badania lekowrażliwości szczepów badanych z uwzględnieniem ich zdolności do tworzenia biofilmu

Nazwa antybiotyku	Szczepy wytwarzające biofilm			Szczepy niewytwarzające biofilmu		
	Oporne	Wrażliwe	Średniowrażliwe	Oporne	Wrażliwe	Średniowrażliwe
Amikacyna	3 (13,64%)	18 (81,82%)	1(4,55%)	2 (4,17%)	41 (85,42%)	5(10,42%)
Gentamycyna	13 (59,09%)	9 (40,91%)	0	23 (47,92%)	25 (52,08%)	0
Netylmycyna	5 (22,73%)	17 (77,27%)	0	12 (25%)	36 (75%)	0
Tobramycyna	15 (68,18%)	7 (31,82%)	0	25 (52,08%)	23 (47,92%)	0

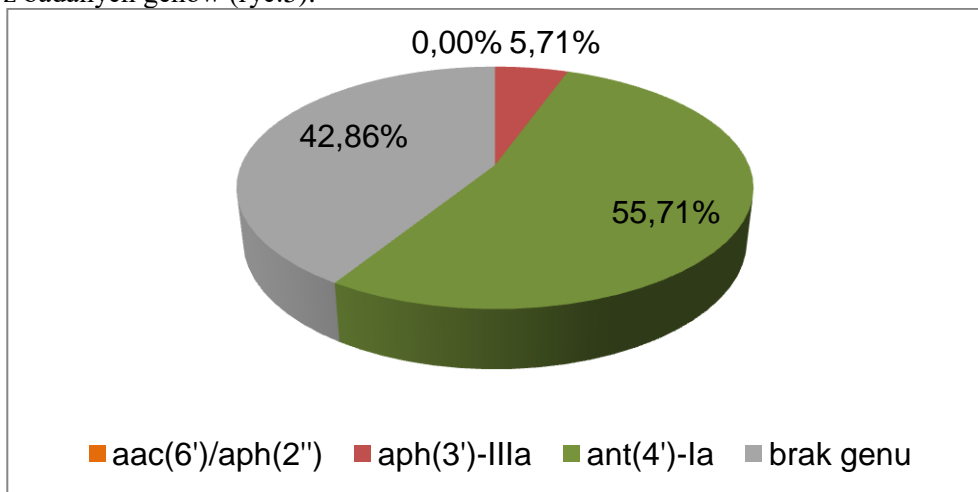
Wśród szczepów badanych szczep ATCC 12228, nieposiadający zdolności do tworzenia biofilmu, jak również szczep ATCC 35983, posiadający zdolność do tworzenia biofilmu wykazały wrażliwość w stosunku do wszystkich badanych antybiotyków.

Ocenę obecności genów warunkujących genetyczną oporność na antybiotyki aminoglikozydowe przeprowadzono wśród 70 badanych szczepów oraz 2 szczepów wzorcowych *S. epidermidis*, u których wcześniej przeprowadzono badanie lekowrażliwości metodą krążkowo-dyfuzyjną (ryc. 4).



Ryc. 4. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji genów *aac(6')/aph(2'')* (491 pz), *aph(3')-IIIa* (242 pz) oraz *ant(4')-Ia* (135 pz) w 1.5% żelu agarozowym; 1528, 1760, 1787, 1788, 1789 – numery próbek badanych wg SUM; M – marker wielkości (100-1000 pz).

Współobecność genów *ant(4')-Ia* oraz *aph(3')-IIIa* wykazano w przypadku 3 szczepów gronkowców naskórkowych, co stanowiło 4,28% badanych szczepów. Wśród 30 (42,86%) szczepów *S. epidermidis* nie wykazano obecności żadnego z badanych genów (ryc.5).



Ryc. 5. Procentowy udział poszczególnych genotypów u szczepów klinicznych *S. epidermidis*.

Liczbę szczepów, u których wykazano obecność poszczególnych genów z uwzględnieniem zdolności do tworzenia biofilmu przedstawiono w tabeli V.

Tabela V. Liczba badanych oraz wzorcowych szczepów *S. epidermidis* z genami warunkującymi oporność na aminoglikozydy w zależności od zdolności do tworzenia biofilmu

Gen	Wszystkie szczepy badane	Szczepy tworzące biofilm	Szczepy nietworzące biofilmu	ATCC 12228	ATCC 35983
<i>ant(4')-Ia</i>	39 (55,71%)	16 (72,73%)	23 (47,92%)	Brak	Obecny
<i>aph(3')-IIIa</i>	4 (5,71%)	1 (4,54%)	3 (6,25%)	Brak	Brak
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Brak	Brak
Brak	30(42,86%)	5 (22,73%)	25 (52,08%)	-	-

Dyskusja

Antybiotyki są stosowane w leczeniu zakażeń bakteryjnych od połowy XX wieku, jednak niewłaściwe ich wykorzystanie doprowadziło do wyselekcjonowania drobnoustrojów opornych na prawie wszystkie używane dziś środki przeciwbakteryjne. Infekcje opornymi patogenami mają często charakter powikłany, a także charakteryzują się wysoką śmiertelnością. Antybiotykooporność obniża także skuteczność leczenia i powoduje wzrost jego kosztów (Podkowik, Bania et al. 2014).

Gronkowce koagulazoujemne, w przeciwieństwie do gronkowca złocistego, przez długi czas uważane były za patogeny umiarkowanie lub zupełnie nieszkodliwe. Dziś zdolność tych bakterii do wywoływania poważnych infekcji nie budzi wątpliwości. Największy udział przypisuje się im w etiologii zapalenia wsierdza, czy w powikłaniach zakażeń ran pooperacyjnych (Podkowik, Bania et al. 2014).

Problem wielolekooporności, występujący u szczepów *S. epidermidis*, związany jest przede wszystkim ze zdolnością tworzenia przez te bakterie biofilmu (Cerca, Martins et al. 2005). Powszechnie znanym zjawiskiem biorącym bezpośredni udział w przekazywaniu między poszczególnymi szczepami genów oporności jest obecność plazmidów, transpozonów, a także integronów. Obecność integronów u bakterii *Staphylococcus* spp. związana jest z ich wielolekoopornością, co potwierdzają badania naukowe (Łabiszak, Koczura et al. 2016). Gen *aac4* determinuje oporność na aminoglikozydy u wszystkich gronkowców, natomiast gen *aac6* warunkuje tę oporność u szczepów *S. epidermidis* (Cerca, Martins et al. 2005).

Badania nad lekoopornością gronkowców koagulazoujemnych na aminoglikozydy były prowadzone przez Koksala i wsp. (Koksal, Yasar et al. 2009). Poddali oni analizie 200 szczepów CoNS, pochodzących z różnych oddziałów szpitala, w tym 87 bakterii *S. epidermidis*. Dodatkowo, grupa badana została podzielona ze względu na oporność na metycylinę. W przeprowadzonych przez nich badaniach wykazano, że 107 (53,5%) szczepów gronkowców koagulazoujemnych wykazało oporność w stosunku do gentamycyny (Koksal, Yasar et al. 2009). Wynik ten został potwierdzony w niniejszych badaniach, gdzie 51,4% badanych szczepów *S. epidermidis* wykazywało oporność na ten aminoglikozyd. Wskazuje to na wysoką oporność szczepów CoNS na gentamycynę. W przeprowadzonych przez Koksala i wsp. badaniach wykazano, że determinanty oporności były przekazywane na plazmidach gronkowców koagulazoujemnych, jak i pomiędzy *S. epidermidis* i *S. aureus* (Koksal, Yasar et al. 2009).

Odmienne aspekty oporności na antybiotyki aminoglikozydowe badał zespół Nuryastuti i wsp. (Nuryastuti, Krom et al. 2011). Oceniali oni zdolność tworzenia biofilmu przez *S. epidermidis* na powierzchniach trzech odmiennych biomateriałów,

stosowanych w operacjach stawów biodrowych i kolanowych oraz wrażliwość tych szczepów na różne stężenia gentamycyny. W otrzymanych przez nich wynikach podkreślono znaczące różnice we wzroście szczepów produkujących biofilm na powierzchni każdego z biomateriałów. Po potraktowaniu wszystkich hodowli gentamycyną w stężeniach 16 µg/ml oraz 32 µg/ml, po 3 godzinach inkubacji, nie we wszystkich przypadkach zauważyli oni zwolnienie funkcji metabolicznych szczepu i zahamowanie produkcji biofilmu. Istniały szczepy, w przypadku których odnotowano wzrost i zachowanie funkcji metabolicznych. Przedstawione wyniki skłaniają do twierdzenia, iż lekowrażliwość szczepów bakteryjnych zależy również od rodzaju podłoża, na którym dany szczep rośnie, co jest istotne szczególnie w kontekście stosowania antybiotykoterapii podczas infekcji po wszczepieniu implantów stawowych (Nuryastuti, Krom et al. 2011). W przeprowadzonych przez nas badaniach oporność na gentamycynę stwierdzono w przypadku 59,09% szczepów wytwarzających biofilm oraz 47,92% szczepów niewytwarzających biofilmu, co wyraźnie wskazuje na zwiększoną oporność wśród szczepów *S. epidermidis* tworzących biofilm.

Maduka-Ezeh i wsp. (Maduka-Ezeh, Greenwood-Quaintance et al. 2012) badali lekowrażliwość SCV (ang. *small colony variants*), które stanowią populację organizmów obecnych w przetrwałych, trudnych do leczenia infekcjach implantów stawowych. Szczepy SCV wykazują różną od normalnych izolatów morfologię, fizjologię i biochemię. Wśród 11 badanych szczepów SCV, 5 z nich wykazało oporność na co najmniej jeden z badanych antybiotyków aminoglikozydowych (amikacynę, gentamycynę, kanamycynę lub tobramycynę), co stanowiło 45,45% (Maduka-Ezeh, Greenwood-Quaintance et al. 2012). Badania te także potwierdziły wysoką oporność gronkowców na antybiotyki aminoglikozydowe.

Badania nad oznaczaniem lekowrażliwości szczepów gronkowców koagulazoujemnych prowadzili także Xu i wsp. (Xu, Shi et al. 2008). Wśród 53 analizowanych szczepów, znajdowały się 24 szczepy należące do gatunku *S. epidermidis*. W przeprowadzonych przez nich badaniach opornych na amikacynę, jak i na gentamycynę było 10 szczepów gronkowca naskórkowego, co stanowiło 41,67% szczepów *S. epidermidis*. Porównując otrzymane przez nich wyniki z naszymi badaniami, w których opornych na gentamycynę było 51,3% szczepów, a na amikacynę 7,13%, można stwierdzić dużą różnicę w lekooporności tych szczepów, co może być spowodowane wieloma czynnikami. Dysproporcja ta może wynikać z różnic geograficznych i niskiej reprezentatywności próby badanej, co wiąże się z odmienną sytuacją epidemiologiczną, rodzajem materiału, z którego pochodzą badane szczepy, a także obecnością innych mechanizmów oporności na antybiotyki aminoglikozydowe (Xu, Shi et al. 2008).

Podsumowanie

Rosnąca oporność bakterii jest zjawiskiem negatywnym i szybko postępującym. Powodem jej jest przede wszystkim niewłaściwy dobór leku w terapii empirycznej, jak również brak odpowiedniego dawkowania w terapii celowanej. Do osiągnięcia zamierzonego celu, czyli eradykacji bakterii z organizmu, potrzebne jest dobranie odpowiedniego leku przeciwbakteryjnego w odpowiedniej dawce i stosowanie leku adekwatnie długo do obowiązujących zaleceń. Dlatego, w obecnych czasach ciągle

rosnącej oporności antybiotykowej, niezwykle ważne jest zachowanie rozważności w stosowaniu antybiotykoterapii oraz opieranie się na rekomendacjach oraz wynikach prowadzonych badań klinicznych.

Wnioski

1. Badane szczepy *Staphylococcus epidermidis*, izolowane z łożyska naczyniowego, wykazały wysoką oporność na gentamycynę i tobramycynę.
2. Najczęściej identyfikowanym genem związanym z opornością na antybiotyki aminoglikozydowe, w badanej grupie szczepów, był gen *ant(4')-Ia*.
3. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy zdolnością tworzenia biofilmu, a opornością na antybiotyki aminoglikozydowe.

Badania zrealizowano w ramach tematu KNW-1-026/N/6/I

Literatura

Bartoszewicz M. **Fenotypowe i genotypowe podstawy tworzenia biofilmu przez gronkowce koagulazoujemne na cewnikach moczowych i naczyniowych - ocena morfologii struktury, sposoby eradycji.** UM Wrocław. 2013; 11:5-47; ISBN: 978-83-7055-486-6.

Becker K., Heilmann Ch., Peters G. **Coagulase-Negative Staphylococci.** Clinical Microbiology Review. 2014; 27(4):870-926.

Budzyńska A., Kaczmarek A., Mikołajczyk D., Gospodarek E. **Zastosowanie metody krążkowo-dyfuzyjnej z oksacyliną i cefoksytyną oraz techniki PCR w identyfikacji metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus epidermidis*.** Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia. 2007; 59:27-33.

Camppocchia D., Montanaro L., Ravaioli S., Pirini V., Cangini I., Arciola C. R. **Exopolysaccharide production by *Staphylococcus epidermidis* and its relationship with biofilm extracellular DNA.** The International Journal of Artificial Organs. 2011; 34(9):832-839.

Cerca N., Martins S., Cerca F., Jefferson K. K., Pier G. B., Oliveira R., Azeredo J. **Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 56:331-336.

Christensen G. D., Simpson W. A., Younger J. J., Baddour L. M., Barrett F. F., Melton D. M., Beachey E. H. **Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.** Journal of Clinical Microbiology. 1985; 22:996-1006.

Delińska-Gawlińska A., Arłukowicz E., Plata-Nazar K., Łuczak G., Kozielska E., Kotłowska-Kmieć A., Borkowska A. **Analiza wyników posiewów krwi u dzieci z założonym cewnikiem centralnym.** Przegląd Epidemiologiczny. 2008; 62:47-53.

Diemond-Hernández B., Solórzano-Santos F., Leañós-Miranda B., Peregrino-Bejarano L., Miranda-Novales G. **Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with *Staphylococcal* device-related infections.** BMC Infectious Diseases. 2010; 10:68.

Dzierżanowska D. **Antybiotykoterapia praktyczna.** 2009; Alfa-medica Press (Polska): 80-81, 115-124; ISBN: 978-83-7522-048-3.

El-Baky R. M. A. **Application of Scanning Electron Microscopy for the Morphological Study of Biofilm in Medical Devices.** In: Kazmiruk V. (Editor) Scanning Electron Microscopy. 2012; InTech Europe (Rijeka); ISBN: 978-953-51-0092-8.

Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST). **Tabele interpretacji wartości granicznych minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz wielkości stref zahamowania wzrostu.** Wersja 6.0, obowiązująca od 1 stycznia 2016 roku.

http://www.korld.edu.pl/pdf/EUCAST_breakpoints_t%C5%82umaczenie_wersja_6_2016.pdf

Garneau-Tsodikova S., Labby K. J. **Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives.** Medicinal Chemistry Communications. 2016; 7(1):11-27.

Gomes F., Teixeira P., Ceri H., Oliveira R. **Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against in vitro *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** Indian Journal of Medical Research. 2012; 135:542-547.

Heczko P.B., Wróblewska M., Pietrzyk A. **Mikrobiologia lekarska.** 2014; PZWL (Polska): 100-107; ISBN: 978-83-200-4308-2.

Koksal F., Yasar H., Samasti M. **Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey.** Microbiological Research. 2009; 164:404-410.

KORLD. **Oznaczanie wrażliwości ziarniaków Gram-dodatnich z rodzaju *Staphylococcus* spp.** Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów KORLD, 2010.

http://www.korld.edu.pl/pdf/Rekomendacje_2010_gronkowce.pdf

Līduma I., Tračevska T., Bērs U., Žileviča A. **Phenotypic and Genetic Analysis of Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis*.** Medisina (Kaunas). 2012, 48(6):305-309.

Łabiszak B., Koczura R. **Integrony bakterii gram-dodatnich.** Postępy Mikrobiologii. 2016; 55(4):398-403.

Maduka-Ezeh A. N., Greenwood-Quaintance K. E., Karau M. J., Berbari E. F., Osmon D. R., Hanssen A. D., Steckelberg J. M., Patel R. **Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* small colony variants associated with prosthetic joint infection.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2012; 74:224-229.

Mączyńska B. **Aminoglikozydy – mechanizm działania, oporność bakterii i ich rola we współczesnej terapii zakażeń.** Forum zakażeń. 2015; 6(1):72.

Meszaros J., Kwiatkowski A. **Aminoglikozydy: aktywność, toksyczność i dawkowanie w niewydolności nerek.** Zakażenia. 2007; 7(6):36,38-43.

Murugan K., Usha M., Malathi P., Saleh Al-Sohaibani A., Chandrasekaran M. **Biofilm forming multi resistant *Staphylococcus* spp. among patients with Conjunctivitis.** Polish Journal of Microbiology. 2010; 59(4):233-239.

Nuryastuti T., Krom B. P., Aman A. T., Busscher H. J., van der Mei H. C. **Ica-expression and gentamicin susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on orthopedic implant biomaterials.** Journal of Biomedical Material Research. 2011; 96(2):365-371.

Papadimitriou-Olivgeri I., Giormezis N., Papadimitriou-Olivgeris M., Zotou A., Kolonitsiou K., Fligou F., Marangos M., Anastassiou E. D., Spiliopoulou I. **Number of positive blood cultures, biofilm formation, and adhesin genes in differentiating true coagulase-negative staphylococci bacteraemia from contamination.** European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2016; 35:57-66.

Podkowik M., Bania J., Schubert J., Bystron J. **Gronkowce koagulazo-ujemne: nowe zagrożenie dla zdrowia publicznego? Życie weterynaryjne** 2014; 89(1):60-66.

Polewczyk A., Janion M., Podlaski R., Kutarski A. **Clinical manifestations of lead-dependent infective endocarditis: analysis of 414 cases.** European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2014; 33:1601-1608.

Stevens N. T., Greene C. M., O'Gara J. P., Humphreys H. **Biofilm characteristics of *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with device-related meningitis.** Journal of Medical Microbiology. 2009; 58:855-862.

Su Mi Ch., Seung-Han K., Hee-Jung K., Dong-Gun L., Jung-Hyun Ch., Jin-Hong Y., Jin-Han K., Wan-Shik S., Moon-Won K. **Multiplex PCR for the Detection of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Methicillin Resistance among *Staphylococcus* Species.** Journal of Korean Medical Science. 2003; 18:631-636.

Wojtyczka R. D., Orlewska K., Kępa M., Idzik D., Dziedzic A., Mularz T., Krawczyk M., Mikłasińska M., Wąsik T. J. **Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment.** International Journal of Environmental Research and Public Health. 2014; 11:4619-4633.

Xu Z., Shi L., Alam M. J., Li L., Yamasaki S. **Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China.** FEMS Microbiology Letters. 2008; 278:223-230.

Biologia spor *Clostridium* spp.

Clostridium spp. spore biology

Krzysztof Sacha¹, Jakub Orszulak¹, Aleksandra Orszulak¹, Monika Kabała²
Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski w Katowicach, Ul. Medyków 18,
40-752 Katowice

¹Studenckie Koło Naukowe

Opiekun koła prof. dr hab. n. med. Gajane Martirosian

Opiekun pracy mgr Monika Kabała

²Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WLK SUM

Autor do korespondencji:

Krzysztof Sacha, krzysztof.sacha1@gmail.com

Ul. Medyków 18, 40-752 Katowice

Streszczenie

Clostridium spp. to Gram-dodatnie laseczki typu Firmicutes wytwarzające endospory. Do tego rodzaju zalicza się około 180 gatunków. Bakterie te różnicujemy między innymi metodą chromatografii gazowej, wykrywając charakterystyczne dla poszczególnych gatunków lotne kwasy tłuszczowe oraz badając aktywność metaboliczną i występowanie spor. Laseczki tego rodzaju powszechnie występują w środowisku naturalnym: w glebie, wodzie, przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt. *Clostridium* spp. posiadają zdolność do wytwarzania wielu toksyn o działaniu litycznym, w tym enterotoksyn wydzielanych podczas sporulacji. Tworzenie form przetrwalnikowych – spor jest jedną z najważniejszych cech bakterii tego rodzaju. Jest to mechanizm obronny indukowany przez niekorzystne warunki środowiska, umożliwiający bakteriom przetrwanie. Spory, zależnie od gatunku, są rozmieszczone w komórce bakteryjnej: centralnie, subterminalnie lub terminalnie. Czynniki inicjującymi sporulację są m. in.: wysoka temperatura, środowisko tlenowe i substancje chemiczne, w tym środki do dezynfekcji na bazie alkoholu. Oporność spor jest uwarunkowana związkami budującymi je – dipikolinianem wapnia i peptydoglikanem o zmienionej strukturze i sprzyja szerzeniu się bakterii między ludźmi. Determinuje to większą zdolność do rozprzestrzeniania się zakażeń, które przy dużej liczbie osłabionych pacjentów w szpitalach mogą mieć ciężki, epidemiczny przebieg. Problem wymaga poważnego podejścia i odpowiedniej organizacji systemu kontroli zakażeń w szpitalach, uwzględniając różne aspekty dotyczące postępowania z zakażonymi pacjentami, środowiskiem szpitalnym, a także edukowania personelu medycznego.

Abstract

Clostridium spp. are spore-producing Gram-positive anaerobic bacilli, belonging to the phylum Firmicutes. This genus involve about 180 species distinguish by metabolic activity, short-chain fatty acids, detected by gas chromatography and occurrence of spores. *Clostridium* spp. exist commonly in the natural habitat: in soil, water, human and animals digestive tract. *Clostridium* spp. produce many toxins with lytic effect, including enterotoxins produced during sporulation. Germination spores in vegetative forms – and opposite is one of the most important characteristics of this species of bacteria. Sporulation is a defense mechanism induced by adverse environmental conditions which allows bacteria to survive. Spores are located differently in bacterial cell depending on species: centrally, subterminally or terminally. Factors which initiate sporulation are: high temperature, aerobic environment and chemical substances, including alcohol based disinfectants. Spores resistance is determined by structures they are build from calcium dipicolinate and peptidoglycan and conduce surviving of bacterium and spreading them between people. It determines larger ability to spread infection, which can have dangerous, epidemic character in hospitals full of weak, vulnerable patients. This problem needs serious attitude and adequate organisation of infection control system in hospitals, including varied aspects pertained behavior with infected patients, hospital environment as well as educating medical personnel.

Wstęp

Bakterie z rodzaju *Clostridium* spp. to wytwarzające endospory, beztlenowe, Gram-dodatnie laseczki należące do typu *Firmicutes* (Mohab, Shawn et al. 2015). Do rodzaju *Clostridium* spp. należy 180 gatunków, z czego tylko kilka jest patogennych dla człowieka, są to między innymi: *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tetani* i *C. botulinum*. Posiadają wspólne cechy biochemiczne: zdolność do syntezy kwasów tłuszczowych, brak enzymów redukujących siarczany, rozkładanie cukrów, w tym tych o budowie polimerowej jak skrobia czy celuloza oraz alkoholi, aminokwasów, puryn i pirymidyn. Gatunki te są w większości niepatogenne, a ponadto mogą mieć istotne znaczenie w różnych gałęziach przemysłu takich jak: farmacja, przetwarzanie żywności czy oczyszczanie ścieków (Dürre 2016). Niektóre szczepy wykorzystywane są do produkcji biopaliw do zastosowań przemysłowych (Liew, Henstra et al. 2017). Oprócz zastosowania w przemyśle, uważa się, że spory mogą służyć jako nośniki do kolonizacji komórek zmienionych nowotworowo w terapii nowotworów (Theys, Pennington et al. 2006). Niektóre z bakterii *Clostridium* spp. wchodzi w skład flory kolonizującej jelita ludzi i zwierząt, przez co mają korzystny wpływ na działanie układu immunologicznego (Mohab, Shawn, Eleftherios et al. 2015). Bakterie Gram-dodatnie, w tym *C. perfringens* mogą powodować wzrost wydzielania IL-12 w dużo większym stopniu niż IL-10, co skutkuje aktywacją komórek NK (*Natural Killer*) oraz nasileniem wytwarzania interferonu gamma (IFN γ). Prowadzi to zarówno do zwiększenia cytotoksyczności limfocytów, jak i wzmocnienia odporności zdrowych komórek na zainfekowanie wirusem oraz hamowanie namnażania się wirusów poprzez inhibicję syntezy łańcuchów białek wirusowych (Hessle, Andersson et al. 2000). Do powszechnego występowania bakterii z rodzaju *Clostridium* spp. przyczynia się ich zdolność do wytwarzania form przetrwalnikowych – spor. Przetrwalniki są bardziej odporne niż formy wegetatywne na niekorzystne warunki środowiska takie jak np. brak glukozy, obecność tlenu, wysoka temperatura czy środki dezynfekcyjne. Spory umożliwiają przetrwanie bakteriom niekorzystnych warunków środowiskowych; mogą one powrócić do formy wegetatywnej, kiedy znajdą się w korzystnym środowisku jakim jest np. rana martwicza dla *C. perfringens*, czy naruszenie mikrobioty jelit po antybiotykoterapii dla *C. difficile* (Talukdar, Olguín-Araneda et al. 2015). Liczne występowanie spor sprzyja szerzeniu się tych bakterii między pacjentami hospitalizowanymi.

Charakterystyka wybranych gatunków *Clostridium* spp.

C. difficile produkuje toksyny A i B oraz toksynę binarną wydzielaną przez szczepy hiperwirulentne. Zakażenie szczepami toksynotwórczymi może dawać szereg objawów o różnej ciężkości takich jak: biegunki poantybiotykowe, bóle brzucha oraz rzekomobłoniaste zapalenie jelit czy okrężnica olbrzymia. Obecnie dużym problemem jest występowanie szczepu hiperwirulentnego NAP1/B1/027, który ma zdolność do nadprodukcji toksyn, wytwarza toksynę binarną, ma dużą zdolność do sporulacji i charakteryzuje się opornością na fluorochinolony (O'Connor J.R., et al. 2009).

C. perfringens wytwarza wiele różnych enzymów i toksyn, m.in. enterotoksynę wydzielaną podczas sporulacji. Bakterie te dzielimy na 5 typów (A, B, C, D, E) w zależności od wydzielanych toksyn. Najważniejsza toksyna – alfa odpowiedzialna za hemolizę, produkowana jest przez wszystkie typy szczepów. Spory *C. perfringens* układają się centralnie. Według danych CDC, w Wielkiej Brytanii i USA zatrucia pokarmowe spowodowane przez *C. perfringens* zajmują 2 miejsce. Toksyny produkowane przez *C. perfringens* są czynnikiem sprawczym zgorzeli gazowej, inaczej nazywanej gangreną. Jest to proces zapalny przebiegający z martwicą mięśni i tkanki łącznej z wytworzeniem gazu. Na skutek przedostania się toksyn do krwi, może dojść do wstrząsu toksycznego, który prowadzi do śmierci (Navarro MA, McClane BA, et al. 2018).

C. tetani tworzy edospory umieszczone na końcu komórki (terminalnie). Należy do bezwzględnych beztlenowców i jest szeroko rozpowszechniona w środowisku, głównie pod postacią spor w glebie, nawozie kurzu. Laseczka ta kolonizuje również przewód pokarmowy, będąc składnikiem naturalnej mikroflory bakteryjnej ludzi i zwierząt. Zakażenie rany formami przetrwalnikowymi, lub wegetatywnymi oraz produkcja egzotoksyn powodują poważną chorobę zakaźną określaną jako tężec. *C. botulinum* wytwarza spory ułożone przy biegunach (subterminalnie). Spory występują w glebie, przewodzie pokarmowym zwierząt. Bakterie *C. botulinum* zaliczamy do 4 grup, w zależności od różnic fizjologicznych i molekularnych pomiędzy szczepami. Jedynie szczepy należące do grup I i II są w stanie produkować toksyny, które u człowieka powodują ciężkie objawy chorobowe. Chorobą spowodowaną przez egzotoksyny produkowane przez bakterie *C. botulinum* jest botulinizm. Do zakażenia może dojść drogą pokarmową, poprzez zjedzenie konserw zawierających toksynę, lub poprzez zakażenie bakteryjne rany – botulinizm przyranny (Farnworth E, Roberts A, et al. 2012).

Występuje również botulinizm noworodków opisany po raz pierwszy w USA w latach 70. XX wieku, polegający na spożyciu spor bakterii obecnych w herbacie słodzonej miodem (López-Laso E, Roncero-Sánchez-Cano I, et al. 2014).

Sporulacja

Sporulacja indukowana jest różnymi czynnikami stresowymi takimi jak: temperatura, alkohol, niedobór składników odżywczych czy obecność tlenu, który dla beztlenowych bakterii *Clostridium* spp. jest toksyczny. W warunkach laboratoryjnych można stosować różne metody indukowania sporulacji. Najskuteczniejszą z nich jest szok termiczny, następnie tlenowy (optymalny czas trwania szoku tlenowego to 72 h) oraz alkoholowy (Burke KE, Lamont JT 2014).

Spory możemy wykryć przy użyciu mikroskopu świetlnego, transmisyjnego mikroskopu elektronowego, spektroskopii Ramana, pęsety optycznej oraz mikroskopii fluorescencyjnej (Kong, Lingbo 2011), (Wang S, Shen A, et al. 2015), (Joshi LT, Phillips DS, et al. 2012), (Claro T, Daniels S, et al. 2014).

W metodzie mikroskopii świetlnej, uprzednio wybarwione spory obserwowane są pod powiększeniem obiektywu 100x z zastosowaniem imersji. Podstawowymi metodami barwienia są metoda Schaffera-Fultona i Trujillo.

Inicjacji sporulacji upatruje się również w procesie *quorum sensing* (QS). *Quorum sensing* jest systemem funkcjonującym u bakterii służącym do kontroli

procesów fizjologicznych i porozumiewania się bakterii, w procesie tym rolę odgrywają zewnątrzpochoodne cząsteczki (Bassler, 1999). Zbadano że jedna ze ścieżek QS – Agr-like, obecna u *C. perfringens* jest niezbędna do wytwarzania enterotoksyny CPE (*Clostridium perfringens enterotoxin*) produkowanej podczas sporulacji

(Li, Chen et al. 2011).

Najważniejszym białkiem niezbędnym do zajścia procesu sporulacji zarówno u *C. perfringens* jak i u *C. difficile* jest regulator transkrypcji Spo0A. Gen spo0A jest obecny u bakterii *Clostridium* spp. i przetrwalnikujących laseczek tlenowych *Bacillus* spp., nie wykryto go natomiast u niesporulujących, spokrewnionych z *Bacillus cereus* bakterii takich jak *Listeria* spp. czy *Staphylococcus* spp. (Brown, Ganova-Raeva et al. 1994).

U *C. perfringens* za aktywację ekspresji genu kodującego białko Spo0A odpowiedzialny jest nieorganiczny fosforan. Nieorganiczny fosforan indukuje sporulację również poprzez blokowanie działania glukozy, hamującej proces sporulacji. Obecność w przewodzie pokarmowym człowieka nieorganicznego fosforanu, sprzyja więc przechodzeniu form wegetatywnych bakterii w spory i wytwarzaniu enterotoksyny CPE, która ma udział w patogenezie chorób wywoływanych przez *C. perfringens* (Li, Paredes-Sabja et al. 2016). Potwierdzeniem tego jak istotną rolę w procesie sporulacji odgrywa białko Spo0A jest niewytwarzający enterotoksyny CPE szczep 13 *C. perfringens*, który posiada kodon stop w genie *spo0A*, w wyniku czego jest niezdolny do sporulacji. Wskazuje to na kluczowe znaczenie tego czynnika zarówno dla sporulacji bakterii jak i dla wytwarzania enterotoksyny (Shimizu, Ohtani et al. 2002) (Huang, Waters et al. 2004).

U *C. difficile* za aktywację czynnika Spo0A poprzez fosforylację odpowiada pięć kinaz histydynowych- CD1352, CD1492, CD1579, CD1949 i CD2492. Ufosforylowany czynnik transkrypcyjny Spo0A (Spo0A~P) bierze udział w ekspresji wielu genów związanych z procesem sporulacji m. in.: genów związanych z tworzeniem przegrody, SASP-4 czy toksyny CPE. Jest on także kluczowym regulatorem operonu spoIIAA-spoIIAB-sigF odpowiedzialnego za syntezę czynnika SigF (Jones, Tracy et al. 2011).

W procesie sporulacji odgrywa również ważną rolę regulator transkrypcji CcpA (*carbon catabolite protein*) o plejotropowym działaniu. CcpA bierze także udział w regulacji wielu innych szlaków metabolicznych. Co ciekawe podczas gdy obecność CcpA jest niezbędna dla wydajnego procesu sporulacji u *C. perfringens*, ekspresja tego czynnika u *C. difficile* wpływa negatywnie na przebieg sporulacji (Antunes, Camiade et al. 2012).

Istotne w procesie sporulacji są również czynniki sigma (*sporulation specific sigma factors*) – SigF, SigE, SigG, SigK. Nadrzędną funkcję ma SigF, który wchodzi w skład operonu spoIIAA-spoIIAB-sigF i razem z Spo0A reguluje ekspresję pozostałych czynników tej grupy. Czynniki SigF i SigG działają regulująco w obrębie spory, a czynniki SigE i SigK w obrębie komórki macierzystej. W przeciwieństwie do *C. perfringens* i *B. subtilis* u *C. difficile* czynnik SigK nie ulega aktywacji proteolitycznej (Li, Paredes-Sabja et al. 2016)

Przebieg sporulacji jest bardzo zbliżony u bakterii rodzaju *Bacillus* spp. i *Clostridium* spp i można go podzielić na 7 etapów. Etap pierwszy rozpoczyna się asymetrycznym podziałem komórki na większą komórkę macierzystą i mniejszą część, nazywaną presporą, z której powstanie endospora. Obydwie części posiadają kompletny genom. Następnie prespora jest pochłaniana przez komórkę macierzystą tworząc początkową formę spory otoczoną błoną wewnętrzną i zewnętrzną. W kolejnych etapach przy udziale komórki macierzystej syntetyzowane są kolejno: korteks, płaszcz i egzosporium, jednocześnie następuje synteza kwasu dipikolinowego, który zapewnia sporze odporność na warunki środowiskowe. Końcowym etapem sporulacji jest liza komórki macierzystej i uwolnienie dojrzałej spory (Leggett, McDonnell et al. 2012).

Budowa endospor

Endospory są nieaktywnymi metabolicznie strukturami komórkowymi, które cechuje duża odporność na działanie czynników fizycznych i chemicznych takich jak: temperatura, promieniowanie elektromagnetyczne, wysuszenie czy enzymy lityczne, co pozwala przetrwać bakterii niekorzystne warunki. Spory odgrywają dużą rolę w rozprzestrzenianiu się bakterii, a także w patogenezie niektórych chorób bakteryjnych. Oporność bakteryjnych spor jest uwarunkowana ich specyficzną budową. Patrząc od wewnątrz w endosporze możemy wyróżnić następujące struktury: rdzeń, błonę wewnętrzną, ścianę spory, korteks (kora), zewnętrzną błonę, płaszcz i egzosporium. Najlepiej poznane są endospory bakterii *Bacillus subtilis*, dlatego bardzo często porównuje się spory innych bakterii do tego gatunku (Markiewicz Z. 2015). Spory *C. difficile* mogą być uwalniane do środowiska z kałem pacjentów hospitalizowanych u których wystąpiły objawy chorobowe, jak i u pacjentów bezobjawowych. Spory mają wysoką zdolność przetrwania. Mogą przetrwać do 5 miesięcy na powierzchniach nieożywionych (Fekety R, Kim KH 1981).

Rdzeń

Najbardziej wewnętrzną częścią endospor jest rdzeń, który zawiera odwodniony cytozol, DNA, RNA oraz enzymy. Posiada on kilka cech strukturalnych, które warunkują oporność spory:

1. Mała zawartość wody (20-50% masy mokrej), która zapewnia wytrzymałość na działanie wysokiej temperatury w wilgotnym środowisku (Li, Paredes-Sabja et al. 2016).
2. Duża ilość dipikolinianu wapnia odpowiada za odporność na promieniowanie ultrafioletowe (UV) (Markiewicz Z. 2015).
3. Zewnętrzne części helisy DNA wiązane są przez białka z rodziny SASP (*small acid soluble proteins*), co powoduje usztywnienie i prostowanie nici DNA. Połączenie się białek SASP z DNA zapewnia większą odporność na promienie UV, a także czynniki chemiczne. Białka SASP ulegają proteolizie enzymatycznej podczas kiełkowania spor (Markiewicz Z. 2015) (Li, McClane 2008).

Błona Wewnętrzna

Kolejną warstwę stanowi błona wewnętrzna. Jej skład lipidowy jest bardzo podobny do tego występującego w błonie komórkowej form wegetatywnych, różni się natomiast składem białkowym. W błonie wewnętrznej znajdują się istotne dla procesu kiełkowania spor (germinacji) receptory GRs (*germinant receptors*) należące do rodziny GerA. Błona ta cechuje się niską przepuszczalnością dla małych cząsteczek takich jak obojętne cząsteczki lipofilowe, związki chemiczne uszkadzające DNA czy woda. Niska przepuszczalność tej błony jest spowodowana istotnie zmniejszoną ruchomością lipidów błonowych w stosunku do błony komórek bakteryjnych (Paredes-Sabja, Shen et al. 2014) (Cowan, Olivastro et al. 2004).

Ściana Spory

Następnym elementem jest ściana spory, która podobnie jak ściana form wegetatywnych zbudowana jest z peptydoglikanu, występują jednak między nimi pewne różnice strukturalne:

1. Krótsze łańcuchy cukrowe, u spor są one zbudowane z około 40 jednostek dwucukrowych; w ścianie komórek wegetatywnych jest to około 100 jednostek dwucukrowych.
2. Brak obecności kwasów tejchojowych.
3. Rzadsze występowanie łańcuchów peptydowych bocznych, co warunkuje mniejsze usieciowanie (Markiewicz Z. 2015).

Ściana spory nie wydaje się odgrywać istotnej roli w odporności na czynniki środowiskowe, podczas germinacji ulega przekształceniu w ścianę komórkową bakterii (Leggett, McDonnell et al. 2012).

Kora

Kolejną warstwa spory to korteks, który odgrywa kluczową rolę w odwodnieniu spory w związku z czym przyczynia się do zwiększonej oporności endospor. Zbudowany jest tak samo jak ściana spory z peptydoglikanu, który w stosunku do ściany komórkowej form wegetatywnych zawiera szereg modyfikacji:

1. Brak obecności kwasów tejchojowych
2. Prawie połowa cząsteczek kwasu N-acetyloneuraminowego ulega cyklizacji tworząc gamma-laktamy kwasu muraminowego, rozpoznawane przez specyficzne enzymy CLE (*cortex lytic enzyme*), które podczas germinacji dokonują hydrolizy peptydoglikanu korteksu.
3. Około ¼ reszt kwasu N-acetyloneuraminowego jest podstawiona nie łańcuchem peptydowym a pojedynczą L-alaniną (Markiewicz Z. 2015).

Modyfikacje wymienione w punktach 2 i 3 odpowiadają za zmniejszone usieciowanie korteksu na poziomie około 3%, dla porównania w ścianie komórki wegetatywnej wynosi ono około 40% (Leggett, McDonnell et al. 2012) (Li, Paredes-Sabja et al. 2016) (Markiewicz Z. 2015).

Płaszcz

Spora posiada również płaszcz stanowiący barierę dla dużych cząsteczek i chroniący ją przed niekorzystnymi czynnikami, jakimi mogą być lizozym czy środki utleniające. Jest on jednak przepuszczalny dla mniejszych cząsteczek, w tym czynników inicjujących germinację. Płaszcz ma budowę warstwową, składa się z warstwy zewnętrznej, bogatej w elektrony i wewnętrznej posiadającej lamelarną strukturę, cechującą się mniejszą gęstością (Markiewicz Z. 2015).

Płaszcz zbudowany jest w głównej mierze z białek, których skład i budowa różni się między poszczególnymi gatunkami, jak również bardzo często między szczepami tego samego gatunku oraz z węglowodanów. Białka możemy podzielić na dwie frakcje: rozpuszczalną, która stanowi większą część (należą do niej m. in. białka: CotA, CotB, CotC, CotD czy CotG) oraz nierozpuszczalną cechującą się dużą zawartością cysteiny. W płaszczu bakterii *B. subtilis* zidentyfikowano do tej pory 70 białek; u rodzaju *Clostridium* poznano jedynie około 20. Jeśli chodzi o morfo-genetyczne czynniki odpowiedzialne za tworzenie trzech pierwszych warstw płaszcza to u *B. subtilis* są to: SpoIVA, SpoVM, SpoIVD, SofA, CotE, a spośród tych czynników u *C. difficile* znaleziono homologi SpoIVA i SpoVM. U *C. difficile* SpoIVA ma istotną rolę w syntezie i lokalizacji płaszcza, jednak w przeciwieństwie do SpoIVA u *B. subtilis* nie jest on niezbędny do tworzenia korteksu. Zidentyfikowany u *C. difficile* czynnik SpiL (*SpoIVA Interacting Protein L*) wiążący się z SpoIVA i biorący udział w formowaniu płaszcza, może wykazywać pewną funkcjonalną analogię z czynnikiem SpoVID u *B. subtilis* (Leggett, McDonnell et al. 2012), (Permpoonpattana, Phetcharaburanin et al. 2013).

Egzosporium

Najbardziej zewnętrzną strukturą spory jest egzosporium, w którego skład wchodzi m.in.: białka, lipidy czy węglowodany. Nie wszystkie bakterie z rodzaju *Clostridium* posiadają egzosporium, znajdziemy je u *C. difficile*, natomiast u *C. perfringens* już nie (Leggett, McDonnell et al. 2012). U *C. difficile* niezbędne do prawidłowego funkcjonowania endosporu jest charakterystyczne białko egzosporium – CdeC. Mutacje w genie kodującym to białko, powodują że spory mają zarówno cieńsze egzosporium jak i płaszcz. Może to sugerować położenie białka CdeC na granicy tych dwóch struktur, spełniając funkcję kotwiczącą. Dodatkowo u *C. difficile* 630 wykryto białka o prawdopodobnej funkcji katalazy – CotCB, CotD, CotG, dwa z nich CotCb i CotG są homologami CotJC *B. subtilis*. Odnaleziono również trzy paralogi (BclA1, BclA2, BclA3) kolageno-podobnej glikoproteiny BclA u *B. subtilis*. Białko BclA1 zlokalizowane jest w egzosporium i skierowane C-kończową domeną do środka spory (Paredes-Sabja, Shen et al. 2014).

Germinacja

Germinacja, zwana również kiełkowaniem, jest to przemiana endosporu w aktywne metabolicznie komórki wegetatywne. Powrót spory do aktywności życiowej zachodzi w korzystnych warunkach środowiskowych i jest indukowany różnymi związkami w nomenklaturze angielskojęzycznej, określanymi jako *germinants*, takimi jak: aminokwasy, kwasy organiczne, związki cholesterolowe, fragmenty

peptydoglikanu, cukry, NaCl czy nukleotydy. Łączą się one ze swoistymi receptorami GRs (*germinant receptors*) zapoczątkowując procesy metaboliczne do których należą:

1. Uwolnienie DPA (*dipicolinic acid*) z rdzenia.
2. Aktywacja enzymów rozkładających korteks SCLE (*spore cortex-lytic enzymes*).
3. Nawodnienie rdzenia (Dürre 2014).

Najpowszechniejszym induktorem germinacji jest L-alanina, aminokwas niezbędny do budowy ściany komórkowej. Niektóre gatunki *Clostridium* spp. mogą germinować w odpowiedzi na L-mleczan i L-serynę, co prawda aminokwasy te nie wchodzi w skład ściany komórkowej, ale mogą być enzymatycznie przekształcane do L-alaniny. L-cysteina także może indukować germinację. Bakterie z rodzaju *Clostridium* posiadają desulfurazę cysteinową, która umożliwia przemianę cysteiny do alaniny. Innymi związkami indukującymi germinację mogą być u *C. difficile* norwalina i u *C. perfringens* L-walina, która bierze udział w syntezie błony komórkowej. Spory *C. difficile* ulegają germinacji w odpowiedzi na związki kwasów żółciowych m. in. kwasu dezoksycholowego, będącego wtórnym kwasem żółciowym, który obecny jest w jelicie grubym człowieka (Bhattacharjee, McAllister et al. 2016).

Germinacja *C. difficile* jest hamowana przez niektóre kwasy żółciowe np. kwas chenodeoksycholowy, jak również progesteron i jego analogi (Sorg, Sonenshein 2009), (Bhattacharjee, McAllister et al. 2016). Germinacja *C. perfringens* może być natomiast hamowana przez niektóre polifosforany (Akhtar, Paredes-Sabja et al. 2008). Germinacja innych spor z rodzaju *Clostridium* może być hamowana przez m.in.: D-alaninę, D-serynę, czy D-cysteinę. Najpowszechniejszymi receptorami germinacji są receptory *Ger-type*, są one zlokalizowane w błonie wewnętrznej, których geny znaleziono w większości bakterii Gram-dodatnich wytwarzających przetrwalniki, jednakże co należy podkreślić nie znaleziono tego typu receptorów u *C. difficile*. Receptor GerA łączy się z L-alaniną, natomiast receptory GerB i GerK łączą się z L-asparaginą, D-glukozą, D-fruktozą i jonami potasu. U *C. perfringens* GerKC składowa receptora GerK pełni kluczową rolę w procesie germinacji i jest niezbędny do aktywacji SCLEs (Bhattacharjee, McAllister et al. 2016) (Li, Paredes-Sabja et al. 2016) (Paredes-Sabja, Torres et al. 2008). Ważną funkcję w procesie germinacji odgrywają proteazy serynowe CspA, CspB i CspC. U *C. difficile* CspC funkcjonuje jako receptor dla kwasów żółciowych. Proteazy CspA, CspB i CspC u *C. perfringens* odpowiadają za aktywację SCLEs. (Francis, Allen et al. 2013). Proteolityczna aktywacja SCLEs, a także ich specyficzność substratowa wobec gamma laktamów kwasu muraminowego pozwala na wybiórczą degradację korteksu w odpowiednich dla germinacji warunkach. Podczas germinacji zachodzi również degradacja białek SASP, powoduje to uwolnienie DNA, które następnie może być poddane procesom transkrypcji i replikacji. Aminokwasy powstałe w wyniku degradacji SASP są wykorzystywane do budowy białek (Hayes, Setlow 2001).

Podsumowanie

W szpitalu znajdują się osłabieni podstawowymi chorobami pacjenci podatni na zakażenia, które mają o wiele cięższy przebieg niż u zdrowych osób i niekiedy stanowią realne zagrożenie dla życia. Zakażeń tymi bakteriami można by w znacznym stopniu uniknąć poprzez przykładanie większej wagi do antyseptyki; dobór odpowiedniej metody i środków, dokładność wykonywania czynności dezynfekcyjnych. Istotne jest, że środki dezynfekcyjne na bazie alkoholu nie są wystarczające do zwalczania spor. Z racji, że są one powszechnie wykorzystywane do antyseptyki rąk, bardzo ważną i skuteczną metodą jest mechaniczne usuwanie form przetrwalnikowych poprzez dokładne mycie rąk pod bieżącą wodą z mydłem (Gould, Moralejo et al. 2017). Do czyszczenia, czy dezynfekcji powierzchni szpitalnych (podłogi, parapety, szafki, brzegi łóżek etc.) powinno się używać antyseptyków na bazie innej substancji np. chloru (Fernando, Gray et al. 2017). Wprowadzono kilka nowych technik, takich jak pary nadtlenu wodoru, promieniowanie UV lub systemy plazmy gazowej (Otter JA, French GL. 2009), (Boyce JM, Havill NL et al. 2008), (Galvin S, Cahill O, O'Connor N et al. 2013), (Zhang A, Nerandzic MM et al. 2013).

Wnioski

Sporulacja jest istotnym czynnikiem sprzyjającym szerzeniu się infekcji wywołanych bakteriami *Clostridium* spp. Ze sporamii niektórych bakterii możemy mieć kontakt w życiu codziennym, występują one w glebie (*C. tetani*) czy w źle przechowywanym pokarmie (*C. perfringens*, *C. botulinum*), w przewodzie pokarmowym zwierząt i człowieka, jednak największą uwagę powinno się poświęcić sporom znajdującym się w środowisku szpitalnym. Mimo posiadania informacji dotyczących biologii spor, które zostały opisane wyżej, w dalszym ciągu dochodzi zarówno do pojedynczych zakażeń jak i epidemii na oddziałach spowodowanych bakteriami z rodzaju *Clostridium*, co nasuwa wniosek, że problem wymaga poważnego podejścia i odpowiedniej organizacji systemu kontroli zakażeń w szpitalach, uwzględniając różne aspekty dotyczące postępowania z zakażonymi pacjentami, środowiskiem szpitalnym, a także edukowania personelu medycznego.

Literatura

- Arnon S., Midura T. F., Damus K., Thompson B., Wood R. M., Chin J. **Honey and other environmental risk factors for infant botulism.** The Journal of Pediatrics. 1979; 94 (2): 331-336.
- Akhtar S., Paredes-Sabja D., Sarker M. R. **Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and spore outgrowth.** Food Microbiology. 2008; 25 (6): 802-8.
- Antunes A., Camiade E., Monot M., Courtois E., Barbut F., Sernova N. V., Rodionov D. A., Martin-Verstraete I., Dupuy B. **Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*.** Nucleic Acids Research. 2012; 40 (21):10701-18.
- Markiewicz Z. **Budowa i Funkcje Komórki Bakteryjnej.** In: Baj J., Markiewicz Z. (Editors) **Biologia Molekularna Bakterii.** 2015; Wydawnictwo Naukowe PWN SA (Polska); ISBN: 978-83-01-18183-3
- Bassler B. L. **How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing.** Current Opinion in Microbiology. 1999; 2 (6): 582-587.

- Bhattacharjee D., McAllister K. N., Sorg J. A. **Germinants and Their Receptors in Clostridia.** Margolin W, ed. *Journal of Bacteriology.* 2016;198(20):2767-2775.
- Boyce J. M., Havill NL, Otter J. A., McDonald L. C., Adams N. M., Cooper T., Thompson A., Wiggs L., Killgore G., Tauman A., Noble-Wang J. **Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on Clostridium difficile environmental contamination and transmission in a healthcare setting.** *Infection Control Hospital Epidemiology* 2008; 29:723–729. 10.1086/589906.
- Brown D. P., Ganova-Raeva L., Green B. D., Wilkinson S. R., Young M., Youngman P. **Characterization of spo0A homologues in diverse Bacillus and Clostridium species identifies a probable DNA-binding domain.** *Molecular Microbiology.* 1994; 14 (3): 411-26.
- Burke K. E., Lamont J. T. **Clostridium difficile Infection: A Worldwide Disease.** *Gut and Liver.* 2014; 8(1): 1-6.
- Claro T., Daniels S., Humphreys H. **Detecting Clostridium difficile Spores from Inanimate Surfaces of the Hospital Environment: Which Method Is Best?.** *Journal of Clinical Microbiology.* 2014; 52(9): 3426-3428.
- Cowan A. E., Olivastro E. M., Koppel D. E., Loshon C. A., Setlow B., Setlow P. **Lipids in the inner membrane of dormant spores of Bacillus species are largely immobile.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004; 101 (20): 7733-7738.
- Dürre P. **Physiology and Sporulation in Clostridium.** In: Eichenberger P, Driks A (Editors) **The Bacterial Spore: from Molecules to Systems.** 2016; American Society for Microbiology Press (USA); ISBN: 9781555819323.
- Farnworth E., Roberts A., Rangaraj A., Minhas U., Holloway S., Harding K. **Tetanus in patients with chronic wounds- are we aware?.** *International Wound Journal.* 2012; 9(1): 93-9.
- Fekety R., Kim K. H., Brown D. Batts D. H., Cudmore M., Silva J., Jr. **Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of Clostridium difficile from the hospital environment.** *The American Journal of Medicine* 1981; 70 (4): 906-8.
- Fernando S., Gray T., Gottlieb T. **Healthcare-acquired infections: prevention strategies.** *Internal Medicine Journal.* 2017; 47 (12): 1341-1351.
- Francis M. B., Allen C. A., Shrestha R., Sorg J. A. **Bile Acid Recognition by the Clostridium difficile Germinant Receptor, CspC, Is Important for Establishing Infection.** *POLS Pathogen.* 2013; 9 (5): e1003356.
- Galvin S., Cahill O., O'Connor N., Cafolla A. A., Daniels S., Humphreys H. **The antimicrobial effects of helium and helium-air plasma on Staphylococcus aureus and Clostridium difficile.** *Letters in applied. Microbiology.* 2013; 57 (2): 83–90.
- Gould D. J., Moralejo D., Drey N., Chudleigh J. H., Taljaard M. **Interventions to improve hand hygiene compliance in patient care.** *Cochrane Database of Systematic Review.* 2017; 8 (9)
- Harry K. H., Zhou R., Kroos L., Melville S. B. **Sporulation and Enterotoxin (CPE) Synthesis Are Controlled by the Sporulation-Specific Sigma Factors SigE and SigK in Clostridium perfringens.** *Journal of Bacteriology.* 2009; 191 (8): 2728-42.
- Hayes C. S., Setlow P. **An α/β -Type, Small, Acid-Soluble Spore Protein Which Has Very High Affinity for DNA Prevents Outgrowth of Bacillus subtilis Spores.** *Journal of Bacteriology.* 2001; 183 (8): 2662-2666.
- Hessle C., Andersson B., Wold A. E. **Gram-Positive Bacteria Are Potent Inducers of Monocytic Interleukin-12 (IL-12) while Gram-Negative Bacteria Preferentially Stimulate IL-10 Production.** *Infection and Immunity.* 2000; 68 (6): 3581-3586.

- Huang I. H., Waters M., Grau R. R., Sarker M. R. **Disruption of the gene (spo0A) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic Clostridium perfringens type A.** FEMS Microbiology Letters. 2004; 233 (2): 233-40.
- Jones S. W., Tracy B. P., Gaida S. M., Papoutsakis E. T. **Inactivation of σ F in Clostridium acetobutylicum ATCC 824 Blocks Sporulation Prior to Asymmetric Division and Abolishes σ E and σ G Protein Expression but Does Not Block Solvent Formation.** Journal of Bacteriology. 2011; 193 (10): 2429-2440.
- Joshi L. T., Phillips D. S., Williams C. F., Alyousef A., Baillie L. **Contribution of Spores to the Ability of Clostridium difficile To Adhere to Surfaces.** Applied and Environmental Microbiology. 2012; 78 (21): 7671-7679.
- Kong L., Zhang P., Wang G., Yu J., Setlow P., Li Y. Q. **Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical tweezers.** Nature Protocols. 2011; 6 (5): 625-39.
- Leggett M. J., McDonnell G., Denyer S. P., Setlow P., Maillard J. Y. **Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance.** Journal of applied microbiology. 2012; 113 (3): 485-98.
- Li J., McClane B. A. **A Novel Small Acid Soluble Protein Variant Is Important for Spore Resistance of Most Clostridium perfringens Food Poisoning Isolates.** POLS Pathogen. 2008; 4 (5): e1000056.
- Li J., Chen J., Vidal J. E., McClane B. A. **The Agr-Like Quorum-Sensing System Regulates Sporulation and Production of Enterotoxin and Beta2 Toxin by Clostridium perfringens Type A Non-Food-Borne Human Gastrointestinal Disease Strain F5603.** Infection and Immunity. 2011; 79 (6): 2451-2459.
- Li J., Paredes-Sabja D., Sarker M. R., McClane B. A. **Clostridium perfringens Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production.** Microbiology spectrum. 2016; 4 (3).
- Liew F., Henstra A. M., Köpke M., Winzer K., Simpson S. D., Minton N. P. **Metabolic engineering of Clostridium autoethanogenum for selective alcohol production.** Metabolic Engineering. 2017; 40: 104-114.
- López-Laso E, Roncero-Sánchez-Cano I, Arce-Portillo E, Ley-Martos M, Aguirre-Rodríguez J, García-Ron A, Mora-Navarro D, Méndez-García M, Camino-León R. **Infant botulism in Andalusia (Southern Spain).** European Journal of Paediatric Neurology. 2014; 18 (3): 321 - 326
- Mohab A., Shawn W., Eleftherios T. **The Clostridium Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2015; 79 (1): 19-37
- Moura, I., Monot, M., Tani, C., Spigaglia, P., Barbanti, F., Norais, N., Dupuy B., Bouza E., Mastrantonio, P. **Multidisciplinary Analysis of a Nontoxicogenic Clostridium difficile Strain with Stable Resistance to Metronidazole.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014; 58 (8): 4957-4960.
- Navarro M. A., McClane B.A., Uzal F.A. **Mechanisms of Action and Cell Death Associated with Clostridium perfringens Toxins.** Toxins. 2018; 10 (5): 212.
- O'Connor J. R., Johnson S., Gerding D. N. **Clostridium difficile Infection Caused by the Epidemic BI/NAP1/027 Strain** (2009) Gastroenterology, 136 (6) , 1913-1924.
- Otter J. A., French G. L. **Survival of nosocomial bacteria and spores on surfaces and inactivation by hydrogen peroxide vapor.** Journal of Clinical Microbiology. 2009; 47 (1): 205-207.
- Paredes-Sabja D., Shen A., Sorg J. A. **Clostridium difficile spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins.** Trends in microbiology. 2014; 22 (7) : 406-16.

Permpoonpattana P., Phetcharaburanin J., Mikelson A., Dembek M., Tan S., Brisson M. C., La Ragione R., Brisson A. R., Fairweather N., Hong H. A., Cutting S. M. **Functional characterization of Clostridium difficile spore coat proteins.** Journal of bacteriology. 2013; 195 (7): 1492-503.

Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H., Ohshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Kuhara S., Hayashi H. **Complete genome sequence of Clostridium perfringens, an anaerobic flesh-eater.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002; 99 (2): 996-1001.

Sorg J. A., Sonenshein A. L. **Chenodeoxycholate Is an Inhibitor of Clostridium difficile Spore Germination.** Journal of Bacteriology. 2009; 191 (3): 1115-7.

Talukdar P., Olguín-Araneda V., Alnoman M., Paredes-Sabja D., Sarker M. **Updates on the sporulation process in Clostridium species.** Research in Microbiology. 2015; 166 (4), 225-235.

Theys J., Pennington O., Dubois L. **Repeated cycles of Clostridium-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects in vivo.** British Journal of Cancer. 2006; 95 (9): 1212-1219.

Wang S., Shen A., Setlow P., Li Y. **Characterization of the Dynamic Germination of Individual Clostridium difficile Spores Using Raman Spectroscopy and Differential Interference Contrast Microscopy.** Journal of Bacteriology. 2015; 197 (14): 2361-2373.

Yang W-W., Crow-Willard E. N., Ponce A. **Production and characterization of pure Clostridium spore suspensions.** Journal of Applied Microbiology. 2009; 106 (1): 27-33.

Zhang A., Nerandzic M. M., Kundrapu S., Donskey C. J. **Does organic material on hospital surfaces reduce the effectiveness of hypochlorite and UV radiation for disinfection of Clostridium difficile?** Infection Control and Hospital Epidemiology. 2013; 34: 1106-1108.

Indeks autorów

Barańska M.	43	Martirosian G.	164
Bartkowiak K.	88, 100, 121	Mazurek U.	78, 139
Bartkowiak M.	88, 100, 121	Niderla-Bielińska J.	88, 121
Bryniarska N.	150	Ołdak Ł.	23
Brzezińska-Lasota E.	43	Orszulak A.	185
Chudzik M.	88, 100, 121	Orszulak J.	185
Czarnecka K. H.	43	Pendrasik A.	100
Ćwiek A.	56	Prusek A.	78
Gorodkiewicz A.	23	Sacha K.	185
Gorodkiewicz E.	9	Sankiewicz A.	23
Idzik D.	172	Sikora B.	78, 139
Jankowska-Steifer E.	88, 100, 121	Skubis A.	78, 139
Jóźwiak J.	35	Swolana D.	172
Kabała M.	164, 185	Szlufik S.	35
Kępa M.	172	Szymańska B.	9
Klicka K.	35	Wąsik T. J.	172
Kosowska A.	35	Wojtyczka R. D.	172
Majewski P.	56	Zawrzykraj M.	139
Małysa P.	139		