

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki medyczne i nauki o zdrowiu – Część I



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2022

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyckowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66743-63-2)

ISBN (wydanie online 978-83-66743-69-4)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-70-0)

Data wydania: maj 2022

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

| | |
|---|----|
| 1. Dabigatran - lek przeciwzakrzepowy nowej generacji <i>Balawejder-Biśto Anna, Homa Katarzyna, Cisko Paulina, Bzdion Damian, Bulanda Anna, Parys Wioletta</i> | 7 |
| 2. Novel applications of phage therapy in autoimmune diseases <i>Chmielewski Michał, Starosz Aleksandra</i> | 16 |
| 3. Mikroangiopatia płucna w przebiegu cukrzycy <i>Paula Nowocień, Angelika Kordylewska-Kubus, Iga Paszkiewicz, Dominik Nowocień</i> | 22 |
| 4. Bioinformatyczna analiza miejsc wiązania enzymu LSD1 w różnych typach nowotworu piersi pozwala wyłonić jego możliwe transkrypcyjne kofaktory <i>Gronkowska Karolina, Robaszkiewicz Agnieszka</i> | 28 |
| 5. Role of E2F family transcription factors and RB protein family in malignant transformation and cancer progression <i>Gronkowska Karolina, Robaszkiewicz Agnieszka</i> | 35 |
| 6. Immunomodulujące właściwości komórek glejowych i ich rola w chorobie Parkinsona <i>Harackiewicz Oliwia, Jankowska Agata, Beata Grembecka</i> | 41 |
| 7. Związane z pćcią różnice w etiologii i przebiegu choroby Parkinsona <i>Harackiewicz Oliwia, Jankowska Agata, Grembecka Beata</i> | 47 |
| 8. Paralysis of the recurrent laryngeal nerve <i>Jurga Marta, Krawczuk Aleksandra, Woch Barbara</i> | 53 |
| 9. Genetyczne aspekty białaczek z zespołem Downa <i>Kuszczak Klaudia</i> | 58 |
| 10. MikroRNA w chłtoniaku z komórek płaszczca <i>Miśkiewicz Joanna, Gola Joanna</i> | 65 |
| 11. Wpływ deregulacji ekspresji cząsteczki miRNA-155 na rozwój chłtoniaka rozlanego z dużych komórek B <i>Miśkiewicz Joanna, Gola Joanna</i> | 72 |
| 12. Podocytes. Small cells with huge responsibilities <i>Parfienowicz Zuzanna, Krętowska Magdalena, Starosz Aleksandra</i> | 80 |
| 13. Inhibitory SGLT-2 w terapii niewydolności serca <i>Kaja Pelar, Michał Rafa, Piotr Gręblowski, Mariusz Kowaliński, Dominik Kurczyński</i> | 86 |

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję monografii naukowych dotyczących szerokiego spektrum nauk. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk medycznych i nauk o zdrowiu, nauk przyrodniczych, nauk technicznych i inżynierskich oraz szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych.

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodsi absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zaczną publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Dabigatran - lek przeciwzakrzepowy nowej generacji

Dabigatran - a new generation anticoagulant

Balawejder-Biśto Anna⁽¹⁾, Homa Katarzyna⁽¹⁾, Cisło Paulina⁽¹⁾, Bzdzion Damian⁽¹⁾, Bulanda Anna⁽¹⁾, Parys Wioletta⁽²⁾

⁽¹⁾Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Balawejder-Biśto Anna: anulabalawejder@gmail.com

Słowa kluczowe: NOAC, Pradaxa, Trombina, Zakrzep, Udar

Streszczenie

Doustne leki przeciwzakrzepowe nowej generacji określane jako NOAC (*non-vitamin K oral anticoagulants*), czyli doustne antykoagulanty niebędące antagonistami witaminy K są reprezentowane przez cztery substancje, tj. dabigatran, riwaroksaban, apiksaban i edoksaban.

Dabigatran jest syntetycznym, odwracalnym i bezpośrednim inhibitorem aktywności trombiny. W leczeniu stosuje się eteksylan dabigatranu, który jest nieaktywnym prolekiem, ulegającym w wątrobie przemianie do aktywnego dabigatranu. W Polsce występuje w preparacie *Pradaxa* w postaci kapsułek twardych. Pradaxa jest lekiem stosowanym do zapobiegania tworzeniu się zakrzepów krwi w żyłach u osób dorosłych, u których przeprowadzono operację wymiany stawu biodrowego lub kolanowego, zapobiegania udarowi i zatorowości systemowej u osób dorosłych, u których występuje nieprawidłowe bicie serca zwane "niezastawkowym migotaniem przedsionków" oraz w leczeniu zakrzepicy żył głębokich i zatorowości płucnej. Dabigatran jest w tej chwili popularnym lekiem przeciwzakrzepowym. Prowadzone są już badania nad nowszymi lekami jednak ich skuteczność musi być jeszcze potwierdzona w kolejnych fazach badań klinicznych.

1. Wstęp

Dabigatran to lek przeciwzakrzepowy, który jest syntetycznym, odwracalnym i bezpośrednim inhibitorem aktywności trombiny. Jego nazwa chemiczna zgodna z IUPAC to: N-{{[2-((p-amidynoanilino)metylo)-1-metylo-5-benzimidazolilo]karbonylo}-N-2-pirydoloalanina.

Lek ten w postaci eteksylan dabigatranu, został wpisany do rejestru przez FDA, czyli Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków w 2010 roku. Dabigatran jest pierwszym zarejestrowanym lekiem zaliczanym do doustnych antykoagulantów niebędących antagonistami witaminy K (*non-vitamin K oral anticoagulants*, NOAC). Badania, które doprowadziły do wprowadzenia do leczenia nadmiernej krzepliwości, skupiały się na tym by wytworzyć syntetyczny związek o małej masie cząsteczkowej, który byłby w stanie w selektywny sposób zahamować swoiste inhibitory czynników krzepnięcia. Leczenie za pomocą NOAC przynosi dużo korzyści w porównaniu z lekami starszej generacji, takimi jak heparyna, które wiązało się z podaniami podskórnymi. Doustne antykoagulanty wykazują szybszy początek i koniec działania. Dodatkowo, ich stosowanie nie wiąże się z koniecznością regularnej kontroli układu krzepnięcia krwi (Witkowski i in. 2016).

2. Przegląd literatury

2.1 Mechanizm działania

Istotny postęp w zakresie leczenia powikłań zakrzepowych stworzyły nowe leki działające na kluczowe etapy kaskady krzepnięcia. Oczekiwania są wysokie, ponieważ ich właściwości mogą pozwolić na skuteczne, bezpieczne i łatwe kontrolowanie aktywności czynników krzepnięcia. Jednym z krytycznych etapów wykrzepiania jest działanie trombiny, która powoduje przejście fibrynogenu w fibrynę. Ponadto trombina aktywuje czynnik XIII stabilizujący skrzep, dzięki któremu rozpuszczalna fibryna staje się formą stabilizowaną. Eteksylan dabigatranu jest

drobnocząsteczkowym prolekiem pozbawionym działania farmakologicznego. Dopiero po podaniu doustnym substancja ta szybko się wchłania i ulega przemianom do aktywnej formy w reakcji katalizowanej przez esterazy osoczowe. Dabigatran reprezentujący nową generację leków przeciwzakrzepowych charakteryzuje się bardziej wybiórczym mechanizmem działania w porównaniu do antagonistów witaminy K. Opiera się on na bezpośrednim hamowaniu jednego z czynników kaskady krzepnięcia. W przypadku dabigatranu jest to czynnik IIa, czyli trombina. Działa przez konkurencyjne i odwracalne wiązanie się z miejscem aktywnym trombiny ludzkiej w sposób zależny od dawki i stężenia. Tym sposobem zapobiega przeksztalceniu fibrynogenu przez trombinę w jego aktywną formę czyli fibrynę. Skutkiem tego działania jest hamowanie rozwoju zakrzepu. Wiążąc się w bezpośredni sposób z cząsteczką trombiny powoduje inaktywację nie tylko wolnej frakcji trombiny, ale także trombiny związanej z zakrzepem, zabezpieczonej przed wpływem heparyny i odpowiedzialnej za powiększanie się zakrzepów (Nagarakanti i Ellis 2012; Kapil et al. 2017).

Obecnie stosowane antykoagulanty mimo zadowalających efektów terapeutycznych stwarzają ryzyko krwawień. W związku z tym nadal istnieje zapotrzebowanie na leki przeciwzakrzepowe o zmniejszonej częstości występowania powikłań krwotocznych, z małym klirensem nerkowym lub z jego brakiem oraz z możliwością tłumienia krzepnięcia wywołanego przez urządzenia medyczne, takie jak mechaniczne zastawki serca lub centralne cewniki żyłne. Aby osiągnąć ten cel, uwaga została przesunięta dalej w górę szlaku krzepnięcia. Wyniki badań fazy 2 z IONIS-FXIRx i osocimabem stanowią dowód na słusność koncepcji dla FXI (czynnika XI) jako nowego celu badań nad lekami przeciwzakrzepowymi. Czynnikiem ten jest prawdopodobnie głównym czynnikiem powodującym zakrzepicę pooperacyjną. Skuteczność hamowania FXI w tym ustawieniu sugeruje, że aktywacja zwrotna FXI przez trombinę jest ważna dla wzrostu i stabilizacji zakrzepu. Pozostaje do ustalenia czy profile korzyści do ryzyka inhibitorów FXI przewyższają profile DOAC (doustnych bezpośrednich antykoagulantów). Bezpośrednie badania porównujące inhibitory FXI z DOAC będą wymagały dużej liczby pacjentów w celu ustalenia czy inhibitory FXI są co najmniej tak samo skuteczne jak DOAC, ale wiąże się z mniejszym krwawieniem (Fredenburgh et al.. 2021).

2.2 Właściwości farmakokinetyczne

Wchłanianie

Eteksylan dabigatranu jest stosowany w postaci kapsułek zawierających peletki, co poprawia jego wchłanianie z przewodu pokarmowego. Po podaniu doustnym prolek ulega rozszczepieniu w osoczu i wątrobie na drodze hydrolizy enzymatycznej. Konwersja jest całkowita, na co wskazuje fakt, że prolek i jego produkty pośrednie są prawie niewykrywalne w osoczu zdrowych uczestników. Enzymy Cyp450 i oksydoreduktazy nie są zaangażowane w ten proces, co zmniejsza ryzyko wystąpienia interakcji z innymi lekami. Bezwzględna dostępność biologiczna eteksylanu dabigatranu po podaniu doustnym wynosi od 3 do 7% i jest niezależna od dawki. Czas potrzebny do osiągnięcia stężenia maksymalnego u zdrowych ochotników wynosi od 0,5h do 2h. Pokarm nie wpływa na dostępność biologiczną leku, ale wydłuża czas niezbędny do osiągnięcia C_{max} o 2h. Jednocześnie podawane inhibitory pompy protonowej zmniejszają całkowity wpływ na organizm o 20-25%. U pacjentów po przebytej artroplastyce stawu biodrowego szybkość wchłaniania dabigatranu jest zmniejszona (C_{max} jest osiągnięte po 6h), za co odpowiada porażenie mięśniówki przewodu pokarmowego i zmiany pH. Zjawisko to pozwala zredukować ryzyko krwawień po wczesnym pooperacyjnym podawaniu eteksylanu dabigatranu. W kolejnych dniach po zabiegu dabigatran ulega wchłanianiu z szybkością charakterystyczną dla zdrowych ochotników (Stangier 2008; http://leki.urpl.gov.pl/files/25_PRADAXA_kap_tw.pdf).

Dystrybucja

Stężenie dabigatranu w osoczu zmniejsza się dwuwkładniczo. Po 4-6 h od podania spada do wartości poniżej 30% stężenia maksymalnego. U zdrowych ochotników w podeszłym wieku utrzymuje się na tym poziomie przez 12-14h po podaniu. Po tym następuje faza eliminacji, w której średni okres półtrwania wynosi 11h i nie zależy od dawki. Dabigatran wiąże się z białkami osocza w 35%, a wartość ta nie zależy od stężenia. Lek ulega umiarkowanej dystrybucji tkankowej, na co wskazuje objętość dystrybucji, która wynosi od 60 do 70 L i przekracza objętość całkowitej ilości

wody zawartej w organizmie. U pacjentów ortopedycznych na pozorną objętość dystrybucji nie wpływa masa ciała, płeć, lub parametry kliniczne (Stangier 2008; http://leki.urpl.gov.pl/files/25_PRADAXA_kap_tw.pdf).

Biotransformacja i eliminacja

Dominującą drogą eliminacji niezmienionego dabigatranu jest wydalanie z moczem, czego dowiedziono podając zdrowym mężczyznom produkt znakowany radioaktywnie. W ten sposób eliminowane jest około 80% dawki dożylnej. Pozostała część ulega sprzężaniu z kwasem glukuronowym i w postaci acyloglukuronidów jest wydalana z żółcią. Koniugaty te w postaci czterech izomerów pozycyjnych wykazują aktywność farmakologiczną zbliżoną do wolnego dabigatranu (Stangier2008;http://leki.urpl.gov.pl/files/25_PRADAXA_kap_tw.pdf).

Specjalne grupy pacjentów:

- Pacjenci w podeszłym wieku
U zdrowych pacjentów całkowity wpływ leku na organizm jest 40-60% większy, a C_{max} o ponad 25% u osób starszych niż młodszych, co odzwierciedla związane z wiekiem zmniejszenie klirensu kreatyniny.
- Pacjenci z niewydolnością nerek
Całkowity wpływ dabigatranu na organizm ochotników z umiarkowaną niewydolnością nerek jest około 2,7 razy większy niż u zdrowych ochotników, a u pacjentów z ciężką niewydolnością nerek ok. 6 razy większy, przy dwukrotnie wydłużonym okresie półtrwania.
- Pacjenci z niewydolnością wątroby
Nie zaobserwowano istotnych zmian we wpływie dabigatranu na pacjentów z niewydolnością wątroby.
- Masa ciała
Minimalne stężenia dabigatranu są o ok. 20% niższe u pacjentów o masie ciała większej niż 100 kg, niż u osób, których waga mieści się w zakresie 50-100 kg. Ograniczone doświadczenie kliniczne u pacjentów poniżej 50 kg, lub powyżej 110 wskazuje, że nie ma potrzeby dostosowywania dawki.
- Płeć
Nie zaleca się modyfikowania dawki w zależności od płci, ze względu na zwiększony o 40-50% przewencyjny wpływ leku na powikłania zakrzepowo-zatorowe u kobiet.
- Pochodzenie etniczne
Właściwości farmakokinetyczne dabigatranu nie różnią się u pacjentów o różnym pochodzeniu etnicznym (Stangier 2008; http://leki.urpl.gov.pl/files/25_PRADAXA_kap_tw.pdf).

2.3 Postacie dostępne w Polsce

Dabigatran jest lekiem stosowanym doustnie. W Polsce występuje w preparacie *Pradaxa* w postaci kapsułek twardych w dawce 75 mg, 110 mg lub 150 mg przeznaczonych dla dorosłych i dzieci powyżej 12 roku życia. Natomiast dzieci poniżej 12 roku życia przyjmują go w postaci granulatu powlekanego. Ponadto dla dzieci poniżej 1 roku życia dostępny jest proszek i rozpuszczalnik do sporządzania roztworu doustnego. Jest lekiem dostępnym na receptę (https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/pradaxa-epar-medicine-overview_pl.pdf).

2.4 Wskazania do stosowania

Lek Pradaxa zawierający dabigatran jest stosowany do:

- zapobiegania tworzeniu się zakrzepów krwi w żyłach u osób dorosłych, u których przeprowadzono operację wymiany stawu biodrowego lub kolanowego;
- zapobiegania udarowi (spowodowanemu przez zakrzep krwi w mózgu) i zatorowości systemowej (zakrzep krwi w innym narządzie) u osób dorosłych, u których występuje nieprawidłowe bicie serca zwane "niezastawkowym migotaniem przedsionków" i u których uważa się, że istnieje ryzyko wystąpienia udaru;

- leczenia zakrzepicy żył głębokich (DVT, zakrzep krwi w żyłę głębokiej, zwykle w nodze) i zatorowości płucnej (PE, zakrzep w naczyniu krwionośnym zaopatrującym płuca) u osób dorosłych oraz zapobiegania ponownemu wystąpieniu tych stanów;
- leczenia zakrzepów krwi w żyłach i zapobiegania ich ponownemu wystąpieniu u dzieci (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pradaxa#authorisation-details-section>).

2.5 Działania niepożądane

Krwawienie jest najczęściej występującym działaniem niepożądanym po stosowaniu eteksylanu dabigatranu. Dotyczy ono głównie osób po 75 roku życia. Wynika to prawdopodobnie ze specyfiki metabolizmu tego związku. Substancja ta jest szybko wchłaniana i hydrolizowana do aktywnej cząsteczki dabigatranu przez esterazy nienależące do układu mikrosomalnego P450. Eteksylan dabigatranu jest substratem dla glikoproteiny P. Jest on w 80% wydalany przez nerki w postaci niezmienionej. W jego przemianie w dabigatran prawdopodobnie uczestniczy glikoproteina P oraz kasetta wiążąca ATP, podrodzina B, członek 1 (ABC1), oraz enzym metabolizujący, karboksylesteraza 1 (CES1).

Wraz z objawami krwawienia, poza zmianami parametrów hematologicznych, mogą także występować takie dolegliwości jak: ogólne osłabienie, zawroty i bóle głowy, bladeść, niewyjaśniony obrzęk, duszności oraz wstrząs. Ponadto często występującymi działaniami niepożądanymi są np. zmniejszenie stężenia hemoglobiny czy zaburzenia czynności wątroby, pojawiające się głównie u chorych stosujących dabigatran celem zapobiegania żylnym powikłaniom zakrzepowo-zatorowym u dorosłych po aloplastyce stawu kolanowego lub biodrowego.

Natomiast u pacjentów stosujących ten związek w profilaktyce udaru mózgu i zatorowości systemowej z migotaniem przedsionków, oprócz różnego rodzaju krwawień, można spotkać się z niedokrwistością, małopłytkowością, biegunką i nudnościami, a także wysypką i świądem. Z kolei podczas leczenia zakrzepicy żył głębokich i zatorowości płucnej oraz podczas zapobiegania nawrotom zakrzepicy żył głębokich i zatorowości płucnej u dorosłych, ujawnić mogą się również wszelkiego rodzaju krwawienia oraz biegunka, nudności, niestrawność, ból brzucha czy owrzodzenie całego układu pokarmowego (http://leki.urpl.gov.pl/files/25_PRADAXA_kap_tw.pdf).

Wady zastawki serca

Z uwagi na brak badań, nie zaleca się stosowania dabigatranu w profilaktyce zdarzeń zakrzepowo-zatorowych u osób z migotaniem przedsionków i innych wad zastawkowych serca, w tym u osób z bioprotezą zastawki serca.

Choroba wrzodowa, aktywne krwawienie

Przeciwwskazane jest stosowanie dabigatranu w przypadku poważnego, aktywnego krwawienia. W chorobie wrzodowej należy ostrożnie stosować ten lek, z uwagi na możliwość wystąpienia krwawienia.

Zaburzona czynność nerek

Należy stosować lek ostrożnie u pacjentów z zaburzoną czynnością nerek oraz dializowanych, z uwagi na możliwe zwiększenie aktywności przeciwzakrzepowej i okresu półtrwania dabigatranu. Zaleca się zmniejszyć dawkę leku u pacjentów z ciężką niewydolnością nerek (CrCl 15-30 mLmin⁻¹) (<https://www.drugs.com/drug-interactions/dabigatran.html>).

2.6 Interakcje

Interakcje z lekami

Dabigatran wykazuje prawie 300 interakcji z innymi lekami, w tym 96 bardzo poważnych. Diltiazem, dronedaron, czy inne leki stosowane w zaburzeniach rytmu serca, mogą zwiększać działanie dabigatranu i jego stężenie we krwi. Połączenie tych leków może zwiększyć ryzyko wystąpienia anemii i powikłań krwotocznych. Z kolei stosowanie escitalopramu razem z dabigatranem może zwiększać ryzyko krwawienia. Interakcja jest bardziej prawdopodobna w przypadku osób w podeszłym wieku lub z chorobami nerek lub wątroby. Cyklosporyna, a także

leki przeciwgrzybicze, jak itraconazol czy ketokonazol, mogą znacząco zwiększać stężenie dabigatranu we krwi. Może to zwiększyć ryzyko poważnych działań niepożądanych, takich jak anemia i powikłania krwotoczne. Stosowanie dabigatranu razem z ibuprofenem, a także innymi niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) może zwiększać ryzyko krwawienia, w tym ciężkiego, a także śmiertelnego krwotoku. Natomiast stosowanie mifepristonu razem z dabigatranem może zwiększać ryzyko i/lub nasilenie krwawienia z pochwy u kobiet. Długotrwałe, obfite krwawienie może wymagać natychmiastowego leczenia (<https://www.drugs.com/drug-interactions/dabigatran.html>).

Interakcje z pożywieniem, suplementami

Stosując dabigatran należy unikać ziół i suplementów o działaniu przeciwzakrzepowym, takich jak: czosnek, imbir, borówka, miłorząb dwuklapowy. Nie należy stosować ziela dziurawca, które może obniżać stężenie dabigatranu w surowicy.

2.7 Zastosowanie riwaroksabanu, edoksabanu oraz apiksabanu

Oprócz dabigatranu nowymi doustnymi lekami przeciwzakrzepowymi są ksabany. Są one wybiórczymi, bezpośrednimi inhibitorami czynnika Xa. Dzięki swojemu mechanizmowi działania hamują kaskadę krzepnięcia krwi, ale w porównaniu do antagonistów witaminy K, nie wywołują zakrzepów w początkowej fazie stosowania (https://journals.viamedica.pl/polski_przeglad_neurologiczny/article/view/47207/36507). U pacjentów z migotaniem przedsionków, w profilaktyce przeciwzakrzepowej, najczęściej stosowanym lekiem jest warfaryna, która jest lekiem starszej generacji. Jednak w ostatnich latach zintensyfikowane zostały prace nad wykorzystaniem ksabanów tj. riwaroksabanu, apiksabanu i edoksabanu, które posiadają szereg zalet (Lii et al. 2018).

Riwaroksaban jest lekiem z wyboru w zapobieganiu udarom mózgu w niezastawkowym migotaniu przedsionków. Lek ten posiada unikalny sposób eliminacji, dwie trzecie wchłanianej dawki ulega metabolizmowi z udziałem CYP4A4/2J2, a pozostała część za pośrednictwem glikoproteiny P ulega wydalaniu w postaci niezmienionej z moczem. Wiąże się to z ryzykiem krwawienia, ponieważ klirens riwaroksabanu jest podatny na zmienność patofizjologiczną i związaną z podawaniem innych leków (Cheong et al. 2019).

Edoksaban posiada podobne zastosowanie. Wykazuje względną skuteczność i bezpieczeństwo w porównaniu z warfaryną, co może uczynić go mniej kosztowną alternatywą dla tego leku. Jego działanie rozpoczyna się szybko po podaniu. Podobnie jak riwaroksaban i apiksaban jest substratem dla glikoproteiny P, ale w przeciwieństwie do nich jest w minimalnym stopniu metabolizowany z udziałem cytochromu CYP3A4, co zdecydowanie zmniejsza jego podatność na interakcje (Cervantes 2019).

Apiksaban jako jedyny z doustnych leków przeciwzakrzepowych niebędących antagonistami witaminy K zmniejsza ryzyko zarówno udaru mózgu, jak i poważnych krwawień u pacjentów z migotaniem przedsionków (Li et al. 2018). Ponadto w badaniach wykazano, że apiksaban nasila endogenną fibrynolizę, szczególnie u pacjentów z upośledzeniem tego procesu przed rozpoczęciem terapii. W porównaniu z grupą pacjentów przyjmujących warfarynę, zdecydowanie lepsze efekty uzyskano po zastosowaniu apiksabanu (Spinthakisi in. 2019).

2.8 Metody chromatograficzne oznaczania dabigatranu oraz innych leków przeciwzakrzepowych (riwaroksabanu, edoksabanu, apiksabanu) w próbkach biologicznych

Ostatnio opublikowane artykuły wskazują, że chromatografia cieczowa jest często stosowaną techniką do oznaczania dabigatranu w połączeniu z innymi lekami przeciwzakrzepowymi, takimi jak: apiksaban, edoksaban oraz riwaroksaban, a także jego nefarmakologicznie aktywnego proleku (eteksylanu dabigatranu) w próbkach biologicznych, co zostało przedstawione w Tab. 1.

Do oznaczania dabigatranu zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) oraz ultra wysokosprawną chromatografię cieczową (UHPLC) w połączeniu z różnymi detektorami, takimi jak: detektor UV-VIS, detektor z matrycą diodową (DAD) oraz tandemowy spektrometr mas (MS/MS).

Najczęściej stosowaną fazą stacjonarną w oznaczeniach dabigatranu były kolumny C18. Natomiast faza ruchoma złożona była z wody z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (eluent A) oraz metanolu lub acetonitrylu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (eluent B).

Zakres liniowości dabigatranu analizowanego przy użyciu metod chromatograficznych (wyrażony w ng mL⁻¹) zapewnił dobrą liniową zależność między polem powierzchni a stężeniem na krzywej kalibracyjnej. Najniższa wartość granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) dabigatranu wynosiła odpowiednio 0,05 ng mL⁻¹ i 0,1 ng mL⁻¹. Natomiast dla precyzji wewnątrzdniowej i międzydniowej współczynniki zmienności (CV%) były odpowiednio ≤ 8,52% oraz ≤ 9,47% (Zhang et al. 2021).

Na podstawie uzyskanych wyników zamieszczonych w Tabeli 1 można stwierdzić, że niskie wartości granic wykrywalności (LOD) i granic oznaczalności (LOQ) oraz precyzji wewnątrz- i międzydniowej wskazują na wysoką czułość i precyzję proponowanych metod oznaczania dabigatranu. Dodatkową zaletą jest krótki czas analizy (3-8 minut), co umożliwia szybkie oznaczanie ilościowe wielu próbek w rutynowej analizie.

Pomyślnie połączenie wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC) i ultra wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (UHPLC) ze spektrometrią mas (MS) dało tym technikom niezwykłą przewagę jako „doskonałe narzędzie analityczne” — łącząc doskonałą zdolność separacji z niezrównaną czułością i specyficzością MS. Techniki HPLC-MS i UHPLC-MS szybko stają się standardową platformą technologiczną m.in. do testów bioanalitycznych (leki w płynach biologicznych). Ponadto, doskonała precyzja i niezawodność metod HPLC i UHPLC z detekcją UV sprawia, że jest to niezastąpione narzędzie do kontroli jakości (QC).

Tab. 1. Metody chromatograficzne oznaczania dabigatranu oraz innych leków przeciwzakrzepowych w próbkach biologicznych.

| Matryca/Związek | Warunki chromatograficzne | Inne parametry | Refs. |
|---|---|---|-----------------------|
| surowica ludzka dabigatran (D), eteksylian dabigatranu (DE) apiksaban (A), riwaroksaban(R) | UHPLC-UV $\lambda = 294$ nm dla (D), $\lambda = 340$ nm dla (DE), $\lambda = 280$ nm dla (A), $\lambda = 249$ nm dla (R) kolumna Agilent Poroshell 120 EC-C18-RP (3.0×50 mm, 2.7 μ m) Eluent A: woda+0.1% kwas mrówkowy Eluent B: metanol+0.1% kwas mrówkowy prędkość przepływu: 0.7 mL min ⁻¹ | Liniowość: 20÷300 ng mL ⁻¹ LOD (ng mL ⁻¹): 4 dla D, A, R; 5 dla DE LOQ (ng mL ⁻¹): 15 dla D, R; 16 dla A; 19 dla DE Czas analizy: 7 min | (Boehr et al. 2017) |
| Surowica ludzka apiksaban (A), dabigatran (D), edoksaban (E), riwaroksaban (R) | UHPLC-MS/MS Kolumna Acquity UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8 μ m) Eluent A: woda+0.1% kwas mrówkowy Eluent B: acetonitryl prędkość przepływu: 0.6 mL min ⁻¹ | Liniowość: 5÷800 nmol L ⁻¹ LOD (nmol L ⁻¹): 0.25 dla A; 0.5 dla D, R; 2.0 dla E LOQ (nmol L ⁻¹): 2.5 dla A, D, R; 5.0 dla E Precyzja wewnątrzdniowa: 2.9÷9.1% | (Lindahl et al. 2018) |

| Matryca/Związek | Warunki chromatograficzne | Inne parametry | Refs. |
|---|--|---|-------------------------------------|
| | | Precyzja międzydniowa: 3.3÷10.0% Czas analizy: 3 min | |
| osocze ludzkie apiksaban (A), dabigatran (D), riwaroksaban (R) | HPLC-MS/MS Kolumna Agilent Polaris C18-A (2.0×100 mm, 3 μm) Eluent A: woda+0.1% kwas mrówkowy Eluent B: metanol+0.1% kwas mrówkowy prędkość przepływu: 350 μL min ⁻¹ | Liniowość: 5÷1000 ng mL ⁻¹ LOQ(ng mL ⁻¹): 5 dla R, 25 dla A, D Precyzja wewnętrzniowa: 3.0÷14.1% Precyzja międzydniowa: 6.0÷17.5% Czas analizy: 5 min | (Lagoutte- Rensi et al. 2018) |
| osocze ludzkie apiksaban (A), dabigatran (D), edoksaban (E), riwaroksaban (R) | UHPLC-MS/MS Kolumna Acquity UPLC BEH C18 (2.1×50 mm, 1.7 μm) Eluent A: woda+0.1% kwas mrówkowy Eluent B: metanol+0.1% kwas mrówkowy prędkość przepływu: 0.1 mL min ⁻¹ | Liniowość: 0.25÷900 ng mL ⁻¹ LOD (ng mL ⁻¹): 0.10 dla R; 0.11 dla E; 0.12 dla A; 0.18 dla D LOQ (ng mL ⁻¹): 0.21 dla A; 0.43 dla R; 0.45 dla D; 0.54 dla E Precyzja wewnętrzniowa: 1.0÷3.2% Precyzja międzydniowa: 1.9÷5.8% Czas analizy: 4 min | (Kuhn et al. 2018) |
| osocze ludzkie dabigatran (D), riwaroksaban (R) apiksaban (A) | HPLC-MS/MS kolumna Phenomenex Luna C18(2) (2.0×50 mm, 5 μm) Eluent A: 0.05% kwas mrówkowy Eluent B: metanol prędkość przepływu: 0.3 mL min ⁻¹ | Liniowość: 1.0÷1000 ng mL ⁻¹ LOQ (ng mL ⁻¹): 1 dla D, R, A Precyzja wewnętrzniowa: 1.4÷9.8% Precyzja międzydniowa: 3.1÷9.3% Czas analizy: 6 min | (Zhang et al. 2020) |
| osocze ludzkie apiksaban (A), dabigatran (D), edoksaban (E), riwaroksaban (R) | HPLC-DAD Kolumna Purospher Star C18 (4.0×55 mm, 3 μm) Eluent A: woda+0.1% kwas mrówkowy Eluent B: acetonitryl prędkość przepływu: 1.0 mL min ⁻¹ | Liniowość: 17÷5280 ng mL ⁻¹ LOQ (ng mL ⁻¹): 17 dla A, R; 33 dla E; 66 dla D Precyzja wewnętrzniowa: 14.55÷16.43% Precyzja międzydniowa: 9.03÷16.27% Czas analizy: 6 min | (Gouveia et al. 2020) |
| osocze ludzkie | UHPLC-MS/MS | Liniowość: 0.1÷500 ng mL ⁻¹ LOD (ng mL ⁻¹): | (Zhang et al. 2021) |

| Matryca/Związek | Warunki chromatograficzne | Inne parametry | Refs. |
|---|---|---|-------|
| eteksylan dabigatranu (DE), dabigatran (D), riwaroksaban (R) edoksaban (E), apiksaban (A) | kolumna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×100 mm, 3.5 μm) Eluent A: woda+0.1% kwas mrówkowy Eluent B: acetonitryl+0.1% kwas mrówkowy prędkość przepływu: 0.30 mL min ⁻¹ | 0.05 dla D, A; 0.1 dla E, R; 0.5 dla DE LOQ (ng mL ⁻¹): 0.1 dla D; 0.5 dla E; 1 dla DE Precyzja wewnątrzdniowa: 1.48÷8.52% Precyzja międzydniowa: 0.91÷9.47% Czas analizy: 8 min | |

3. Podsumowanie

Dabigatran reprezentujący nową generację leków przeciwzakrzepowych charakteryzuje się bardziej wybiórczym mechanizmem działania w porównaniu do antagonistów witaminy K. Opiera się on na bezpośrednim hamowaniu jednego z czynników kaskady krzepnięcia. W przypadku dabigatranu jest to czynnik IIa, czyli trombina. Działa przez konkurencyjne i odwracalne wiązanie się z miejscem aktywnym trombiny ludzkiej w sposób zależny od dawki i stężenia. Tym sposobem zapobiega przekształceniu fibrynogenu przez trombinę w jego aktywną formę czyli fibrynę. Dabigatran jest w tej chwili popularnym lekiem przeciwzakrzepowym, prowadzone są już badania nad nowszymi lekami jednak ich skuteczność musi być jeszcze potwierdzona w kolejnych fazach badań klinicznych.

4. Literatura

- Boehr S, Haen E (2017) Development of an UHPLC-UV-method for quantification of direct oral anticoagulants: apixaban, rivaroxaban, dabigatran, and its prodrug dabigatran etexilate in human serum. *Therapeutic Drug Monitoring* 39(1): 66-76.
- Cervantes CE, Merino JL, Barrios V (2019). Edoxaban for the prevention of stroke in patients with atrial fibrillation. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 17(4):319-330.
- Cheong EJY, Teo DWX, Chua DXY, et al. (2019) Systematic development and verification of a physiologically based pharmacokinetic model of rivaroxaban. *Drug Metabolism and Disposition* 47(11):1291-1306.
- Fredenburgh JC, Weitz JI. (2021) New anticoagulants: Moving beyond the direct oral anticoagulants. *Journal of Thrombosis Haemostasis* 19(1):20-29.
- Gouveia F, Bicker J, Santos J, et al. (2020) Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 184: 113109. http://leki.urpl.gov.pl/files/25_PRADAXA_kap_tw.pdf [Data dostępu: 10.11.2021r.] https://journals.viamedica.pl/polski_przegląd_neurologiczny/article/view/47207/36507 [Data dostępu: 17.11.2021r.] <https://www.drugs.com/drug-interactions/dabigatran.html> [Data dostępu: 10.11.2021r.] https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/pradaxa-epar-medicine-overview_pl.pdf [Data dostępu: 18.11.2021r.] <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pradaxa#authorisation-details-section> [Data dostępu: 05.11.2021r.]
- Kapil N, Datta YH, Alakbarova N, et al. (2017) Antiplatelet and anticoagulant therapies for prevention of ischemic stroke. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 23(4): 301-318.
- Kuhn J, Gripp T, Flieder T, et al. (2018) Measurement of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma using automated online solid-phase extraction combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison with coagulation assays. *Clinica Chimica Acta* 486: 347-356.

- Lagoutte-Renosi J, Le Poupon J, Girard A, et al. (2018) A simple and fast HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, rivaroxaban in human plasma. *Journal of Chromatography B* (1100-1101): 43-49.
- Li X, Keshishian A, Hamilton M, et al. (2018) Apixaban 5 and 2.5 mg twice-daily versus warfarin for stroke prevention in non valvular atrial fibrillation patients: Comparative effectiveness and safety evaluated using a propensity-score-matched approach. *Plos One* 13(1):e0191722.
- Lindahl S, Dyrkorn R, Spigset O, et al. (2018) Quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human serum by UHPLC-MS/MS-method development, validation, and application. *Therapeutic Drug Monitoring* 40(3): 369-376.
- Nagarakanti R, Ellis CR (2012). Dabigatran in clinical practice. *Clinical Therapeutics* 34(10): 2051-2060.
- Spinthakis N, Gue Y, Farag M, et al. (2019) Apixaban enhances endogenous fibrinolysis in patients with atrial fibrillation. *Europace* 21:1297-1306.
- Stangier J (2008) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate. *Clinical Pharmacokinetics* 47(5):285-295.
- Witkowski M, Witkowska M, Smolewski P, i in. (2016) Najnowsze zaleceni dotyczące zastosowania nowych doustnych antykoagulantów w rutynowej praktyce. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 70: 43-55.
- Zhang M, Moore GA, Chin PKL (2020) Simultaneous determination of dabigatran, rivaroxaban, and apixaban in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring* 42(3): 473-480.
- Zhang YF, Liu XQ, Wang Y, et al. (2021) Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of direct oral anticoagulants in human plasma. *Journal of Chromatography B* 1182: 122952.

2. Novel applications of phage therapy in autoimmune diseases

Chmielewski Michał ⁽¹⁾, Starosz Aleksandra ⁽²⁾

⁽¹⁾ Medical University of Białystok, Student Research Club at Department of Regenerative Medicine, and Immune Regulation

⁽²⁾ Medical University of Białystok, Department of Regenerative Medicine, and Immune Regulation
Research tutor: Kamil Grubczak PhD

Keywords: bacteriophages, immunology, phage display

Abstract

Autoimmune diseases are complex disorders of the immune system induced inter alia by genetic, immunologic, and environmental factors. Unfortunately, despite years of research, these conditions are still not fully understood, especially in the context of their pathomechanism. Thus, to date, completely effective drugs have not been developed. Bacteriophages are promising new opportunities for innovative therapeutics. Phage therapy is still underestimated due to the fact that bacteriophage's activity is predominantly linked to “digestion of bacteria.” Here, we conducted a comprehensive summary of the latest data available in context of various bacteriophages properties. Our review provides current insight into direct and indirect applications of bacteriophages as a novel potential therapeutic approach in autoimmune disorders. Recent studies indicate phages are direct participants in the immunomodulatory processes, and possess the ability to interact with immune cells. These data highlight the potential of bacteriophages for development of novel immunotherapy methods.

1. Introduction

Frederick Twort and Felix d’Herelle independently discovered “an invisible, antagonistic microbe of the dysentery bacillus “, in 1915 and 1917, respectively. d’Herelle was the first who called them bacteriophages, which means “bacteria eaters.” Bacteriophages, also known as phages, are a type of viruses that infect and replicate within bacteria and archaea. Most important part of a phage is their DNA or RNA genome, which can contain between as little as four and up to hundreds of genes. Those genes encode proteins responsible for genetic material encapsulation, and constituting structures essential for infecting bacteria. (Barr 2017) (Fig. 1.) In-depth studies of these viruses, including mechanisms of their replication and adaptation, allowed to draw a hypothesis for use of bacteriophages in antibacterial therapies.

In addition, shortly after these discoveries d’Herelle demonstrated mutual interactions occurring between bacteriophages and immune cells. (d’Herelle and Smith 1922) For the next decades, numerous studies have been conducted on the topic of phage and immunology. Research centers such as Phage Therapy Center of Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences are of immense value, constantly working on developing new therapeutic approaches implementing use of phages. Those include not only conventional use to fight multiresistant bacteria, but also as novel applications in allergology, immunology and transplantology. Established in 2005 in Wrocław, Poland, was the first such unit operating in accordance with EMA and helped pave the way for phage therapy research in Europe. Nowadays there are still aspects requiring investigation if we want to implement bacteriophages more commonly in novel therapeutic approaches.

2. Content

Our review was aimed at revealing the most recent data on immunomodulatory properties of bacteriophages, and current approaches to implement these results in development of novel therapies. The paper has been divided into two mutually linked parts for the most concise presentation of the topic of phages in autoimmunity. First, we will overview the recent literature on phage's potential for immunomodulation - influence on different cell types and immune-related proteins, and even interaction with microbiome. Subsequently, phage display technology will be discussed to reveal its

potential in diagnosis of allergic and autoimmune diseases. Moreover, promising ways of bacteriophages implementation in development of biopharmaceuticals will be demonstrated.

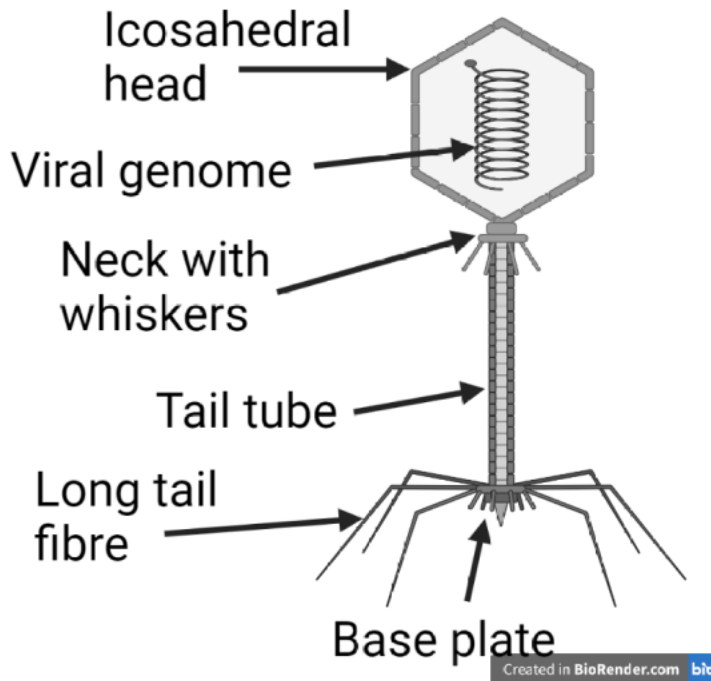


Fig. 1. Schematic structure of typical bacteriophage.

3. Literature review

The condition of the human gut microbiome is considered as one of the most essential elements to maintain general health. Therefore, in case of any disturbances, it also possesses a profound influence on pathophysiology of autoimmune diseases. Interestingly, besides more than ten trillion bacteria in our microbiome, the guts are the site of residence for an estimated number of two trillion phages. Thus, constituting together with residual bacteria ‘intra-body phagosome’. (Barr 2017) Commensal bacteria are subjected to the process defined briefly as ‘population control’. Phages are constantly transforming selected bacterial hosts into virocells, switching their function towards production of phage particles that ends with cellular lysis and release of newly formed viruses. Noteworthy, dysregulation in the balance of that phenomenon can result in autoimmune conditions, such as Parkinson’s disease and type 2 diabetes (Tetz et al. 2018; Ma et al. 2018).

Our knowledge on the process of other than guts organs infiltration by phages is scarce. Those limitations correspond also to interactions of those microbes with host cells, and results from the fact that phages cannot infect eukaryotic cells using the same mechanism as the one implemented against bacteria. Fundamental differences in cell-surface receptors and intracellular machinery between the prokaryotic and eukaryotic cells might be the main cause of that phenomenon. However, despite these dissimilarities, phages have been known for years to completely penetrate the bodies of humans and other vertebrate organisms. Current knowledge explains that fact by phage ability to adhere to mucus as a result of hundreds of weak binding interactions between the multimeric capsid proteins (such as T4 phage Hoc proteins demonstrating four Ig-like folds) and the highly diverse glycans covering the mucin glycoproteins. (Barr 2017) (Fig. 2.)

Phages are exogenous and immunogenic protein particles, capable of stimulating humoral immunity and inducing anti-phage antibodies, even though experimental evidence derived from numerous observational studies indicates the safety of their use. Mammalian defensive immune response towards phages is mild, to the point that only a few reports of anaphylactic reactions have

been published to date. Furthermore, in a recent study researchers found that A3R phages do not induce degranulation of human granulocytes, thus supporting the hypothesis for the safety of phages used in therapy. (Borysowski et al. 2017) Moreover, we observe a growing number of evidence suggesting immunomodulatory and tolerogenic properties these microbes possess. (Fig. 2.)

Phages exhibit the ability to indirectly inhibit helper type 1 T cells (Th1), macrophages and NK cells proliferation (Górski et al. 2018), interact with regulatory T cells, Th2 cells, macrophages, monocytes, and B cells inducing up- and down-regulation of various anti-inflammatory (IL-10, SOCS3, IL-1RA, IL-4, TGF- β , IL-19, IL-20, IL-24) and pro-inflammatory (IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF- α) cytokines and chemokines. In addition, they also promote antigen presentation by dendritic cells (DC) to B cells. (Górski et al. 2017; Van Belleghem et al. 2017; Van Belleghem et al. 2018)

Lately, theory on the nature of these direct and indirect interactions has been created. Following migrating from the gut, most importantly to regional lymph nodes and other tissues, intrabody phages interact predominantly with regulatory T cells, Th2 cells mediating immunomodulatory and immunosuppressive functions. (Barr 2017) Acquired knowledge about the nature of direct interactions with immune cells suggest key role of phage capsid proteins, including: Lys-Gly-Asp (KGD) sequence present in certain capsid protein of T4 phage (potential ligand for integrin receptors on cells). (Górski et al. 2017) Human T cells exhibit adhesive interactions with immobilized T4 and HAP1 phages; such interactions can be mediated by at least some phage capsid proteins. For example, it has been demonstrated that T cells adhere to gp24 (but not Hoc) protein. This interaction seems to be mediated by integrins of the β -1 and β -3 families as they can be blocked by respective monoclonal antibodies and the β -3 function inhibitor, eptifibatide. (Górski et al. 2017) Phages were also documented to enter the inside of eukaryotic cells through a Trojan Horse mechanism, whereby phages infect or integrate into a bacterial host, which is in turn engulfed by, or enters a eukaryotic cell and subsequently releases the phage particles. Dendritic cells, which are known to sample intestinal luminal contents, can actively phagocytize phage particles in culture. Phage engulfment renders dendritic cells incapable of further phagocytosis, suggesting that phage sampling by dendritic cells could negatively impact their proinflammatory functions. (Gorski et al. 2006) However, it is important to note that the mechanisms behind phage uptake by eukaryotic cells are just beginning to be explored. Importantly, different capsid proteins vary in immunogenicity and the influence of selected phages on the immune system depends on the route of administration. (Fig.2.)

Study from 2017 on Peripheral Mononuclear Blood Cells (PBMCs) responses to phages showed enhanced up-regulation of IL-10 after PNM (*Podoviridae*) and *P. aeruginosa* phage (*Myoviridae*) stimulation. (Van Belleghem et al. 2017) Same study showed bacteriophage's ability to induce production of IL-1RA - the antagonist of IL-1 (one of the main inflammatory cytokines), thereby attenuating the inflammation process. That favorable potential was shown to be significant in the context of preclinical research on therapy of allergic rhinitis. (Wang et al. 2014) Such beneficial effects could presumably be attributed to other autoimmune diseases due the fact that most of our current anti-inflammatory therapeutic methods implement up-regulation of IL-10 and inhibition of pro-inflammatory cytokines and chemokines. (Fig. 2.)

LPS belongs to the group of pathogen-associated molecular patterns (PAMP), detected by Toll-like receptors and triggering a non-specific activation of the immune response. Short tail fibers of bacteriophage T4 consist of a gp12 protein that functions as the LPS-binding site, allowing them to adhere to the *Escherichia coli* surface. Interestingly, Miernikiewicz et al. investigated what exact effects that T4 phage protein has on immunity. They found that gp12 from T4 phage through binding to LPS in a murine model would decrease the ability of LPS to induce inflammation in vivo (Miernikiewicz et al. 2016). Study showed that infiltration of leukocytes to lungs, liver and spleen was markedly increased in mice treated with LPS when compared to control (PBS treated) mice, which indicated an inflammatory reaction of the immune system. However, in mice treated with recombinant gp12 immediately after LPS injection, leukocyte infiltration in the investigated tissues was minor, Gp12 also significantly decreased inflammatory infiltrate induced by LPS in liver and spleen. (Miernikiewicz et al. 2016) Observed anti-inflammatory effects of T4 gp12 protein mentioned above, are in accordance with data from 2017 study of the influence of bacteriophage preparations on the autoimmune inflammatory process. Conducted on the murine collagen-induced arthritis (CIA),

commonly used as an animal model of rheumatoid arthritis, this study did not suggest that bacteriophages may aggravate the symptoms of rheumatoid arthritis. In contrast, the results showed that T4 phage may even exert an immunosuppressive effect in its mouse model. (Międzybrodzki et al. 2017) (Fig. 2.)

Furthermore, T4 phages were also found to exert effects on innate immunity actions including production of reactive oxygen species by activated neutrophils. It was shown that phages present the ability to diminish phagocyte ROS production (Międzybrodzki et al. 2007). The reactive oxygen species (such as peroxides, superoxide, singlet oxygen, and alpha-oxygen) alongside reactive nitrogen species are highly reactive chemicals. Phagocytic cells of the immune system (like neutrophils, eosinophils, monocytes) produce ROS when stimulated. Application of phages in therapies in the form of unorthodox antioxidants is as of this day purely hypothetical though such adjunctive therapies might prove beneficial in future clinical immunology and allergology. Reduction of phagocyte ROS excretion was linked to reduction in onset and severity of several autoimmune diseases, including: rheumatoid arthritis, asthma, atopic dermatitis. (Bowler and Crapo 2002) (Fig. 2.)

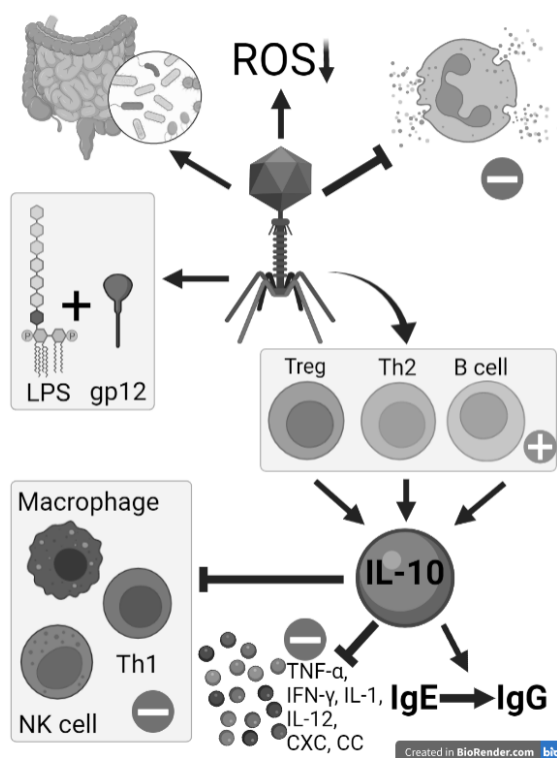


Fig. 2. Bacteriophage’s effects on the immune system.

Phage display is a laboratory technique for the study of protein–protein, protein–peptide, and protein–DNA interactions. This technology is based on a direct linkage between phage phenotype and its encapsulated genotype, which leads to presentation of molecule libraries on the phage surface. Phage display is utilized in studying protein–ligand interactions, receptor binding sites and in improving or modifying the affinity of proteins for their binding partners. (Bazan et al. 2012) Various bacteriophage systems can be utilized for phage display, including T4, lambda, and filamentous M13 phage. Phage display techniques have proven a terrific value in diagnostics, for example in identifying interactions of IgE antibodies with specific epitopes (Chen and Dreskin 2017). It provides researchers with unparalleled perspectives, because it enables them to establish a link between genetic information and protein. The phage display technique gives the opportunity to create libraries which contain up to 10 billion different variants and could be used for affinity screening of combinatorial peptide libraries to study protein–ligand interactions and to characterize these ligands, receptor and

antibody-binding sites define epitopes for monoclonal antibodies, select enzyme substrates and screen cloned antibody repertoires. (Bazan et al. 2012) The phage display technique is performed as follows: (Fig. 3.)

1. Insertion of foreign DNA to phage genome.
2. Amplification of phages displaying various kinds of protein.
3. Binding phages with specific receptors.
4. Washing of non-specific binding phages.
5. Elution of phages displaying the biggest affinity to the receptor.
6. Amplification of those phages by letting them infect bacteria specific for them.
7. Analysis of collected data.

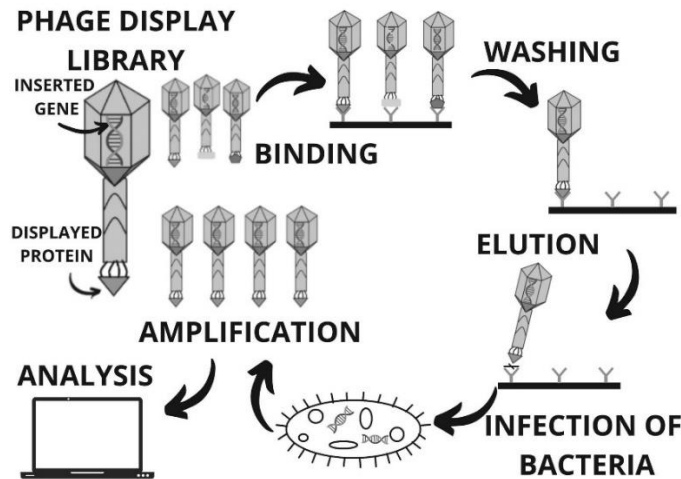


Fig. 3. Schematic procedure of phage display. (Ledsgaard et al. 2018)

Most importantly, phage display proved itself to be a reliable and robust tool for developing biopharmaceuticals. As an example, Humira® generated with phage display, was the first FDA-approved therapy based on human monoclonal antibody (tumor necrosis factor- α blocker). The drug is used, inter alia, in therapy for psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, and Crohn's disease.

We would like to summarize future possibilities of new direct phage therapy of autoimmune diseases both currently only hypothetical and in preclinical and clinical trials. Examples of such applications of direct use of phage therapy with enlisted main mechanism of action include: allergic rhinitis (up-regulation of IL-10) asthma (induction of IL-1RN), autoimmune liver disease (up-regulation of IL-10 and IL-1RN, down-regulation of ROS, NF- κ B and TLR4 receptors) (Górski et al. 2018), rheumatoid arthritis (LPS binding), rheumatoid arthritis, asthma, atopic dermatitis (inhibition of ROS production). Examples of phage display-derived therapeutics, currently in development as combinatorial drug to standard therapy include: Belimumab (systemic lupus), MOR103(rheumatoid arthritis), Tralokinumab (asthma) and Mavrimumab (ulcerative colitis), CNTO 1959 (plaque psoriasis). (Frenzel et al. 2016)

4. Conclusions

Bacteriophages, despite their discovery more than 100 years ago, started to gain an enormous amount of attention in recent decades. This fact may be associated with growing antibiotic resistance and increasing number of multi-resistant pathogens; therefore, novel therapeutic approaches are required. Considering huge knowledge gaps in the phage-related field, especially in context of their effects on immune response, there are numerous aspects that could provide a basis for novel drug development. Thanks to the huge amount of work done already by scientists worldwide, promising

data are obtained on phage use in diagnosis and therapy of various autoimmune and allergic diseases, and treatment of bacterial infections. Phage display technology is one of the most significant tools nowadays that might be crucial for developing novel reliable therapeutic models and pharmaceuticals. Further research is highly required to precisely establish the role of bacteriophages in our immune system. Moreover, our knowledge about phage display technology needs to be expanded for its active implementation in everyday work on novel drugs.

5. References

- Barr, Jeremy (2017) A bacteriophages journey through the human body. *Immunological Reviews* 279(1): 106-122.
- Bazan J, Całkosiński I, Gamian A (2012) Phage display-a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother* 8(12): 1817-1828.
- Borysowski J, Międzybrodzki R, Wierzbicki P et al. (2017) A3R Phage and Staphylococcus aureus Lysate Do Not Induce Neutrophil Degranulation. *Viruses* 9(2): 36.
- Bowler RP, Crapo JD (2002) Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 110(3): 349-356.
- Chen X, Dreskin SC (2016) Application of phage peptide display technology for the study of food allergen epitopes. *Molecular Nutrition & Food Research* 61(6): 10.1002.
- d'Hérelle F, Smith GH (1922) *The Bacteriophage: Its Role in Immunity*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co./Waverly Press.
- Frenzel A, Schirrmann T, Hust M (2016) Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *MAbs* 8(7): 1177-1194.
- Górski A, Dąbrowska K, Międzybrodzki R et al. (2017) Phages and immunomodulation. *Future Microbiology* 12(10): 905-914.
- Górski A, Jończyk-Matysiak E, Łusiak-Szelachowska M et al. (2018) Phage therapy in allergic disorders? *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.) 243(6): 534-537.
- Górski A, Jończyk-Matysiak E, Łusiak-Szelachowska M et al. (2018) Therapeutic potential of phages in autoimmune liver diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 192(1): 1-6.
- Górski A, Wazna E, Weber-Dąbrowska B et al. (2006) Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46(3): 313–319.
- Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A et al. (2018) Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins* 10(6): 236.
- Ma Y, You X, Mai G et al. (2018) A human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes. *Microbiome* 6(1): 24.
- Miernikiewicz P, Kłopot A, Soluch R et al. (2016) T4 Phage Tail Adhesin Gp12 Counteracts LPS-Induced Inflammation In Vivo. *Front Microbiol* 7: 1112.
- Międzybrodzki R, Borysowski J, Kłak M et al. (2017) In Vivo Studies on the Influence of Bacteriophage Preparations on the Autoimmune Inflammatory Process. *BioMed Research International* 2017: 3612015.
- Międzybrodzki R, Switala-Jelen K, Fortuna W et al. (2008) Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Virus Res.* 131(2): 233-242.
- Tetz G, Brown S. M, Hao Y et al. (2018) Parkinson's disease and bacteriophages as its overlooked contributors. *Scientific Reports* 8(1): 10812.
- Wang SB, Deng YQ, Ren J et al. (2014) Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model. *BMC Immunol* 15: 9.
- Van Belleghem JD, Clement F, Merabishvili M et al. (2017) Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa phages. *Sci Rep.* 7(1): 8004.
- Van Belleghem JD, Dąbrowska K, Vaneechoutte M et al. (2018) Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses* 11(1): 10.

3. Mikroangiopatia płucna w przebiegu cukrzycy

Pulmonary microangiopathy in Diabetes Mellitus

Paula Nowocień, Angelika Kordylewska-Kubus, Iga Paszkiewicz, Dominik Nowocień

Katedra Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Schorzeń Kardiometabolicznych, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: prof. dr hab.n.med. Krzysztof Strojek kstrojek@sum.edu.pl

Paula Czado: paulaczado@gmail.com

Słowa kluczowe: powikłania cukrzycy, FEV1, DLCO, funkcja płuc

Streszczenie

Cukrzyca jest chorobą przewlekłą, która rozwija się, gdy trzustka nie produkuje wystarczającej ilości insuliny lub gdy zaburzone jest jej efektywne wykorzystanie przez organizm. Hiperglikemia jako skutek niekontrolowanej cukrzycy z czasem prowadzi do poważnych uszkodzeń wielonarządowych. Uszkodzeniu ulegają m.in. płuca i dochodzi do rozwoju mikroangiopatii płucnej potwierdzonej w badaniach histopatologicznych oraz czynnościowych układu oddechowego. Dostępne badania donoszą o pogorszeniu parametrów mierzonych w spirometrii takich jak FEV1 (natężona objętość wydechu pierwszosekundowa) i FVC (natężona pojemność życiowa) oraz DLCO (badanie zdolności dyfuzji gazów w płucach) w cukrzycy typu 1 i 2. W niniejszym artykule przedstawiono przegląd wiedzy na temat mikroangiopatii płucnej w przebiegu cukrzycy oraz jej wpływu na czynność układu oddechowego.

1. Wstęp

Cukrzyca (Diabetes Mellitus, DM), powszechnie uważana za chorobę „cywilizacyjną” jest zaburzeniem metabolicznym. Charakteryzuje ją zaburzony metabolizm węglowodanów, białek i tłuszczów, a także przewlekła hiperglikemia, która wynika z upośledzenia wydzielania insuliny, insulinooporności lub współistnienia tych mechanizmów. Cukrzyca jest poważnym problemem. W 2019 szacowana liczba chorych dotkniętych DM wynosiła 463 miliony osób, co stanowiło około 10% światowej populacji dorosłych (Saeedi i in. 2019). Wówczas była to 9 najczęstszą przyczyną zgonów, aż około 1,5 miliona zgonów było spowodowanych bezpośrednio cukrzycą. Istnieją dwa główne typy cukrzycy - typ 1 oraz typ 2. Cukrzyca typu 2 jest najczęściej występującą postacią stanowiąc około 90% przypadków choroby. Zaburzenia metabolizmu węglowodanów to także nieprawidłowa tolerancja glukozy oraz nieprawidłowej glikemii na czczo (tzw. stan przedcukrzycowy). Każdy z tych stanów charakteryzuje hiperglikemia, która wpływa destrukcyjnie na ściany naczyń krwionośnych, prowadząc do mikroangiopatii. Rozpoczyna się proces niszczenia naczyń przedwłośniczkowych, podkapilarnych oraz sieci naczyń włosowatych. Mikroangiopatia cukrzycowa obejmuje retinopatię, nefropatię, neuropatię. Te powikłania często prowadzą do utraty wzroku, czy przewlekłej niewydolności nerek, a także zwiększają ryzyko wystąpienia udaru mózgu (Resnick i Howard 2002).

2. Epidemiologia

Cukrzyca stanowi poważne zagrożenie. Statystycznie każdego roku liczba chorych wzrasta o 300 tys. W 2018 roku w Polsce zdiagnozowanych na cukrzycę było 2,9 mln dorosłych, z czego 1,3 mln mężczyzn i 1,6 mln kobiet. Cukrzyca i jej liczne powikłania są przyczyną skrócenia życia chorych o średnio 15 lat w stosunku do osób zdrowych w tym samym wieku. Kolejne zatrważające dane dotyczą pacjentów, którym w 2018 udzielano pomocy z powodu choroby niedokrwiennej serca czy udaru. Co trzeci pacjent miał rozpoznaną cukrzycę.

3. Opis zagadnienia

Cukrzyca jako zaburzenie ogólnoustrojowe charakteryzuje się przewlekłą hiperglikemią związaną ze stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym. Do powikłań ostrych zaliczamy kwasicę ketonową, kwasicę mleczanową, nieketonową hiperglikemię hiperosmolarną oraz hipoglikemię (Szadkowska 2012). Zmiany zachodzące w naczyniach krwionośnych prowadzą do rozwoju późnych (przewlekłych) powikłań cukrzycy, określa się je jako mikroangiopatię i makroangiopatię. Makroangiopatie obejmują zmiany miażdżycowe dużych naczyń i przyczyniają się do wystąpienia zawału serca czy udaru mózgu. W powikłaniach mikroangiopatycznych dotyczących drobnych tętnic, żył i naczyń włosowatych dochodzi do uszkodzenia układu sercowo-naczyniowego, nerek oraz siatkówki, jednak uszkodzenie naczyń może dotyczyć również innych narządów takich jak płuca (Kashihara i in. 2010). Niewiele jest jednak badań, które ukazują wpływ DM na funkcję płuc, a molekularne podstawy związku cukrzyca–płuca nie zostały w pełni zbadane i zrozumiane (Matsubara i Hara 1991). Dotychczas niektóre artykuły poświęcone mikroangiopatii płucnej skupiały się głównie na pacjentach dorosłych, lecz należy pamiętać, że podobnych zmian można spodziewać się również u pacjentów pediatrycznych. Wynika to z faktu, że wcześniejsze wystąpienie cukrzycy i dłuższy czas jej trwania zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań w okresie dziecięcym (Vojtková i in. 2012). W poniższej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat wpływu długotrwałej hiperglikemii na funkcję płuc.

4. Powikłania płucne u chorych na cukrzycę

Jak donoszą Manglano i Samper (Díez-Manglano i Samper 2021) na czynność płuc wpływ ma wiele czynników m.in. wiek, masa ciała, płeć czy pochodzenie etniczne. Badania płuc otyłych szczurów z cukrzycą wykazały zgrubienie blaszki błony podstawnej kapilar płucnych, podobnie sytuacja wyglądała podczas autopsji osób z cukrzycą, gdzie zaobserwowano pogrubienie naczyń włosowatych oraz nabłonka. Pogrubienie to wynika ze zmian zapalnych oraz zwłóknień powodujących pogorszenie objętości płuc w przebiegu cukrzycy typu 2. Przedstawionych zostało dotychczas kilka koncepcji wyjaśniających uszkodzenie płuc w przebiegu cukrzycy. Utrzymująca się hiperglikemia nasila stres oksydacyjny, który następnie pobudza nieenzymatyczną, prowadząc do włóknienia płuc. Obserwuje się również nieprawidłowości w wielu szlakach m.in. kinazy białkowej B (PKB), polioliowym, jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB) oraz transformującego czynnika wzrostu (TGF-β). Nieprawidłowości te prowadzą do rozwoju zaburzeń naczyń włosowatych płuc. Zaobserwowano także pogrubienie błony podstawnej oraz zmiany w kolagenie, co wpływa na uszkodzenie układu oddechowego. Znaczenie mogą mieć też inne czynniki takie jak zmiany w surfaktancie, upośledzenie ruchomości klatki piersiowej czy też zmiany reaktywności oskrzeli (Vojtková i in. 2012). Dzięki dużym rezerwom naczyniowym płuc pojawienie się objawów i upośledzenie funkcji rozwija się później niż w mniejszych naczyniach krwionośnych, takich jak naczynia nerek czy siatkówki, pomimo porównywalnego nasilenia anatomicznych zmian. W związku z tym upośledzenie czynności płuc w cukrzycy jest niedostatecznie rozpoznane (Khatieb 2019). Uszkodzeniu ulega bariera pęcherzykowa, powodując obniżenie pojemności i przepływów płucnych, co przy obecności innych powikłań znacznie pogarsza funkcjonowanie organizmu. Upośledzenie czynności płuc w związku z cukrzycą, choć niewielkie, może mieć szkodliwy wpływ na pacjentów z przewlekłymi chorobami płuc, takimi jak przewlekła obturacyjna choroba płuc lub mukowiscydoza (Kessler i in. 2012).

5. Metodyka badań funkcji płuc

Relacja między pogorszeniem funkcji płuc a cukrzycą jest przedmiotem dyskusji od wielu lat. Dotychczasowe badania wykazują ograniczenie rezerw wentylacyjnych układu oddechowego oraz upośledzenie pojemności dyfuzyjnej płuc dla tlenu węgla zarówno u chorych na cukrzycę typu 1, jak i 2. Do najczęściej wykonywanych nieinwazyjnych badań należą: spirometria statyczna, dynamiczna oraz badanie zdolności dyfuzyjnej płuc (DLCO). W literaturze można także znaleźć

informacje o zastosowaniu tomografii komputerowej, pletyzmografii oraz testów wysiłkowych (Matsubara i Hara 1991).

Aby otrzymać wiarygodne i miarodajne pomiary, zaleca się wykonanie spirometrii, jednak nie jednorazowo, lecz kilkakrotnie w odstępach czasowych na przestrzeni lat. Parametrem brany pod uwagę w długotrwałej obserwacji pacjentów z cukrzycą jest FEV1 oraz FVC (Kaminsky 2004).

Największe dotychczas badanie prospektywne na podstawie bazy danych populacji Australii zostało wykonane przez Davisa i wsp. Do badania zostało włączonych 125 pacjentów z cukrzycą typu 2 bez poprzednich chorób płuc, którym spirometria była wykonana przy włączeniu do eksperymentu oraz po 7 latach. Dowiedziono, że w tej grupie średnie tempo pogarszania się czynności płuc, mierzone na podstawie FEV1 wynosiło 71ml/rok, natomiast oczekiwana wartość średnia w populacji zdrowych zakłada pogorszenie o 25-30 ml/rok. W badaniu regresji liniowej jedynym predyktorem czynności płuc była kontrola glikemii oceniana na poziomie HbA1c. Rezultatem badań było ukazanie, że wzrost HbA1c o 1% był związany ze spadkiem FVC o 4%, co może świadczyć o powiązaniu cukrzycy z pogorszeniem funkcji płuc (Davis i in. 2004). Wniosek, który wyciągnięto w tym badaniu, potwierdził się w innych, niezależnych publikacjach. W badaniach przeprowadzonych przez van den Borsta i in. cukrzyca była związana ze znacznie zmniejszonym przewidywanym odsetkiem natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (FEV1%) i odsetkiem natężonej pojemności życiowej (FVC%), chociaż stosunek FEV1/FVC został zachowany (Borst i in. 2010). Kolejnym wskazanym w piśmiennictwie parametrem świadczącym o uszkodzeniu bariery pęcherzykowo-płucnej jest pomiar zdolności dyfuzyjnej płuc DLCO. Zmiana struktury mikrokrążenia płucnego powoduje zmianę stosunku wentylacji do perfuzji, co prowadzi do jej upośledzenia oraz zmniejszenia zdolności dyfuzyjnej płuc. Miarą objętości dyfuzyjnej płuc jest objętość gazu dyfundującego przez błonę pęcherzykowo-włośniczkową. Gazem wskaźnikowym jest tlenek węgla, dodatkowo do oznaczenia objętości pęcherzykowej stosuje się znikomą ilość helu. Obniżenie DLCO może wynikać z obturacji, zaburzenia krążenia płucnego lub struktury bariery pęcherzykowo-włośniczkowej. Parametr ten powinien być interpretowany razem z wynikami innych badań czynnościowych płuc (Kuziemski i in. 2009).

W badaniu funkcji płuc u pacjentów z DM1 Strojek i wsp. potwierdzili obniżenie DLCO w grupie 31 niepalących chorych. Spadek tego parametru dotyczył zarówno pacjentów z powikłaniami systemowymi cukrzycy, jak i bez nich. Brak takich zmian stwierdzono w grupie kontrolnej 18 zdrowych i niepalących ochotników (Strojek i in. 1992).

Zhang i wsp. podjęli się podsumowania 93 publikacji naukowych dotyczących zmian w płucach u pacjentów z cukrzycą, szukali także dowodów na dwukierunkowy związek pomiędzy DM a funkcjami tego narządu. Jak podają autorzy, łączna średnia ważona różnic (WMD) między pacjentami z cukrzycą i bez wynosiła dla parametrów takich jak natężona pojemność życiowa (FVC) i natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa (FEV1) odpowiednio -5,91% i -5,65% dla wartości przewidywanych. Stwierdzono również, że każde zmniejszenie przewidywanej wartości parametru FVC o 10% wiązało się z 13% wzrostem ryzyka wystąpienia cukrzycy. Wykazano, że osoby bez cukrzycy z obniżoną czynnością płuc były bardziej narażone na rozwój insulinooporności i hiperinsulinemii. Jednym z wyjaśnień może być to, że markery stanu zapalnego takie jak fibrynogen, które wiązano z obniżoną czynnością płuc u zdrowych osób, były również związane z rozwojem cukrzycy. Konieczna jest jednak kontynuacja badań i potwierdzenie, czy podwyższony poziom glikemii przed wystąpieniem cukrzycy i wkrótce po jej rozpoznaniu pośredniczą w szkodliwym wpływie na czynność płuc oraz czy upośledzona funkcja płuc jest czynnikiem ryzyka wystąpienia cukrzycy. Metaanaliza przeprowadzona przez autorów potwierdza istotny statystycznie spadek FEV1, FVC oraz DLCO u pacjentów zarówno z DM 1, jak i 2 oraz słabą kontrolą glikemii, co wskazuje, że zaburzenia funkcji płuc zależą nie tylko od występowania insulinooporności (Zhang i in. 2021). W badaniu Sweet Breath Study przez 3 miesiące 60 osób poddano intensywnemu leczeniu cukrzycy. Krótkoterminowa korzyść z kontroli glikemii na czynność płuc była znamienna u osób z dobrymi odpowiedziami (definiowanymi jako spadek HbA1c po leczeniu > 0,5%). U pacjentów wykazano znaczącą poprawę wartości spirometrycznych między początkiem a końcem badania. Potwierdza to poniekąd wzajemną korelację pomiędzy DM a pogorszeniem parametrów czynnościowych w badaniu spirometrycznym (Borst i in. 2010).

W 2021 roku na podstawie 66 artykułów sporządzono i opublikowano wyczerpującą metaanalizę, w której określano wpływ DM2 na wybrane parametry czynnościowe płuc: FEV1, FVC, PEF oraz DLCO (Mangano i Smaper). Wykazano, że u osób z cukrzycą typu 2 wszystkie powyższe parametry ulegają istotnemu spadkowi w porównaniu do grupy zdrowych i są niezależne od płci. Czynnikiem zakłócającym analizę mogła być nadwaga i otyłość, które często występują u pacjentów z cukrzycą i wiążą się z upośledzeniem czynności płuc ze względu na zmianę ruchu klatki piersiowej, przepony oraz upośledzeniem podatności płuc. Mimo to zaobserwowano spadek FEV1, FVC oraz DLCO u pacjentów z nadwagą, otyłością oraz prawidłową masą ciała (Díez-Mangano i Samper 2021). Autorzy metaanalizy podkreślają, iż mimo niezaprzeczalnego związku pogorszenia funkcji płuc w przebiegu DM, konieczne jest wykonanie dalszych badań z uwzględnieniem dużej liczby pacjentów z różnych obszarów geograficznych, ponieważ pacjenci zamieszkujący ten sam kontynent, ale różne regiony geograficzne, mogą znacząco się od siebie różnić.

Vojtková i wsp. opisują, że w przypadku pacjentów pediatrycznych upośledzenie czynności płuc zaobserwowano u 51,2% dzieci z DM1 trwającą średnio 3 lata (Vojtková i in. 2012). U 45,6% z tych pacjentów stwierdzono restrykcje w badaniu spirometrycznym, a u 7,7 % obturacje. Zmiany spadkowe zaobserwowano również w wartościach parametrów takich jak natężona pojemność życiowa (FVC) i szczytowym przepływie wydechowym u dzieci z średnim czasem trwania DM1 wynoszącym 5,2 roku. Wykazano, że dzieci z DM1 o średnim czasie trwania 5,6 roku osiągały niższe wartości FVC i FEV1 w porównaniu z dziećmi zdrowymi w zbliżonym wieku. Chorzy z cukrzycą typu 2 również wykazywali zmniejszone wartości parametrów FVC i FEV1, a czas trwania cukrzycy i wysokie wartości glikemii negatywnie wpływały na funkcje płuc. Uważa się, że pomocnym badaniem dla pacjentów z DM1 może być przesiewowe DLCO, ponieważ może ono wykazać pierwsze symptomy mikroangiopatii. U pacjentów z DM1 o czasie trwania średnio 8,3 roku stwierdzono niższe wartości DLCO niż u zdrowych osób. W świetle powyższych informacji należy rozważyć stosowanie badań spirometrycznych u chorych na cukrzycę, co może być dobrym narzędziem przesiewowym. Poznanie wpływu cukrzycy na czynność układu oddechowego jest istotne dla wyodrębnienia odpowiedniej grupy chorych, dla których powinno się dobrać odpowiednie leczenie np. z zastosowaniem insuliny wziewnej.

6. Terapia Insuliną wziewną

Chociaż od odkrycia insuliny w roku 1921 minęło już 100 lat, to nadal pozostaje ona podstawowym lekiem w leczeniu cukrzycy. Lek ten podawany jest podskórnie lub dożylnie, ale jego stosowanie powinno być poprzedzone skrupulatną edukacją pacjenta, a także weryfikacją, czy wszystkie informacje są dla chorego zrozumiałe. Niestety, u wielu osób, pomimo spełnienia wcześniej wymienionych warunków, nie udaje się uzyskać wyrównania metabolicznego choroby. Do przyczyny takiego stanu, oprócz błędów w insulinoterapii, zaliczyć można niechęć do częstego nakłuwania skóry przy podawaniu insuliny. Ograniczenia te przyczyniły się do poszukiwania innych dróg podania insuliny, które mogłyby konkurować z tradycyjnym sposobem. Atrakcyjnym pomysłem wydaje się być podanie insuliny drogą wziewną, co mogłoby wpłynąć zarówno na poprawę jakości życia pacjentów, jak i zachęcić do leczenia osoby dotychczas uprzedzone do iniekcji (Cunningham i Tanner 2020). Preparat insuliny wziewnej Exubera opracowany został w porozumieniu firm Nektar Therapeutics, Pfizer Inc. i Aventis S.A do terapii cukrzycy 1 i 2 typu. Pomimo doniesień o podobnym czasie osiągnięcia maksymalnego stężenia insuliny w porównaniu do klasycznej drogi podania, Exubera została wycofana z produkcji, a wiele firm farmaceutycznych zawiesiło badania nad insuliną wziewną (Rave i in. 2007). Obecnie ciekawym rozwiązaniem jest insulina wziewna Afrezza (insulina ludzka) w formie proszku stosowana przy pomocy poręcznego inhalatora. Jest to jedyna insulina wziewna rekomendowana do leczenia cukrzycy typu 1 i 2 w Stanach Zjednoczonych. Do najczęściej pojawiających się działań niepożądanych zalicza się przewlekły kaszel, podrażnienie gardła, a także infekcje górnych dróg oddechowych (Kim i Plosker 2015). Pomimo tych ograniczeń jest ona dobrze tolerowanym lekiem i może stanowić alternatywę do klasycznego podania insuliny.

7. Prewencja

Powikłania wspomniane w powyższym tekście tłumaczą chorobowość i śmiertelność, do których prowadzi cukrzyca. Celem prewencji cukrzycy jest wyrównanie glikemii, z czym wiąże się redukcja dolegliwości związanych z DM, zmniejszenie kosztów związanych z jej leczeniem, a także zmniejszenie śmiertelności i umieralności z powodu powikłań sercowo-naczyniowych. Badania kliniczne jednoznacznie wskazują na zmianę stylu życia jako najskuteczniejszą metodę w redukcji rozwoju cukrzycy typu 2. Podstawowym rodzajem prewencji w DM jest zmiana diety, aktywność fizyczna oraz edukacja pacjentów, także w kwestii palenia tytoniu. Nawet 5% utrata masy ciała w przypadku pacjentów otyłych może istotnie zmniejszyć ryzyko zachorowania na cukrzycę. Rodzajem prewencji wtórnej, której działania mogą zwolnić przebieg choroby lub ciężkości jej powikłań, jest interwencja farmakologiczna. Skuteczność wykazało stosowanie metforminy, w szczególności u osób młodych i otyłych (Knowler 2002). W randomizowanym badaniu DPP (Diabetes Prevention Program) udowodniono, że zmiana stylu życia redukuje częstość zapadania na cukrzycę o 58%, a przyjmowanie metforminy o 31% w porównaniu do grupy placebo. Jednak jednym z najistotniejszych klinicznie zagadnień jest profilaktyka naczyniowa (mikro- i makronaczyniowa), bowiem przewlekłe powikłania cukrzycy stanowią największe obciążenie zarówno finansowe, jak i zdrowotne pacjentów. Badanie STOP-NIDDM z 2003 roku dowiodło zmniejszenie liczby incydentów sercowo-naczyniowych o 49% u grupy chorych stosujących akarbozę (Chiasson 2003). Ponieważ przeprowadzone badania trwały krótko (ok. 3 lat), wyniki należałoby potwierdzić w długotrwałej obserwacji pacjentów. Prewencja rozwoju mikroangiopatii płucnej w przebiegu cukrzycy opiera się na ww. działaniach, ponieważ dotychczas nie opisano skutecznej metody celowanej zapobiegającej jej rozwojowi.

8. Podsumowanie

Upośledzenie czynności płuc w przebiegu cukrzycy jest potwierdzone badaniami zarówno histopatologicznymi miąższu płucnego, jak i testami czynnościowymi. Jak dotąd nie udało się wprowadzić metod wczesnego wykrywania oraz monitorowania mikroangiopatii płucnej, czego przyczyną może być duża rezerwa naczyniowa płuc, która kompensuje częściową utratę miąższu, nie dając znaczących objawów klinicznych. Zdając sobie sprawę z wpływu DM na płuca, wszystkim chorym należy zalecić regularne wykonywanie podstawowych badań czynnościowych układu oddechowego (np. spirometria) w celu wczesnej diagnostyki cukrzycowej mikroangiopatii płucnej, tym samym przyczyniając się do usprawnienia opieki nad pacjentem z cukrzycą typu 1 i 2.

9. Literatura

- Chiasson JL, Josse RG, Gomis R i in. (2003) Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA* 290(4): 486-94
- Cunningham SM, Tanner DA (2020) A Review: The Prospect of Inhaled Insulin Therapy via Vibrating Mesh Technology to Treat Diabetes. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(16): 5795
- Davis WA, Knuiman M, Kendall P i in. (2004) Glycemic Exposure Is Associated With Reduced Pulmonary Function in Type 2 Diabetes: The Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Care* 27 (3): 752-757
- Diez-Manglano J, Asin Samper U (2021) Pulmonary function tests in type 2 diabetes: a meta-analysis. *ERJ Open Res*. 7(1): 00371-2020
- Kaminsky DA (2004) Spirometry and Diabetes: Implications of reduced lung function. *Diabetes Care*: 837-838
- Kashihara N, Haruna Y, Kondeti VK i in. (2010) Oxidative stress in diabetic nephropathy. *Current medicinal chemistry*, 17(34): 4256-69
- Kessler L, Moreau F, Degot T i in. (2012) The lung: A target organ for diabetes. *Médecine des Maladies Métaboliques*: 317-322

- Khateeb J, Fuchs E, Khamaisi M (2019) Diabetes and Lung Disease: A Neglected Relationship. *Rev Diabet Stud.* 15: 1-15
- Kim ES, Plosker GL (2015) AFREZZA® (insulin human) Inhalation Powder: A Review in Diabetes Mellitus. *Drugs* 75(14): 1679-86
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE i in. (2002) Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 346(6): 393-403
- Kuziemski K, Górska L, Jassem E (2009) Mikroangiopatia płucna w przebiegu cukrzycy. *Pneumonologia i Alergologia Polska* 77: 394-399
- Matsubara T, Hara F (1991) The pulmonary function and histopathological studies of the lung in diabetes mellitus. *Nihon Ika Daigaku Zasshi:* 528-36
- Rave K, Heise T, Pfützner A i in. (2007) Coverage of Postprandial Blood Glucose Excursions With Inhaled Technosphere Insulin in Comparison to Subcutaneously Injected Regular Human Insulin in Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 30(9): 2307–2308
- Resnick HE, Howard BV (2002) Diabetes and cardiovascular disease. *Annual review of medicine* 53: 245–267
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P i in. (2019) Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice* 157: 107843
- Strojek K, Ziora D, Sroczyński JW (1992) Pulmonary complications of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 35(12): 1173-6
- Szadkowska A (2012) Ostre stany w cukrzycy. *Family Medicine & Primary Care Review* 2012, 14, 2: 286–290
- van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP (2010) Pulmonary function in diabetes: a metaanalysis. *Chest* 138(2): 393-406
- Vojtková J, Ciljaková M, Michnová Z (2012) Chronic complications of diabetes mellitus related to the respiratory system. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 18(3): 112-5

4. Bioinformatyczna analiza miejsc wiązania enzymu LSD1 w różnych typach nowotworu piersi pozwala wyłonić jego możliwe transkrypcyjne kofaktory

Bioinformatic analysis of LSD1 enrichment in the genome of two different types of breast cancers allows to identify its possible transcription cofactors

Gronkowska Karolina ^(1,2), Robaszkiewicz Agnieszka ⁽²⁾

⁽¹⁾ Szkoła Doktorska BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów PAN w Łodzi, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12 /16, 90-237 Łódź

⁽²⁾ Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

Opiekun naukowy: dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ

Agnieszka Robaszkiewicz: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Słowa kluczowe: ekspresja genów, czynnik transkrypcyjny, epigenetyka, metylacja histonów

Streszczenie

Specyficzna dla lizyny demetylaza histonów 1A (LSD1 lub KDM5A) jest enzymem uczestniczącym w regulowaniu transkrypcji, ponieważ usuwa reszty metylowe z histonów. Najnowsze doniesienia przypisują temu enzymowi rolę również w modyfikowaniu substratów niehistonowych. Pro- i antytranskrypcyjna aktywność demetylasy warunkowana jest obecnością innych komponentów represorowych kompleksów CoREST i NuRD oraz ulegającą demetylacji resztą aminokwasową histonu H3. Poza stosunkowo dobrze poznanym schematem występowania LSD1 na chromatynie ulegającej transkrypcyjnej inaktywacji, będącym wynikiem oddziaływania enzymu z wymienionymi wyżej kompleksami, brakuje informacji na temat zależności pomiędzy oddziaływaniem enzymu z DNA w miejscu wiązania poszczególnych czynników transkrypcyjnych. Dysponując danymi z eksperymentów ChIP-Seq zdeponowanymi w bazie NCBI wyłonione zostały fragmenty genomu charakteryzujące się obecnością LSD1 w dwóch liniach nowotworu piersi MCF7 (estrogenozależnego) oraz MDA-MB-231 (estrogenoniezależnego), a następnie zidentyfikowano motywy bogate w LSD1, które odniesiono do znanych już motywów dla czynników transkrypcyjnych. W oparciu o analizowane dane wygenerowano listę czynników wspólnych i swoistych dla danej linii nowotworu piersi, wśród których pojawiły się m.in. czynniki kontrolowane przez podziały mitotyczne z rodziny E2F i związane z estrogenem receptory z grupy ERR1-3. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na funkcjonalną zależność pomiędzy LSD1 i wyłoniłymi czynnikami transkrypcyjnymi, których pojawienie się w określonej lokalizacji genomu może pociągać za sobą wiązanie LSD1 i modyfikacje struktury chromatyny.

1. Wstęp

Aktywność transkrypcyjna genu, która w dużej mierze odpowiada za poziom kodowanego przez niego białka, jest ściśle kontrolowana przez szereg mechanizmów. Zaliczyć do nich można m.in. sygnalizację wewnątrzkomórkową, oddziaływanie czynników transkrypcyjnych z sekwencjami regulatorowymi genów (promotorami, wzmacniaczami, insulatorami) oraz modyfikacje epigenetyczne w szczególności nukleosomów, które determinują siłę oddziaływania histonów z DNA. Kowalencyjne modyfikacje histonów wpływają na siłę interakcji między tymi dwoma komponentami chromatyny, co z kolei przekłada się na dostępność DNA dla maszyny transkrypcyjnej (Hughesi Lambert 2017; Cramer 2019).

Jedną ze składowych kodów epigenetycznego jest metylacja, która dotyczy reszt lizyny. Stopień metylacji (mono-, di- i trzymetylacja) i jej lokalizacja mogą pełnić zarówno funkcję nasilającą jak i hamującą transkrypcję. Dla przykładu, trójmetylowana lizyna 4 histonu H3 jest obecna w sekwencjach promotorowych aktywnych transkrypcyjnie genów, podczas gdy trójmetylacja lizyny 9 histonu H3 jest wiązana z wyciszeniem transkrypcji. Za usuwanie reszt metylowych z dwóch wymienionych wyżej reszt lizyny histonu H3 odpowiada swoista dla lizyny demetylaza histonu 1A

(z ang. Lysin-specific demethylase 1A – LSD1, znana także jako KDM5A). Enzym ten demetylując lizynę czwartą histonu H3 hamuje transkrypcję genów, podczas gdy przeprowadzana przez nią demetylacja lizyny dziewiętej wywołuje efekt dokładnie odwrotny. Stąd enzym ten pełni funkcję zarówno aktywatora jak i represora genów. Stosunkowo nowe doniesienia literaturowe wskazują na udział niehistonowych substratów w LSD1-zależnym regulowaniu procesu transkrypcji (Perillo i in. 2020).

Pojawienie się LSD1 na chromatynie jest najczęściej opisywane w kontekście formowania kompleksów represorowych CoREST i NuRD (Wang i in. 2009; Song i in. 2020). W obydwu przypadkach aktywności demetylazy towarzyszy aktywność jednej lub dwóch deacetylaz histonów – HDAC1 i/lub HDAC2. Usuwanie reszt metylowych z lizyny 4 histonu H3 oraz acetylowych z wielu pozycji aminokwasowych nukleosomów sprzyja zamykaniu struktury chromatyny, co negatywnie wpływa na proces syntezy mRNA. LSD1 oddziałuje również fizycznie i funkcjonalnie z rodziną białek SNAG, charakteryzującą się obecnością palca cynkowego i udziałem w wyciszeniu ekspresji genów. Molekularnym przełącznikiem zmieniającym swoistość substratową demetylazy, a tym samym kierunek zmian wydajności transkrypcji, jest kinaza białkowa C β (PKC β) (Metzger i in. 2010). Fosforyluje ona treoninę szóstą histonu H3 umożliwiając interakcję pomiędzy domeną katalityczną LSD1 oraz mono- i dwumetylowaną lizyną 9 histonu H3, co w konsekwencji pozytywnie wpływa na ekspresję genów. Ponadto, enzym ten aktywuje transkrypcję genów kontrolowanych przez jądrowe receptory hormonozależne, m.in. receptor estrogenowy, retinoidowy czy androgenowy, z wyjątkiem receptora progesteronowego, który jest wiązany przez enzym pod nieobecność progesteronu na sekwencjach promotorowych genów zależnych od progesteronu i tak powstały wielopodjednostkowy kompleks CoREST wraz z receptorami progesteronowymi hamuje transkrypcję (Razin i in. 2011; Perillo, Tramontano et al. 2020).

Poza opisanymi wyżej receptorami jądrowymi dla hormonów brakuje doniesień literaturowych o innych czynnikach transkrypcyjnych, które funkcjonalnie współpracują w LSD1. Czy mogą one odpowiadać za wiązanie LSD1 i kompleksów, w skład których wchodzi ten enzym, z sekwencjami promotorowymi genów? Czy też sytuacja jest dokładnie odwrotna: LSD1-zależny remodeling reszt aminokwasowych histonów determinuje pojawienie się określonych czynników transkrypcyjnych? Aby stworzyć podstawy do dalszych badań mających na celu rozwikłanie wymienionych wyżej kwestii podjęliśmy próbę wyłonienia matematycznie możliwych interakcji LSD1 z czynnikami transkrypcyjnymi. Badanie opiera się na założeniu, że oddziaływanie pomiędzy enzymem oraz czynnikiem transkrypcyjnym może zachodzić, gdy oddziałują one z taką samą lub istotnie podobną sekwencją DNA. Analizę przeprowadzono w dwóch liniach komórkowych ludzkiego nowotworu piersi – MCF7 (estrogenozależny) i MDA-MB-231 (pozbawiony receptorów dla estrogeny, progesteronu oraz HER2) przez wzgląd na przytoczone wyżej doniesienia literaturowe opisujące interakcję pomiędzy LSD1 i m.in. receptorem estrogenowym. Do wyłonienia motywów DNA, z którymi w badanych liniach nowotworowych oddziałuje demetylaza, wykorzystano ogólnie dostępne dane z eksperymentu ChIP-Seq, po czym uzyskane motywy zestawiono z dobrze już znanymi motywami dla czynników transkrypcyjnych.

2. Materiały i Metody

Do wyznaczenia miejsc wiązania LSD1 w dwóch liniach nowotworu piersi wybrano następujące dane zdeponowane w bazie NCBI: MCF7 – BioSample SAMN07765434 (SRR6153311-SRR6153318) i MDA-MB-231 – BioSample SAMN07765802 (SRR6153327 – SRR6153334) (Boulding i in. 2018). Wyniki uzyskane zostały za pomocą sekwencjonowania nowej generacji fragmentów DNA wyizolowanych z immunoprecypitowanej chromatyny, którą otrzymano przy użyciu przeciwciał anty-LSD1.

Analizę bioinformatyczną polegającą na identyfikacji regionów w genomie wzbogaconych w LSD1 przeprowadzono na platformie internetowej UseGalaxy.org (Afgan i in. 2018). Surowe dane pozbawione adapterów zostały przyrównane do ludzkiego genomu hg19 za pomocą algorytmu Bowtie2. Dane dla poszczególnych linii zostały połączone ze sobą narzędziem Merge BAM files. Powstałe pliki BAM (po jednym dla każdej linii) posłużyły do identyfikacji regionów o zwiększonej obecności LSD1. Do tego celu wykorzystano narzędzie MACS2 callpeak (z ang. Model-based

Analysis of ChIP-seq), a uzyskane regiony w formacie BED zostały porównane z listą sekwencji zachodzących na miejsca inicjacji transkrypcji genów (± 2 kbp). Miało to na celu wyłonienie regionów wzbogaconych w LSD1 będących jednocześnie sekwencjami promotorowymi. Sekwencje FASTA miejsc wiązania LSD1 wyłoniono za pomocą narzędzia bedtools GetFastaBed. Zostały one następnie wykorzystane do zidentyfikowania 10 motywów internetowym narzędziem MEME-ChIP dostępnym na platformie MEME Suite (Bailey i in. 2009; Machanicki Bailey 2011). Motywy zostały następnie porównane do znanych sekwencji, z którymi wiąże się czynniki transkrypcyjne (HOMOCOMO Human – v11 CORE). Spodziewana częstość występowania motywów w obrębie jednej sekwencji ustalona została na 0 lub 1.

3. Wyniki

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna miejsc wiązania LSD1 z DNA w komórkach dwóch linii raka piersi wyłoniła aż 26565 regiony bogate w demetylazę w linii MCF7 ($p < 0.001$) oraz 1265 regiony w linii MDA-MB-231 ($p < 0.05$). Wśród zidentyfikowanych fragmentów tylko 124 pokrywały się z sekwencjami promotorowymi genów w linii MCF7, podczas gdy w linii MDA-MB-231 LSD1 znaleziono w 253 promotorach. Za sekwencję promotorową przyjęto fragmenty przylegające do miejsca inicjacji transkrypcji (TSS) i sięgające powyżej i poniżej niego na odległość 2 000 nukleotydów.

Wśród 10 motywów, z którymi oddziaływała demetylaza w linii MDA-MB-231, wyłoniono 4 niepasujące do żadnej znanej sekwencji DNA wiązanej przez czynniki transkrypcyjne (Rys. 1).



Rys. 1. Zidentyfikowane motywy DNA wzbogacone w LSD1 w linii MDA-MB-231 oraz lista czynników transkrypcyjnych o podobnej rozpoznawanej sekwencji.

Lista 10 sekwencji DNA wytypowanych przez program MEME w oparciu o dane uzyskanych z metody ChIP-Seq, w której sekwencjonowano fragmenty DNA uzyskane w trakcie immunoprecypitacji chromatyny przeciwciałem przeciwko LSD1 w komórkach MDA-MB-231.

Pozostałym 6 motywom przypasowano od jednego do siedemnastu białek. Należy zauważyć, że motywy odpowiadające największej liczbie czynników transkrypcyjnych charakteryzowały się stosunkowo wysoką powtarzalnością tych samych nukleotydów, co w znacznym stopniu ogranicza możliwość wnioskowania o swoistości oddziaływania enzymu z typowymi dla tych sekwencji

regulatorami transkrypcji. W wyłonionej grupie czynników transkrypcyjnych stosunkowo dużą część stanowiły czynniki z rodziny GATA (1-4 i 6), FOX i MEF2A-D. Wszystkie wymienione grupy czynników transkrypcyjnych regulują podziały, różnicowanie i śmierć komórek, przy czym białka MEF2 robią to w odpowiedzi na zmiany poziomu jonów wapnia. Czynniki z grupy IRF (1, 2, 3), kontrolujące geny wrażliwe na interferon, odpowiedzialne są za odporność wrodzoną i nabytą, podczas gdy małe białka MAFF, MAFG i MAZ chronią komórki przed stresem m.in. oksydacyjnym poprzez funkcjonalną interakcję z czynnikiem NRF2 (Jefferies 2019).

W linii MCF7 motywom dla LSD1 przypisano aż 75 czynników transkrypcyjnych i tylko jeden z motywów nie został przypisany do żadnego znanego regulatora ekspresji genów (Rys. 2). W wyłonionej liście czynników znaczną jej liczbę stanowiły białka z rodziny E2F (4, 6 i 7), które wiążą ekspresję genów z przebiegiem cyklu komórkowego oraz stopniem różnicowania komórek (Dimovai Dyson 2005). Podobnie jak w linii MDA-MB-231, zaobserwowano czynniki z grupy IRF (1, 3, 4 i 8), ELF (2, 3 i 5) i KLF (1, 5, 6 i 15) regulujących wiele aspektów związanych z podziałami mitotycznymi, różnicowaniem i śmiercią komórek.

Co ciekawe, wśród czynników potencjalnie oddziałujących z motywami dla LSD1 w estrogenozależnej linii MCF7 zaobserwowano receptory retinoidowe RXRA i RXRB, co zgadza się z opisanymi w literaturze przykładami oddziaływania demetylaz z tymi właśnie białkami. Tym samym zwiększa to wiarygodność przeprowadzonej w niniejszej pracy analizy bioinformatycznej oraz prawdopodobieństwo zachodzenia identyfikowanych interakcji pomiędzy LSD1 i czynnikami transkrypcyjnymi również w układach *in vivo*. Ponadto, w przypadku MCF7 zaobserwowano zgodność motywów LSD1 i receptorów dla hormonów steroidowych z rodziny ERR (1-3), które nazywane są inaczej receptorami związanymi z estrogenem. Sugeruje to, że demetylaza w linii estrogenozależnej może razem z receptorami ERR nasilać transkrypcję estrogeno-zależnych genów. Przemawia za tym również brak obecności LSD1 na motywach dla jądrowego receptora ERR w linii MDA-MB-231 (Rys. 3).

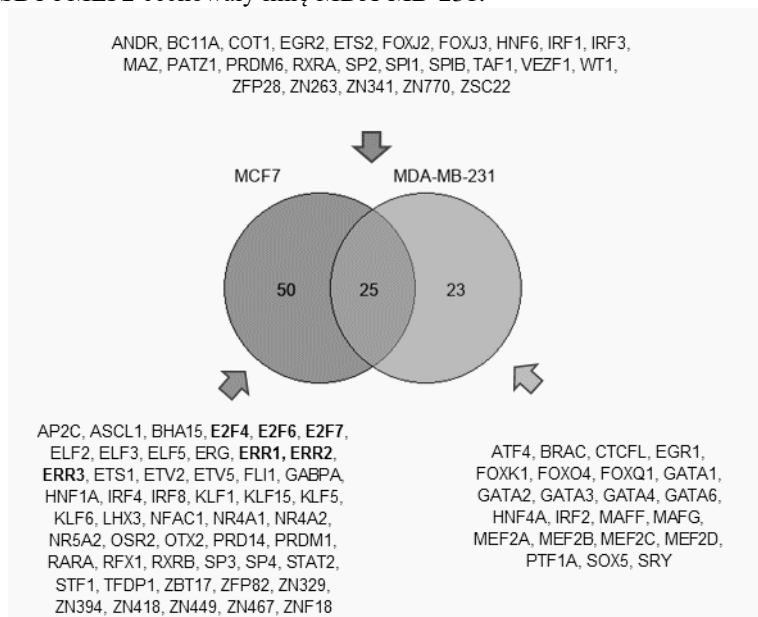


Rys. 2. Zidentyfikowane motywy DNA wzbogacone w LSD1 w linii MCF7 oraz lista czynników transkrypcyjnych o podobnej rozpoznawanej sekwencji.

Lista 10 sekwencji DNA wytypowanych przez program MEME w oparciu o dane uzyskanych z metody ChIP-Seq, w której sekwencjonowano fragmenty DNA uzyskane w trakcie immunoprecypitacji chromatyny przeciwciałem przeciwko LSD1 w komórkach MDA-MB-231.

W toku dalszej analizy wyłonionych zostało 25 czynników transkrypcyjnych wspólnych dla obydwu linii komórkowych. W grupie tej na uwagę zwracał receptor androgenowy (ANDR) aktywowany przez testosteron (Rys. 3), który jest obecny zarówno w linii MCF7 jak i MDA-MB-231. Wspólny okazał się być również receptor retinoidowy alfa, który może tworzyć homodimery lub heteordimery z receptorem retinoidowym beta i innymi białkami. W oparciu o uzyskane wyniki można założyć, że LSD1 pojawia się w miejscach wiązania receptorów jądrowych, które są aktywne w badanych liniach komórkowych.

Jak wspomniano wcześniej, czynniki z grupy E2F oraz ERR zaobserwowano wyłącznie w estrogenozależnych komórkach linii MCF7, podczas gdy motywy wspólne dla LSD1 i czynników GATA oraz LSD1 i MEF2 cechowały linię MDA-MB-231.



Rys. 3. Wspólne i swoiste dla badanych linii komórkowych czynniki transkrypcyjne rozpoznane w miejscach wiązania LSD1.

Venn diagram przedstawia czynniki transkrypcyjne o motywach podobnych lub identycznych do sekwencji, na których zidentyfikowano obecność LSD1. Dwie listy czynników zestawiono ze sobą w celu wyłonienia wspólnych dla obydwu linii oraz swoistych modulatorów transkrypcji.

4. Dyskusja

Poszukiwanie nowych funkcjonalnych powiązań pomiędzy aktywnością LSD1 i czynnikami transkrypcyjnymi, a przez to i wydajnością ekspresji genów, podyktowana jest w dużej mierze dostępnością licznych inhibitorów tego enzymu. Część z nich hamuje aktywność demetylazy, podczas gdy inne negatywnie wpływają na interakcję pomiędzy enzymem i podjednostkami kompleksu CoREST, co ogranicza aktywność demetylazy. Związki takie jak TCP, ORY-1001, GSK-2879552, IMG-7289, INCB059872, CC-90011 i ORY-2001 są obecnie testowane w badaniach klinicznych, których celem jest określenie skuteczności wymienionych inhibitorów w leczeniu drobnokomórkowego nowotworu płuc i ostrej białaczki szpikowej (Fang i in. 2019). Uzyskane informacje na temat ich farmakokinetyki, biodostępności, toksyczności czy wywoływanych efektach ubocznych umożliwią szybką adaptację terapii z ich wykorzystaniem do leczenia innych chorób, u podłoża których leżeć będą zaburzenia ekspresji genów zachodzące na poziomie transkrypcji. Stąd informacje pochodzące nawet z modeli probabilistycznych, matematycznych i statystycznych przybliżają nas do wyłonienia nowych, praktycznych możliwości zastosowania inhibitorów LSD1. Ponadto, stosunkowo dobrze poznany mechanizm regulowania transkrypcji genów przez poszczególne czynniki transkrypcyjne pozwala na dość szybkie i stosunkowo trafne wnioskowanie

o roli LSD1 w kontrolowaniu ekspresji danego genu lub ich określonej puli. Dla przykładu, obecność demetylazy na motywach charakterystycznych dla czynników E2F4, E2F6 i E2F7 sugeruje udział tego enzymu w represji genu, ponieważ wymienione białka spotykane są w sekwencjach promotorowych nieaktywnych transkrypcyjnie genów. W takim przypadku inhibitory LSD1 mogą zostać wykorzystane do odblokowania lub zwiększenia ekspresji genów. Ponieważ znaczny odsetek dostępnego w komórce enzymu występuje w formie związanej z kompleksami represorowymi, w skład których wchodzi ponadto enzymy takie jak HDAC1 i/lub HDAC2, do przywrócenia transkrypcji genów wyciszonych przez promotory bogate w E2F4, E2F6 czy E2F7 konieczna może być jednoczesna inhibicja demetylazy i deacetylasy. I odwrotnie, wykazanie obecności LSD1 na motywach typowych dla receptora estrogenowego w komórkach estrogenozależnych wskazywać może na supresję genów kontrolowanych przez receptor estrogenowy po zaaplikowaniu inhibitorów demetylaze.

Zakładając dużą wiarygodność informacji o możliwym oddziaływaniu LSD1 z czynnikami transkrypcyjnymi w dalszym ciągu nierozstrzygnięta pozostaje kwestia molekularnych podstaw takiej interakcji. Jak wymieniono wyżej, LSD1 jest dobrze poznanym komponentem większych kompleksów wyciszających transkrypcję genów, za czym przemawiają także informacje wynikające z budowy domenowej tego enzymu. Otwarte pozostają zatem kwestie dotyczące fizycznego oddziaływania demetylazy z czynnikami transkrypcyjnymi czy mechanizmów odpowiedzialnych za pojawienie się enzymu w danym miejscu w genomie (w szczególności gdyby odbywało się to niezależnie od kompleksów NuRD czy CoREST).

5. Wnioski

Przeprowadzona analiza wykazała obecność LSD1 na fragmentach DNA, które są rozpoznawane i wiązane przez szereg czynników transkrypcyjnych. Sugeruje ona zatem możliwą funkcjonalną interakcję enzymu z innymi białkami niż te, które opisane zostały już w literaturze. Prawdopodobieństwo zachodzenia interakcji w warunkach *in vivo* zwiększa również fakt, że motywy dla LSD1 pokrywają się z motywami dla receptorów retinoidowych czy receptorów związanymi z estrogenem w linii MCF7, której tempo podziałów mitotycznych determinowane jest dostępnością m.in. estradiolu, a tego rodzaju współpraca pomiędzy LSD1 a wymienionymi wyżej receptorami została wcześniej dowiedziona.

Tego rodzaju analizy mogą stać się podwaliną do dalszych, ukierunkowanych już badań o charakterze empirycznym, mających na celu poznanie nowych jednostek regulatorowych. Wykazanie współpracy pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi i LSD1 daje szansę na intencjonalne modulowanie ekspresją genów zależnych od danego czynnika transkrypcyjnego przy użyciu związków wpływających na aktywność demetylazy. Przez wzgląd na różnorodność czynników transkrypcyjnych i kontrolowanych przez nie procesów inhibitory LSD1 mogą posłużyć do wpływania na proliferację, różnicowanie czy śmierć komórek.

6. Literatura

- Afgan E, Baker D, Batut B i in. (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic acids research* 46(W1): W537-W544.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA i in. (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research* 37(Web Server issue): W202-208.
- Boulding T, McCuaig RD, Tan A i in. (2018) LSD1 activation promotes inducible EMT programs and modulates the tumour microenvironment in breast cancer. *Scientific reports* 8(1): 73.
- Cramer P (2019) Organization and regulation of gene transcription. *Nature* 573(7772): 45-54.
- Dimova DK and Dyson NJ (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24(17): 2810-2826.
- Fang Y, Liao G and Yu B (2019) LSD1/KDM1A inhibitors in clinical trials: advances and prospects. *Journal of hematology & oncology* 12(1): 129.
- Hughes TR and Lambert SA (2017) Transcription factors read epigenetics. *Science* 356(6337): 489-490.

- Jefferies CA (2019) Regulating IRFs in IFN Driven Disease. *Frontiers in immunology* 10: 325.
- Machanick P and Bailey TL (2011) MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27(12): 1696-1697.
- Metzger E, Imhof A, Patel D i in. (2010) Phosphorylation of histone H3T6 by PKCbeta(I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature* 464(7289): 792-796.
- Perillo B, Tramontano A, Pezone A i in. (2020) LSD1: more than demethylation of histone lysine residues. *Experimental & molecular medicine* 52(12): 1936-1947.
- Razin SV, Gavrilov AA, Pichugin A i in. (2011) Transcription factories in the context of the nuclear and genome organization. *Nucleic acids research* 39(21): 9085-9092.
- Song Y, Dagil L, Fairall L i in. (2020) Mechanism of Crosstalk between the LSD1 Demethylase and HDAC1 Deacetylase in the CoREST Complex. *Cell reports* 30(8): 2699-2711 e2698.
- Wang Y, Zhang H, Chen Y i in. (2009) LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer. *Cell* 138(4): 660-672.

5. Role of E2F family transcription factors and RB protein family in malignant transformation and cancer progression

Gronkowska Karolina ^(1, 2), Robaszkiewicz Agnieszka ⁽²⁾

⁽¹⁾ Szkoła Doktorska BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów PAN w Łodzi, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12 /16, 90-237 Łódź

⁽²⁾ Katedra Biofizyki Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

Opiekun naukowy: dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ

Agnieszka Robaszkiewicz: agnieszka.robaszkiewicz@biol.uni.lodz.pl

Keywords: proliferation, cell cycle, gene expression regulation

Abstract

E2F transcription factors regulate the expression of genes that are crucial for cell proliferation, especially those involved in progression through the G1 and S phase of the cell cycle. The activity of E2F factors is regulated by association with the retinoblastoma tumor suppressor proteins (Rb). Although mutations in E2F1 itself are very rare, the E2F/Rb pathway is frequently dysregulated in tumors. The aim of this review is to describe the mechanisms that controls RB/E2F-dependent gene regulation and indicate the role of RB and E2F in tumor formation and progression, as well as in the emergence of resistance to therapy.

1. Introduction

Tumors arise as a result of various damaging factors acting on cells. These factors include replication errors, exposure to chemical and physical carcinogens or oncogenic viruses, which lead to transformational changes (both genetic and epigenetic) and finally to tumor progression. Transformational changes primarily involve oncogenes and tumor suppressor genes. Protooncogenes that promote cell growth or differentiation under physiological conditions become oncogenes. Point mutations, chromosomal mutations, change in gene copy number, or increased their gene expression can lead to oncogene activation. Protein products of tumor suppressor genes act to inhibit proliferation or participate in processes to maintain the genetic stability of the cell. During carcinogenesis, suppressors lose their function through deletions, point mutations or epigenetically reduced expression.

Mutations that confer some advantage in growth are considered as causal factors in the transformation process. They are also accompanied by additional changes that contribute to more genetic and epigenetic alterations and increased tumor resistance and survival.

2. Description of issue

E2F transcription factors regulate the expression of a number of genes that are essential for cell proliferation, particularly these involved in progression through G1 and S phase of the cell cycle. The activity of E2F factors is regulated by their binding to tumor suppressor proteins, which belong to the retinoblastoma (RB) protein family. The E2F1 transcription factor functions as both an oncogene and a tumor suppressor depending on its transcriptional targets. The E2F binding motifs occur also in a wide range of promoters, which are functionally linked to other intracellular processes than proliferation. These include cell migration, DNA damage response, apoptosis, and autophagy. Furthermore, RBs create complexes not only with E2Fs, but also with other transcription factors and proteins, which are capable of chromatin remodeling and, hence, modulate gene transcription. Although the E2F pathway is frequently deregulated in cancer, the contributions of E2F to tumorigenesis, as well as tumor progression, are not fully uncovered. The aim of this review is to describe the mechanisms that regulate the RB/E2F pathway and indicate the role of RB and E2F in tumor formation and progression, as well as in the emergence of resistance to therapy.

3. Review

The mechanism of gene expression regulation by E2F and RB

The family of E2Fs comprises eight members, which are divided into two subfamilies based on their impact on the gene transcription. Transcription activators are represented by E2Fs 1–3, whereas repressors by E2Fs 4–8 (Morgunova et al. 2015). Members from 1 to 5 are evolutionarily conserved and regulated by the binding of corresponding pocket proteins (Fig1). This five E2Fs contain a DNA-binding domain (DBD), transactivation domain, marked-box domain (CM) and coiled-coil domain. The DBD directly interacts with DNA sequences and cooperates with CMD in heterodimerization with DP (pocket) proteins, which can be functionally divided into p105 and p107/p130 groups. The latter domain allows E2Fs to act jointly with other transcription factors. Pocket protein binding requires two binding areas in E2Fs: TD and CMD/DP. These binding sites determine the affinity of retinoblastoma (RB) proteins to E2F. Pocket proteins phosphorylation by cyclin dependent kinases (CDKs) on distinct residues regulates the affinity of these proteins for the E2Fs transactivation domain (Liban et al. 2017). The ‘classical’ transcription factors numbered from 1 to 6 bind to DNA preferentially as heterodimers with the corresponding DPs (DP1, DP2, DP3), the two members of the family, E2F7 and E2F8, which are ‘atypical’ due to the presence of two distinct DNA-binding subdomains. They also lack the transactivation domain that is found in all other E2Fs. Therefore, these two transcription factors are not regulated by the canonical cyclin-dependent kinase-retinoblastoma pathway. E2F7 and E2F8 form homodimers or heterodimers to target DNA (Morgunova et al. 2015, Emanuele et al. 2020). Interactions of E2Fs with DNA were analyzed using molecular dynamics simulations, biochemical affinity measurements, and chromatin immunoprecipitation. Analysis of E2F amino acid-nucleotide contacts and their molecular dynamics led to conclusion on the binding to the same core sequence 5'-GGCGGG-3' in vitro and in vivo by both ‘typical’ and ‘atypical’ transcription factors. This explains the mechanism by which E2F8 is capable of regulating the cell cycle by directly repressing target genes, which are activated by E2F1-3/DP heterodimers (Morgunova et al. 2015).

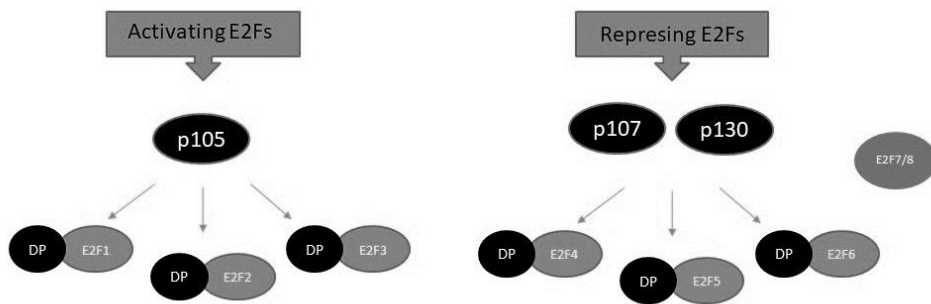


Fig 1. E2F family members and their interacting partners. Transcription activators are represented by E2Fs 1–3, whereas repressors by E2Fs 4–8. Members from 1 to 6 are regulated by the binding of corresponding pocket proteins. E2F7 and E2F8 form homodimers or heterodimers to target DNA.

Retinoblastoma pocket protein family is represented by p105 (RB1 gene), p107 (RBL1 gene), and p130 (RBL2 gene). RB members contain a pocket domain that empowers their interaction with E2F transactivation domain, whereas C-terminal domain (CTD) of RBs is required for the growth suppression via E2F inhibition and regulate RBs stability (Liban et al 2017). The C-terminal end of Rb inhibits its degradation by physically blocking access to the proteasomal initiation region (Tomita, Huibregtse and Matouschek 2020). The “pocket” is characterized by the LxCxE binding cleft, which mediates interaction of RBs with cellular proteins that function as chromatin remodelers. In growth inhibited cells (senescent, during checkpoint-mediated cell cycle arrest, exit to G1/G0) RBs occur in an active, hypophosphorylated form on chromatin, where it restricts the ability of a cell to progress

from G1/G0 to S phase, primarily by inhibiting transcription activity of E2F transcription factors (Delou, Biasoli and Borges 2016, Dyson 2016). Hyperphosphorylation of RB in G1/G0 by the cyclin D-CDK4/6 complexes result in the disassembly of gene repressive complexes, displacement of the components from the suppressed promoters, release of E2F transcription activity and cell cycle progression to the S phase due to unlocking expression of genes, which are required for cell proliferation. Upon a stressful stimulus or differentiation protein phosphatase 1 (PP1) removes phosphate groups from RBs, whereas inhibitors of cyclin D-CDK4 and CDK6 such as p16 simultaneously prevent its phosphorylation thereby arresting cells before their enter the S phase. Furthermore, RBs create complexes not only with E2Fs, but also with other transcription factors and proteins, which are capable of chromatin remodeling and, hence, modulate gene transcription (Delou, Biasoli and Borges 2016). Once recruited to the chromatin, RBs anchor other proteins and create RB-based predominantly repressive complexes, which change the chromatin and DNA structure by covalently modifying histones and DNA. The repressors and protein factors that cooperate with RBs include these which recognize LxCxE motif: DNA methyltransferases, histone deacetylases, heterochromatin protein HP1, ATPase subunits of the SWI/SNF complexes - BRM (Brahma) and BRG1 (Brm-related gene 1), and other, which do not require LxCxE cleft for interaction with RBs: histone methyl transferase Suv39h1 and histone demethylases (LSD1, RBP2). Through the physical interaction with these proteins, RBs are involved not only in local gene promoter inactivation but also global epigenetic control of cellular senescence and differentiation (Uchida 2016). According to interaction databases such as STRING, EBI-IntAct, I2D, and MINT, there are more than 300 proteins that may cooperate with RBs (Dyson 2016).

E2F1 is the most thoroughly studied member of the E2F family. Furthermore, hyperproliferative effects in cancer have been directly attributed to E2F1 dysregulation. This factor preferentially interacts with RB1 to blocks S phase entry. RB1-E2F1 complexes represent the classical mechanism of RB action (Fig 2). The interaction of E2F1 with pRB (p105) leads to the suppression of the E2F1. Phosphorylation of pRB allows the release of active E2F1, which is required to drive the cell cycle from the G1 to S phase. Active pRB is observed in quiescent cells, during G1 phase of the cell cycle, and during checkpoint- mediated cell cycle arrest (Dyson 2016).

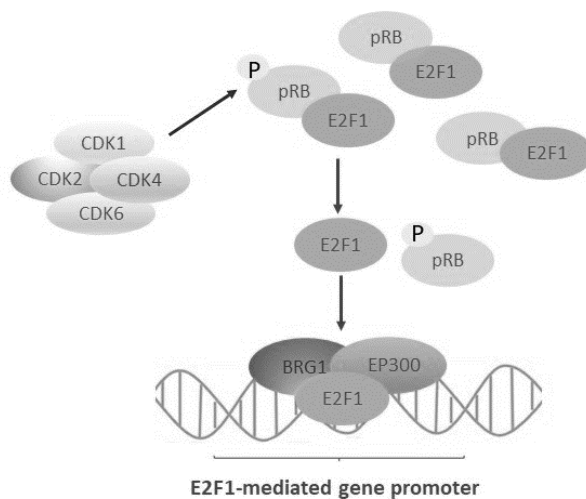


Fig 2. Mechanisms that control RB/E2F1-dependent gene regulation. Hyperphosphorylation of pRB by cyclin-dependent kinases (CDKs) result in the disassembly of gene repressive complexes, and release of E2F transcription activity.

One of the well-documented hallmarks of cancer is deregulation of the cell cycle progression. Cancer cells often undergo mutations that disrupt the control of the transcriptional program responsible for cell cycle entry. These mutations allow cancer cells to make their divisions

independent of external signals and gain unlimited replicative potential. Since numerous of E2F1-regulated genes are implicated in promoting cell cycle progression, this transcription factor is considered a tumor promoter. However, mutations in E2F1 itself are very rare. Loss-of-function mutations of RB1 are much more commonly described. In addition to loss-of-function mutations, the RB1 gene undergoes chromosomal deletion in some cancers. Additionally, some viruses such as human papillomavirus (HPV) encode proteins, which contain an LxCxE motif that binds pRB. Such an interaction in virus-infected cells results in displacement of E2F1 from pRB and deregulation of E2F1, which may promote cell cycle entrance. Moreover, overexpression or gain-of-function mutations of CDK4/6 are frequently observed in cancers. These disorders may also lead to activation of the E2F1 pathway, as increased phosphorylation of pRB by CDKs promotes E2F1 transcription activity (Poppy Roworth, Ghari and La Thangue 2015).

Cancers are characterized by the coexistence of phenotypically and functionally distinct cells. Among them, cancer stem cells (CSCs) are distinguished. CSCs derive from normal stem cells or differentiated tumor cells. They have the ability to self-renew (so they are progenitors of tumor cells and can maintain their own population), the ability to initiate tumor formation from a limited number of cells, and the ability to differentiate into different cell types present in the tumor. Literature data suggest that E2Fs are involved in acquiring stemness by cancer cells and maintaining the ability to self-renew by CSCs. It has been shown that E2F1 can directly transcriptionally activate stem cell transcription factors such as KLF4, NANOG, SOX2 and SCF. Since CSCs can initiate tumors and have a high metastatic ability, they are believed to be the cells responsible for the formation of metastatic foci. Moreover, E2F1 is directly involved in the process of metastasis formation. Loss of E2F1 has been shown to result in decreased VEGFA expression and defects in angiogenesis (Xie et al. 2021). Another feature of cancer cells is altered energy metabolism. A phenomenon associated with cancer cell metabolism is known as Warburg effect, which involves the shift from glucose oxidation to aerobic glycolysis, that results in high rates of glucose utilization and lactate production. Several hypotheses have been proposed regarding the benefits of the Warburg effect on cancer cells. These include higher rates of ATP synthesis, generation of glycolytic intermediates for biosynthetic reactions, and remodeling of the tumor microenvironment. It has been shown that E2F1 can promote this metabolic switch both by enhancing glycolysis and by repressing glucose oxidation in mitochondria (Denechaud, Fajas and Giralt 2017). Furthermore, CSCs are resistant to chemotherapy and radiotherapy. E2F1 through activation of ABCG2 expression has been shown to drive chemotherapeutic drug resistance in lung and breast cancer cells. Under hypoxia, E2F1 can transactivate the RAD51 promoter to facilitate DNA repair in prostate cancer cells (Xie et al. 2021).

On the other hand, E2F1 acts as a tumor suppressor through regulation of DNA repair and propagation of programmed cell death. Exposure of cells to genotoxic agents results commonly in either growth arrest and DNA repair or programmed cell death. These mechanisms are considered to prevent the propagation of mutations and represents a key mechanism for averting malignancy. E2F1, can induce apoptosis through a number of p53-dependent and p53-independent mechanisms. E2F1-induced apoptosis is attributed mainly to E2F-mediated upregulation of various pro-apoptotic genes such as Apaf1, caspases, BH3-only proteins, the p53 family member p73 and p53 pro-apoptotic cofactors such as ASPP1 and ASPP2 (Korotayev and Ginsberg 2008). It was shown that activation of E2F1 upregulates the expression of four autophagy related genes: microtubule-associated protein-1 light chain-3 (LC3), autophagy-related gene-1 (ATG1), ATG5 and damage-regulated autophagy modulator (DRAM) (Polager, Ofir and Ginsberg 2008). RB1 and E2F1 together form a part of DNA repair complex. Upon DNA damage, E2F1 is phosphorylated at Ser31 by the ATM and ATR kinases. In response to agents that cause DSBs, E2F1 is phosphorylated by ATM, in response to ultraviolet (UV) radiation, E2F1 is phosphorylated by ATR. When E2F1 is phosphorylated at this site, the 14-3-3 τ protein binds to and stabilizes E2F1 by inhibiting its ubiquitination and degradation. Then, a complex containing TopBP1 is formed. TopBP1 recruits E2F1 to sites of DNA damage through this phosphospecific interaction independently of the DNA-binding or transcriptional activation domains of E2F1. Other TopBP1 domains bind to phosphorylated motifs on other DNA damage response factors, including RAD9, 53BP1 and MDC1, which facilitate the recruitment of TopBP1 to damaged DNA. RB stabilizes phosphorylated E2F1 and the E2F1-TopBP1 interaction. Moreover, RB is

necessary for the recruitment of the BRG1 ATPase to DSBs, which stimulates DNA end resection and homologous recombination (HR). Animal model study showed that the lack of site-specific phosphorylation or RB dysfunction display the same DNA repair defect (Vélez-Cruz et al. 2016, Manickavinayam et al. 2020). It was shown that E2F1 depletion affects HR also by affecting the expression of RAD51 (one of HR proteins), and, hence, reducing RAD51 foci formation. It was suggested that a reduction in the number of foci containing RAD51 causes irregular strand pairing and sequence homology searching, which results in the accumulation of ssDNA gaps (Choi and Kim 2019). In addition to phosphorylation, E2F1 is also acetylated in response to DNA damage, on three lysine residues K117, K120, and K125. E2F1 acetylation creates binding motif for the bromodomains of the p300/KAT3B and CBP/KAT3A acetyltransferases. Such an interaction is required for the recruitment of p300 and CBP to DSBs and the induction of histone acetylation at sites of damage. In nucleosomes surrounding DSBs, p300 and CBP mediate the acetylation of multiple lysine residues on histone H3, including H3K56 and H3K18. Mutation preventing E2F1 acetylation preclude the recruitment of p300 and CBP to DSBs and other chromatin modifying and DNA repair factors, including BRG1, NBS1 and Tip60. It was proposed that p300/CBP-mediated histone acetylation in nucleosomes flanking DSB cooperates with nucleosome-remodeling complexes, such as SWI/SNF, to relax chromatin structure at the sites of DNA damage and to allow efficient access to the DNA repair machinery (Manickavinayam i in. 2019). RB is required for stabilizing the TopBP1-E2F1 complex at DSBs, but also for the recruitment of p300 and CBP to DSBs. E2F1 also stimulates the repair of UV photoproducts through the recruitment of the GCN5 HAT to sites of damage, which then increases histone H3 lysine 9 acetylation (H3K9ac) and enhances the recruitment of the nucleotide excision repair (NER) factors (Vélez-Cruz and Johnson 2017). RB takes also part in Non-Homologous End-Joining (NHEJ). It was shown that cells with loss of RB family function were characterized by reduced levels of NHEJ. Bioinformatic analysis indicated that Ku80, Ku70 and DNA-PK, required for DSB repair by NHEJ, may interact with RB1 (Cook et al. 2015).

4. Conclusions

RB acts as a tumor suppressor factor. This factor preferentially interacts with E2F to block entry into S phase. Interaction of E2F with RB leads to suppression of E2F. Phosphorylation of RB allows the release of active E2F, which is required to drive the cell cycle from G1 to S phase. E2Fs act in a tightly coordinated manner to enable cell cycle-dependent gene expression and prevent the spread of mutations by inducing DNA repair or programmed cell death. Deregulation of the RB/E2F pathway leads to neoplastic transformation by allowing uncontrolled cell proliferation. In turn, overactivation of E2F1 leads to tumor progression by promoting the stemness of cancer cells, changing the metabolic profile of the cells, allowing metastasis and increasing resistance to therapy.

5. Literature

- Choi EH and Kim KP (2019) E2F1 facilitates DNA break repair by localizing to break sites and enhancing the expression of homologous recombination factors. *Experimental & Molecular Medicine* 51(9): 1–12.
- Cook R, Zoumpoulidou G, Luczynski MT et al. (2015) Direct involvement of retinoblastoma family proteins in DNA repair by non-homologous end-joining. *Cell reports* 10(12): 2006–2018.
- Delou JMA, Biasoli D and Borges HL (2016) The Complex Link between Apoptosis and Autophagy: a Promising New Role for RB. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 88: 2257–2275.
- Denechaud PD, Fajas L and Giralt A (2017) E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Frontiers in Endocrinology* 8:311.
- Dyson NJ. (2016) RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes & development*, 30(13): 1492–1502.
- Emanuele MJ, Enrico TP, Mouery RD et al. (2020) Complex Cartography: Regulation of E2F Transcription Factors by Cyclin F and Ubiquitin. *Trends in cell biology*, 30(8): 640–652.

- Korotayev K and Ginsberg D (2008) Many pathways to apoptosis: E2F1 regulates splicing of apoptotic genes. *Cell Death & Differentiation* 15(12): 1813–1814.
- Liban TJ, Medina EM, Tripathi S et al. (2017) Conservation and divergence of C-terminal domain structure in the retinoblastoma protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(19): 4942 – 4947.
- Manickavinayaham S, Vélez-Cruz R, Biswas AK et al. (2019) E2F1 acetylation directs p300/CBP-mediated histone acetylation at DNA double-strand breaks to facilitate repair. *Nature Communications* 10(1): 4951.
- Manickavinayaham S, Velez-Cruz R, Biswas AK et al. (2020) The E2F1 transcription factor and RB tumor suppressor moonlight as DNA repair factors. *Cell Cycle* 19(18): 2260–2269.
- Morgunova E, Yin Y, Jolma A et al. (2015) Structural insights into the DNA-binding specificity of E2F family transcription factors. *Nature communications* 6:10050.
- Polager S, Ofir M and Ginsberg D (2008) E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 27(35): 4860–4864.
- Poppy Roworth A, Ghari F and La Thangue NB (2015) To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Molecular & cellular oncology* 2(1): e970480–e970480.
- Tomita T, Huibregtse JM and Matouschek A (2020) A masked initiation region in retinoblastoma protein regulates its proteasomal degradation. *Nature Communications* 11(1): 2019.
- Uchida C (2016) Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures. *BioMed Research International* 2016: 5959721.
- Vélez-Cruz R, Manickavinayaham S, Biswas AK et al. (2016) RB localizes to DNA double-strand breaks and promotes DNA end resection and homologous recombination through the recruitment of BRG1. *Genes & Development* 30(22): 2500–2512.
- Vélez-Cruz R and Johnson DG (2017) The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: Pushing back against genome instability on multiple fronts. *International Journal of Molecular Sciences* 18(8):1776
- Xie D, Pei Q, Li J et al. (2021) Emerging Role of E2F Family in Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology* 11: 723137.

6. Immunomodulujące właściwości komórek glejowych i ich rola w chorobie Parkinsona

Immunomodulative properties of glial cells and their role in Parkinson's disease

Harackiewicz Oliwia, Jankowska Agata, Beata Grembecka

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

Harackiewicz Oliwia: oliwia.harackiewicz@gmail.com

Słowa kluczowe: mikroglej, astrocyty, neurozapalenie, neuroprotekcja

treszczenie

Aktywność komórek glejowych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) ściśle związana jest z przebiegiem i postępem choroby Parkinsona (chP). Zarówno astrocyty, jak i mikroglej przyjmować mogą różne fenotypy, związane z aktywnością pro- bądź przeciwzapalną. Prowadzi to z jednej strony do rozwoju czy pogłębiania się występującego w obrębie OUN neurozapalenia niszczącego komórki nerwowe, z drugiej zaś, przyczyniają się do usunięcia patologicznych czynników oraz ochrony neuronów i innych komórek mózgowia przez działanie neuroprotektoryjne i regeneracyjne. Komórki glejowe pozostają w stałym kontakcie ze sobą i z okolicznymi neuronami, tym samym wpływając wzajemnie na swoje funkcjonowanie. Komórki obwodowego układu odpornościowego są w stanie przedostać się przez uszkodzoną barierę krew-mózg do OUN wspierając komórki glejowe w ich prozapalnej aktywności, jednocześnie wspomagając zachowanie prawidłowego stosunku między pro- i przeciwzapalnymi fenotypami mikrogleju. Celem pracy jest przedstawienie najważniejszych aspektów profilu pro- i przeciwzapalnego komórek glejowych, ich roli w przebiegu choroby Parkinsona oraz wzajemnego oddziaływania na siebie obwodowego układu odpornościowego z ośrodkowym układem nerwowym.

1. Wstęp

Choroba Parkinsona (chP) jest postępującym schorzeniem neurodegeneracyjnym charakteryzującym się obumieraniem neuronów dopaminergicznych (DA), obserwowanym głównie w obrębie części zbitej istoty czarnej (SNpc, *substantia nigra pars compacta*). W obrazie histopatologicznym w neuronach można zaobserwować liczne ciała Lewy'ego, których rdzeniem jest patologiczna forma nieprawidłowo pofalowanego białka α -synukleiny (α -syn) (Gawel i Potulska-Chromik 2015).

Na skutek zmian neuropatologicznych i funkcjonalnych w strukturach jąder podstawy pojawiają się objawy chP, które można podzielić na motoryczne i niemotoryczne. Główne symptomy chP określane jako tzw. „triada chP” stanowią: sztywność mięśniowa, drżenie spoczynkowe i bradykineza. Najnowsze badania wskazują, że fazę objawów motorycznych poprzedza często faza objawów niemotorycznych, wśród których wskazuje się zaburzenia węchu oraz fazy paradoksalnej snu (Heinzel i in. 2019). W zaawansowanym stadium chP występują zaburzenia funkcji poznawczych, depresja i anhedonia oraz zachowania lękopodobne (Loas i in. 2012).

Obecnie leczenie chP skupia się na niwelowaniu objawów i poprawie jakości życia pacjenta, i polega głównie na stosowaniu metod farmakologicznych (przyjmowanie lewodopy, pramipeksolu, ropinirolu). Inwazyjne metody operacyjne (dootrzewnowe wlewy lewodopy, metoda głębokiej stymulacji mózgu) stosowane są, gdy tradycyjna farmakoterapia przestaje być skuteczna (Motyl 2017).

Etiologia chP nadal nie została poznana. Postać sporadyczna chP stanowi około 95% przypadków zachorowań (Le i in. 2016). Biorąc pod uwagę częstość występowania tej postaci znaczący udział w etiologii choroby wydają się mieć czynniki środowiskowe (Joers i in. 2017). Badania wskazują, że postępującej neurodegeneracji w OUN towarzyszy chroniczny stan zapalny, który wywoływany jest przez nieprawidłowo sfałdowaną i odkładającą się w neuronach α -syn. W charakterystycznym dla chP neurozapaleniu czynny udział biorą komórki glejowe, głównie mikroglej i astrocyty. Oba typy komórek wykazują zróżnicowane działanie pro- i przeciwzapalne,

przyczyniając się zarówno do rozprzestrzeniania się neurozapalenia w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN), jak i neuroprotekcji okolicznych neuronów DA. Komórki glejowe pozostają w stałym kontakcie ze sobą, z neuronami oraz komórkami obwodowego układu odpornościowego. W artykule zamierzamy omówić właściwości immunomodulacyjne komórek glejowych, ze wskazaniem na te, które mogą mieć znaczenie zarówno w postępie i utrzymywaniu stanu zapalnego, jak i aktywacji procesów naprawczych oraz neuroprotekcyjnych.

2. Astrocyty

Astrocyty są komórkami glejowymi, które w mózgowiu występują najliczniej. Mimo to istota czarna (SN) charakteryzuje się ich relatywnie niskim zagęszczeniem (Joe i in. 2018). Cechują się właściwościami przeciwzapalnymi i neuroprotekcijnymi, co wiąże się z przyjmowanymi przez astroglej fenotypami morfologicznymi.

2.1 Budowa

W OUN 20-40% wszystkich komórek stanowią astrocyty. Komórki te posiadają liczne drobne wyrostki, zajmujące około 80% powierzchni ich błony komórkowej, które są w stałym kontakcie z naczyniami krwionośnymi, synapsami neuronów i innymi komórkami glejowymi. Wyróżnia się dwa podstawowe typy astrocytów – astrocyty włókniste oraz astrocyty protoplazmatyczne. Oba rodzaje znajdują się zarówno w istocie białej, jak i szarej rdzenia kręgowego i mózgu, ale różnią się między sobą morfologicznie (Zhou i in. 2019).

Morfologia astrocytów może ulegać zmianom w zależności od przyjmowanego przez te komórki fenotypu o profilu pro- bądź przeciwzapalnym. Fenotypem spoczynkowym określa się fenotyp o głównie prozapalnej funkcji (A1), natomiast w wyniku przełączenia tego fenotypu na aktywny komórki przyjmują profil przeciwzapalny (A2) (Joe i in. 2018).

2.2 Właściwości i rola astrocytów

Zmiana fenotypu spoczynkowego (A1) na aktywny (A2) związana jest z wydzielaniem czynników o działaniu neurotroficznym (np. MANF – *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor*, czy CDNF – *cerebral dopamine neurotrophic factor*) (Machaliński i in. 2012). Taka aktywacja ma miejsce w przypadku, gdy w OUN dochodzi do uszkodzeń bądź stanu zapalnego. Astrocyty wydzielają również czynniki prozapalne, jakimi są chemokiny: CCL2 i CCL5 – *chemokines (C-C motif) ligand 2, 5* i CXCL1, CXCL10, CXCL12 – *chemokine (C-X-C motif) ligand 1, 10, 12*, jednakże należy podkreślić przewagę właściwości przeciwzapalnych nad prozapalnymi (Joe i in. 2018; Soung i Klein 2020).

Główną rolą astrocytów jest utrzymanie w mózgowiu stanu homeostazy. Wiąże się to ze wzmoczoną ekspresją kanału Kir4.1 (kanału potasowego; *inward-rectifier potassium-channel*) czy transportera GLAST (transporter EAAT1; *excitatory amino acid transporter*), co prowadzi do wychwytu i usuwania kolejno jonów potasu i glutaminianu, pochodzących z uszkodzonych komórek neuronalnych (Joe i in. 2018). Ponadto przez produkcję glutationu (GSH) są w stanie kontrolować stres oksydacyjny, będący jedną z głównych przyczyn występowania neurodegeneracji. Stres oksydacyjny może być niebezpieczny ze względu na wydzielane w jego efekcie reaktywne formy tlenu (ROS) mające bezpośredni wpływ na metabolizm białek i szlaki sygnałowe niezbędne w komunikacji międzykomórkowej (Peterson i Flood 2012). Astrocyty stanowią element strukturalny bariery krew-mózg (BBB; *blood-brain barrier*) i wpływają na synaptogenezę oraz przebudowę strukturalną synaps już istniejących (Joe i in. 2018).

Neurony, tak jak każde inne komórki organizmu, do prawidłowego funkcjonowania potrzebują źródeł energii, których dostarczają im astrocyty, będące jedynym magazynem glikogenu w mózgu (Kuter i in. 2019). Dodatkowo komórki astrogleju dostarczają neuronom energię w postaci mleczanu (powstałego w procesie przeprowadzanego przez nie procesu glikolizy) i ciał ketonowych (Joe i in. 2018; Kuter i in. 2019). Ze względu na postępującą w chP neurodegenerację neurony pobierają większą ilość energii celem rekompensaty deficytów związanych z zachodzącymi w mitochondriach zmianami w łańcuchu transportu elektronów. Biorąc pod uwagę fakt, że zagęszczenie astrocytów występujących w SN jest niskie, neurony DA w tej strukturze są bardziej

narażone na degenerację (Kuter i in. 2019). Sugerować to może, że neurony nie giną w wyniku aktywacji astrocytów, a raczej w przypadku ich nieobecności w swoim środowisku (Joe i in. 2018). Przez wiele lat zastanawiano się nad rolą blizny astrocytarnej, tworzonej przez kumulujące się astrocyty, przypisując jej właściwości hamujące regenerację neuronów (Łabuzek i in. 2015). Obecnie pojawiają się przesłanki świadczące o jej potencjalnej roli neuroprotektynnej, wynikającej z wydzielanych przez nią czynników wzrostu i białek macierzy pozakomórkowej, które wspierają regenerację aksonów neuronów (Liddelow i Barres 2016; Joe i in. 2018). Neuroprotektynne właściwości astrocytów wykazano również na poziomie ekspresji powierzchniowych białek receptorowych. W chP ekspresji na astrocytach ulega receptor FcγR (receptor immunoglobuliny G; IgG), biorący udział w wychwycie patologicznej formy α -syn, która wiązana jest przez IgG (Tansey i Romero-Ramos 2018).

Przytoczone powyżej informacje świadczą o wiodącej funkcji przeciwzapalnej astrocytów, które nie tylko utrzymują neurony w fizjologicznym stanie równowagi, ale bezpośrednio niwelują efekty neurozapalenia, przyczyniając się do neuroregeneracji i odnowy komórek nerwowych.

3. Mikroglej

Komórki mikrogleju najliczniej występują w SN, hipokampie, jądrach podstawy oraz węchomózgowiu. Przypuszcza się, że neurony DA w SNpc są szczególnie wrażliwe i narażone na degradację ze względu na duże zagęszczenie komórek mikrogleju w SN (Tang i Le 2014). W OUN reprezentują wrodzony układ immunologiczny, stanowiąc pierwszą linię obrony przed uszkodzającymi czynnikami (Tang i Le 2014). Podobnie jak astrocyty, mikroglej przyjmuje różne formy morfologiczne (istniejące w heterogennej populacji), związane z jego właściwościami zarówno pro- jak i przeciwzapalnymi (Joers i in. 2017).

3.1 Budowa

Komórki mikrogleju stanowią 5-20% wszystkich komórek glejowych w OUN (Łabuzek i in. 2015). Mikroglej posiada różne formy morfologiczne, ale sprowadza się je do dwóch głównych fenotypów (podobnie jak makrofagi) (Łabuzek i in. 2015).

Pierwszy z fenotypów, M1, jest aktywowany na drodze klasycznej i prowadzi do przyjęcia przez mikroglej prozapalnego profilu działania. Ciało komórki przyjmuje wtedy ameboidalny kształt i pokrywa się filopodiami i pseudopodiami, charakteryzuje się też dobrze rozwiniętym aparatem Golgiego i dużą liczbą lizosomów (Łabuzek i in. 2015).

Aktywacja alternatywna skutkuje przyjęciem fenotypu M2, związanego z jego właściwościami przeciwzapalnymi. W tym przypadku mikroglej przyjmuje formę komórek rozgałęzionych o małym, wydłużonym ciele komórki z licznymi, długimi wyrostkami. Struktury te rozciągają się, wydłużają i kurczą, tym samym przeszukując otaczające je środowisko. Po napotkaniu nieprawidłowej α -syn, patogenu czy szczątków zniszczonych neuronów dochodzi do aktywacji komórki mikrogleju z fenotypu spoczynkowego [za który przyjmuje się fenotyp M2 (Łabuzek i in. 2015)] do aktywnego (M1), która związana jest ze zmianą w morfologii komórki, w ekspresji jej genów oraz produkcji i ekspresji licznych czynników (Peterson i Flood 2012).

3.2 Właściwości prozapalne

Komórki mikrogleju różnicują się do fenotypu M1 poprzez aktywację klasyczną, którą inicjują czynniki prozapalne takie jak IFN- γ (interferon gamma) czy LPS (lipopolisacharyd bakteryjny) (Ward i in. 2015).

Fenotyp M1 jest zdolny do usuwania resztek komórek ze swojego środowiska na drodze fagocytozy, co jest możliwe dzięki dużej liczbie lizosomów (Łabuzek i in. 2015). Ponadto przyczynia się do wychwytu patologicznej formy α -syn, która odkładając się w neuronach DA prowadzi do ich uszkodzenia (Tansey i Romero-Ramos 2018).

Mikroglej o fenotypie M1 wydziela liczne cytokiny prozapalne, ROS, tlenek azotu (NO), chemokiny, proteazy i toksyny, co skutkuje zniszczeniem patogenów i/lub uszkodzonych neuronów (Tang i Le 2014). Istnieją przesłanki świadczące o tym, że klasyczna aktywacja mikrogleju może

inicjować migrację komórek obwodowego układu immunologicznego do OUN, co prowadzi do nasilenia i utrwalenia zachodzącego w mózgu stanu zapalnego (Lazdon i in. 2020).

3.3 Właściwości przeciwzapalne

Występujące w OUN neurozapalenie może nieść też pozytywne efekty, jako że przyczynia się do neutralizacji zagrażających jego funkcjonowaniu czynników i plastyczności neuronów (Le i in. 2016). Aktywność komórek mikrogleju o fenotypie M2 związana jest z wydzielaniem czynników przeciwzapalnych, a także ekspresją konkretnych genów, co daje efekt w postaci naprawy i regeneracji uszkodzonych neuronów (Tang i Le 2014). Po wyeliminowaniu czynnika odpowiedzialnego za stan zapalny mikroglej uwalnia cytokiny przeciwzapalne (np. IL-4, IL-10), czynniki wzrostu (np. TGF- β 1 – *transforming growth factor β 1*) i neurotrofiny (np. BDNF – *brain-derived neurotrophic factor*) odpowiedzialne za neuroregenerację w obrębie SN (Peterson i Flood 2012; Łabuzek i in. 2015).

Podobnie jak w przypadku astrocytów, wspomniany już Fc γ R, ulega ekspresji również na komórkach mikrogleju, dzięki czemu ma on zdolności do usuwania patologicznej formy α -syn związanej z IgG w kompleksie (Tansey i Romero-Ramos 2018).

Wiele czynników i mechanizmów może regulować aktywność i właściwości mikrogleju, co, ze względu na ich protekcyjną rolę, przyczynia się do naprawy i regeneracji uszkodzonych komórek. Dodatkowo osłabiają odpowiedź prozapalną fenotypu M1 mikrogleju, dzięki czemu dochodzi do wyhamowania wydzielania przez niego cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ , a także NO, ROS, metaloproteinaz (MMP) czy czynników takich jak NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Tang i Le 2014; Łabuzek i in. 2015). Za te mechanizmy odpowiedzialne są endogenne receptory ulegające ekspresji na mikrogleju, do których zaliczyć możemy: GR (receptor glikokortykoidowy), ER (receptor estrogenu), Nurr1 (należący do podrodziny receptorów jądrowych NR4A2), PPARs (receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów) czy receptor IL-4 (Tang i Le 2014; Le i in. 2016). Przykładowo, IL-4 po związaniu ze swoim receptorem hamuje produkcję i działanie prozapalnych IL-6, IL-8, NO i TNF- α oraz łagodzi szkodliwe dla OUN działanie LPS (inicjującego klasyczną aktywację mikrogleju do fenotypu M1) (Tang i Le 2014). Inny receptor, GR, po związaniu z glikokortykoidami (GC) wpływa na ekspresję genów komórki i osłabia działanie czynników prozapalnych, cytokin i NF κ B (Tang i Le 2014), a także wzmacnia regeneracyjne właściwości jednego z fenotypów M2 (Joers i in. 2017).

TGF- β odpowiada za stymulację limfocytów do wydzielania przeciwzapalnej IL-4, co skłania jednocześnie mikroglej do aktywacji w sposób alternatywny (M2), tym samym promując działanie neuroprotekcyjne i hamując prozapalne właściwości mikrogleju o fenotypie M1 (Łabuzek i in. 2015).

Prawidłowo funkcjonujący mikroglej, zachowana homeostaza w OUN oraz interakcja między mikroglejem a neuronami są niezbędne do ochrony komórek nerwowych przed toksycznością i stanem zapalnym (Tansey i Romero-Ramos 2018).

Mikroglej przybierając fenotyp pro- i przeciwzapalny bezpośrednio związany jest zarówno z inicjowaniem i utrwalaniem neurozapalenia, jak i działaniami neuroprotekcyjnymi i regeneracyjnymi neuronów w OUN.

4. Udział komórek gleju w rekrutacji obwodowych mechanizmów odpornościowych w chP

W sytuacji, w której zachowana jest homeostaza organizmu, OUN można uznać za immunologicznie uprzywilejowany. W warunkach trwającego w OUN procesu zapalnego, który występuje w przebiegu chP, dochodzi do rozszczelnienia BBB. Zaburzenie integralności i właściwości BBB ułatwia aktywowanym prozapalnie limfocytom i monocytom przenikanie do obszarów OUN, gdzie występuje neurodegeneracja (Madej i in. 2013).

Badania wskazują, że komórki obwodowego układu odpornościowego mogą migrować do OUN w warunkach przewlekłego stanu zapalnego w OUN. Ze zjawiskiem tym związane są różne mechanizmy komunikacji między mikroglejem a neuronami. Badania sugerują, że przyczynia się do tego również zmiana profilu mikrogleju na aktywny (Lazdon i in. 2020). Prawidłowa interakcja

między wydzielaną przez neurony glikoproteiną fraktalkiną (CX3CL1) a jej receptorem umiejscowionym na mikrogleju (CX3CR1) ogranicza migrację komórek układu odpornościowego do mózgu. W przypadku upośledzenia tego mechanizmu mikroglej nie jest w stanie efektywnie ograniczać infiltracji monocytów do OUN (Łabuzek i in. 2015).

Patologiczna forma α -synukleiny uwalniana jest przez uszkodzony neuron do środowiska, co stymuluje mikroglej do podjęcia aktywności prozapalnej, celem zniwelowania zagrażającego OUN czynnika. W wyniku uwalniania czynników prozapalnych dochodzi do modyfikacji α -syn (utleniania, fosforylacji, nitrowania) i powstania jej toksycznych form. Nieprawidłowe białko przenika do szczylnych węzłów chłonnych, gdzie zostaje związane przez komórki APC (*antigen presenting cells*, komórki prezentujące antygen), co skutkuje indukcją efektorowych komórek T. Następnie limfocyty T [Th (T helperowe), Tc (T cytotoksyczne) i Treg (T regulatorowe)] przekraczają BBB wędrując do miejsca zapalenia. Peptydy α -syn związane z MHC I (*major histocompatibility complex class I*, główny kompleks zgodności tkankowej klasy I) na neuronach oraz z MHC II (*major histocompatibility complex class II*, główny kompleks zgodności tkankowej klasy II) na mikrogleju ponownie stymulują komórki obwodowego układu odpornościowego, prowadząc do reakcji zapalnej. Wydzielane przez limfocyty i mikroglej czynniki prozapalne prowadzą co prawda do usunięcia patologicznego białka, ale jednocześnie uszkadzają sąsiednie neurony, wskutek czego dochodzi do dalszego uwalniania α -syn (Mosley i Gendelman 2017). Te wpływające na siebie wzajemnie mechanizmy, prowadzące do nieustannej obecności białka w przestrzeni międzykomórkowej i ciągłego napędzania procesów zapalnych, określane są mianem samonapędzającej się pętli neurozapalenia (Tang i Le 2014).

W międzyczasie poza OUN limfocyty Th2 stymulują komórki B do produkcji przeciwciał anti- α -syn, które przekraczają BBB, wiążą się z epitopami α -syn występującymi na powierzchni neuronów i angażują układ dopełniacza, prowadząc do cytotoksyczności zależnej od przeciwciał i ostrej reakcji zapalnej (Mosley i Gendelman 2017).

Naciek komórek obwodowego układu immunologicznego do OUN związany jest nie tylko z wydzieleniem czynników prozapalnych przez aktywowane komórki układu odpornościowego (np. wydzielane przez Th1 i Th17: IFN- γ , TNF- α czy IL-17), ale prowadzi również do działania przeciwwzapalnego. Treg poprzez uwalnianie IL-10 i TGF- β mogą hamować zarówno rekrutację limfocytów do OUN, jak i aktywność mikrogleju M1. Ponadto wydzielane przez Th2 czynniki takie jak np. IL-5 i IL-4 stymulują mikroglej o fenotypie prozapalnym do przejścia w fenotyp przeciwwzapalny/spoczynkowy – M2 (Mosley i Gendelman 2017).

5. Podsumowanie

Przebieg i postęp chP związany jest z aktywnością komórek glejowych, takich jak astrocyty i mikroglej. Oba rodzaje komórek mogą przyjmować różne fenotypy odpowiedzialne za przyjmowanie odmiennych profili opartych o ich działanie pro- bądź przeciwwzapalne. Aktywacja prozapalna komórek gleju prowadzi do wydzielania cytokin i chemokin, które sprzyjają rozwojowi i utrwaleniu występującego w OUN neurozapalenia. Zmiana fenotypu na przeciwwzapalny sprzyja ochronie neuronów i innych komórek mózgowia poprzez ekspresję czynników warunkujących ich neuroprotekcję i regenerację. Astrocyty, mikroglej i neurony wpływają wzajemnie na swoje funkcjonowanie poprzez różne mechanizmy komunikacji międzykomórkowej. Neurozapalenie w obrębie OUN uszkadza BBB, wpływając na jej przepuszczalność, przez co komórki obwodowego układu odpornościowego są w stanie przedostać się przez nią i wędrować w kierunku miejsca zapalenia. Z jednej strony komponenty układu immunologicznego, wraz z komórkami glejowymi, przyczyniają się do neutralizacji patologicznej α -syn, tym samym oczyszczając przestrzeń międzykomórkową, z drugiej zaś – prowadzą do rozwoju odpowiedzi odpornościowej zależnej od przeciwciał i angażują inne komórki, co prowadzi do pogłębienia reakcji zapalnej. Poznanie czynników, które mogą modyfikować właściwości immunomodulujące komórek glejowych, zwłaszcza w zakresie ich zdolności naprawczych, jest szansą na opracowanie terapii, która będzie hamowała postęp chP.

6. Literatura

- Gaweł M, Potulska-Chromik A (2015) Choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimera i Parkinsona. *Postępy Nauk Medycznych* t. XXVIII, nr 7
- Heinzel S, Berg D, Gasser T i in. (2019) Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Movement Disorders* 34(10): 1464-1470
- Joe EH, Choi DJ, An J i in. (2018) Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology* 27(2): 77-87
- Joers V, Tansey MG, Mulas G i in. (2017) Microglial Phenotypes In Parkinson's Disease And Animal Models Of The Disease. *Progress In Neurobiology* 155: 57-75
- Kuter K, Olech Ł, Głowacka U i in. (2019) Astrocyte support is important for the compensatory potential of the nigrostriatal system neurons during early neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* 148: 63-79
- Loas G, Krystkowiak P, Godefroy O (2012) Anhedonia in Parkinson's Disease: An Overview. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 24: 444-451
- Lazdon E, Stoloro N, Frenkel D (2020) Microglia And Parkinson's Disease: Footprints To Pathology. *Journal of Neural Transmission* 127: 149-158
- Le W, Wu J, Tang Y (2016) Protective Microglia And Their Regulation In Parkinson's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9(89)
- Liddel S, Barres B (2016) Not everything is scary about a glial scar. *Nature* 532: 182-183
- Łabuzek K, Skrudlik E, Gabryel B i in. (2015) Przeciwwzapalna funkcja komórek mikrogleju w świetle najnowszych badań naukowych. *Annales Academiae Medicae Silesiensis* 69: 99-110
- Machaliński B, Łażewski-Banaszek P, Dąbkowska E i in. (2012) Rola czynników neurotroficznych w procesach regeneracji układu nerwowego. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 46(6): 579-590
- Madej JA, Madej JP, Kandefer-Gola M (2013) Przebieg procesu zapalnego w narządach immunologicznie uprzywilejowanych. *Medycyna Weterynaryjna* 69(6)
- Motyl J (2017) Znaczenie kinazy sfingozyny-1 oraz sfingozyno-1-fosforanu w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona oraz w farmakologicznej cytoprotekcji. *Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego. Polska Akademia Nauk, Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału*
- Mosley RL, Gendelman HE (2017) T cells and Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 16(10): 769-771
- Peterson LJ, Flood PM (2012) Oxidative Stress and Microglial Cells in Parkinson's Disease. *Mediators of Inflammation* 2012: 401264
- Soung AL., Klein RS (2020) Astrocytes: Initiators of and Responders to Inflammation. *Glia in Health and Disease. IntechOpen*
- Tang Y, Le W (2014) "Good" And "Bad" Microglia In Parkinson's Disease: An Understanding Of Homeostatic Mechanisms In Immunomodulation. In: Thomas M (Ed) *Inflammation In Parkinson's Disease*. Springer, New York: 105-126
- Tansey MG, Romero-Ramos M (2018) Immune system responses in Parkinson's disease: Early and dynamic. *The European journal of neuroscience* 49(3): 364-383
- Ward RJ, Dexter DT, Crichton RR (2015) Ageing, neuroinflammation and neurodegeneration. *Frontiers in Bioscience, Scholar* 7: 189-204
- Zhou B, Zuo YX, Jiang RT (2019) Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 25: 665-673

7. Związane z płcią różnice w etiologii i przebiegu choroby Parkinsona

Sex-related differences in the etiology and course of Parkinson's disease

Harackiewicz Oliwia, Jankowska Agata, Grembecka Beata

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

Harackiewicz Oliwia: oliwia.harackiewicz@gmail.com

Słowa kluczowe: neuroprotekcja, estrogeny, metale ciężkie

Streszczenie

Wpływ na rozwój i przebieg choroby Parkinsona (chP) mają zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Ryzyko wystąpienia chP wzrasta wraz z wiekiem, ale znaczenie ma także m.in. charakter podejmowanej pracy zawodowej, styl życia, aktywność fizyczna, współistniejące uzależnienia, stężenie hormonów płciowych oraz płeć. Badania wskazują, że żeńskie hormony płciowe, jakimi są estrogeny, pełnią rolę neuroprotekcijną. Dane epidemiologiczne pokazują, że kobiety chorują statystycznie w późniejszym wieku niż mężczyźni. Mężczyźni, ze względu na zawodowych, bardziej narażeni są na nadmierną ekspozycję na metale ciężkie i substancje o potencjalnym działaniu neurotoksycznym. Również sam przebieg choroby różni się u obu płci. Niektóre obserwowane objawy i ich nasilenie charakterystyczne są dla mężczyzn, inne – dla kobiet. Przebieg chP u kobiet może być cięższy i bardziej dotkliwy, co w konsekwencji szybciej prowadzi do niepełnosprawności i utraty samodzielności. Obserwacje te skutkują koniecznością dostosowania odpowiedniej terapii, która efektywnie zniweluje występujące symptomy, aby uniknąć ewentualnych skutków ubocznych stosowanych farmakoterapii. W pracy omówiono wyniki badań dotyczących związku pomiędzy etiologią chP a płcią ze szczególnym uwzględnieniem czynników środowiskowych, które mogą modyfikować profil ekspresji genów związanych z chP.

1. Wstęp

Choroba Parkinsona (chP) jest chorobą neurodegeneracyjną, która w obrazie neuropatologicznym cechuje się utratą neuronów dopaminergicznych (DA) w części zbitiej istoty czarnej (SNpc) oraz postępującym odkładaniem się agregatów α -synukleiny w neuronach ośrodkowego (OUN) i obwodowego układu nerwowego (Xu i Pu 2016). Zaraz po chorobie Alzheimera, stanowi drugą co do częstości występowania chorobę neurodegeneracyjną, której częstość pojawiania się oraz rodzaj i nasilenie objawów wykazuje dodatnią korelację z wiekiem (Pagano i in. 2016). Według badań statystycznych prawdopodobieństwo zachorowania na chP wynosi 2%. Młodzi ludzie chorują rzadko, ale po 50. roku życia ryzyko zachorowania wzrasta aż do 9%. Obecnie szacuje się, że około 1-2% osób chorych jest po 65. roku życia (Reuter 2018). Ważnym czynnikiem różnicującym częstość zapadalności na chP jest płeć – szacuje się, że mężczyźni chorują 1,5 do 2 razy częściej niż kobiety (Lee i in. 2019). Charakterystyczne objawy triady chP, które stanowią kryterium rozpoznania klinicznego występują w stopniu zbliżonym u obu płci. Badania wskazują jednak, że rodzaj oraz stopień nasilenia innych objawów ruchowych chP oraz objawów poza-motorycznych wykazuje zróżnicowanie zależne od płci pacjenta (Cerri i in. 2019).

Etiologia chP jest złożona i nadal trwają badania nad określeniem czynników, które inicjują kaskadę neurodegeneracji obserwowaną w przebiegu choroby. Biorąc pod uwagę fakt, że sporadyczna postać chP stanowi większość przypadków zachorowań, wiele uwagi poświęca się znalezieniu czynników epigenetycznych i środowiskowych (Pavlou i Outeiro 2017). Badania epidemiologiczne wskazują, że wystąpienie choroby może być związane m.in. z wykonywanym zawodem, środowiskiem życia, poziomem stresu, stylem życia (ekspozycja na substancje uzależniające), poziomem hormonów (zwłaszcza glikokortykoidów i hormonów płciowych) (Abbas i in. 2017). Czynnikiem, który może łączyć obserwowane w badaniach epidemiologicznych prawidłowości może być płeć pacjentów. W pracy omówione zostaną przykłady związanych z płcią różnic w przyczynach powstawania i przebiegu chP. Przedstawione zostaną także aktualne hipotezy dotyczące prawdopodobnych mechanizmów różnic międzypłciowych w przebiegu chP, które

zaprezentowane zostaną w oparciu o analizę aktualnego piśmiennictwa związanego z przedstawianym tematem.

2. Etiologia chP

Wieloletnie badania poświęcone identyfikacji czynników odpowiedzialnych za neurodegenerację w chP nie przyniosły do tej pory jednoznacznych odpowiedzi (Kouli i in. 2018). Powstało wiele teorii mających na celu wyjaśnienie przypuszczalnych czynników inicjujących rozwój chP. Wiadomo, że na jej patogenezę wpływ mają zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe i w obu przypadkach doszukuje się różnic występujących w obrębie płci. Badania epidemiologiczne wyraźnie wskazują na fakt, że ryzyko zachorowania jest znacząco wyższe u mężczyzn niż u kobiet (Motyl 2017). Ponadto niektóre wyniki badań sugerują, że kobiety (w przeciwieństwie do mężczyzn) zapadają na chorobę znacznie później, nawet po ok. 79. roku życia, co może wiązać się z potencjalnym neuroprotektynym działaniem estrogenów (Dziedziejko i in. 2009). Poza hormonalnym podłożem różnic w zapadalności i przebiegu choroby między obiema płciami, na uwagę zasługują także czynniki środowiskowe i styl życia oraz wcześniejsza ekspozycja na substancje o działaniu uzależniająca.

2.1 Neuroprotektynne działanie estrogenów

Estrogeny są żeńskimi hormonami płciowymi, których stężenie w organizmie znacznie spada wraz z wiekiem. W związku z tym odsetek kobiet, u których diagnozuje się chP po przejściu menopauzy (zarówno naturalnej, wynikającej z wieku, jak i chirurgicznej – zaistniałej w wyniku przeprowadzenia zabiegów histerektomii czy owariektomii) jest znacząco wyższy niż u kobiet w okresie przedmenopauzalnym. Ponadto wykazano korelację między wydłużonym okresem ekspozycji na estrogeny a mniejszym nasileniem objawów chP (Lee i in. 2019). Ochronne działanie estrogenów wyjaśniane jest za pomocą mechanizmów angażujących receptory estrogenowe typu alfa i beta ($ER\alpha$ i $ER\beta$), które obecne są w jądrach komórkowych neuronów DA w układzie nigrostriatalnym oraz na komórkach glejowych (Dye i in. 2012). Aktywowane prozapalnie komórki glejowe inicjują śmierć komórek nerwowych i podtrzymują proces zapalny poprzez wydzielanie czynników takich jak TNF- α (czynnik martwicy nowotworów α). Estrogeny, wpływając na ekspresję genów, prowadzą do zmniejszenia ekspresji TNF- α , co zmniejsza ryzyko uszkodzeń komórek nerwowych (Dziedziejko i in. 2009).

Udowodniono, że estradiol, po związaniu ze swoistym receptorem na komórkach glejowych (np. mikroglej, astrocyty), przejawia działanie cytoprotektynne zmniejszając aktywność czynnika NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) w astrogleju (Dziedziejko i in. 2009). Ponadto estrogeny stymulują komórki glejowe do wydzielania czynników wzrostu i neurotrofin, a także substancji regulujących (np. apoE – apolipoproteina E), które przyczyniają się do utrzymania komórek nerwowych w ich prawidłowym, fizjologicznym stanie. W uszkodzonych rejonach OUN (np. na skutek neurodegeneracji, czy niedokrwienia) dochodzi do nekrozy i apoptozy komórek nerwowych, co spowodowane jest intensywnym, dokomórkowym napływem jonów wapnia. Czynniki wzrostu, takie jak BDNF (czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego), CNTF (rzęskowy czynnik wzrostu) oraz IGF (insulinopodobny czynnik wzrostu) mają wpływ na zahamowanie tego procesu. W chorobach neurodegeneracyjnych dochodzi do uszkodzenia komórek OUN m.in. poprzez pobudzenie receptora NMDA (kwasu N-metylo-D-asparaginowego) przez nadmiar kwasu glutaminowego pochodzącego z uszkodzonych komórek. Estrogeny, na drodze pozareceptorowej, przeciwdziałają śmierci komórek nerwowych spowodowanych aktywnością receptora NMDA (Dziedziejko i in. 2009).

2.2 Znaczenie warunków życia i pracy

Wśród przyczyn chorób neurodegeneracyjnych ogromny udział ma stres oksydacyjny. Jest to stan, gdy w organizmie procesy oksydacyjne przeważają nad procesami antyoksydacyjnymi, czego przyczyną są reaktywne formy tlenu (RFT), które są związkami silnie utleniającymi. Stres oksydacyjny może być wynikiem wysokiej ekspozycji na metale ciężkie, takie jak mangan czy żelazo (Mizera i in. 2014).

W dalszym ciągu znaczna część populacji Polski zamieszkuje obszary wysoko zurbanizowane (dane z GUS 2020) w związku z czym mieszkańcy narażeni są na ekspozycję na zanieczyszczenia powietrza, zarówno substancjami lotnymi, jak i różnego rodzaju pyłami zawierającymi substancje toksyczne. Zanieczyszczenia wynikają m.in. z przemysłu i działalności fabryk, spalin itp.

Mężczyźni z reguły częściej podejmują pracę fizyczną (np. górnictwo, hutnictwo, blacharstwo), która związana jest z użytkowaniem i stałym przebywaniem w środowisku zawierającym szkodliwe czynniki, takie jak metale ciężkie. Udowodniono, że chelatacja jonów żelaza w SNpc wymaga udziału neuromelaniny (NM). Steżenie NM w układzie nigrostratalnym zmniejsza się wraz z wiekiem (Mochizuki i in. 2020), co prowadzi do akumulacji jonów żelaza sprzyjających powstawaniu dużej liczby cząsteczek czynnych oksydacyjnie poprzez udział w reakcji Fentona. W chP w wyniku degeneracji dochodzi do rozkładu dopaminy, którego jednym z produktów jest nadtlenek wodoru (H_2O_2). Następnie H_2O_2 oddziałując z jonami żelaza przekształca się do rodnika hydroksylowego reagującego z samą dopaminą, w efekcie czego powstaje neurotoksyna 6-hydroksydopamina, co potęguje zachodzącą w OUN neurodegenerację (Mizera i in. 2014). W związku z fizjologicznie niższym poziomem żelaza u kobiet (co związane jest zarówno z cyklem miesięczkowym, jak i niskim poziomem żelaza dostarczanego w diecie), mężczyźni bardziej narażeni są na szkodliwe działanie jego nadmiaru (Rushton i in. 2001).

Rozwój rolnictwa i potrzeba produkcji coraz większej ilości żywności wymusiło stosowanie substancji owadobójczych czy nawozów, mających na celu m.in. ochronę roślin przed szkodnikami. Przykładami takich środków są herbicydy i pestycydy, takie jak parakwat czy rotenon. Badania dowodzą, że oba te środki mają negatywny wpływ na stan OUN. Parakwat jest związkami, który może przekraczać barierę krew-mózg poprzez kanały zależne od jonów sodu, wpływając tym samym na szlak pentozofosforanowy i pośrednio zwiększa stres oksydacyjny w komórkach – upośledza wewnątrzkomórkowe układy antyoksydacyjne doprowadzając do uszkodzeń lipidów białek oraz struktur DNA i RNA. Narażenie na dużą dawkę tego środka ma toksyczny wpływ na neurony DA w SNpc, a poprzez zwiększenie stresu oksydacyjnego prowadzi do agregacji α -synukleiny i powstania ciałek Lewy'ego (Pingale i Gupta 2020).

Rotenon, w przeciwieństwie do parakwatu, poprzez wysoką lipofilność swobodnie przekracza barierę krew-mózg i hamuje aktywność mitochondrialnego kompleksu I, co niesie ze sobą liczne konsekwencje: zwiększenie stresu oksydacyjnego przez wytwarzanie RFT, dysfunkcje mitochondriów, zmiany w metabolizmie lipidów i glutationu oraz tworzenie agregatów α -synukleiny (Pingale i Gupta 2020).

2.3 Znaczenie używania substancji psychoaktywnych

Pomimo podejmowania licznych działań profilaktycznych, narkomania nadal stanowi olbrzymi problem, duży odsetek społeczeństwa przyjmuje środki psychoaktywne, przy czym można zauważyć, że to mężczyźni sięgają po narkotyki częściej niż kobiety – za wyjątkiem amfetaminy i ecstazy, które są przyjmowane z tą samą częstością (Malczewski i in. 2020).

MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna) jest neurotoksyną, której aktywny metabolit MPP^+ (kation 1-metylo-4-fenylpirydyny) jest selektywnie wychwytywany przez komórki DA i zakłóca mitochondrialny łańcuch oddechowy poprzez inhibicję kompleksu I. Neurotoksyna ta jest po dziś dzień stosowana do zwierzęcego modelowania chP – jej odkrycie przyczyniło się do powstania teorii o wpływie środowiska na patogenezę choroby, po tym jak u narkomanów (zażywających heroinę, której składnikiem jest MPTP) zauważono parkinsonizm. Układ nigrostriatalny kobiet wydaje się być chroniony przez 17-beta-estradiol, co dodatkowo potwierdza protekcyjną rolę estrogenów w chP (Dziedzicko i in. 2009).

Wysoka ekspozycja na metale ciężkie, jak np. mangan, nie musi być związana ze środowiskiem życia czy podejmowanym zawodem. U narkomanów obserwuje się coraz częstsze zatrucia tym metalem, pochodzącym z zyskującego na popularności efedronu. Substancja ta, o działaniu bardzo podobnym do amfetaminy, jest otrzymywana z utlenienia efedryny bądź pseudofedryny nadmanganianem potasu. Przyjmowanie nieprawidłowo oczyszczonego z manganu narkotyku prowadzić może do poważnych zatruc, a tym samym do wzmożenia stresu oksydacyjnego,

zaburzonego funkcjonowania mitochondriów i metabolizmu glutaminianu i dopaminy (Mizera i in. 2014).

3. Zróżnicowanie objawów chP w zależności od płci

Badania epidemiologiczne wskazują na to, że kobiety zapadają na chP statystycznie później niż mężczyźni (≈ 2 lata później), co tłumaczy się prawdopodobnym wyższym początkowym (przed wystąpieniem objawów choroby) stężeniem dopaminy w prążkowie u kobiet. Sugeruje się, że u kobiet, przed pojawieniem się objawów, poziom dopaminy jest aż o 16% wyższy niż u mężczyzn (Haaxma i in. 2007). Ponadto mężczyźni zapadają na chP dwa razy częściej niż kobiety, przy czym u kobiet choroba postępuje szybciej i obserwuje się wyższą śmiertelność (Cerri i in. 2019).

Badania Martinez-Martin i in. przeprowadzone na ponad 950 pacjentach z chP wykazały, że u kobiet częściej występują takie objawy niemotoryczne jak depresja, zmęczenie, zaparcia, utrata węchu i smaku, nadmierna potliwość czy zmiana wagi – są też bardziej nasilone niż u mężczyzn. Ponadto kobiety są bardziej narażone na rozwój dysfagii, podczas gdy mężczyznom doskwierać może nadmierny ślinotok (Martinez-Martin i in. 2012; Reuter 2018).

Mężczyźni nie tylko mają większe predyspozycje do rozwoju łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI – *mild cognitive impairment*), ale również do szybszego ich rozwoju w późniejszych stadiach choroby, natomiast pacjentki z reguły osiągają lepsze wyniki w testach mierzących ogólne funkcje poznawcze, czy płynność mowy, w przeciwieństwie do testów badających funkcje wzrokowo-przestrzenne. Sugeruje się, że w neuroprotekcji, a tym samym w natężeniu i występowaniu niektórych objawów, istotną rolę ma poziom estrogenów (Lin i in. 2018). Oprócz tego obserwuje się u mężczyzn większe deficyty w aspektach dotyczących procesów skupiania uwagi i pamięci roboczej, w porównaniu do kobiet z chP, u których nie występuje demencja (Cerri i in. 2019).

Kobiety częściej borykają się z ciężką depresją i utrzymującymi się epizodami lękowymi, a także stanami nerwicowymi (Reuter 2018). Mężczyźni z kolei skarżyć się mogą na dysfunkcje seksualne i pogorszenie relacji seksualnych z partnerem/partnerką oraz gorzej radzą sobie z interpretacją emocjonalnego wyrazu twarzy innych osób (Reuter 2018; Cerri i in. 2019). Jednym z bardziej charakterystycznych niemotorycznych objawów chP są zaburzenia w fazie snu REM – RBD (*REM sleep behavior disorder*). Wcześniej istniała teoria, że RBD dotyczyło częściej mężczyzn niż kobiet, ponieważ głównie u nich notowano występowanie tego objawu. Najnowsze badania wykazują jednak, że częstość występowania RBD jest taka sama i u mężczyzn, i u kobiet, natomiast u pacjentek objawy te są mniej agresywne i w mniejszy sposób oddziałują na ich jakość życia, przez co rzadziej zgłaszają ten problem lekarzom (Cerri i in. 2019). Jednakże u mężczyzn rzeczywiście obserwuje się zaburzenia zachowania występujące podczas fazy snu REM, a do tego zwiększenie senności w ciągu dnia (Reuter 2018).

Rozpatrując przykłady objawów motorycznych można zauważyć, że wśród kobiet częściej występuje drżenie (u 67% kobiet, podczas gdy u mężczyzn odsetek ten stanowi 48%), przy jednoczesnym wolniejszym rozwoju objawów obniżających sprawność ruchową (obejmowanych przez UPDRS-III – *Unified Parkinson's Disease Rating Scale III*): zaburzenia mowy, maskowaty wyraz twarzy, sztywność mięśniowa, problemy z szybkimi, naprzemiennymi ruchami rąk, zaburzenia postawy i bradykineza (Haaxma i in. 2007). Natomiast pacjentki z chP wykazują większą skłonność do wystąpienia zaburzeń związanych z utrzymaniem stabilnej postawy (Cerri i in. 2019). U mężczyzn częściej obserwuje się uogólnioną bradykinezję (Reuter 2018), a także upośledzenia motoryki objawiające się tzw. „zamrożeniem chodu” (*freezing of gait*) czy chodem magnetycznym, co może prowadzić do upadków i związanych z tym powikłań. Płeć męska jest czynnikiem predysponującym do wystąpienia symptomu zwanego kamptokormią, czyli zaburzenia postawy charakteryzującego się nieprawidłowym, pogłębionym zgięciem tułowia do przodu, występującym podczas stania czy chodzenia (zanikającym w pozycji leżącej). Różnice w występowaniu i nasileniu powyższych symptomów u obu płci skłaniają badaczy do dalszych badań nad rozwojem innych zaburzeń postawy występujących w chP, w zależności od płci pacjenta (Cerri i in. 2019). Co ciekawe, ekspozycja na estrogeny skutkuje zmianą nasilenia objawów ruchowych chP. W badaniach przeprowadzonych przez Lee i in. (2019) zaobserwowano, że u osób z chP z dłuższą ekspozycją na estrogen objawy

motoryczne choroby były mniej nasilone, a także cechowała je wyższa dostępność transportera dopaminy (DAT) w brzusznej i tylnej skorupie, w stosunku do osób o krótszej ekspozycji na ten hormon.

4. Możliwości leczenia i profilaktyka

Aktualnie brakuje skutecznej terapii, która w pełni leczyłaby chorobę Parkinsona i zapobiegałaby jej objawom. Główne strategie terapii opierają się na leczeniu farmakologicznym, szczególnie skupiającej się na podawaniu L-dopy (lewodopy) czy też agonistów dopaminy, takich jak ropinirol czy pramipeksol. Długotrwałe stosowanie leków farmakologicznych wiąże się jednak z niepożądanymi skutkami ubocznymi, takimi jak dyskinezy (nieskoordynowane, mimowolne ruchy kończyn i głowy). W tym przypadku rozważa się metody bardziej inwazyjne – chirurgiczne, np. metoda głębokiej stymulacji mózgu (DBS – *deep brain stimulation*) (Motyl 2017) wpływająca na ogólną poprawę objawów motorycznych w chP – u mężczyzn obserwuje się znacznie większą poprawę dotyczącą kamptokormii i utrzymania prawidłowej postawy niż u kobiet, mimo, że to pacjentki mówią o większej poprawie jakości życia (Cerri i in. 2019).

W związku z neuroprotekcijną rolą estrogenów coraz większą uwagę skupia się na ich możliwym działaniu terapeutycznym i profilaktycznym w chP. Na ten temat powstało wiele różnych badań. W jednym z nich wykazano, że zastosowanie hormonalnej terapii zastępczej u kobiet z chP, u których leczenie lewodopą nie zostało jeszcze wprowadzone, skutkowało u nich mniejszym nasileniem objawów niż w przypadku mężczyzn. Ponadto, inne wyniki badań mówią o tym, że u kobiet leczonych zarówno lekami przeciwparkinsonowskimi, jak i doustnie podawanymi estrogenami, stwierdzono dłuższy okres dobrej sprawności w porównaniu do kobiet przyjmujących podobne dawki leków, ale bez zastosowania estrogenów. Zaobserwowano również, że zastępcza terapia hormonalna ma właściwości protekcyjne względem rozwoju otępienia w chP (Dziedziejko i in. 2009).

Estrogeny, jako żeńskie hormony płciowe, nie powinny być stosowane u mężczyzn, ze względu na ich działanie feminizujące na męski organizm. Sugeruje się, że pewna grupa leków (SERM – selektywne modulatory receptora estrogenowego) o działaniu antagonistycznym względem estrogenu w tkance sutkowej, oraz agonistycznym w takich tkankach jak np. kości, może stanowić w przyszłości obiecującą alternatywę w leczeniu mężczyzn. Mimo, że wpływ SERM na chP nie został w pełni udokumentowany, istnieją przesłanki o ich korzystnym wpływie na MCI oraz poprawę pamięci werbalnej u kobiet, natomiast u mężczyzn – poprawę w procesach skupiania uwagi, pamięci i funkcjach wykonawczych bez efektów feminizujących (Cerri i in. 2019).

Badania przeprowadzone na szczurach z modelem chP wykazały, że inhibitory 5 α -reduktazy (odpowiedzialnej za rozkład progesteronu do jego metabolitów) mają wpływ na obniżenie nasilenia dyskinez wywołanych leczeniem lewodopą zarówno u samic, jak i samców (Cerri i in. 2019).

Styl życia może znacznie wpłynąć na rozwój i postęp chP, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Stosowanie odpowiednio zbilansowanej diety, a szczególnie dbanie o prawidłowy poziom cholesterolu, przyczynia się do ochrony przed rozwojem chP. Jego poziom, wyższy niż 180 mg/dL przy zachowanym stężeniu LDL (tzw. „dobrego cholesterolu” na poziomie nie mniejszym niż 110 mg/dL) wiązany jest z mniejszym ryzykiem zachorowania na chP u mężczyzn w średnim wieku i u kobiet w wieku podeszłym. Kolejnym istotnym czynnikiem, który chroni przed rozwojem, nasileniem objawów i postępem chP jest aktywność fizyczna. Udowodniono pozytywny wpływ ćwiczeń fizycznych na ogólny stan zdrowia i wiązany jest z niższym ryzykiem wystąpienia chP, jej lepszym rokowaniem i łagodniejszym przebiegiem (Cerri i in. 2019).

5. Podsumowanie

Rozwój, postęp jak i metody terapii chP u kobiet i u mężczyzn różnią się. Obecnie uważa się, że to właśnie styl życia i nasze otoczenie mają największy wpływ na przebieg choroby. Geneza różnic płciowych leży głównie w podłożu hormonalnym – wiąże się to zarówno z metabolizmem estrogenów, jak i progesteronu. Również różnice w poziomie żelaza u obu płci przyczyniać się mogą do większej podatności OUN na stres oksydacyjny, a co za tym idzie, neurodegenerację. Mężczyźni

częściej podejmują się pracy fizycznej, zwłaszcza w przemyśle czy rolnictwie, przez co bardziej narażeni są na nadmierną ekspozycję na metale ciężkie. Jak wskazują statystyki, również częściej sięgają po narkotyki, co dodatkowo predysponuje do możliwego zatrucia toksynami i manganem. Podejmowana terapia chP powinna być odpowiednio dostosowana m.in. ze względu na płeć, jako że towarzyszące chorobie objawy mogą występować w innym nasileniu. Nie wszystkie strategie terapii sprawdzą się w leczeniu u wszystkich pacjentów, należy bowiem pamiętać o tym, że choroba u każdego może mieć swój indywidualny przebieg.

6. Piśmiennictwo

- Abbas MM, Xu Z, Tan LCS (2017) Epidemiology of Parkinson's Disease – East Versus West. *Movement Disorders Clinical Practice* 5(1): 14-28
- Cerri S, Mus L, Blandini F (2019) Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *Journal of Parkinson's Disease* 9(3): 501-515
- Dye RV, Millej KJ, Singer EJ i in. (2012) Hormone replacement therapy and risk for neurodegenerative diseases. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012(258454)
- Dziedziczko V, Białecka M, Machoy-Mokrzyńska A i in. (2009) Rola estrogenów w chorobie Parkinsona. *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej* 63: 627-633
- GUS – Migracje wewnętrzne 2020: Migracje na pobyt stały ludności (Tabela 54) <https://demografia.stat.gov.pl/BazaDemografia/Tables.aspx> (dostęp online)
- Haaxma CA, Bloem BR, Oyen WJ i in. (2007) Gender differences in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 78(8): 819-824
- Kouli A, Torsney KM, Kuan WL (2018) Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. T. B. Stoker (Eds.) i in., *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Codon Publications. Chapter 1
- Lee YH, Cha J, Chung SJ i in. (2019) Beneficial effect of estrogen on nigrostriatal dopaminergic neurons in drug-naïve postmenopausal Parkinson's disease. *Scientific Reports* 9(10531)
- Malczewski A, Bevez M, Dalmata M i in. (2020) Raport o stanie narkomani w Polsce 2020. Krajowe Biuro do Spraw Przeciwdziałania Narkomanii
- Martinez-Martin P, Falup Pecuriaru C, Odin P i in. (2012) Gender-related differences in the burden of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 259(8): 1639-1647
- Mizera J, Furgala A, Gawlik M (2014) Wczesna diagnostyka chorób neurodegeneracyjnych uwarunkowanych przez czynniki środowiskowe o działaniu prooksydacyjnym. *Farmacja Polska* 70(11): 597-600
- Mochizuki H, Choong CJ, Baba K (2020) Parkinson's disease and iron. *Journal of Neural Transmission* 127(2): 181-187
- Motyl J (2017) Znaczenie kinazy sfingozyny-1 oraz sfingozyno-1-fosforanu w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona oraz w farmakologicznej cytoprotekcji. Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego. Polska Akademia Nauk, Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału
- Lin SJ, Baumeister TR, Garg S i in. (2018) Cognitive profiles and hub vulnerability in Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology* 9(482)
- Pagano G, Ferrara N, Brooks DJ i in. (2016) Age at onset and Parkinson disease phenotype. *Neurology* 86(15): 1400-1407
- Pavlou MAS, Outeiro TF (2017) Epigenetics in Parkinson's Disease. Delgado-Morales R. *Neuroepigenomics in Aging and Disease*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 978: 363-390
- Pingale T, Gupta GL (2020) Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 199(173060)
- Reuter I (2018) Elsevier Essentials Choroba Parkinsona. Urban & Fischer Munich Wrocław: 8-15
- Rushton DH, Dover R, Sainsbury AW i in. (2001) Why should women have lower reference limits for haemoglobin and ferritin concentrations than men? *BMJ* 322: 1355-1357
- Xu L, Pu J (2016) Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenic Dysfunction to Potential Clinical Application. *Parkinson's Disease* 2016(1720621)

8. Paralysis of the recurrent laryngeal nerve

Jurga Marta⁽¹⁾, Krawczuk Aleksandra⁽¹⁾, Woch Barbara⁽¹⁾

Katedra i Klinika Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Opiekun naukowy: dr n. med. Karolina Dorobisz

Jurga Marta: marta.jurga9@gmail.com

Keywords: vocal folds paralysis, reinnervation, dyspnoea.

Abstract

The paralysis of the recurrent laryngeal nerve is severe condition, which may lead to hoarseness, stridor or even fatal dyspnoea. In this article it was shown that the most common cause of RLN paralysis is iatrogenic. Another significant causes are neoplastic disease and neurological conditions. RLN paralysis can also develop due to cardiovascular diseases, radiotherapy, infectious or inflammatory causes. It is proved, that vocal cords paralysis, which is caused by RLN paralysis, can spontaneously recover within time. However, there are a lot of invasive procedures, which can be performed in order to improve vocal folds condition, such as injection laryngoplasty, laterofixation of vocal folds or RLN reinnervation.

1. Introduction

Recurrent laryngeal nerve paralysis, which can manifest as vocal folds paralysis (VFP), otherwise known as vocal cord paralysis (VCP), occurs more often nowadays. This severe condition, caused by different agents and mechanisms, is responsible for decline in the quality of life and may result in hoarseness, flaccidity of vocal folds, voice changes or even it's loss. The aim of this article was to sum up the various causes of recurrent laryngeal nerve paralysis and the diversity methods of treatment.

2. Description of recurrent laryngeal nerves (RLNs) paralysis

The recurrent laryngeal nerves (RLNs) are branches of the cervical part of the vagus nerve. The left RLN appears anteriorly at the level of the arch of the aorta and loops posteriorly under it. The right RLN loops around the right subclavian artery. The course of the nerves continues posteriorly to the lobe of the thyroid gland as they pass into the tracheoesophageal groove. The RLNs follow to the back of the cricothyroid joint. At this point, they enter the larynx and later become the inferior laryngeal nerves (Allen et al. 2021).

The recurrent laryngeal nerves supply intrinsic muscles of the larynx with the exception of the cricothyroid muscles. The knowledge of the anatomical course of the RLN is important to understand the mechanisms of its injury. Because of its longer course, the risk of injuring the left RLN is higher. (Misiólek et al. 2014; Toutounchi et al. 2014).

Injuries of the RLN can cause paralysis of the intrinsic muscles, which will manifest in the impaired vocal cord function or even paralysis. The universal symptom, due to vocal cord paralysis is hoarseness (Ahmad et al. 2004).

3. Literature review

3.1 Causes

Vocal cord paralysis is a common symptom of multiple diseases. The reasons for vocal cord paralysis can be divided into two groups: traumatic and atraumatic. RLN injury, which can lead to vocal cord paralysis can happen due to many causes, such as iatrogenic reasons (surgical procedures, endotracheal intubation), malignant tumors in the region of the skull base, neck, or chest, trauma neurological diseases i.e. stroke (specifically lateral medullary syndrome also known as Wallenberg's syndrome), bulbar palsies or demyelinating disease. RLN paralysis may also be idiopathic (Culp and

Patel 2021). According to Toutouchi et al. (2014) the percentage statistics are presented as: 31.11% for idiopathic paralysis, 31.11% for tumors, 28.89% for surgery, 2.2% for other causes such as: trauma, brain problems, systemic disease.

Iatrogenic causes

One of the most common causes of vocal cord paralysis is iatrogenic (Chen et al. 2007). It was estimated that the incident of permanent, operation-related vocal cord palsies from injury to the RLN is considered as 1%. Nevertheless, the most studied causes are thyroidectomies and parathyroidectomies, in which the risk of RLN injuries is 14% for thyroidectomy and 7% for parathyroidectomy (Culp and Patel 2021).

Identifying the nerve during surgical procedures on thyroid and parathyroid glands is one of the most efficient ways to avoid RLN injury.

Thyroidectomy is a procedure in which a part of, or a whole thyroid gland is surgically removed. The indications are various and include benign or malignant conditions such as hyperthyroidism, goiter, thyroid nodules, and different types of thyroid cancers or metastases (Biello et al. 2021).

There are various mechanisms of RLN injury during thyroidectomy. These include partial or complete transection, which usually occurs at the level of the upper two tracheal rings, where the nerve gets close to the thyroid lobe, nerve handling or traction, contusion, clamping, burn, misplaced ligature, and finally crush compromised blood supply (Zakaria et al. 2011).

Other surgical procedures with a high risk of RLN injury are excision of tumors, carotid endarterectomy, cardio surgery, and neurosurgery procedures (especially anterior approach spine surgery in the cervical region (Misiołek et al. 2014) and thoracic interventions.

Vocal Folds Paralysis (VFP) is also one of the most severe complications of esophagus cancer surgery. There are a few features, which can be defined as independent risks, such as the size of the recurrent laryngeal nerve (thin RLN is more predisposed), female sex, and body mass index (BMI) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (Saito et al. 2018). Scipione et al. in 2007 research showed that obese patients (BMI $\geq 35 \text{ kg/m}^2$) who underwent esophagectomy had an increased risk for VFP than nonobese patients. The suggested mechanism is stretching of the nerve as well as the heat transmission from electrocautery. Compression or vascular compromise also have been pointed out as potential causes (Saito et al. 2018; Mboumi et al. 2019). Furthermore, Y. Saito et al. informed that left RLN is injured more frequently than the right RLN. It can be explained by its longer intrathoracic course (Chen et al. 2007; Saito et al. 2018).

RLN injury can also appear as a complication after endotracheal intubation. The mechanism is based on nerve compression between arytenoid cartilage, thyroid cartilage, and the cuff of the endotracheal tube. Risk factors include the cuff's size, age, sex, and individual characteristics. Other invasive procedures such as laryngoscopy or bronchoscopy can also lead to RLN injury.

Neoplastic disease

Tumors are another significant cause of RLN injury. Moreover, one study shows that non-laryngeal malignancies are responsible for 24.7% of all unilateral vocal cord paralysis (UVFP) and 80% of those being pulmonary or mediastinal (Culp and Patel 2021). What is more, malignancy is a very significant cause of UVFP. It is reported especially in primary and metastatic lung and laryngeal carcinoma. In thyroid and central nervous system cancers, it is believed not as frequent as in the previous ones (Williamson and Shermetaro 2021).

The most common neoplastic cause of VFP is lung carcinoma invasion when RLN can be injured due to its locoregional spread. Therefore, it can be said that it was the most common neoplastic etiology, especially in men population (Chen et al. 2007). Different frequent neoplasm is esophagus carcinoma. VFP in the cause of esophageal cancer is considered as a bad prognostic sign because it testifies to its advanced stage (VFP as an expression of tumor extension through the wall of the esophagus) (Chen et al. 2007; Tachimori et al. 1995). Metastatic lymph node tumor, which enlargement can as well involve RLN. Another neoplastic disease reported as a reason for VFP (mainly UVFP) is breast cancer (Chen et al. 2007; Glazer et al. 1983; Tachimori et al. 1995).

Neurological causes

Neurological affections are another significant group of VFP causes. Lateral medullary syndrome, also known as Wallenberg's syndrome, or posterior inferior cerebellar artery syndrome, which is a type of stroke, can cause vocal cord palsy and stridor. The pathomechanism of this neurological disease is connected with the obstruction in brain arteries. The symptoms are caused due to ischemia of the specific part of the brain stem. In the case of vocal cord palsy, the corresponding anatomy location, which has been unsupplied is nucleus ambiguus (which supplies cranial nerves IX and X) (Ahmed et al. 2013). Other medullary lesions which may lead to laryngeal pathology, including paralysis, are postpolio syndrome, syringomyelia, Arnold-Chiari malformation, or motor-neuron diseases such as primary lateral sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, progressive bulbar palsy, and progressive spinal muscular atrophy (Erman et al. 2009).

Other

The authors describe that the VFP can develop after radiotherapy (Chen et al. 2007; Crawley et al. 2015). Radiation-induced VCP was also reported by Chen et al. (2007). Authors observed that 10 patients develop VCP (which was 3.4%). The impact of radiation therapy is also seen in the research of (Crawley and Sulica, 2015). They report 10 patients which had radiotherapy in the past, and whom the VCP develop.

From among the VFP origins, we should not forget Vascular-Cardiac Causes. They include aortic dissection, pseudoaneurysm, congenital heart disease, pulmonary artery enlargement, pulmonary embolism, or Ortner syndrome (hoarseness due to stretching or compression of the nerve). Ortner syndrome is induced mainly by left atrial enlargement. Another reported cause is mitral valve prolapse (Chen et al. 2007; Paquette et al. 2012).

Infectious and inflammatory conditions are also worth noting. Most infections of the VFP are mainly self-limiting viral diseases, bacterial abscesses, and sarcoidosis, silicosis, or fibrosing mediastinitis. Tuberculosis is a rare reason for VFP (Chen et al. 2007; Paquette et al. 2012). What is more is that recurrent laryngeal nerve paralysis was also reported as an extremely rare complication of subclinical Lyme disease. In this case parenteral ceftriaxone was performed and after seven days the complete recovery, confirmed in videolaryngoscopy, could be observed. (Karosi et al. 2009)

Last but not least another reason is idiopathic cause. It can be said that it is an idiopathic cause if all other reasons were ruled out. According to Chen et al. (2007) among 291 patients, who participated in the study, 31 patients had no reason for VCP revealed (10.7%).

4. Treatment

When injured, RLN is proven to spontaneously recover within time. Voice therapy can help with maximizing voice efficiency. Commonly UVFP is successfully treated by voice therapy exclusively (Allen et al. 2021; Chen et al. 2007). When the case is more severe and the results are not satisfactory one may consider performing more invasive procedures such as injection laryngoplasty, arytenoid adduction, laryngeal framework surgery, and even reinnervation (Allen et al. 2021; Chen et al. 2007).

Injection laryngoplasty may provide temporary alleviation. Injection of synthetic material into the disabled VF sets it into a midline position. Unfortunately, the materials can resorb, so before spontaneous recovery, reinjections may be necessary. The most severe complication of the VF augmentation is irritation to the tissue which might resolve in its histopathological changes (Allen et al. 2021).

Laryngeal framework surgery allows permanently medialize VF. This open neck procedure is based on the external insertion of a synthetic implant and is completely reversible (Allen et al. 2021).

BVFP commonly results in airway compromise and is associated with potentially dangerous or even fatal dyspnea requiring improvement of patient's ventilation. Most BVFP are treated surgically. Nowadays endolaryngeal glottal enlargement is believed to be the golden-standard solution (Allen et al. 2021; Misiołek et al. 2014).

Due to the narrowing of the airways, tracheostomy is an often-performed procedure. It allows ventilation while waiting for spontaneous reinnervation. It is also common to perform laser endoscopic arytenoidectomy or cordotomy. They are irreversible and permanent methods. Arytenoidectomy is the removal of arytenoid cartilage and cordotomy involves excision of laryngeal soft tissues, both using a CO₂ laser. It is also possible to combine them into one operation (arytenoidcordectomy). Both procedures provide expansion of the glottal inlet and consequently lead to proper ventilation (Biello et al. 2021; Misiólek et al. 2014).

Suture laterofixation is considered as an alternative to tracheostomy and consists of the lateralization of the VF. It is potentially reversible, minimally invasive, and proven successful in enlargement of glottis inlet and ventilation improvement. The treatment is endoscopic and can be proceeded both unilaterally and bilaterally. When needed it may be coupled with arytenoidectomy, cordotomy, or arytenoidcordectomy. The expected side effect is hoarseness. Sometimes reoperation is necessary, but generally, complications are rare (Misiólek et al. 2014; Toutouchi et al. 2014).

There are two types of RLN reinnervation: selective and nonselective. Commonly it is performed 6 to 12 months after the injury. The break is necessary in the case of spontaneous RLN function recovery (Biello et al. 2021). Nonselective reinnervation is the first choice for UVFP. It focuses on nerve reconstruction requiring innervation of abductors and adductors. Different methods have been suggested, from which neurotaphy between donor and RLN is believed most effective. Usually, the common branch of ansa cervicalis is considered the best-suited donor because it is at a close distance to the operated area and has an analogous amount of motor fibers and diameter to the recurrent laryngeal nerve (Biello et al. 2021; Scipione et al. 2007).

The main goal of nonselective reinnervation is to recreate the balance between antagonistic muscles. This method leads to the improvement of the arytenoid position. When compared with different surgical treatments it proves a few advantages, such as preservation of the laryngeal muscles stimulation and avoiding of muscle atrophy, good voice results, can be used when larynx still grows and lac of foreign materials. However, sometimes aforementioned interventions are performed together because temporary medialization can protect from aspiration and provides a good voice outcome before the complete reinnervation appears (Biello et al. 2021; Scipione et al. 2007).

Selective reinnervation adductors or/and abductors are reinnervated independently and are preferred in BVFP. The main problem concerning these patients is the paramedian position of the VF, so crucial is to rebuild inspiratory abduction through triggering posterior cricoarytenoid muscles. It prevents synkinetic vocal adduction while respiration. For BVFP, selective reinnervation provides airways recovery and good voice outcomes (Biello et al. 2021; Scipione et al. 2007). The principal nerve responsible for respiration is the phrenic nerve - it is active in deep as well as in quiet breathing, which makes it a suitable donor for this procedure (Biello et al. 2021). Trials prove that reinnervation of both, abduction, and adduction muscles of the larynx with phrenic and hypoglossal nerves is effective (Ahmad et al. 2004).

Research emphasizes the possibility of introducing adjuvant nimodipine (Williamson and Shermetaro 2021) and immediate intraoperative reconstruction (Erman et al. 2009; Toutouchi et al. 2014).

In the future patients with permanent BVFP, posterior cricoarytenoid muscles at least partially reinnervated and with muscle bulk enough to guarantee a response, and mobile cricoarytenoid joints may benefit from RLN stimulators. After reinnervation, implanted pacers might effectively stimulate the neuromotor fibers and lead to even better voice outcomes (Allen et al. 2021).

5. Summary

Right and left RLNs are branches of the cervical part of the vagus nerve. Because of its longer course, left RLN more susceptible to injury. There are many causes that may lead to VFP - the most frequent is iatrogenic. Other ones are neoplastic and neurological diseases, vascular-cardiac causes, and infections.

UVFP is successfully treated with vocal therapy. If results are not satisfactory, one may perform more invasive procedures (injection laryngoplasty, arytenoid adduction, laryngeal framework surgery).

BVFP is mostly treated surgically. The main goal is to widen narrowed airways, using tracheostomy, laser endoscopic arytenoidectomy, or cordotomy. Potentially reversible suture laterofixation is considered as an alternative to tracheostomy.

Reinnervation is proven an efficient method of treating both UVFP and BVFP. In the future, patients may also benefit from RLN stimulators.

6. Bibliography

- Ahmad S, Muzamil A, Lateef M (2002) A study of incidence and etiopathology of vocal cord paralysis. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 54(4): 294–296.
- Ahmed RA, Shaheen M, Noshi MS (2013). Lateral medullary syndrome: An unusual central cause for unilateral vocal cord palsy. *Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences* 5(2):89–92.
- Allen E, Minutello K, Murcek BW (2017) Anatomy, Head and Neck, Larynx Recurrent Laryngeal Nerve. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470179/> (Online Access: 24.11.2021).
- Biello A, Kinberg EC, Wirtz ED (2020) Thyroidectomy. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563279/> (Online Access: 23.11.2021).
- Chen HC, Jen YM, Wang CH, et al. (2007) Etiology of vocal cord paralysis. *ORL* 69(3): 167–171.
- Crawley BK, Sulica L (2015) Vocal fold paralysis as a delayed consequence of neck and chest radiotherapy. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 153(2): 239–243.
- Culp JM, Patel G (2021) Recurrent Laryngeal Nerve Injury. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560832/> (Online Access: 23.11.2021).
- Erman AB, Kejner AE, Hogikyan ND, et al. (2009) Disorders of cranial nerves IX and X. In *Seminars in neurology* (Vol. 29, No. 01, pp. 085–092).
- Glazer HS, Aronberg DJ, Lee JK, et al. (1983) Extralaryngeal causes of vocal cord paralysis: CT evaluation. *American Journal of Roentgenology* 141(3):527–531.
- Karosi T, Rácz T, Szekanez É, et al. (2009) Recurrent laryngeal nerve paralysis due to subclinical Lyme borreliosis. Cambridge University Press [Internet]. <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-laryngology-and-otology/article/abs/recurrent-laryngeal-nerve-paralysis-due-to-subclinical-lyme-borreliosis/BD1D9269EB79EE47A6BDCEDC30D54F05> (Online Access: 12.01.2022).
- Mboumi IW, Reddy S, Lidor AO (2019) Complications After Esophagectomy. *Surg. Clin. North Am.* 99(3): 501–510.
- Misiólek M, Stelmańska K, Twardokęs M, et al. (2014) Operacyjne uszkodzenia nerwów krtaniowych. *Polski Przegląd Otorinolaryngologiczny* 3(1): 15–19.
- Paquette CM, Manos DC, Psooy BJ (2012) Unilateral vocal cord paralysis: a review of CT findings, mediastinal causes, and the course of the recurrent laryngeal nerves. *Radiographics* 32(3): 721–740.
- Saito Y, Takeuchi H, Fukuda K, et al. (2018) Size of recurrent laryngeal nerve as a new risk factor for postoperative vocal cord paralysis. *Diseases of the Esophagus* 31(6).
- Scipione CN, Chang AC, Pickens A, et al. (2007) Transhiatal esophagectomy in the profoundly obese: implications and experience. *The Annals of thoracic surgery* 84(2): 376–383.
- Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, et al. (1995) Vocal cord paralysis in patients with thoracic esophageal carcinoma. *Journal of surgical oncology* 59(4): 230–232.
- Toutounchi SJS, Eydi M, Golzari SE, et al. (2014) Vocal cord paralysis and its etiologies: a prospective study. *Journal of cardiovascular and thoracic research* 6(1): 47.
- Williamson AJ, Shermetaro C (2018) Unilateral Vocal Cord Paralysis. <https://europepmc.org/article/MED/30571041/NBK430685#free-full-text> (Online Access: 23.11.2021).
- Zakaria HM, Al Awad NA, Al Kreedes AS, et al. (2011) Recurrent laryngeal nerve injury in thyroid surgery. *Oman medical journal* 26(1):34.

9. Genetyczne aspekty białaczek z zespołem Downa

Genetics aspects of myeloid leukemia in Down syndrome

Kuszczak Klaudia

Zakład Transplantologii Klinicznej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny, Lublin

Opiekun naukowy: Agnieszka Szymczyk

Kuszczak Klaudia:klaudia.kuszczak@umlub.pl

Słowa kluczowe: ALL, AML, AMKL, GATA1, RUNX1

Streszczenie

Zespół Downa jest schorzeniem o podłożu genetycznym, w którym wyróżniamy: trisomię 21 pary chromosomu, mozaicyzm, translokację robertsonowską. Pacjenci posiadają specyficzny fenotyp oraz, z uwagi na zmiany genetyczne, również predyspozycje na tle neurologicznym jak Alzheimer, manifestacje na tle kardiologicznym oraz naczyniowym, w tym białaczki, a pośród nich między innymi zespół mielodysplastyczny, przejściowe zaburzenie szpikowe, białaczkę limfoblastyczną i ostrą białaczkę szpikową. Celem pracy jest przegląd wiedzy z zakresu genetycznych aspektów nowotworów hematologicznych pacjentów cierpiących na zespół Downa oraz omówienie ich roli w procesie diagnostycznym, właściwego doboru strategii terapeutycznych.

Abstract

Down syndrome is a genetic disorder and we can distinguish: trisomy of the 21st chromosome pair, mosaicism, and Robertsonian translocation. Patients have a specific phenotype and, due to genetic changes, also a neurological predisposition, such as Alzheimer's, cardiological and vascular manifestations, such as leukemias, such as myelodysplastic syndrome, transient myeloid disorder, lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia. The aim of the study is to review the knowledge of the genetic aspects of hematological cancers in patients suffering from Down's syndrome and to discuss their role in the diagnostic process and the proper selection of therapeutic strategies.

1. Wstęp

Rozwój nauki, metod i technologii diagnostycznych, wykrywania i leczenia, który ma miejsce na przestrzeni dziesięcioleci, znacznie zwiększył możliwości diagnozowania chorób we wczesnych stadiach choroby nowotworowej, dając tym samym szansę na przeżycie pacjentów. Proces diagnostyczny jest niezwykle ważny w hematologii onkologicznej i często jest jednym z niezastąpionych elementów w procesie i metodzie leczenia. Dzięki niemu można wyróżnić grupy, podgrupy, klasy danej choroby, badać mechanizmy chorób, wykrywać progresję, prognozować.

Zagadnienie białaczek, o ile jest powszechne i coraz lepiej opisywane w literaturze medycznej, o tyle pacjenci z zespołem Downa stanowią mniejszość w populacji, co skutkuje gorszym poznaniem zagadnienia. Zgodnie z klasyfikacją podaną przez Światową Organizację Zdrowia (ang. WHO, World Health Organization) nowotworów układu krwiotwórczego z roku 2016 wyróżnia się mieloproliferaacje związane z zespołem Downa, a pośród nich białaczkę szpikową związaną z zespołem Downa oraz przemijającą nieprawidłową mielopoezę. Szacuje się, że zespół Downa (ZD) dotyczy 1 na 800 do tysiąca urodzonych dzieci, zaś pośród nich dwudziestokrotnie częściej występuje ostra białaczka limfocytowa (ALL - ang. Acute lymphocytic leukemia) i sto pięćdziesięciokrotnie ostra białaczka szpikowa (AML - ang. Acute myeloid leukemia) w porównaniu z ich rówieśnikami. Za taki stan prawdopodobnie odpowiada hematopoeza klonalna (CH - ang. clonal hematopoiesis) odpowiadająca za promowanie replikacji w prekursorach komórek krwi.

2. Objawy i podłoże genetyczne zespołu Downa

Zespół Downa został po raz pierwszy zaobserwowany w roku 1862 przez angielskiego lekarza, Johna L. Downa. Obecnie może być wykrywany w okresie ciąży podczas przeprowadzania badań prenatalnych. Osoby z zespołem Downa odznaczają się charakterystycznym wyglądem,

w którym zauważyć można między innymi: skośność oczu oraz ich szerokie rozstawienie, zmarszczkę nakątną, przez co początkowo zespół Downa nazywany był mongolizmem lub też idiotyzmem mongolskim z uwagi na deficyty intelektualne. U chorych obserwuje się mniejsze lub słabe napięcie mięśniowe, duży, wystający poza obręb ust język, mały podbródek, szeroką oraz płaską twarz, pletwiastą, krótką szyję, krótkie palce oraz duży odstęp pomiędzy dużym a drugim palcem. Chorzy odznaczają się tendencją do niskiego wzrostu, narażeni są wraz z wiekiem na przyrost masy ciała, co skutkuje otyłością w dorosłym życiu. W obrazie neurologicznym notuje się opóźnienie rozwoju, co dotyczy blisko 1/3 pacjentów. Noworodki średnio 3-4 miesiące później niż ich rówieśnicy zaczynają raczkować, a blisko pół roku później od nich samodzielnie chodzić. Upośledzenie intelektualne notuje się z łagodną, umiarkowaną oraz rzadko z poważną niepełnosprawnością intelektualną. Zdolności językowe są upośledzone, często jękają się, mówią szybko i niezrozumiale. Stosunkowo rzadkie są problemy na tle społecznym, dzieci dość dobrze socjalizują się z otoczeniem w porównaniu do innych schorzeń, w których występuje niepełnosprawność intelektualna (Wester Oxelgren *et al.*, 2019). Osoby chore częściej zapadają na Alzheimera, a także o około 5-15% częściej dotyczą ich napady padaczkowe. Bardzo częstym defektem są zaburzenia i schorzenia dotyczące narządu słuchu lub wzroku i dotyczą one połowy przypadków chorych. 40% chorych z zespołem Downa rodzi się z wrodzonymi wadami serca, a spośród nich niemal 80% nie posiada wykształconej przegrody przedsionkowo-komorowej, międzyprzedsionkowej lub międzykomorowej. Wraz z wiekiem pacjent zaczyna mieć problemy z zastawką mitralną. U niektórych pacjentów może występować przetrwały przewód tętniczy czy tetralogia Fallota (Sullivan i in. 2017).

U podstaw schorzenia najczęściej leży trisomia 21 pary chromosomu stanowiąca 95% przypadków. Jest ona efektem błędów podziału materiału genetycznego w pierwszym etapie mejozy (68% przypadków) oraz w drugim etapie mejozy (21% przypadków). Oprócz tego wyróżnia się błędy w mejozie I i II po stronie rodzicielskiej, w pierwszym przypadku stanowi około 4% osób dotkniętych zespołem Downa i 5% w drugim, z tego zaś 88% przypadków w przypadku oogenezy i 8% spermatogenezy. Błędy podziału materiału genetycznego mogą dotyczyć także etapu formowania zygoty i stanowią od 4 do 6%.

Translokacja Robertsonowska stanowi 2-4% przypadków i polega na przyłączeniu ramienia długiego 21 chromosomu do 14 lub 21. Oba zapisy kariotypu są następujące: 45,XX,t(14q;21q) 45,XX,t(21q;21q), jednak nie stwierdza się tutaj efektu wieku matczynego, a translokacja może być zarówno ojcowskiego jak i matczynego pochodzenia, chociaż zdarzają się unikalne przypadki, jak na przykład translokacja (13;14), (11;21)(p13;q22) (Gumus, 2019).

Zdecydowanie najrzadziej występującą jest mozaicyzm 21 chromosomu i szacuje się go na około 2% ogółu przypadków. Zachodzi on na dwa sposoby: na skutek nondysjunkcji w zdrowym zarodku lub rzadziej spotykanym, nieprawidłowym podziale w aneuploidalnym zarodku, co prowadzi do powstania linii komórkowej o prawidłowej liczbie chromosomów. Kariotyp zapisuje się poprzez dodanie przedrostka „mos” oznaczającego właśnie mozaicyzm: mos 46,XX/47,XX,+21 albo mos 46,XY/47,XY,+21. Mimo to zdarzył się przypadek bliźniąt mozaicznych wraz z trisomią 21 pary chromosomu oraz translokacją robertsonowską i rearanacją (trisomia 21 z 46, XX, + 21, der (21;21) (q10; q10)) (Cao i in. 2021).

Niekiedy dochodzi także do duplikacji fragmentu chromosomu, co skutkuje jego trisomią. Kariotyp chorego oznacza się 46,XX lub XY dup(21q). Pacjenci tacy prezentują szereg zróżnicowanych cech fenotypowych zespołu Downa, zależnie od tego, jakie geny występują w nieprawidłowej ilości kopii.

Powielony materiał genetyczny jest przyczyną nadekspresji części genów zlokalizowanych na 21 chromosomie. Oszacowano że ulega jej około 310 genów, co stanowi 50% całości genów. Niektóre badania wskazują, że rejon krytyczny dla wystąpienia zespołu Downa znajduje się na 21q22.1-q22.3. W przedziale tym znajdują się kluczowe geny dla prekursora białka dysmutazy ponadtlenkowej (ang. Superoxide dismutase - SOD), amyloidu (ang. Amyloid-beta precursor protein - APP) i *ETS2* (Zhang i in. 2018). *APP* jest genem znajdującym się na 21 chromosomie i posiada 18 egzonów. Domniema się, że jego funkcją biologiczną jest udział w schorzeniu Alzheimera, chociaż nie ma na to jednoznacznych dowodów. SOD jest enzymem, który katalizuje dysmutację rodnika

ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego. Spekuluje się, że udział w schorzeniu bierze również mikroRNA.

3. Zaburzenia hematoonkologiczne u chorych z ZD

Ostra białaczka szpikowa jawi się jako choroba o niejednorodnym podłożu genetycznym o różnorodnych subklonach, co prowadzi do różnorodnej podatności na poznane metody leczenia. Pomiędzy wystąpieniem AML a trisomią 21. chromosomu zachodzi duży związek i szacuje się, że stanowi około 35% przypadków. Ostra białaczka limfoblastyczna wykazuje wskaźnik od 90 do 95% wyleczeń wśród dzieci, charakteryzuje się jednak słabym wskaźnikiem przeżycia ogólnego długoterminowego pośród pacjentów dorosłych, wynoszącym mniej więcej 40%. Sam zespół Downa jest zależnym czynnikiem prognostycznym decydującym o nawrocie ALL (ostra białaczka limfoblastyczna). Pacjenci tacy mają wyższy wskaźnik śmiertelności związany z leczeniem. Szacuje się, że blisko 26% pacjentów obciążonych zespołem Downa dotyczy remisja nowotworu (Short i in. 2020). Porównując te dane do 15% remisji w przypadku pacjentów nie dotkniętych ZD, daje to 11% większe ryzyko nawrotu ALL, a śmiertelność jest wyższa o 7%.

Dzieci z zespołem Downa narażone są też na przejściową nieprawidłową mielopoezę (TAM – ang. Transient abnormal myelopoiesis), wcześniej uznawaną za przejściową formę białaczki. Zaburzenie przejściowej nieprawidłowej mielopozy dotyczy blisko 10-20% populacji dzieci. Pod względem klinicznym oraz hematologicznym jest podobna do ostrej białaczki megakarioblastycznej (AMKL – ang. Acute megakaryoblastic leukemia), poprzedzona mutacją somatyczną genu *GATA1*, zlokalizowanego na chromosomie X i kodującego czynnik transkrypcyjny wiążący *GATA* czynnikiem wiązania powiązany z chromosomem X, odpowiadający za regulację różnicowania się oraz dojrzewanie komórek megakariocytowych oraz erytoidalnych; z tego powodu w zespole Downa może dochodzić do produkcji krótszego białka *GATA1*, co pociąga za sobą w konsekwencji brak kontroli nad proliferacją niedojrzałych megakariocytów. Megakariocyty w przypadku braku obecności *GATA1* nadmiernie proliferują oraz prowadzą do niewytwarzania się płytek krwi.

4. Białaczki z ZD

Pacjenci obarczeni *TAM* umierają we wcześniejszym wieku na skutek niewydolności narządowej, a zwłaszcza wątroby. U większości noworodków obserwuje się podwyższoną liczbę białych krwinek, powiększenie wątroby lub też może przebiegać bezobjawowo. *TAM* prowadzi do podwyższonych wskaźników enzymatycznych funkcji wątroby prowadząc do jej zwłóknienia, stanu zagrażającego zdrowiu oraz często prowadząc do zgonu.

W schorzeniu biorą udział białka *GATA* od 1 do 6 (z czego pierwsze trzy *GATA1*, *GATA2*, *GATA3* odpowiadają za różnicowanie komórek krwiotwórczych, układu nerwowego i komórek śródbłonka, zaś *GATA5* oraz *GATA6* regulują rozwój i różnicowanie komórek endo- i mezodermy). W blastach AMKL-DS, oprócz trisomii 21 chromosomu, występują dodatkowe mutacje genetyczne istotne w procesach hematopojezy. *GATA1* może wchodzić w interakcje z innymi mutacjami prowadząc do promowania progresji, między innymi wpływ może mieć wobec onkogennej, nawracającej mutacji w receptorze szpikowym CSF2RB, następnie przejąć jego funkcję hot spot. Do jednych z najczęściej nabywanych wariantów należą mutacje w genach kodujących kompleksy kohezyny, a pośród nich *NIPBL*, *CTCF*, *STAG2*, *SMC3*, *SMC1A*, *RAD21*, odgrywają ważną rolę w nawrotach mutacji w przypadku ostrej białaczki szpikowej, czy też kinazy KIT, rodziny *JAK* (1-3), *MPL*, czy regulatorów epigenetycznych *SUZ12*, *KANSL1*, *EZH2* oraz *RAS*, *ASXL1*, *KDM6A* (Labuhn i in., 2019). Mutacje kohezyny nie wskazują na zwiększony poziom aneuploidii aniżeli w komórkach, w których do niej nie doszło, co częściowo obala hipotezę, że mogą one promować brak stabilności genomu ze względu na ich istotną rolę w procesie mitozy i segregację chromosomów (Boucher i in., 2021). Pośród częstych mutacji genetycznych występują mutacje z przesunięciem ramki odczytu, delecje zmiany nonsensowne oraz zmiany sensu, które prowadzą do utraty funkcjonalności transkrypcyjnych czynników *MYC*, *CREBBP*, *TP53*, a szacuje się, że ich częstotliwość występowania plasuje się na poziomie mniej więcej od 5-9% przypadków. Mutacje *CTCF* występują zarówno w białaczkach z ZD jak i bez; mogą mieć charakter mutacji

nonsensownych, czy zmiany sensu, interkalacji lub też delecji, które najczęściej są duże, w obrębie motywu palca cynkowego i gdzie przypuszcza się, że wpływają one na zaburzony proces wiązania DNA. Częstotliwość wariantów alleli jaką się obserwuje skłania do przypuszczenia, że jest spowodowana we wczesnej fazie ekspansji klonalnej podobnie jak *GATA1*. *CTCF* bierze dużą rolę w koordynowaniu ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój układu krwiotwórczego, a zwłaszcza prawidłowego różnicowania się erytroblasów oraz ich proliferacji.

GATA1 posiada dwa warianty, pierwszym jest białko złożone z 413 aminokwasów, drugi zawiera 330 aminokwasów. Drugi z wariantów jest mutacją somatyczną, przez wycięcie eksonu 2, na skutek czego następuje synteza krótszego białka o 40 kDA. Izofорма *GATA1*, nazwana *GATA1s* produkowana jest w blastach i linii komórkowej CMK osób cierpiących na białaczkę AMKL z ZD, co więcej *GATA1s* inicjowany jest poprzez *MET84*. Białko takie ma inną transkrypcyjną aktywność od pełnej długości formy 50 kDA. Mutacja w *GATA1* prowadzi do zmian w promotorze CDA i promuje odmienne wzorce ekspresji w ZD CDA oraz bez ZD w AML. Wpływa na zaburzoną aktywację genów odpowiedzialnych za erytroleukemię. RB1, E2F stanowiące kofaktory mogą być regulowane przez indukowane zmiany transkrypcji *GATA1* (Orozco-Vela i in., 2020). *GATA1* jest prawdopodobnie promowany i wspierany w okresie prenatalnym, potwierdza taką hipotezę opisany przypadek bliźniąt jednojajowych, dwuowodniowych oraz jednokosmówkowych z mutacją *GATA1*, która powstała jeszcze w okresie płodowym, poprzez duplikację *GATA1* w eksonie 2, przed wystąpieniem białaczki, co sugeruje, że *GATA1* jest silnym prowodyrem zmian nowotworowych. Na chromosomie 7 znaleziono rearanżację, na skutek której doszło do delecji w czterech genach kodujących białka *MYL10*, *IFT22*, *COL26A1*, oraz objęła dwa pierwsze eksony *CUX1* (Bache i in., 2020). Unikalną cechą ALL z ZD jest hipermetylacja promotora *RUNX1*, zmniejsza ekspresję *RUNX128* w normalnych komórkach limfoidalnych i progenitorowych.

Pośród wszystkich *RUNX1*, wyróżnia się trzy izoformy powstałe na skutek splicingu alternatywnego: *RUNX1a*, *RUNX1b* oraz *RUNX1c* (Santoni i in. 2021). W proces różnicowania się megakariocytów zaangażowane jest miR-27 wpływając na obniżoną ekspresję genu *RUNX1*. Dodatkowo, oba te czynniki są zaangażowane w pętlę sprzężenia regulacyjnego, zwrotnego. Poprzez nieprawidłowe konfiguracje w chromosomie 21 lub inne, jeszcze niepoznane czynniki, prowadzi do błędnej ekspresji genu *SON*. Czynnika splicingu oraz biorącego udział w nieprawidłowej transkrypcji genów *RUNX1*, odpowiadającego za przebieg prawidłowej megakariopoezy, kompleksu AP-1 stanowiących składowe genów *FOSB*, *JUNB* i *JUN* popychając dalej molekularnie rozwój AMKL zarówno z ZD jak i bez ZD. Z uwagi, że *RUNX1* zlokalizowany jest także na chromosomie 21 OSN prowadzi do zmniejszonego poziomu ekspresji *RUNX1*. *SON* wpływa też na rozrost populacji CD41+ oraz CD61+, komórek polipolidalnych potwierdzając jego zdolności do regulacji różnicowania się megakariocytów. Gen *SON* stanowi interesujący czynnik transkrypcyjny powodujący zahamowanie różnicowania się megakariocytów tak jak *GATA1* i przyczyniać się może do rozwoju AMKL. Przeprowadzone badania nad płodami myszy wykazały, że pozbawione *RUNX1* odznaczały się one całkowitym barakiem zdolności do hematopoezy wątrobowej w okresie płodowym.

Agresywnym typem ostrej białaczki szpikowej jest ostra białaczka promielocytowa (ang. Acute promyelocytic leukemia, APML/APL), która wedle klasyfikacji francusko-amerykańsko-brytyjskiej, ma wysokie ryzyko nawrotów oraz wysoki odsetek zgonów. Jako jeden obiecujący kierunek poznania mechanizmu białaczkowego, uważa się korelację między ludzką elastazą neutrofilową (NE) oraz *CUX1* p200 wpływając na komórki U937 i NB4. Czynniki te biorą prawdopodobnie udział w transkrypcji, różnicowaniu się i morfogenezie. W pierwszym przypadku wyższa ekspresja elastazy powodowała obniżenie poziomu ekspresji p200 *CUX1*, zaś w komórkach NB4 zadziałały przeciwnie; niski poziom NE powodował silniejszy wzrost poziomu p200 *CUX1*. Co więcej, potwierdzono, że p200 *CUX1* znajduje się w kompleksach immunopercypitowanych any-NE niżeli w kontroli komórek IgG, stanowiąc przyczynę nieprawidłowych podziałów komórkowych oraz różnicowania się komórek NB4 APL. Elastaza neutrofilowa promuje też różne nowotwory, a poprzez degradację substratu-1 receptora insuliny sprzyja migrowaniu komórek białaczkowych AML, co więcej wchodzi w interakcję z CSF-3 (czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii

granulocytów) i powoduje zniesienie czynności czynnika proliferacyjnego komórek progenitorowych CD34+ (Yu i in. 2020).

AMKL, jak i inne podtypy AML, w wynikach cytologicznych wykazują zarówno zmiany strukturalne w chromosomach jak i liczbowe, zaś stosunkowo rzadko spotykanym typem zmian jest t(1;22)(p13;q13) łącznie z fuzyjnym transkryptem *RBM15-MKLI*, nie występujący samodzielnie tylko i wyłącznie w Zespole Downa bez AML. Zmiana taka posiada stosunkowo słabą prognozę remisji, ponieważ mieści się w granicy połowy badanych. Sugeruje się, że *RBM15-MKLI* ma wpływ na pochodzenie komórek blastycznych z megakariocytów, erytoidów oraz progenitora prowadząc do patologicznej megakariopoezy, a badania z wykorzystaniem siRNA pokazują zahamowania różnicowania się megakariocytów i mieloidów, co wskazuje na zaangażowanie RBM15 do szlaków sygnalizacyjnych *NOTCH*. W większość zmiana t(1;22)(p13;q13) i *RBM15-MKLI* dotyczy głównie przypadków dzieci oraz niemowląt chorujących na AMKL z ZD, jednak praca zespołu Saito pokazała interesujący przypadek dorosłego chorego z t(1;22)(p13.3;q13.1) oraz *RBM-15MKLI* po przebytych leczeniu guza powstałego z komórek zarodkowych o innym pochodzeniu niżeli śródpiersia. W wywiadzie pacjent negował choroby hematologiczne w historii rodziny oraz nie miał oznak klinicznych dla zespołu Downa. Podjęto leczenie konwencjonalnymi metodami jak w AML. Wdrożono leczenie cytarabiną oraz idarubicyną, dokonano przeszczepu allogenicznego stanowiącego przeszczep krwi pępowinowej (Saito i in. 2020).

ERG jest jednym z przedstawicieli rodziny genów czynników transkrypcyjnych ETS, położonym na 21 chromosomie na ramieniu długim Hsa21 o wielkości 8,3 Mb. *ERG* odgrywa istotną rolę w hematopoezie i megakariopoezie. Wysoka ekspresja *ERG* oznacza słabą prognozę zarówno w AML jak i AMKL z ZD. W badaniach in vivo przeprowadzonych na mysim modelu pokazano, że nadekspresja *ERG* może wspierać prekursorów płodowej wątroby dla megakariocytów oraz wchodzić w interakcje z *GATA1s*. W ludzkiej trisomii 21 chromosom *ERG* może być genem krytycznym, prowadzić do skrócenia długości *GATA1* i pełnić kluczową rolę w chorobach szpikowych człowieka zarówno DS-TMD jak i DS-AMKL (Salek-Ardakani i in. 2009; Stankiewicz i Crispino 2009).

MikroRNA należy do podklasy niekodujących RNA, zawiera około XX nukleotydów; molekuly te odpowiedzialne są za kontrolę wielu procesów zachodzących w komórkach: proliferację, apoptozę, różnicowanie się i specjalizację komórek, ekspresję. Mają szczególne znaczenie w procesach nowotworowych, a badania pokazują, że wpływ na regulację czynności microRNA.

Najbardziej narażonym na zmiany jest chromosom 21, a co z tym jest związane, również miR zlokalizowane nim takie jak miR-99a, let-7-c czy miR-125b. Ulegają one obfitszej ekspresji w różnorodnych tkankach związanych z rozwojem ZD takich jak serce czy mózg. MiR-155 pełni rolę, regulatora stanów zapalnych indukowanych przez cytokininy, ponadto jest w stanie regulować dużo szlaków oraz wpływać na inne geny. Sprawia to, że pełni funkcję ważnego biomarkera prognostycznego, wpływa na NF-κB, modulując odpowiedź immunologiczną na infekcje, a także jest związany z chorobami nowotworowymi, czy autoimmunologicznymi oraz na *FLT3-ITD* będącym receptorem kinazy tyrozyny regulującym procesy hematopoezy (Nguyen i in. 2021). Angażowany jest w patogenezę AML przez nadprodukcję komórek B i jest uznawany również za czynnik onkogenny, niski poziom ekspresji promuje i prowadzi do zmian typowych dla chłoniaka z komórek B, a w przypadku AML wiąże się ze słabym rokowaniem niezależnie od zmian molekularnych i cytogenetycznych. Nadekspresja miR-155 może prowadzić u pacjentów z ZD do patologicznych zmian w mózgu. Sygnalizacja komórkowa może być powiązana z aktywnością miR-155-5p i wpływać na rodzinę białek TNF (TNFR1, TNFR2, TNFA, TNFB) odpowiedzialnych za oddziaływanie na receptory cytokinowe (Sas i in. 2020).

TNF-α jest czynnikiem związanym z procesami zapalnymi oraz insulinooporność oraz na aktywność fenotypu M1 makrofagów. Wpływa to na poziom ekspresji miR-99a, zaś on z kolei wpływając na proces aktywacji fenotypu M2 (Jaiswal i in. 2019). Nadekspresja miR-99a oraz rodziny let-7-c prowadzi do zmian w tkance sercowej i może prowadzić do wad serca płodu obciążonego zespołem Downa. Szczególnie dużą ekspresję miR-125b notuje się w hipokampie, korze mózgu, w płacie skroniowym. Wpływać również może regulacyjnie na geny wpływające na procesy apoptozy mitochondrialnej, przy czym nie kontroluje ich bezpośrednio, a wpływa na aktywację prozapalną makrofagów działając proekspresyjnie na BIK i MTP18 (Duroux-Richard i in. 2016). W łożysku

znaleziono dwa mikro RNA regulowane w górę miR-1973 oraz miR-3196 na skutek trisomii 21 pary chromosomów, ponadto, regulują one geny związane z rozwojem ośrodkowego układu nerwowego, czy rozwój mózgu typowe dla dzieci z ZD.

5. Podsumowanie i wnioski

Pomimo dobrego poznania natury białaczek bez ZD oraz z ZD pozostaje nadal wiele pytań oraz niewiadomych do rozważenia pod kątem możliwości wykorzystania diagnostyki białaczek na tle genetycznym oraz wykorzystania ich do stworzenia innowacyjnych kierunków terapii pacjentów. Istnieje nadal mało pewnych onkogenów, które predysponują chorych do krótszego życia w remisji bez objawów klinicznych, czy krótszego przeżycia całkowitego, a dodatkowo interakcje między niektórymi nie są pewne. Zdecydowanie najmniej poznanym aspektem jest wpływ mikroRNA na powstawanie zaburzeń epigenetycznych prowadzących do rozwoju białaczek, możliwości wpływu na szlaki metaboliczne, geny oraz białka i enzymy. Jako, że fundamentalną i najmniej zbadaną funkcję mają cząsteczki mikroRNA, powinniśmy dążyć do szybszego i bardziej dogłębnego poznania ich roli w celu obrania najbardziej skutecznych metod diagnostyki chorych obarczonych Zespołem Downa, dążyć do opracowania metod leczenia obarczonych mniejszą śmiertelnością, specjalnie dobranych do pacjentów z ZD, którzy na co dzień borykają się z innymi wadami bądź chorobami.

6. Literatura

- Bache, I. et al. (2020) 'A shared somatic translocation involving CUX1 in monozygotie twins as an early driver of AMKL in Down syndrome', *Blood Cancer Journal*, 10(3), pp. 1–4. doi:10.1038/s41408-020-0293-6.
- Boucher, A.C. et al. (2021) 'Clinical and biological aspects of myeloid leukemia in Down syndrome', *Leukemia*, 35 pp. 3352–3360. doi:10.1038/s41375-021-01414-y.
- Cao, D. et al. (2021) 'Monozygotie twins discordant for homologous Robertsonian translocation trisomy 21 of 46, XX, +21, der (21;21) (q10; q10) in a twin-to-twin transfusion syndrome, case report', *BMC Pregnancy and Childbirth*, 21(1), p. 101. doi:10.1186/s12884-021-03587-x.
- Duroux-Richard, I. et al. (2016) 'miR-125b controls monocyte adaptation to inflammation through mitochondrial metabolism and dynamics', *Blood*, 128(26), pp. 3125–3136. doi:10.1182/blood-2016-02-697003.
- GUMUS, E. (2019) 'Two Rare Variants of Down Syndrome: Down-Turner Syndrome and Down Syndrome with Translocation (13;14): A Case Report', *Iranian Journal of Public Health*, 48(11), pp. 2079–2082.
- Jaiswal, A. et al. (2019) 'MicroRNA-99a mimics inhibit M1 macrophage phenotype and adipose tissue inflammation by targeting TNF α ', *Cellular & Molecular Immunology*, 16(5), pp. 495–507. doi:10.1038/s41423-018-0038-7.
- Labuhn, M. et al. (2019) 'Mechanisms of Progression of Myeloid Preleukemia to Transformed Myeloid Leukemia in Children with Down Syndrome', *Cancer Cell*, 36(2), pp. 123-138.e10. doi:10.1016/j.ccell.2019.06.007.
- Nguyen, L.X.T. et al. (2021) 'Cyttoplasmic DROSHA and non-canonical mechanisms of MiR-155 biogenesis in FLT3-ITD acute myeloid leukemia', *Leukemia*, 35(8), pp. 2285–2298. doi:10.1038/s41375-021-01166-9.
- Orozco-Vela, M. et al. (2020) 'Complete blood count differences in a cohort of Down syndrome neonates with transient abnormal myelopoiesis screened for GATA1 pathogenic variants', *American Journal of Medical Genetics Part A*, 182(9), pp. 2085–2093. doi:10.1002/ajmg.a.61748.
- Saito, Y. et al. (2020) 'Acute megakaryoblastic leukaemia with t(1;22)(p13·3;q13·1)/RBM15-MKL1 in an adult patient following a non-mediastinal germ cell tumour', *British Journal of Haematology*, 190(6), pp. e329–e332. doi:10.1111/bjh.16900.
- Salek-Ardakani, S. et al. (2009) 'ERG Is a Megakaryocytic Oncogene', *Cancer Research*, 69(11), pp. 4665–4673. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0075.

- Santoni, G. et al. (2021) 'ERK Phosphorylation Regulates the Aml1/Runx1 Splice Variants and the TRP Channels Expression during the Differentiation of Glioma Stem Cell Lines', *Cells*, 10(8), p. 2052. doi:10.3390/cells10082052.
- Sas, V. et al. (2020) 'MicroRNA-155-5p Plays a Critical Role in Transient Leukemia of Down Syndrome by Targeting Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Members.', *Cell Physiol Biochem*, pp. 994–1012.
- Short, N.J. et al. (2020) 'Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges', *Cancer Discovery*, 10(4), pp. 506–525. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1011.
- Stankiewicz, M.J. and Crispino, J.D. (2009) 'ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells', *Blood*, 113(14), pp. 3337–3347. doi:10.1182/blood-2008-08-174813.
- Sullivan, R.T., Frommelt, P.C. and Hill, G.D. (2017) 'Earlier Pulmonary Valve Replacement in Down Syndrome Patients Following Tetralogy of Fallot Repair', *Pediatric Cardiology*, 38(6), pp. 1251–1256. doi:10.1007/s00246-017-1653-2.
- Wester Oxelgren, U. et al. (2019) 'More severe intellectual disability found in teenagers compared to younger children with Down syndrome', *Acta Paediatrica*, 108(5), pp. 961–966. doi:10.1111/apa.14624.
- Yu, L. et al. (2020) 'Neutrophil elastase-mediated proteolysis of the tumor suppressor p200 CUX1 promotes cell proliferation and inhibits cell differentiation in APL', *Life Sciences*, 242, p. 117229. doi:10.1016/j.lfs.2019.117229.
- Zhang, G.-W. et al. (2018) 'Down-regulation of ETS2 inhibits the invasion and metastasis of renal cell carcinoma cells by inducing EMT via the PI3K/Akt signaling pathway', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, pp. 119–126. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.029.

10. MikroRNA w chłoniaku z komórek płaszczka

MicroRNAs in mantle cell lymphoma

Miśkiewicz Joanna^(1,2), Gola Joanna⁽²⁾

⁽¹⁾ Szkoła Doktorska, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekun naukowy: dr hab. n. med. Joanna Gola, prof. SUM

Miśkiewicz Joanna: d201010@365.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: chłoniaki, miRNA, apoptoza, proliferacja, onkogeneza

Streszczenie

Cząsteczki mikroRNA to małe, endogenne, jednoniciowe, niekodujące cząsteczki mikroRNA wykazujące zdolność regulowania ekspresji mRNA genu docelowego na podstawie komplementarności bądź częściowej komplementarności miRNA z 3'UTR mRNA. MiRNA kontroluje wzrost, podział, różnicowanie, embriogenezę, metabolizm, onkogenezę oraz apoptozę komórek. Zaobserwowano iż miRNA regulują ekspresję genów kodujących liczne onkogeny oraz supresory, a także same mogą spełniać rolę onkogenów/supresorów. MiRNA spełnia niepodważalną rolę w rozwoju wielu nowotworów, w tym nowotworów hematologicznych. Jednym z nich jest chłoniak z komórek płaszczka (MCL). MCL to rzadka choroba nowotworowa pochodząca z dojrzałych limfocytów B, charakteryzująca się szeregiem zaburzeń molekularnych, z których główną rolę odgrywa translokacja (11;14)(q13;q32) wpływająca na zwiększoną ekspresję genu kodującego cyklinę D1. MCL jest nieuleczalnym schorzeniem o przebiegu agresywnym i nawrotowym. Wciąż ogromnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny jest proces diagnostyczno-terapeutyczny MCL. Od lat trwają badania nad poznaniem molekularnych mechanizmów choroby, umożliwiających poznanie podstaw patogenetycznych a tym samym możliwych celów terapeutycznych. Z uwagi na powyższe zwrócono uwagę na rolę miRNA. Wielokrotne badania nad funkcją miRNA w MCL potwierdziły udział wielu cząsteczek w rozwoju omawianego schorzenia, w tym m.in. miR-155, miR-150, miR-17-92, miR-223, miR-15/miR-16-1 oraz miR-506. Dokładne poznanie mechanizmów molekularnych działania miRNA w MCL umożliwi poznanie nowych potencjalnych biomarkerów diagnostycznych, nowych celów terapeutycznych oraz rokowniczych.

1. Cząsteczki mikroRNA

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) to małe, liczące około 20 nukleotydów jednoniciowe, niekodujące cząsteczki, przeciwdziałające powstaniu konkretnego białka poprzez dwa odrębne mechanizmy. MikroRNA uczestniczą w wielu ważnych procesach biologicznych zarówno w stanie zdrowia, jak i choroby organizmu, takich jak: embriogeneza, różnicowanie, rozwój, metabolizm, onkogeneza oraz proces apoptozy komórek (Ha i Kim 2014). Ponadto sugeruje się iż miRNA mogą brać udział w komunikacji międzykomórkowej (Turchinovich i in. 2016).

Sekwencje mikroRNA występują w intronach pre-miRNA, a także eksonach lub intronach niekodujących RNA (Saliminejad i in. 2019; Kalla i in. 2015; Oszolak i in. 2008). Biogeneza cząsteczek obejmuje szlak kanoniczny i niekanoniczny. Geny kodujące cząsteczki mikroRNA ulegają transkrypcji w wyniku działania polimerazy RNA II (Pol II), jako pri-miRNA. W dojrzewaniu pri-miRNA zaangażowane są dwa enzymy: Dicer i Drosha należące do rodziny rybonukleaz III (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010). Kanoniczne cząsteczki pri-miRNA mają w swej strukturze czapkę 5'. W wyniku działania kompleksu składającego się z białka DGCR8 (DGCR8, ang. *DiGeorge syndrome Critical Region 8*) oraz enzymu Drosha, w jądrze, pri-miRNA ulegają przekształceniu w pre-miRNA. Proces ten polega na skróceniu cząsteczki do około 70-nukleotydowego produktu (García-López i in. 2013; Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010). DGCR8 oraz enzym Drosha tworzą kompleks nazywany Mikroprocesorem (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Ouellet i in. 2006). Utworzony pre-miRNA jest eksportowany do cytoplazmy poprzez

białko jądrowe związane z Ras oraz XPO5 (ang. *Exportin 5*) a następnie ulega rozszczepieniu (Lund i in. 2004). We wspomnianym procesie biorą udział trzy czynniki: enzym Dicer, białka AGO (ang. *Argonaut*) oraz białko TRBP (ang. *transactivating response RNA-binding protein*). Wśród białek AGO wyróżniamy dwie podrodziny: AGO oraz PIWI. W strukturze AGO wyróżniamy dwie domeny: PIWI, która wykazuje funkcję endorybonukleazy oraz domenę PAZ wiążącą RNA (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Bartel 2004). Enzym Dicer jest białkiem o masie ok. 200 kDa, które zawiera w swojej strukturze sześć domen: domenę PAZ, która odpowiada za wiązanie białek, domenę wiążącą dsRNA, domenę helikaza-ATPaza, dwie domeny katalityczne wykazujące aktywność RNazy III oraz DUF283 (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Ouellet i in. 2006). Dicer wykazuje powinowactwo do dwuniciowego RNA (dsRNA, ang. *double stranded RNA*), rozpoznając go i rozcinając (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Ouellet i in. 2006), co powoduje powstanie dsRNA, które zostaje zatrzymane w kompleksie RISC, rozpoznającym nić przewodnią dsRNA. Po degradacji staje się ona dojrzałą cząsteczką mikroRNA, zawierającą na końcu 5' sekwencję o długości 7 nukleotydów, która wiąże się z mRNA genu docelowego. Dojrzała cząsteczką mikroRNA pozostająca w kompleksie RISC, wykazuje zdolność nie tylko rozpoznawania mRNA docelowego ale również kontroluje jego ekspresję poprzez dwa mechanizmy (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Ouellet i in. 2006). W przypadku pełnej komplementarności między miRNA a mRNA, następuje proces hydrolizy mRNA przeprowadzany przez enzym Dicer. Proces ten powoduje rozszczepienie docelowego mRNA i został nazwany potranskrypcyjnym wyciszaniem genów (PTGS, ang. *Post-Transcriptional Gene Silencing*). Drugi mechanizm dotyczy hamowania syntezy białka w przypadku niepełnej komplementarności między mRNA a miRNA, po przyłączeniu cząsteczki mikroRNA do 3'UTR docelowego mRNA (Bartel 2004).

Drugim szlakiem biogenezy cząsteczek mikroRNA jest szlak niekanoniczny, który charakteryzuje się brakiem aktywności enzymu Drosha/DGCR8 bądź enzymu Dicer. Szlaki niekanoniczne wykorzystują kombinacje białek takich jak: enzym Dicer, enzym Drosha, exportyna 5 oraz białko Ago2. Przykładami pre-miRNA wytwarzanych przez szlak niezależny od Drosha/DGCR8 to mirtrony, powstające z intronów w trakcie splicingu oraz pre-miRNA z cząsteczką 7-metyloguanozyny (m7G) (Ruby i in. 2007; Babiarz i in. 2008; Xie i in. 2013). Pre-miRNA powstające bez enzymu Dicer, ulegają przetworzeniu przez enzym Drosha z transkryptów shRNA (ang. *short hairpin RNA*) o strukturze spinki do włosów. Dojrzwianie wspomnianych pre-miRNA, następuje w wyniku działania białek AGO2 (Yang i in. 2010).

Wieloletnie badania nad rolą cząsteczek mikroRNA w organizmach ujawniły ważną rolę miRNA w wielu procesach biologicznych oraz w utrzymaniu homeostazy organizmu. Ponadto wzięto pod uwagę, iż mikroRNA mogą regulować ekspresję licznych genów supresorowych oraz onkogennych. Cząsteczki mikroRNA mogą również same oddziaływać jako supresory oraz onkogeny (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010). Wiadomo iż mikroRNA może szczególnie kontrolować cykl komórkowy, proces proliferacji i śmierci komórek w wielu typach nowotworów, również w nowotworach hematologicznych, w tym w chłoniakach niezłośliwych. Jednym z typów nowotworów, w których miRNA odgrywa szczególną rolę w patogenezie i rozwoju schorzenia, jest chłoniak z komórek płaszczka.

2. Chłoniak z komórek płaszczka

Chłoniak z komórek płaszczka (ang. MCL, *mantle cell lymphoma*) to agresywny nowotwór hematologiczny, podtyp niezłośliwego chłoniaka (ang. NHL, *non-Hodgkin lymphoma*) z komórek B. Zaburzeniem genetycznym charakterystycznym dla MCL jest translokacja (11;14)(q13;q32) skutkująca nadekspresją cykliny D1 (Maddocks 2018; Szymczyk i Walewski 2010). MCL charakteryzuje się szybkim wzrostem jak w przypadku chłoniaków agresywnych oraz nieuleczalnością obserwowaną w przebiegu przewlekłym (Szymczyk i Walewski 2010).

Nazwa schorzenia odnosi się do pierwotnego zajęcia strefy płaszczka otaczającego część środkową (ośrodki rozmnażania) grudek chłonnych przez komórki nowotworowe. Wyodrębniono cztery cytologiczne typy MCL: blastoidalny, pleomorficzny, z małej komórki oraz klasyczny. Typ MCL z małej komórki jest podobny do przewlekłej białaczki limfocytowej. Wyróżnia się również

trzy histologiczne typy MCL: rozlany, grudkowy oraz strefy płaszcza (Szymczyk i Walewski 2010; Swerdlow i in. 2008; Bertoni i Ponzoni 2007).

Aktualna klasyfikacja MCL zaktualizowana w 2016 roku przez Światową Organizację Zdrowia wyróżnia dwa szlaki molekularne rozwoju omawianego chłoniaka. Jeden ze szlaków charakteryzuje się niezmutowanym lub zmutowanym w niewielkim stopniu, regionem zmiennym łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (IGHV, ang. *immunoglobulin heavy chain variable*) oraz ekspresją czynnika transkrypcyjnego SOX11 (ang. *SRY-Box Transcription Factor 11*). Drugi szlak molekularny rozwoju MCL obejmuje mutację IGHV oraz brak ekspresji SOX11 (Swerdlow i in. 2016). Ponadto zwrócono uwagę iż u niewielkiego odsetka osób chorych obserwuje się mutacje obejmujące NOTCH1/NOTCH2 (ang. *Notch signaling pathway 1/2*) oraz TP53 (ang. *Tumor protein p53*). Również stwierdzono iż rearanżacje CCND2 (ang. *cyclin D2*) występują w połowie przypadków MCL bez obecnej ekspresji cykliny D1 (Swerdlow i in. 2016).

W patogenezie MCL ważną rolę odgrywa cyklina D1, niewystępująca w prawidłowych limfocytach B. Jak wspomniano powyżej, nadekspresja wynika z translokacji genu kodującego cyklinę D1 - CCND1, z chromosomu 11q13 na 14q32 do części kodującej IGH_H. W wyniku wspomnianej mutacji następuje nadekspresja cykliny D1 co oddziałuje na dysregulację cyklu komórkowego w fazie G1-S. Cyklina D1 wiążąc się z cyklinami CDK4 oraz CDK6, powoduje przejście komórki do fazy S, w wyniku fosforylacji kompleksu retinoblastoma 1. Kluczowa w patogenezie MCL, jest również dysregulacja procesów naprawczych DNA oraz procesów umożliwiających przeżycie komórki. Opisane procesy patogenetyczne są warunkowane przez zmiany genetyczne w genach kodujących: CDKN2A (ang. *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), MYC, BCL2 (ang. *B-cell lymphoma 2*), SYK (ang. *Spleen Associated Tyrosine Kinase*), TP53 (ang. *tumor protein 53*) oraz ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) (Jares i in. 2007).

W celu rozpoznania choroby wykonuje się badania immunohistochemiczne, mające na celu potwierdzenie obecności antygenów dojrzałych limfocytów B, to znaczy: CD79a, CD43, CD22, CD19 oraz CD20, a także powierzchniowej immunoglobuliny M i/lub D. Pomocnym może być również potwierdzenie badaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji in-situ (FISH, ang. *fluorescence in situ hybridization*), obecności translokacji (11,14)(q13;q32) (Swerdlow i in. 2008; Bertoni i Ponzoni 2007; Jares i in. 2007; Walewski 2009).

W chwili rozpoznania choroby, większość chorych znajduje się w III lub IV stopniu zaawansowania ustalonym według klasyfikacji *Ann Arbor*, a ponadto stwierdza się zajęcie pozawęzłowe głównie dotyczące szpiku. Często dochodzi również do zajęcia, pod postacią polipów, przewodu pokarmowego. Ponadto w połowie przypadków proces choroby obejmuje śledzionę, w mniejszym stopniu zajęciu ulega wątroba, pierścień Waldeyera, ślinianki przyuszne, płuca, skóra, oczodół i gałki oczne oraz ośrodkowy układ nerwowy (Szymczyk i Walewski 2010; Romaguera i in. 2003; Martin i in. 2008; Martin, Coleman i Leonard 2009). Cechą charakterystyczną omawianego typu nowotworu jest częste występowanie krótkich okresów remisji, po następujących kolejnych zastosowanych, nieskutecznych schematach terapeutycznych. Jedną z odmian MCL – o powolnym przebiegu cechuje się złożonymi zmianami genetycznymi, ekspresją czynnika SOX11, mutacją w obrębie IGH_H (ang. *immunoglobulin variable heavy chain*), długim czasem przeżycia oraz brakiem zmian węzłowych (Szymczyk i Walewski 2010; Martin, Chadburn i in. 2009).

Celem oceny stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaka z komórek płaszcza wykonuje się: rutynowe badania laboratoryjne (morfologię, cytologię), biopsję szpiku oraz tomografię komputerową m.in. miednicy, jamy brzusznej oraz klatki piersiowej (Szymczyk i Walewski 2010). W zależności od wskazań klinicznych wykonuje się następujące badania: cytometria przepływową szpiku lub krwi, badania obrazowe ośrodkowego układu nerwowego, badanie endoskopowe przewodu pokarmowego oraz badanie płynu mózgowo-rdzeniowego (Szymczyk i Walewski 2010).

Leczenie chorych na MCL do dziś pozostaje wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Dotychczas dostępne metody terapeutyczne skutkują przejściową remisją, jednakże następują również nawroty choroby oraz współistniejąca oporność na stosowane leczenie. Pacjenci w ramach zaleceń diagnostyczno-terapeutycznych są włączani do badań klinicznych. W przypadku pacjentów pozostających w dobrej kondycji ogólnej oraz w dobrym stanie narządowym zaleca się zastosowanie immunochemioterapii R-CHOP, bądź R-hyper-CVAD/MA obejmującą: cyklofosfamid, winkrystynę,

deksametazon/naprzeniennie arabinozyd cytozyny, metotreksat, adriamycyna oraz rytuksymab. W następnej kolejności stosuje się leczenie mieloablacyjne oraz auto-HSCT (ang. *autologous hematopoietic stem cell transplantation*) – autologiczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (Szymczyk i Walewski 2010; Walewski 2009). Wybór zastosowanego leczenia jest uzależniony od ogólnego stanu pacjenta, jego wieku oraz występowania schorzeń współistniejących. Ponadto wybór jest uzależniony od możliwości zastosowania chemioterapii z auto-HSCT (Szymczyk i Walewski 2010).

Pomimo istotnego rozwoju medycyny wciąż trudnością pozostaje usystematyzowanie skutecznych schematów terapeutycznych oraz diagnostycznych. Nowym, potencjalnym graczem, okazują się być cząsteczki mikroRNA, które jak wspomniano w poprzedniej części wpływają na wiele ważnych procesów biologicznych. Okazuje się iż mikroRNA mogą istotnie wpływać na patogenezę, rozwój oraz oporność na wdrażane procesy terapeutyczne.

3. MikroRNA w chłoniaku z komórek płaszczu

Do chwili obecnej wciąż trwają badania nad profilem cząsteczek mikroRNA w chłoniaku z komórek płaszczu oraz nad poznaniem ich wpływu na molekularny mechanizm rozwoju schorzenia.

Jedną z cząsteczek poddanych analizie jest cząsteczka miR-155, ulegająca deregulacji w wielu chłoniakach z komórek B, T oraz NK, co sugeruje jej znaczącą rolę w patogenezie chłoniaków, w tym MCL. Yim i wsp. (Yim i in. 2014) wykazali iż miR-155-3p jest wyciszony w komórkach MCL w wyniku zaburzonej metylacji DNA. Wspomniany proces prowadzi do odwracalnego wyciszenia ekspresji poprzez dodanie grupy metylowej w pozycji piątej w pierścieniu cytozyny w sekwencji CpG w sekwencji promotora (Yim i in. 2014). Omawiana cząsteczka może hamować rozwój komórek nowotworowych poprzez celowanie w LT- β (ang. *Lymphotoxin-beta*), który wraz z LT- β R (ang. *Lymphotoxin-beta receptor*) aktywuje szlak sygnalizacyjny NF- κ B w komórkach MCL (Yim i in. 2014). Wyciszenie ekspresji miR-155-3p jest powiązane z nadekspresją LT- β .

Cząsteczka miR-150 okazuje się być istotnym czynnikiem supresyjnym. Celem miR-150 jest MET receptor czynnika wzrostu hepatocytów (HGF, ang. *hepatocyte growth factor*). Zarówno HGF jak i MET są ważne w rozwoju embrionalnym natomiast ich dysregulacja może przyczynić się do procesu nowotworzenia, co wykazano również w przypadku MCL (Zhang i in. 2020). MET może indukować kolejne szlaki sygnalizacyjne w tym: Raf/Ras oraz PI3K/AKT hamując proces apoptozy i pobudzając proliferację. Dokładny mechanizm molekularny działania MET w MCL nie został dokładnie zbadany, jednakże stwierdzono iż miR-150 negatywnie reguluje poziom ekspresji MET. Ponadto zwiększona ekspresja miR-150 wpływa hamująco na proliferację pierwotnych komórek nowotworowych w MCL oraz promującą na ich apoptozę (Zhang i in. 2020).

Nadekspresja klastra miRNA-17-92 w komórkach nowotworowych wykazuje silne działanie onkogenne poprzez hamowanie procesu apoptozy, pobudzenie proliferacji komórek a tym samym wpływ na wiele szlaków molekularnych co silnie oddziałuje na gorsze rokowanie u chorych na MCL. Okazuje się iż miR-17-92 może silnie wpływać na obniżenie wrażliwości komórek na radioterapię przy jednoczesnej nasilonej aktywności szlaku sygnalizacyjnego, promującego przeżycie komórek nowotworowych – PI3K/Akt, poprzez obniżenie ekspresji PHLPP2 oraz PTEN, negatywnie regulujących wspomniany szlak. PTEN zapobiega fosforylacji Akt a PHLPP2 defosforyluje Akt powodując jego inaktywację. MiRNA-17-92 obniżając poziom ekspresji PTEN i PHLPP2 indukuje wspomniany szlak, co skutkuje opornością na proapoptotyczne promieniowanie rentgenowskie (Jiang i in. 2010).

Zwrócono również uwagę na onkogeną funkcję klastra miR-17-92 oraz jego związek z czynnikiem transkrypcyjnym Myc, który uznano również za czynnik prognostyczny w chłoniaku z komórek płaszczu (Hartman i in. 2008; Navarro i in. 2009). Navarro i wsp. (Navarro i in. 2009) zbadali możliwy synergizm działania MYC oraz miR-17-5p/miR-20a wykazując zależność między wysokimi poziomami wspomnianych czynników a krótszym czasem całkowitego przeżycia. Obserwowana zależność nie dotyczyła wzrostu tylko jednego ze wspomnianych czynników (Navarro i in. 2009).

W większości przypadków MCL dochodzi do nadekspresji cykliny D1 uczestniczącej w progresji cyklu komórkowego w etapie G1-S. W wyniku łączenia cykliny D1 z kinazami CDK4/CDK6 (ang. *Cyclin-dependent kinase 4/6*) powodującymi dezaktywację białka RB1, co prowadzi do przejścia komórki w fazę S, w wyniku uwolnienia czynników E2F (Zhao i in. 2010). Zhao i wsp. wykazali iż bezpośrednim celem miR-29 jest CDK6. Ponadto wykazano iż obniżenie ekspresji miR-29 powoduje zwiększenie poziomu CDK6. Stąd wnioskuje się iż miR-29 spełnia rolę supresorową w patogenezie MCL (Zhao i in. 2010).

MiR-223 to kolejna cząsteczka o stwierdzonej deregulacji w MCL. Wspomniana cząsteczka wykazuje niższy poziom ekspresji w chłoniakach niezziarniczych w stosunku do poziomów uzyskanych u osób zdrowych. Szczególnie cząsteczka miR-223 miała niższe poziomy w chłoniaku z komórek z płaszczą (Zhou i in. 2012). Zhou i wsp. (Zhou i in. 2018) wykazali również w kolejnych badaniach obniżoną ekspresję cząsteczki miR-223 w porównaniu z grupą kontrolną, która stanowiła osoby zdrowe. Stwierdzono również korelację niskiej ekspresji miR-223 ze słabą przeżywalnością. Ponadto stwierdzono iż zwiększona ekspresja miR-223 wpływa na obniżenie żywotności i proliferacji komórek oraz nasilenie procesu apoptozy. Jako cel miRNA wskazano czynnik transkrypcyjny SOX11. Stwierdzono istotnie odwrotną korelację miR-223 oraz SOX11 w próbkach MCL. Z uwagi na powyższe miR-223/SOX11 może stanowić nowy cel terapeutyczny u pacjentów chorych na MCL (Zhou i in. 2018).

Stwierdzono iż poziom ekspresji klastra miR-15a/16-1, ulegającego kontroli epigenetycznej, są istotnie obniżone w chłoniaku z komórek płaszczą (Zhang i in. 2012). Ponadto z niekorzystnym rokowaniem, krótszym czasem przeżycia oraz chemoopornością wiąże się znacząco zwiększona ekspresja czynnika transkrypcyjnego Myc. Zhang i wsp. (Zhang i in. 2012). wykazali iż Myc wpływa, poprzez acetylację histonów na obniżenie aktywności transkrypcyjnej promotora cząsteczek miR-15a/ miR-16-1 w MCL. Ponadto stwierdzono iż zarówno Myc jak i deacetylaza histonowa 3 (HDAC3, ang. *histone deacetylase 3*) współdziałają w wyciszeniu ekspresji genu kodującego miR-15a/miR-16-1. Represja genu kodującego wspomniane cząsteczki miRNA, poprzez Myc, zachodzi w wyniku: hamowania transkrypcji poprzez modyfikację acetylacji histonów oraz hamowania aktywności polimerazy RNA II (Zhang i in. 2012).

Jako czynnik patogenetyczny w MCL, zdefiniowano również cząsteczkę B7-H3, znaną również jako CD276. Cząsteczka ta należąca do rodziny B7, wykazuje działanie kostymulujące reakcje immunologiczne, w tym produkcję interferonu γ (IFN- γ) oraz aktywację limfocytów T (Chapoval i in. 2001). Obniżenie poziomu B7H3 powoduje zahamowanie proliferacji i inwazji komórek MCL (Zhang i in. 2015). Zhu i wsp. wykazali istotnie wyższą ekspresję B7H3 u pacjentów chorych na MCL, co wskazuje na onkogenne działanie cząsteczki zarówno w rozwoju jak i progresji choroby. Ponadto badacze zwrócili uwagę na rolę miR-506, jako cząsteczki hamującej proliferację komórek oraz nasilenie chemowrażliwości i apoptozy komórek. W MCL, poziom miR-506 wykazywał istotnie obniżoną ekspresję, a ponadto wykazano iż mRNA B7H3 ulega obniżeniu pod wpływem wspomnianej cząsteczki miRNA. W związku z powyższym udowodniono iż B7H3 stanowi cel dla miR-506. Zarówno B7H3 jak i miR-506 mogą stanowić nowe, potencjalne cele terapeutyczne MCL (Zhu i in. 2019).

4. Podsumowanie

Chłoniak z komórek płaszczą to agresywny nowotwór hematologiczny charakteryzujący się bardzo szybkim wzrostem oraz nieuleczalnością. Jest rzadką postacią nowotworu wywodzącego się z dojrzałych limfocytów B. Obecnie medycyna zмага się nie tylko z trudnością wczesnego rozpoznania schorzenia ale również brakiem określonego schematu terapeutycznego. W związku z powyższym wciąż trwają intensywne badania nad zoptymalizowaniem procesu diagnostyczno-terapeutycznego. Coraz częściej zwraca się uwagę na rolę małych, niekodujących cząsteczek mikroRNA w patogenezie, rozwoju oraz chemooporności. Wielokrotne badania nad rolą miRNA w MCL ujawniły rolę cząsteczek, w tym m.in. miR-155, miR-150, miR-17-92, miR-223, miR-15/miR-16-1 oraz miR-506. Jednakże dokładne mechanizmy molekularne wpływające na rozwój omawianej choroby nie są do końca poznane. Dokładne poznanie mechanizmów molekularnych

wpływających na deregulację miRNA w MCL umożliwi poznanie nowych potencjalnych biomarkerów diagnostycznych oraz nowych celów terapeutycznych.

5. Bibliografia

- Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y. i in. (2008) Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development*. 22(20): 2773–2785.
- Bartel DP. (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell*, 116(2): 281–297.
- Bertoni F, Ponzoni M. (2007) The cellular origin of mantle cell lymphoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(10): 1747–1753.
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS. i in. (2001) B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nature Immunology*. 2(3): 269–274.
- García-López J, Briño-Enríquez MA, Del Mazo J. (2013) MicroRNA biogenesis and variability. *Biomolecular Concepts*. 4(4), 367–380.
- Ha M, Kim VN. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524.
- Hartmann E, Fernandez V, Moreno V. i in. (2008) Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Clinical Oncology*. 26(30): 4966–4972.
- Hukowska-Szematowicz B, Deptuła W. (2010) Biologiczna rola mikroRNA (miRNA) – nowe dane. *Postępy biologii komórki*. 37(3): 585–597.
- Jares P, Colomer D, Campo E. (2007) Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature Reviews. Cancer*. 7(10): 750–762.
- Jiang P, Rao EY, Meng N. i in. (2010) MicroRNA-17-92 significantly enhances radioresistance in human mantle cell lymphoma cells. *Radiation Oncology* 5, 100.
- Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA. i in. (2015) MicroRNAs: New players in IBD. *Gut*, 64(3), 504–517.
- Lund E, Güttinger S, Calado A. i in. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654): 95–98.
- Maddocks K. (2018) Update on mantle cell lymphoma. *Blood*. 132(16): 1647-1656.
- Martin P, Chadburn A, Christos P. i in. (2008) Intensive treatment strategies may not provide superior outcomes in mantle cell lymphoma: overall survival exceeding 7 years with standard therapies. *Annals of Oncology*. 19(7): 1327–1330.
- Martin P, Chadburn A, Christos P. i in. (2009) Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 27(8): 1209–1213.
- Martin P, Coleman M, Leonard JP. (2009) Progress in mantle-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 27(4): 481–483.
- Navarro A, Beà S, Fernández V. i in. (2009) MicroRNA expression, chromosomal alterations, and immunoglobulin variable heavy chain hypermutations in Mantle cell lymphomas. *Cancer Research*. 69(17):7071-7078.
- Ouellet DL, Perron MP, Gobeli LA. i in. (2006) MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2006: 69616.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z. i in. (2008) Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & Development*, 22(22): 3172–3183.
- Romaguera JE, Medeiros LJ, Hagemeister FB. i in. (2003) Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer*. 97(3): 586–591.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 448(7149):83–86.
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. (2019) An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology*. 234(5): 5451-5465.

- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. i in. (2008) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon 2008.
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA. i in. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 127 (20): 2375–2390.
- Szymczyk M, Walewski J. (2010) Chłoniak z komórek płaszczka — współczesne poglądy na diagnostykę i leczenie. *Hematologia*, 1(4): 330–341.
- Turchinovich A, Tonevitsky AG, Burwinkel B. (2016) Extracellular miRNA: A collision of two paradigms. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(10), 883–892.
- Walewski J. (2009) Pozostałe chłoniaki z dojrzałych obwodowych limfocytów B. W: Krzakowski M. (red.). Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Tom II. Via Medica, Gdańsk 2009: 574–597.
- Xie M, Li M, Vilborg A. i in. (2013) Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*. 155(7):1568–1580.
- Yang JS, Maurin T, Robine N. i in. (2010) Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(34): 15163–15168.
- Yim RLh, Wong KY, Kwong YL. i in. (2014) Methylation of miR-155-3p in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas. *Oncotarget*. 5(20): 9770-9782.
- Zhao JJ, Lin J, Lwin T. i in. (2010) microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 115 (13): 2630–2639.
- Zhang X, Chen X, Lin J. i in. (2012) Myc represses miR-15a/miR-16-1 expression through recruitment of HDAC3 in mantle cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Oncogene*. 31(24): 3002–3008.
- Zhang WJ, Chen FF, Wang YQ. i in. (2020) MiR-150 inhibits proliferation of mantle-cell lymphoma cells via regulation of MET. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 24(23):12063-12072.
- Zhang W, Wang Y, Wang J. i in. (2015) B7-H3 silencing inhibits tumor progression of mantle cell lymphoma and enhances chemosensitivity. *International Journal of Oncology*. 46(6): 2562-2572.
- Zhou K, Feng X, Wang Y. i in. (2018) miR-223 is repressed and correlates with inferior clinical features in mantle cell lymphoma through targeting SOX11. *Experimental Hematology* 58: 27-34.
- Zhou K, Yi S, Yu Z. i in. (2012) MicroRNA-223 expression is uniformly down-regulated in B cell lymphoproliferative disorders and is associated with poor survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 53 (6): 1155-1161.
- Zhu XW, Wang J, Zhu MX. i in. (2019) MicroRNA-506 inhibits the proliferation and invasion of mantle cell lymphoma cells by targeting B7-H3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 508(4): 1067-1073.

11. Wpływ deregulacji ekspresji cząsteczki miRNA-155 na rozwój chłoniaka rozlanego z dużych komórek B

Deregulation effect of miRNA-155 expression on the diffuse large B-cell lymphoma development

Miśkiewicz Joanna^(1,2), Gola Joanna⁽²⁾

⁽¹⁾ Szkoła Doktorska, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekun naukowy: dr hab. n. med. Joanna Gola, prof. SUM

Miśkiewicz Joanna: d201010@365.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: chłoniaki, mikroRNA, onkogeneza

Streszczenie

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL) należy do heterogenicznej grupy nowotworów wywodzących się z dojrzałych, obwodowych limfocytów B. DLBCL charakteryzuje się złożoną patogenezą uwzględniającą zarówno czynniki immunologiczne, infekcyjne, środowiskowe jak i genetyczne.

Wciąż trwające badania nad zrozumieniem molekularnego podłoża patogenetycznego, kierują się ku małym, niekodującym, jednoniciowym cząsteczkom mikroRNA umożliwiającym potranskrypcyjną regulację ekspresji genów docelowych. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie roli jednej z cząsteczek mikroRNA - miR-155, w patogenezie DLBCL. MiR-155 to cząsteczka fizjologicznie uczestnicząca w procesie humoralnej odpowiedzi immunologicznej oraz hematopoezie. Znaczną zmianę ekspresji zaobserwowano w wielu typach nowotworów, w tym w DLBCL. Wielokrotne badania wykazały jej zwiększoną ekspresję oraz wpływ na wiele szlaków i poziom ekspresji kluczowych czynników patogenetycznych, w tym m.in. wpływ na białka uczestniczące w procesie apoptozy (Bax/Bcl-2, kaspaza 3), wpływ na białka regulujące cykl komórkowy (cyklina B1, cyklina D1, CDK4), wpływa na TGFBR2, czynnik transkrypcyjny FOXO3, białko DEPTOR, wpływ na czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α), białko c-CBL oraz szlak PI3K-AKT.

Cząsteczka miR-155 może oddziaływać na wiele procesów stymulujących rozwój DLBCL, w tym nasilenie proliferacji, hamowanie apoptozy oraz zaburzenia cyklu komórkowego. Może więc stanowić istotny cel w postępowaniu terapeutycznym i diagnostycznym. Jednakże z uwagi na złożoność wpływu miR-155 na zaburzenia molekularne niezbędne są dalsze analizy oraz badania nad poznaniem roli wspomnianej cząsteczki.

1. Chłoniak rozlany z dużych komórek B

Chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL, ang. *diffuse large B cell lymphoma*) należy do grupy nowotworów układu chłonnego, wywodzących się z obwodowych, dojrzałych limfocytów B (Warzocha 2013, Chan 2010). Jest to najczęściej występująca grupa chłoniaków. Aktualnie DLBCL klasyfikuje się na podstawie wytycznych WHO (ang. *World Health Organization*) z 2016 roku, wyróżniając: DLBCL NOS (ang. *DLBCL not otherwise specified*) – DLBCL bliżej nieokreślony, THRLBCL (ang. *T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma*) – DLBCL z licznymi histiocytami i/lub komórkami T, DLBCL CNS (ang. *primary DLBCL of the central nervous system*) - DLBCL pierwotny, ośrodkowego układu nerwowego, DLBCL EBV+, DLBCL związany z przewlekłym zapaleniem, PCDLBCL-LT (ang. *primary DLBCL of the central nervous system*) (Swerdlow i in. 2016; Warzocha i Puła 2017).

Najczęstszym objawem sugerującym wystąpienie u pacjenta DLBCL są powiększone węzły chłonne bądź/ oraz obecność w obszarze pozawęzłowym guza. Z uwagi na wspomniany objaw, zalecaną metodą diagnostyczną jest biopsja bądź wycięcie chirurgiczne dla pozyskania materiału

diagnostycznego. W ostateczności przeprowadza się biopsję gruboigłową. Pozyskany materiał powinien zostać oceniony przez hemopatologa. Ponadto, w procesie diagnostycznym zostają uwzględnione badania laboratoryjne, w tym ocena parametrów biochemicznych nerek i wątroby, status wirusologiczny na obecność HCV, HBV, HIV bądź EBV, a także ocenę morfologii krwi (Swerdlow i in. 2016, Warzocha 2020). Zgodnie z zaleceniami WHO, koniecznością jest również przeprowadzenie badania immunohistochemicznego, a także w miarę możliwości również badania fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. *fluorescent in-situ hybridization*) umożliwiającego diagnozowanie rearanżacji genu *MYC*. Obecność translokacji *MYC* wymusza dalsze badania oceniające poziom ekspresji genów *BCL-6* oraz *BCL-2* (Warzocha 2020; Hans i in. 2004; Obermann i in. 2009; Aukema i in. 2014). Po skutecznym rozpoznaniu należy w jak najszybszym czasie wdrożyć leczenie zgodne ze schematami terapeutycznymi z uwzględnieniem zaawansowania choroby, wiekiem, czynnikami rokowniczymi oraz chorobami towarzyszącymi. Podstawowy schemat leczenia jest oparty na systemie R-CHOP uwzględniający radioterapię z cyklofosfamidem, winkrystyną, rytuksymabem, doksorubicyną oraz prednizonem. Liczba cykli schematu zależy od rozległości zmian oraz zaawansowania choroby (Warzocha 2013). W przypadku nawrotu DLBCL bądź oporności na stosowane leczenie, przeprowadza się ocenę zaawansowania omawianego schorzenia oraz biopsję potwierdzającą diagnozę. U pacjentów chorych na DLBCL, ale pozostających w dobrym stanie, zaleca się chemioterapię wysokodawkowaną oraz procedurę autologicznego przeszczepiania krwiotwórczych komórek macierzystych (auto-HSCT, ang. *autologous hematopoietic stem cell transplantation*) (Warzocha 2020; Hamlin i in. 2003; Spaepen i in. 2003).

DLBCL można różnicować m.in. ze względu na morfologię (typ immunoblastyczny, anaplastyczny, centroblastyczny), nieprawidłowości genetyczne czy powiązania wirusowe. Zastosowanie mikromacierzy umożliwia lepsze zrozumienie patogenezy dzięki poznaniu unikalnych profili genów (Chan 2010; Iqbal i in. 2009). Profilowanie ekspresji genów pozwoliło na wyodrębnienie dwóch głównych podtypów DLBCL, zróżnicowanych pod względem zaburzeń genetycznych: ABC-DLBCL (ang. *activated B-cell*) – DLBCL wywodzący się aktywowanych komórek B oraz podtyp GCB-DLBCL (ang. *germinal center B-cell*) prezentujący zestaw genów wyrażanych przez komórki B centrum rozmnażania (Chan 2010).

Podtyp ABC-DLBCL charakteryzuje się aktywacją kompleksu CBM, który wpływa na indukcję szlaku NF- κ B, a tym samym na zwiększoną ekspresję genów kodujących czynniki antyapoptotyczne, m.in. *Bcl-2* (Bielska i in. 2013; Frick i in. 2012). W podtypie ABC dochodzi również do aktywacji szlaku NF- κ B, częściej obserwowanej w podtypie ABC niż w podtypie GCB. Analizy wykazały iż mutacje określonych regulatorów szlaku NF- κ B mogą być odpowiedzialne za przypadki jego aktywacji. Dochodzi m.in. do mutacji w genach kodujących *CARD11* (ang. *Caspase Recruitment Domain Family Member 11*), *TNFRSF11A* (ang. *TNF Receptor Superfamily Member 11a*), *RANK* (ang. *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B*), *TRAF2* (ang. **TNF Receptor Associated Factor 2**), *TNFAIP3* (ang. *TNF Alpha Induced Protein 3*) oraz *TRAF5* (ang. *TNF Receptor Associated Factor 5*) (Chan 2010; Compagno i in. 2009; Honma i in. 2009). W podtypie ABC dochodzi do niepełnego przekształcania limfocytów B w komórki plazmatyczne na skutek zaburzeń funkcjonalnych genu *Blimp-1* (ang. *B lymphocyte induced maturation protein 1*). Zaburzenia różnicowania warunkuje również delecja genów *PRDM1* (ang. *PR/SET Domain 1*) oraz *IRF4* (ang. **Interferon Regulatory Factor 4**) (Bielska i in. 2013; Juszczynski 2010). Czynnikiem zaangażowanym w zaburzenia apoptozy i regulację cyklu komórkowego w podtypie ABC jest również białko *MYC* (ang. *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*) (Bielska i in. 2013; Nedomova i in. 2013; Kluk i in. 2012).

Defektem molekularnym w GCB-DLBCL jest translokacja genu kodującego białko *BCL-2*, skutkujące jego nadekspresją i hamowaniem apoptozy komórek nowotworowych DLBCL (Bielska i in. 2013, Nedomova i in. 2013, Durnick i in. 2010). Jednakże najczęstszym zaburzeniem w podtypie GCB-DLBCL jest nadekspresja genu *BCL-6* (ang. *B-cell CLL/lymphoma 6*). Wspomniane białko odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu limfocytów B, właściwego formowania centrów rozmnażania oraz kontroli cyklu komórkowego (Frick i in. 2012; Prusisz i in. 2012; Wagner i in. 2010). *BCL-6* hamuje ekspresję genów, które wpływają na regulację cyklu komórkowego, proces programowanej śmierci komórki oraz reakcję komórki na uszkodzenia materiału DNA, hamując

wejście na drogę apoptozy poprzez inhibicję genów *TP53* (ang. *tumor protein p53*), *CHEK1* (ang. *checkpoint kinase 1*) oraz *ATR* (ang. *ataxia telangiectasia and Rad3 related*) (Bielska i in. 2013; Gouveia i in. 2012). BCL-6 reguluje inhibitory cyklu komórkowego p27 (CDKN1B, ang. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*) oraz p21 (CDKN1A, ang. *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) (Frick i in. 2012; Cerchietti i in. 2010). Ponadto u pacjentów chorych na DLBCL z podtypem GCB, zachodzi delecja w genie *P TEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), regulatorze szlaku PI3K/AKT (Bielska i in. 2013). Rozwój DLBCL może również wiązać się z mutacjami w genie kodującym FAS, a także nadekspresją antyapoptycznego genu kodującego białko cFLIP (ang. *Cellular FLICE-like inhibitory protein*) (Chan 2010; Takahashi i in. 2006).

Patogeneza DLBCL pomimo wielu lat badań i wielokrotnych analiz wymaga dalszych wnikliwych badań nad molekularnymi szlakami patogenetycznymi. Wciąż pojawiające się trudności w diagnostyce i terapii stanowią wyzwanie dla medycyny. Wśród nowych rozwiązań nadziei upatruje się w cząsteczkach mikroRNA. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie wpływu jednej z cząsteczek - miR-155, w patogenezie omawianej choroby nowotworowej.

2. Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz miR-155

MikroRNA (miRNA) to krótkie, liczące od 19 do 25 nukleotydów, niekodujące, jednoniciowe cząsteczki wykazujące zdolność potranskrypcyjnej regulacji genów docelowych. Cząsteczki mikroRNA wykazują wpływ regulacyjny na ekspresję transkryptów homologicznych do genu docelowego. Regulacja jest możliwa dzięki pełnej bądź częściowej komplementarności miRNA do docelowego mRNA. W pierwszym przypadku dochodzi do rozszczepienia docelowego mRNA, natomiast w drugim zachodzi hamowanie syntezy białka (Lu i Rothenberg 2018).

Geny kodujące miRNA występują zarówno w intronach oraz eksonach. Mogą być również umiejscowione w miejscach niepodlegających translacji (Grenda i in. 2013; Isik i in. 2010). Geny są zorganizowane w skupiskach, charakterystycznie dla działania polimerazy II i III (Borchert i in. 2006; Lee i in. 2002; Lee i in. 2004). Wyróżnia się dwa szlaki biogenezy cząsteczek mikroRNA: kanoniczny i niekanoniczny.

W kanonicznym szlaku biogenezy mikroRNA, primiRNA (pierwotne miRNA) są transkrybowane przez polimerazę III RNA, a następnie przetwarzane w pre-miRNA przez kompleks tzw. mikroprocesor. Kompleks składa się wielobiałkowej jednostki, zbudowanej z białek związanych z RBA, rybonukleoproteiny, dsRNA oraz rodziny białek mięsaka Ewinga. Druga podjednostka składa się z białka DGCR8 (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) oraz enzymu Drosha (Annese i in. 2020; Ha i Kim 2014; Han i in. 2004; Okada i in. 2009; Gregory i in. 2004). Mikroprocesor wykazuje zdolność rozcinania określonego motywu primiRNA, u podstawy struktury spinki do włosów. Utworzony pre-miRNA jest transportowany do cytoplazmy z jądra komórkowego poprzez kompleks związany z RAS białka jądrowego - guanozyno-5'-trifosforanazy oraz eksportyny 5 (Annese i in. 2020; Okada i in. 2009). Kolejny etap modyfikacji pre-miRNA odbywający się w cytoplazmie, polega na usunięciu końcowej pętli przez endonukleazę Dicer RNazy III, skutkując powstaniem krótkich dupleksów miRNA, dołączanych ostatecznie do wieloskładnikowego kompleksu RISC (Annese i in. 2020; Han i in. 2004; Okada i in. 2009; Gregory i in. 2004; Cullen 2004; Liu i in. 2008; Noland i Doudna 2013). Kompleks RISC jest zbudowany z: składnika katalitycznego RISC 2 (Ago2), białka zawierające domenę nukleazy gronkowcowej 1 (SND1, ang. *Staphylococcal Nuclease And Tudor Domain Containing 1*), białka Aubergine z rodziny Ago, genu o podwyższonym poziomie astrocytów (AEG-1, ang. *Astrocyte Elevated Gene-1*), FMR1 (ang. *Fragile X Mental Retardation 1*), VIG (ang. *vasa intronic gene*), R2D2 (ang. *a dsRNA binding protein with two dsRNA binding domains*) oraz helikazy Armitrage-RNA1 (Annese i in. 2020; Noland i Doudna 2013; Santhekadur i Kumar 2020; van den Berg i in. 2008). Nić miRNA, ulegająca włączeniu do kompleksu RISC jest nicią aktywną, natomiast druga nić oznaczana jako miR*, nazywana również nicią pasażerską, ulega degradacji (Annese i in. 2020; Meijer i in. 2014). Cały kompleks RISC jest kierowany do konkretnego mRNA, wpływając na jego stabilność oraz hamując etapy syntezy białek (Annese i in. 2020; Filipowicz i in. 2008).

Niekanoniczny szlak biogenezy miRNA, powstaje w wyniku kombinacji białek uczestniczących w szlaku kanonicznym. Z uwagi na wspomniany fakt wyróżnia się dwa rodzaje

szlaku niekanonicznego: szlak Dicer-niezależny oraz szlak Drosha/DGCR8-niezależny. Przykładem Dicer-niezależnego powstawania miRNA jest biogeneza cząsteczki miR-451 – powstawanie pre-miRNA następuje w wyniku uwolnienia przez enzym Drosha, natomiast w cytoplazmie jest przyłączany do Ago2 (Annese i in. 2020; Cheloufi i in. 2010). Powstawanie miRtronów to przykład szlaku Drosha/DGCR8-niezależnego, w którym pri-miRNA są przetwarzane przez splicing a nie w wyniku działania mikroprocesora (Annese i in. 2020; Ruby i in. 2007).

W niniejszej pracy zostanie omówiona jedna z cząsteczek miRNA - miR-155 występująca w eksonie 3 (21q21.3) ludzkiego chromosomu 21 (Zheng i in. 2020). MiR-155 uczestniczy w immunologicznej odpowiedzi humoralnej oraz hematopoezie (Zhu i in. 2016). Badania i analizy prowadzone w ostatnich latach wykazały iż miR-155 jest związany z patogenezą wielu nowotworów w tym z rozwojem DLBCL.

3. Cząsteczka miR-155 w DLBCL

MiR-155 okazuje się być istotnym regulatorem molekularnych szlaków patogenetycznych chłoniaka rozlanego z dużych komórek B. U pacjentów chorych na DLBCL wykazano wyższą ekspresję miR-155 promującą nowotworzenie. Badając możliwy wpływ regulacyjny miR-155 na szlaki molekularne ustalono hamujący wpływ cząsteczki na poziom ekspresji czynnika FOXO3 (ang. *Forkhead Box O3*) sprzyjając tym samym nasiloniej proliferacji oraz hamując proces programowanej śmierci komórki (Zheng i in. 2020). Zheng i wsp. badając zależności między miR-155 i FOXO3 a cechami kliniczno-patologicznymi wysnuli wniosek iż wskazane zależności są ściśle związane z 5-letnim przeżyciem pacjentów oraz wartością wyniku międzynarodowego wskaźnika prognostycznego IPI (ang. *international prognostic index*). Wysoka ekspresja miR-155 i niska ekspresja FOXO3 sugerują złe rokowanie pacjentów chorych na DLBCL (Zheng i in. 2020).

Cząsteczka miR-155 istotnie wpływa na regulację cyklu komórkowego. Zhu i wsp. wykazali iż obniżenie ekspresji miR-155 wpływa na zatrzymanie progresji cyklu komórkowego w fazie G0/G1, hamując proliferację komórek nowotworowych. Przeciwnie – zwiększenie ekspresji miR-155 nasila przejście cyklu w fazę S a tym samym nasilenie proliferacji komórkowej (Zhu i in. 2016). MiR-155 reguluje ekspresję białek skorelowanych z cyklem komórkowym oraz apoptozą. Wykazano dodatnią korelację między miR-155 a cykliną D1, cykliną B1 oraz CDK4. Wzrost ekspresji D1 oraz CDK4 wpływa na progresję cyklu komórkowego do fazy S. Wykazano iż zwiększenie ekspresji miR-155 skutkuje obniżeniem stosunku proapoptotycznego białka Bax do antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz obniżeniem poziomu kaspazy 3 (Zhu i in. 2016). Omawiana cząsteczka mikroRNA wpływa również na poziom wydzielania prozapalnego czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor α*) oddziałującego na generowanie cytokin tj.: IL-1b, IL-10 oraz IL-6 (Zhu i in. 2016). Cząsteczka miR-155 może również regulować proces apoptozy poprzez regulację ekspresji receptora transformującego czynnika wzrostu 2 (TGFB2, ang. *Transforming Growth Factor Beta Receptor 2*). TGF- β to cytokina która wpływa na wiele ważnych procesów komórkowych w tym wzrost, różnicowanie, formowanie, migrację komórek oraz procesy chemotaksji i programowanej śmierci komórki (Zhu i in. 2016; Stępień-Wyrobiec i in. 2008). Wiadomo iż poprzez zwiększony poziom miR-155, poziom TGFB2 ulega obniżeniu, co wpływa znacząco na hamowanie procesu apoptozy (Zhu i in. 2016).

Jednym z markerów prognostycznych chłoniaka DLBCL jest szlak PI3K-AKT regulowany przez wiele czynników (Uddin i in. 2006). Dotychczasowe badania wykazały iż pod regulacyjnym wpływem miR-155 pozostają fosfataza SHIP1, kinaza WEE1 oraz p85 (Huang i in. 2012). Analiza przeprowadzona przez Huang i wsp. wykazała iż wzrost ekspresji miR-155 bezpośrednio celuje w p85 powodując obniżony poziom jego ekspresji (Huang i in. 2012). Represja poziomu p85 indukuje AKT a tym samym wspomniany wyżej szlak skutkując nasiloną proliferacją oraz hamowaniem programowanej śmierci komórek nowotworowych. Innym zidentyfikowanym negatywnym regulatorem szlaku PI3K-AKT jest SHIP1, którego ekspresja jest również hamowana przez miR-155, a tym samym podobnie jak p85, dochodzi do aktywacji AKT (Uddin i in. 2006).

Kluczową rolę w patogenezie DLBCL odgrywa czynnik transkrypcyjny NF- κ B, będący regulatorem odpowiedzi immunologicznej, powiązany z indukcją zapaleń, chorobami autoimmunologicznymi, zakażeniami oraz rozwojem chorób nowotworowych. NF- κ B, z uwagi na to,

iz wykazuje zdolność indukcji proliferacji, hamowania apoptozy, a także nasila proces angiogenezy, może być kluczowym czynnikiem progresji nowotworu (Skórka i Giannopoulos 2021). W badaniach Jabłońska i wsp. wskazali na wpływ regulacyjny miR-155 na ekspresję genów kodujących CD40 (ang. *cluster of differentiation 40*), RelB (ang. *RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit*), IκBα (ang. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), BCL2A1 (ang. *BCL2 Related Protein A1*) oraz TNFAIP3/A20 (ang. *TNF Alpha Induced Protein 3*) zależnych od NF-κB (Jabłońska i in. 2020). Hamowanie ekspresji miR-155 w komórkach nowotworowych spowodowało blokowanie ekspresji wymienionych wyżej genów kontrolowanych przez NF-κB, Wspomniane wyniki sugerują, iż cząsteczka miR-155 wpływa na modulację ekspresji genów zależnych od czynnika NF-κB. (Jabłońska i in. 2020).

MiR-155 wykazuje zdolność regulacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej DLBCL, w tym między innymi reguluje sygnalizację BCR poprzez celowanie w białka DEPTOR oraz c-CBL (ang. *casitas B lineage lymphoma*) (Jabłońska i in. 2020). C-CBL, należące do rodziny białek CBL, to wielofunkcyjne białko wykazujące aktywność ligazy ubikwityny E3, biorącej udział w procesie ubikwitynacji i degradacji białka (Lyle i in. 2019). W komórkach B, wspomniane białko, uczestniczy m.in. w aktywacji tolerancji immunologicznej, dojrzewaniu powinowactwa przeciwciał oraz uczestniczy w kontroli ośrodka rozmnażania (Jabłońska i in. 2020; Li i in. 2019). Z uwagi na fakt iż c-CBL pełni funkcje supresorowe wobec nowotworów, obniżenie jego ekspresji może oddziaływać indukująco na sygnalizację BCR (Li i in. 2019).

Białko DEPTOR, zidentyfikowane jako onkogen sprzyjający wzrostowi i przeżyciu komórek nowotworowych, moduluje szlak mTOR oraz niektóre czynniki takie jak BCL6, PAX5 (ang. *Paired Box 5*) oraz IRF4 (ang. **Interferon Regulatory Factor 4**) (Jabłońska i in. 2020; Peterson i in. 2009; Quwaider i in. 2017). Jabłońska i wsp. wykazali całkowitą utratę ekspresji DEPTOR w typach DLBCL innych niż GCB, a ponadto stwierdzono iż szlak NF-κB hamuje transkrypcję czynnika DEPTOR (Jabłońska i in. 2020). W badaniach Yu i wsp. wykazali, iż jedna z podjednostek szlaku NF-κB - p65 blokuje ekspresję mRNA DEPTOR (Yu i in. 2016). Stwierdzono iż nadekspresja p65 tłumi aktywność promotorów DEPTOR (Jabłońska i in. 2020). Należy również uwzględnić fakt iż DEPTOR moduluje ekspresję i migrację cytokin, w tym m.in. czynnik martwicy nowotworów TNF-α, IL-6 oraz IL-8, których ekspresja jest również modulowana przez miR-155. Jabłońska i wsp. W swoich badaniach wykazali, iż blokada czynnika DEPTOR skutkuje nasileniem ekspresji mRNA wymienionych cytokin. Ponadto, jego obniżona ekspresja wpływa na nasilenie migracji nowotworowych komórek DLBCL. Wspomnieni autorzy zaobserwowali również, iż nasilone mRNA DEPTOR jest skorelowane z dłuższym czasem przeżycia pacjentów chorych na DLBCL (Jabłońska i in. 2020).

4. Podsumowanie

Chłoniak rozlany z dużych komórek B należy do jednego z najbardziej agresywnych chłoniaków, o szybkim przebiegu. Pomimo sprecyzowanych schematów diagnostyczno-terapeutycznych, proces ten nie zawsze okazuje się skuteczny, stąd uzasadnienie mają wciąż trwające na świecie badania nad dogłębną analizą patogenezy. Analizy naukowców często skupiają się wokół cząsteczek mikroRNA, mających szczególnie i silny wpływ na ekspresję genów docelowych, regulujących wiele ważnych szlaków molekularnych. Wiele dotychczasowych badań i analiz wykazało istotny wpływ miR-155 na szereg procesów patogenetycznych w DLBCL. Poprzez wpływ na czynniki kontrolne cyklu komórkowego, białka proapoptotyczne i antyapoptotyczne oraz wiele kluczowych szlaków sygnałowych, może stanowić ważny cel molekularny w opracowywaniu procesu diagnostyczno-terapeutycznego. Jednakże koniecznością są dalsze badania nad dokładniejszym poznaniem mechanizmów molekularnego oddziaływania miR-155.

5. Bibliografia

Annese T, Tamma R, De Giorgis M, Ribatti D. (2020) *MicroRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis*. *Frontiers in Oncology*. 10, 581007.

- Aukema SM, Kreuz M, Kohler CW. i in. (2014) *Biological characterization of adult MYC-translocationpositive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma*. *Haematologica*. 99(4): 726–735.
- Bielska M, Lech-Marañda E, Pastorczak A, Młynarski W. (2013) *Onkogenne zaburzenia molekularne w podtypach chłoniaków rozlanych z dużych komórek B*. *Hematologia*. 4 (4): 333–338.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. (2006) *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. *Nature Structural & Molecular Biology*. 13(12): 1097–1101.
- Cerchietti LC, Ghetu AF, Zhu X. i in. (2010) *A small molecule inhibitor of BCL6 kills DLBCL cells in vitro and in vivo*. *Cancer Cell*. 17(4): 400–411.
- Chan WJ. (2010) *Pathogenesis of diffuse large B cell lymphoma*. *International Journal of Hematology*. 92(2): 219–230.
- Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, Hannon GJ. (2010) *A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis*. *Nature*. 465(7298):584–589.
- Compagno M, Lim WK, Grunn A. i in. (2009) *Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma*. *Nature*. 459(7247): 717–721.
- Cullen BR. (2004) *Transcription and processing of human microRNA precursors*. *Molecular Cell*. 16(6): 861–865.
- Durnick DK, Law ME, Maurer MJ. i in. (2010) *Expression of LMO2 Is associated with t(14;18)/IGH-BCL2 fusion but not BCL6 translocations in diffuse large B-cell lymphoma*. *American Journal of Clinical Pathology*. 134(2): 278–281
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) *Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* *Nature Reviews. Genetics*. 9(2): 102–114.
- Frick M, Dörken B, Lenz G. (2012) *New insights into the biology of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma*. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. 25(1): 3–12.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G. i in. (2004) *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. *Nature*. 432(7014) :235–240
- Grenda A, Budzyński M, Filip AA. (2013) *Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz ich znaczenie w powstawaniu i przebiegu wybranych zaburzeń hematologicznych*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 67:174–185.
- Gouveia GR, Siqueira SA, Pereira J. (2012) *Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma*. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 34(6): 447–451.
- Ha M, Kim VN. (2014) *Regulation of microRNA biogenesis*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15(8):509–524.
- Hamlin PA, Zelenetz AD, Kewalramani T. i in. (2003) *Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma*. *Blood*. 102(6): 1989–1996
- Han J, Lee Y, Yeom KH. i in. (2004) *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes & Development*. 18(24):3016–3027
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC. i in. (2004) *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. *Blood*. 103(1): 275–282.
- Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M. i in. (2009) *TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas*. *Blood*. 114(12):2467–2475.
- Huang X, Shen Y, Liu M. i in. (2012) *Quantitative proteomics reveals that miR-155 regulates the PI3K-AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma*. *The American Journal of Pathology*. 181(1):26-33.
- Isik M, Korswagen HC, Berezikov E. (2010) *Expression patterns of intronic microRNAs in Caenorhabditis elegans*. *Silence*. 1(1): 5.
- Iqbal J, Liu Z, Deffenbacher K, Chan WC. (2009) *Gene expression profiling in lymphoma diagnosis and management*. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*. 22(2):191–210.

- Jabłońska E, Białopiotrowicz E, Szydłowski M. i in. (2020) *DEPTOR is a microRNA-155 target regulating migration and cytokine production in diffuse large B-cell lymphoma cells*. *Experimental Hematology*. 88: 56-67.
- Juszczyński P. (2010) *Struktura genetyczna chłoniaków rozlanych z dużych komórek B: od mikromacierzy DNA do celowanej terapii*. *Hematologia*. 1(1): 15–28.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT. i in. (2002) *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. *The EMBO Journal*. 21(17): 4663-4670.
- Lee Y, Kim M, Han J. i in. (2004) *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *The EMBO Journal*. 23(20): 4051-4060.
- Li X, Gong L, Gu H. (2019) *Regulation of immune system development and function by Cbl-mediated ubiquitination*. *Immunological Reviews*. 291(1) :123–133.
- Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. (2008) *MicroRNAs: biogenesis and molecular functions*. *Brain Pathology*. 18(1): 113–121.
- Lu TX, Rothenberg ME. (2018) *MicroRNA*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 141(4): 1202-1207.
- Lyle CL, Belghasem M, Chitalia VC. (2019) *c-Cbl: An Important Regulator and a Target in Angiogenesis and Tumorigenesis*. *Cells*. 8(5):498.
- Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P. i in. (2012) *Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas*. *PLoS One*.7(4): e33813.
- Meijer HA, Smith EM, Bushell M. (2014) *Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?* *Biochemical Society Transactions*. 42(4): 1135–1140.
- Nedomova R, Papajik T, Prochazka V. i in. (2013) *Cytogenetics and molecular cytogenetics in Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL)*. *Biomedical papers of Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 157(3): 239–247.
- Noland CL, Doudna JA. (2013) *Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways*. *RNA*. 19(5): 639–648.
- Obermann EC, Csato M, Dirnhofner S, Tzankov A. (2009) *Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment*. *Journal of Clinical Pathology*. 62(8): 754–756.
- Okada C, Yamashita E, Lee SJ. i in. (2009) *A high-Resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. *Science*. 326(5957): 1275–1279.
- Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC. i in. (2009) *DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival*. *Cell*. 137(5): 873–886.
- Prusisz W, Sewastianik T, Juszczyński T. (2012) *Molekularne mechanizmy działania i patogenetyczna rola deregulacji BCL6 w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B — implikacje kliniczne i terapeutyczne*. *Hematologia*. 3(4): 302–312.
- Quwaider D, Corchete LA, Misiewicz-Krzeminska I. i in. (2017) *DEPTOR maintains plasma cell differentiation and favorably affects prognosis in multiple myeloma*. *Journal of Hematology & Oncology*. 10(1): 92.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. (2007) *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. *Nature*. 448(7149): 83–86.
- Santhekadur PK, Kumar DP. (2020) *RISC assembly and post-transcriptional gene regulation in Hepatocellular Carcinoma*. *Genes & Diseases*. 7(2):199–204.
- Skórka K, Giannopoulos K. (2021) *Budowa i funkcje jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB) oraz jego znaczenie w przewlekłej białaczce limfocytowej*. *Acta Haematologica Polonica*. 43(1): 54-62.
- Spaepen K, Stroobants S, Dupont P. i in. (2003) *Prognostic value of pretransplantation positron emission tomography using fluorine 18-fluorodeoxyglucose in patients with aggressive lymphoma treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation*. *Blood*. 102(1): 53–59
- Stępień-Wyrobiec O, Hrycek A, Wyrobiec G. (2008) *Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta) – budowa, mechanizmy oddziaływania oraz jego rola w patogenezie toczenia rumieniowatego układowego*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 62: 688-693.

- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA. i in. (2016) *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. Blood. 127(20): 2375–2390.
- Takahashi H, Feuerhake F, Kutok JL. i in. (2006) *FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes*. Clinical Cancer Research. 12(11 Pt 1): 3265–3271.
- Uddin S, Hussain AR, Siraj AK. i in. (2006) *Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival*. Blood. 108(13): 4178–4186.
- van den Berg A, Mols J, Han J. (2008) *RISC-target interaction: cleavage and translational suppression*. Biochimica et Biophysica Acta. 1779(11): 668–677.
- Wagner SD, Ahearne M, Ferrigno PK. (2010) *The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy*. British Journal of Haematology. 152(1): 3–12.
- Warzocha K. (2013) *Chłoniak rozlany z dużych komórek B — zasady postępowania w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii*. Hematologia, 4(2): 123–136.
- Warzocha K. (2020) *Chłoniaki rozlane z dużych komórek B*. Onkologia w Praktyce Klinicznej – Edukacja, Tom 6, Supl. A: 411-438.
- Warzocha K, Puła B. (2017) *Rozpoznanie i leczenie chorych na chłoniaka rozlanego z dużych komórek B*. Hematologia. 8(2): 113-131.
- Yu X, Jin D, Yu A. i in. (2016) *p65 down-regulates DEPTOR expression in response to LPS stimulation in hepatocytes*. Gene. 589(1):12–19.
- Zheng X, Rui H, Liu Y, Dong J. (2020) *Proliferation and apoptosis of B-cell lymphoma cells under targeted regulation of FOXO3 by miR-155*. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases. 12(1): e2020073
- Zhu FQ, Zeng L, Tang N. i in. (2016) *MicroRNA-155 Downregulation Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. Oncology Research. 24(6): 415-427.

12. Podocytes. Small cells with huge responsibilities

Parfienowicz Zuzanna, Krętowska Magdalena, Starosz Aleksandra

Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Opiekun naukowy: dr n. med. Kamil Grubczak

Parfienowicz Zuzanna : zuzanna.parfienowicz@gmail.com

Słowa kluczowe: podocytopathies, glomerulus, MCD, FSGS, DMS

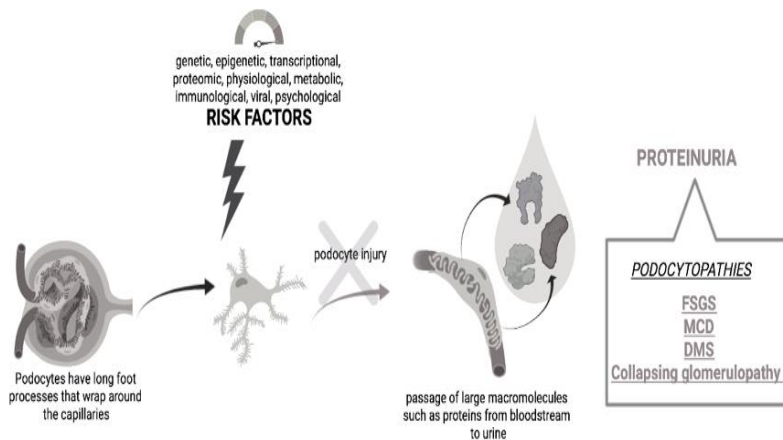
Abstract

Podocytes are small cells located in the Bowman's capsule in the kidneys. They have long foot processes called pedicels that wrap around the capillaries creating longitudinal slots between protrusions. Those open areas are covered by slit diaphragms that restrict the passage of large macromolecules from the bloodstream. In accordance, injuries within podocytes lead to a dysfunction of the filtration barrier, commonly associated with proteinuria or nephrotic syndrome. General term podocytopathies is used to describe such kidney diseases. These conditions are becoming more common nowadays, often progressing to end-stage renal pathologies. Morphological stratification allowed us to divide those disorders into: focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), minimal changes disease (MCD), diffuse mesangial sclerosis (DMS) and collapsing glomerulopathy. Considering the proven significance of podocytes in the pathogenesis of glomerulopathies, they are currently a target for studies on novel diagnostic and therapeutic protocols. To summarize, different factors might contribute to podocytopathies; notwithstanding, they all demonstrate similarities in terms of clinical symptoms and podocyte injury. Therefore, studies focusing on the podocytes are challenging and interesting to further research.

1. Introduction

Kidneys are bean-shaped, structurally complex organs, playing an essential role in maintaining body homeostasis. In accordance, they are responsible for cleansing blood of the waste products, controlling properly the body water level, regulating ions composition, and preserving acid balance. (Wallace 1998). An optimal state, namely homeostasis, is crucial for cells to present normal physiology, metabolism and function. Commonly, complications within kidneys lead to disturbance of acid-base balance and consequently homeostasis. Physiological disorders are followed by pH-related dysregulation. (Hamm et al. 2015) The kidneys consist of nephrons as their basic physiological units. Within nephrons, the glomerular filtration barrier demonstrates a layered arrangement composed of endothelial cells, glomerular basement membrane, podocytes, and mesangial cells. Podocytes are important elements in maintaining filtration barrier. They form slit diaphragms that prevent uncontrolled plasma proteins diffusion and are responsible for the synthesis of the components constituting glomerular basement membrane. Podocytes are atypical epithelial cells that demonstrate three structurally and functionally different elements: a large cell body, major extending processes, and foot processes. The latter ones create complex networks between neighboring podocytes to cover the glomerular capillaries within the Bowman capsules. The foot processes transform adhering to the glomerular basement membrane and forming junctions called the slit diaphragms. Damage in that specific area is one of the most common causes of glomerular disease. Additionally, actin is a vital element of the foot processes; what is the significant difference between primary and secondary processes (on the contrary, they are microtubular-based). Actin is the main element of foot processes' cytoskeleton and plays a role in attaching the podocytes to their environment. These discrepancies might justify why the foot processes are the only ones involved in glomerulopathies. (Garg 2018) Injured podocytes present significant morphological changes, such as loss of foot processes, vacuolization, retraction and detachment of cells from the glomerular basement membrane (GBM), leading to the dysfunction in the filtration barrier. Disturbance in the typical structure of podocytes is considered the most significant element of these cells, predominantly due to malfunction in the actin cytoskeleton of foot processes. Disorders of filtration barrier may also result

from mutation-related changes in their architectural elements – nephrin and podocin. Pathological events accompanying these phenomena cause a rare, hereditary nephrotic syndrome. The lack of slit diaphragms proper structure is commonly associated with proteinuria. In general, direct or indirect podocyte injuries leading to proteinuria or nephrotic syndrome are kidney diseases called podocytopathies. In histopathological assessment, we divide them into focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), minimal changes, diffuse mesangial sclerosis (DMS) and collapsing glomerulopathy. (Rys.1). Noteworthy, despite podocyte structure damage as a common element, podocytopathies might be triggered by multi- or monogenic changes or even environmental risk factors. Podocytes' injuries may result from autoimmune reactions involving autoantibodies aimed at podocytes, toxins, selected cytokines, or other poorly known circulating factors. Despite intensive research in renal diseases, epidemiological data on podocytopathies are still scarce. That is primarily related to the diagnostic limitations, with biopsy being the confirmatory method and usually young age of the pathological process initiation. Systematic disorders can influence podocyte structure, so the lesions might be unspecific with different underlying causes. Nevertheless, it seems that interest in podocytopathies is gradually increasing worldwide, considering their contribution to end-stage kidney diseases. (Kopp et al. 2020; Rosenberg and Kopp 2017)



Created in BioRender.com bio

Rys. 1. Schematic graphs presenting the risk factors of injury and mechanism of podocytes damage resulting in the loss of the filtration barrier tightness manifested by proteinuria- leading symptom of podocytopathies. (access on the 30th December 2021)

2. Content

In the current review work, we aimed at providing succinct information on podocytes' significant role in the pathological conditions associated with renal dysfunction. Comprehensive data summary was prepared based on the most recent papers available in databases, including Medline and Scopus, to provide the most significant and reliable information. We believe that our paper will provide essential background for the researcher explicitly interested in the role of podocytes in glomerulopathies and their possible potential as novel biomarkers and therapeutic targets in glomerulus-related disorders.

3. Literature review

Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) - the leading cause of renal functional pathology globally, is the first disease associated with podocytes injury. FSGS histological pattern might result from several different etiologies; however, demonstrating the same common characteristics – disturbed structure and reduced number of podocytes. Cumulative analysis of all the variables allowed to distinguish six clinical groups: two dominant forms - idiopathic or adaptive FSGS, three less common - high-penetrance genetic, viral-mediated, and drug-induced), and APOL1-associated FSGS. Interestingly, podocyte injury associated with all types of FSGS, and any other glomerular diseases, may itself trigger a mechanism similar to podocyte stress and genetic susceptibility, leading to the pathological features of adaptive FSGS. Clinical manifestation of FSGS condition is typically a proteinuria of a nephrotic or subnephrotic kind. Diagnosis of FSGS may be challenging, requiring the in-depth collection of the patient medical history, laboratory testing, and renal histopathology to obtain all the necessary data. Identifying the suitable syndrome is key to presenting an adequate therapy, which may help to prevent progression to end-stage renal disease. Unfortunately, such an unfavorable prognosis commonly corresponds to many forms of FSGS. Importantly, treatment should be personalized as, for example, immunosuppressive medications efficiently influence podocytes in idiopathic FSGS, and rarely in those with mutation-related, especially with nephrotic proteinuria manifestation. Therapy with glucocorticoids might exert beneficial effects; however, it is commonly associated with relapses. (Rosenberg and Kopp 2017) In complex cases of patients suffering from FSGS with steroid-resistant nephrotic syndrome, renal transplantation might be the only effective management option. Still, however, the risk of recurrence of the disease is significantly high, reaching approximately 30% in pediatric patients. In hereditary forms, chances for the disease relapse after transplantation are not so significant, constituting less than 10% of subjects. (Büscher and Weber 2012)

Collapsing glomerulopathy is described as a morphological variant of focal segmental glomerulosclerosis. That type of renal disease demonstrates the collapse of the glomerular capillaries, both segmental and global, remarkable hypertrophy and hyperplasia of podocytes, and severe tubulointerstitial disease. In electron microscopy, extensive foot processes effacement can be observed. Noteworthy, the cause of collapsing glomerulopathy has not been discovered yet. In the course of that condition, the areas within collapsed capillaries exhibit proliferation and dedifferentiation of mature podocytes with concomitant loss of cyclin-dependent kinase inhibitor 1B expression. Viral agents, such as HIV and parvovirus, may be considered a possible etiology. However, despite certain similarities to idiopathic collapsing glomerulopathy, HIV-related disturbances in kidneys are also associated with reticular aggregates that are not present in the discussed condition. Glomerulopathy is characterized by proteinuria and an accelerating decrease in kidney functions. In contrast to FSGS, the rate of disease exacerbation is significantly higher. Interestingly, there is also a significant predominance of prevalence among the black race subjects. Collapsing glomerulopathy does not respond to monotherapy with corticosteroids; however, the optimal treatment approach has not been established yet. Unfortunately, the prognosis of the condition is also not optimistic with its rapid evolution towards end-stage renal disease, not responding to treatment. (Fogo et al. 2015; Schwimmer et al. 2003; Morales et al. 2019)

Another podocyte-related pathology is minimal change disease (MCD) - a leading cause of idiopathic nephrotic syndrome. Intense proteinuria is a distinctive feature and leads to edema and intravascular volume depletion. Histologically, MCD does not demonstrate any association with any other disease entity. It may occur both, in children and adults, in different clinical settings, with similar clinical manifestations. However, the prevalence of MCD is significantly higher among children. Therefore, the proper patient qualification is necessary to introduce adequate treatment protocol as we can observe some differences between children and adults. For example, MCD present in children is usually idiopathic, when in adults minimal change disease results from secondary causes (such as infections). Furthermore, there are differences in treatment response, including time to remission, response rate and timing of relapses (in children remission occurs in a shorter time and relapsing is more frequent than in adults). The most characteristic feature of minimal change disease is foot

processes effacement. Electron microscopy is the only method that clearly exposed those changes, which was a diagnostic obstacle for decades. The other problem with precise diagnosis is the fact that most children respond efficiently to steroid treatment - a "steroid-sensitive nephrotic syndrome." Therefore, MCD is usually discovered after renal biopsy is performed when patients demonstrate steroids resistance. Despite the lack of data on actual etiology of MCD, several forms have been identified based on different pathogenesis. Nonetheless, immunologic-related dysregulation and modifications of the podocyte seem to be key factors in modifying the integrity of the glomerular basement membrane leading to proteinuria. Above mentioned steroid therapy is predominantly based on prednisone use. Unfortunately, it is common for steroid-sensitive forms of the disease to relapse, and combined therapy with immunosuppressants might be required. Furthermore, in the acute treatment, intake of salt and fluids must be reduced to mitigate the appearance of edema. Interestingly, steroids-responding MCD are presumed not lead to chronic renal damage; on the contrary, forms unresponsive to steroids may later progress to FSGS. (Vivarelli et al. 2017)

As focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease share certain similarities, they should always be considered in the diagnostic process. Both of these diseases are usually essential finding in the histological picture of idiopathic nephrotic syndrome. As MCD and FSGS share common pathogenesis, they can be reported as a disease continuum; however, they may also be considered two different diseases. Even slight variations in features, histology, and treatment outcome play a crucial role in differential diagnosis of these two conditions. Interestingly, recent data suggested that MCD and idiopathic FSGS may be the same disease but have different phenotypes. In clinical trials, idiopathic FSGS is suggested to be an advanced stage of MCD. Moreover, effective treatment response is more likely to appear in the earlier phase of the disease, usually described as MCD. (Vivarelli et al. 2017; Maas et al. 2016)

Diffuse mesangial sclerosis (DMS) is a rare congenital renal disease usually manifested as a nephrotic syndrome that appears in children. Nephrotic syndrome occurs at birth or within the first year of life. What is more, DMS has lethal development. DMS is represented by early-onset and rapid progression leading to end-stage renal disease. It may reveal as an isolated lesion or in the course of the Denys-Drash syndrome (a rare disorder with congenital nephropathy, male pseudohermaphroditism, and Wilms' tumor), with a higher rate of renal disease exacerbation in the latter case. Commonly, nephrotic syndrome emerges at the age of a few months; however, Wilm's tumor may be the initial symptom of the disease. In DMS, glomeruli are small and present condensed images, with early lesions demonstrating increased loss of mesangial collagen, gradually progressing to sclerosis with dense collagen. Hypercellularity does not appear in the condition. Mesangial matrix sclerosis occurs with minimal or absent mesangial cell proliferation. Podocytes undergo hypertrophy at an early stage of the disease. Later, podocytes are vacuolated and transform into crown-like shape. Basement membranes are thickened, patency of capillary lumen is reduced. However, the most important diagnostic features are small glomeruli, increased mesangial collagen density, and extensive foot process effacement. DMS has a poor prognosis, with ineffective corticosteroid therapy and disease progression to the end-stage renal failure. Fortunately, the survival rate has increased over the decades. (Fogo et al. 2015b; Vankalakunti et al. 2012; Nso Roca et al. 2009; Rheault 2014)

The current knowledge about the pathogenesis of glomerulopathies unambiguously highlights the importance of podocytes in developing these diseases. That fact is predominantly justified by role of these cells as significant elements of the glomerulus, and when injured, they significantly disturb the proper renal function. Accordingly, these features might potentially be used to develop more specific diagnostic procedures and, presumably, novel therapeutic protocols. Podocytes or even their elements can be detected in the urine in the course of pathological conditions. Such findings may be used in diagnosis of glomerular damage. This factor can appear in early stages and may act as a predictive tool to monitor the disease control and risk of progression assessment. (Müller-Deile and Schiffer 2017) Glomerulopathies are considered jeopardy for the patients due to their progression to end-stage renal disease when kidneys no longer provide an adequate function to maintain homeostasis. Patients suffering from glomeruli-related pathologies often require dialysis or even a kidney transplant. Discovery of a novel, more effective ways to prevent life-threatening complications is of great importance nowadays. Podocytes seem to be a promising target to fulfill

expectations in that field. Targeting podocytes with more specific agents would be highly favorable, as commonly used immunosuppressants and steroids are often associated with complications. (Müller-Deile and Schiffer 2017) Current experimental studies focus on preventing or at least reducing podocyte injury. That could be expanded with protocols involving stimulating podocyte regeneration as a form of therapy in the future. (Kopp et al. 2020) Nowadays, increasing attention is paid to podocyte-related disorders and their management. Hopefully, that trend will contribute in the future to the development of novel therapeutic approaches. (Kopp et al. 2020)

1. Summary and conclusions

Considering presented podocytopathies, we found that these conditions affect life of the patients significantly. Noteworthy, podocyte-related disorders in most cases progress to nephrotic syndrome with a high tendency for relapses. Edema was considered as the most negative symptom in patients' opinion. In context of etiology, each podocytopathies presented - focal segmental glomerulosclerosis, minimal change disease, diffuse mesangial sclerosis, or collapsing glomerulopathy, results from a combination of different factors, with no clear contributing element among all genetic, proteomic, immunological, viral, and others reported to date. (Kopp et al. 2020) These aspects make those disorders even more challenging, both from scientific and practical points of view. However, despite complex etiology, as demonstrated above, they present many similarities – clinical symptoms and podocyte injury. In context of FSGS and MDG, they have even considered just stages of the same disease due to comparable clinical manifestations. In accordance, most recent studies suggest considering DMS, FSGS, MCD, and collapsing glomerulopathy as clinical entities, using general term of 'podocytopathies.' (Kopp et al. 2020) Despite numerous studies revealing molecular and cellular mechanisms of podocytopathies, there are unknown aspects of podocytes injuries and their clinical consequences. Therefore, further studies aimed at these cells are of great importance in context of complete identification of the related renal diseases background.

4. Literature

- Büscher AK, Weber S (2012) Educational paper: the podocytopathies. *Eur J Pediatr* 171(8): 1151-60.
- Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, Alpers CE (2015a) *AJKD Atlas of Renal Pathology: Collapsing Glomerulopathy*. *Am J Kidney Dis* 66(2): e3-4.
- Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, Alpers CE (2015b) *AJKD Atlas of Renal Pathology: Diffuse Mesangial Sclerosis*. *Am J Kidney Dis* 66(4): e23-4.
- Garg P (2018) A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol* 47 Suppl 1: 3-13.
- Hamm LL, Nakhoul N, Hering-Smith KS (2015) Acid-Base Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10(12): 2232-42.
- Kopp JB, Anders HJ, Susztak K, Podestà MA, Remuzzi G, Hildebrandt F, Romagnani P (2020) Podocytopathies. *Nat Rev Dis Primers* 6(1): 68.
- Maas RJ, Deegens JK, Smeets B, Moeller MJ, Wetzels JF (2016) Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease. *Nat Rev Nephrol* 12(12): 768-776.
- Morales E, Alonso M, Gutiérrez E (2019) Collapsing glomerulopathy: update. *Med Clin (Barc)* 152(9): 361-367.
- Müller-Deile J, Schiffer M (2017) Podocytes from the diagnostic and therapeutic point of view. *Pflugers Arch* 469(7-8): 1007-1015.
- Nso Roca AP, Peña Carrión A, Benito Gutiérrez M, García Meseguer C, García Pose A, Navarro M (2009) Evolutionary study of children with diffuse mesangial sclerosis. *Pediatr Nephrol* 24(5): 1013-9.
- Rheault MN (2014) Nephrotic and nephritic syndrome in the newborn. *Clin Perinatol* 41(3): 605-18.
- Rosenberg AZ, Kopp JB (2017) Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 12(3): 502-517.
- Schwimmer JA, Markowitz GS, Valeri A, Appel GB (2003) Collapsing glomerulopathy. *Semin Nephrol* 23(2): 209-18.

Vankalakunti M, Jha PK, Madraki RM, Siddini V, Babu K, Ballal SH (2012) Diffuse mesangial sclerosis - Report of two cases. Indian J Nephrol 22(3): 213-6.

Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, Emma F (2017) Minimal Change Disease. Clin J Am Soc Nephrol 12(2): 332-345.

Wallace MA (1998) Anatomy and physiology of the kidney. AORN J 68(5): 800, 803-16, 819-20; quiz 821-4.

13. Inhibitory SGLT-2 w terapii niewydolności serca

SGLT-2 inhibitors in the treatment of heart failure

Kaja Pelar, Michał Rafa, Piotr Gręblowski, Mariusz Kowaliński, Dominik Kurczyński

Koło Studenckiego Towarzystwa Naukowego przy II Katedrze i Oddziale Klinicznym Kardiologii,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

Opiekun naukowy: Dr hab. n. med. Andrzej Tomasiak

Kaja Pelar: a.kaja.pelar@gmail.com

Słowa kluczowe: HF, empagliflozyna, dapagliflozyna

Streszczenie

Niewydolność serca jest rosnącym problemem epidemiologicznym, w związku z czym w grupie cierpiących na nią osób prowadzone są liczne badania nad nowymi możliwościami terapeutycznymi. Inhibitory SGLT-2, będące do niedawna stosowane jako leki hipoglikemizujące u chorych na cukrzycę typu 2, stały się jedną z nowych grup substancji dopuszczonych w terapii niewydolności serca. Celem tej pracy jest omówienie mechanizmów działania i efektów klinicznych leczenia z użyciem inhibitorów SGLT-2 u pacjentów z niewydolnością serca na podstawie dostępnego piśmiennictwa.

1. Wstęp

Mianem niewydolności serca (HF) określa się występujący u 1-2/100 dorosłych mieszkańców Europy zespół objawów klinicznych, wynikający z funkcjonalnego lub strukturalnego uszkodzenia serca. Zaburzenia te mogą powodować zmniejszenie rzutu serca lub upośledzenie jego wypełniania. Obraz kliniczny HF obejmuje objawy podmiotowe, takie jak duszność, ortopnoe, spadek tolerancji wysiłku, napadową duszność w nocy, oraz przedmiotowe - poszerzenie żył szyjnych, trzeszczenia nad polami płucnymi i obrzęki obwodowe. Podtypy kliniczne HF wyróżnia się na podstawie stopnia upośledzenia frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF), która towarzyszy objawom klinicznym. Zalicza się do nich niewydolność serca ze zmniejszoną frakcją wyrzutową lewej komory (HFrEF), która charakteryzuje się spadkiem LVEF poniżej 40%, niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową (HFpEF), jeżeli LVEF wynosi ponad 50%, oraz niewydolność serca z pośrednią frakcją wyrzutową (HFmrEF) o frakcji wyrzutowej większej niż 40%, ale mniejszej niż 50%. Najczęściej występującą postacią jest HFrEF, stanowiąca 60% wszystkich zachorowań na HF, natomiast HFmrEF i HFpEF stanowią odpowiednio 16% i 24% zachorowań (Chioncel i in. 2017).

Patofizjologia niewydolności serca ze zredukowaną i z zachowaną frakcją wyrzutową wykazuje znaczne różnice, co ma istotne przełożenie na terapię obu postaci chorób. HFpEF charakteryzuje się strukturalnymi i komórkowymi zmianami, prowadzącymi do zaburzeń rozkurczu lewej komory. Może się do tego przyczynić przerost kardiomiocytów, włóknienie przestrzeni międzykomórkowej, zaburzenia relaksacji włókien mięśniowych oraz przewlekły stan zapalny spowodowany współistniejącymi chorobami. W przypadku HFrEF, przyczyną zaburzeń jest najczęściej utrata kardiomiocytów o ostrej lub przewlekłej przyczynie, prowadząca do niewydolności skurczowej. Powodem najczęściej jest zawał serca, ale chorobę może również wywołać zapalenie mięśnia sercowego lub patologie zastawek serca. Pomiędzy obiema postaciami choroby występują również różnice epidemiologiczne, a także w rodzaju przerostu mięśnia sercowego - w przypadku HFpEF przerost kardiomiocytów jest najczęściej koncentryczny, a na chorobę częściej zapadają kobiety i osoby w wieku starszym. W HFrEF natomiast hipertrofia zwykle ma charakter ekscentryczny, a zapadalność jest wyższa u osób młodszych i mężczyzn, co może mieć związek z częstszym występowaniem choroby niedokrwiennej serca wśród pacjentów tej płci (Schwinger 2021).

2. Farmakoterapia niewydolności serca

Podstawę leczenia HFrEF stanowi postępowanie farmakologiczne. Celem terapii jest zmniejszenie śmiertelności wśród chorych, redukcja częstości hospitalizacji związanych z zaostrzeniem przebiegu HF oraz poprawa stanu klinicznego i jakości życia pacjentów. Farmakoterapia obejmuje inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI) lub inhibitory receptora angiotensyny i neprylizyny (ARNI), beta-adrenolityki (LBA) i antagonisty receptora mineralokortykoidowego (MRA). Każda z wymienionych grup leków ma udowodnioną skuteczność w redukcji częstości hospitalizacji i śmiertelności wśród pacjentów z HFrEF. Za podstawę farmakoterapii uważa się połączenie leków z grup ACEI, LBA i MRA w stopniowo zwiększanych dawkach. Zastąpienie substancji z grupy ACEI na rzecz ARNI jest wskazane u pacjentów symptomatycznych korzystających z terapii trójlekowej. W wytycznych Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego wśród leków zalecanych u wszystkich objawowych pacjentów z HFrEF przyjmujących terapię potrójną znalazły się również inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego 2 (inhibitory SGLT-2, flozyny) - dapagliflozyna i empagliflozyna, otrzymując najwyższą klasę zaleceń (McDonagh i in. 2021).

Należy dodać, że przed przeprowadzeniem badań z wykorzystaniem flozyn, farmakoterapia pozwalała na poprawę rokowania jedynie u pacjentów z niewydolnością serca ze zmniejszoną frakcją wyrzutową. W przypadku pacjentów z HFpEF przeprowadzono liczne badania kliniczne oceniające wpływ leków z grup ACEI, ARNI, MRA oraz innych (sartany, digoksyna, sildenafil) na przebieg choroby, jednak żadna z ocenianych substancji nie wpłynęła istotnie na zmniejszenie ryzyka hospitalizacji i zgonu. Z kolei wśród pacjentów z HFmrEF nigdy nie przeprowadzono dużego, randomizowanego badania prospektywnego, pozwalającego ocenić skuteczność terapii. Jedynie zebrane dane pochodziły z analizy podgrup w badaniach dotyczących HFpEF.

3. Charakterystyka i dotychczasowe zastosowanie inhibitorów SGLT-2

Leki z grupy flozyn są lekami przeciwcukrzycowymi, których punktem uchwytu jest przeciwdziałanie zwiększonej reabsorpcji glukozy w nerkach. Poprzez zahamowanie receptorów SGLT-2 w cewce bliższej nefronu powodują wystąpienie glukozurii, która wiąże się ze spadkiem stężenia glukozy we krwi, utratą 300-400 kcal/dobę, obniżeniem wartości hemoglobiny glikowanej oraz zwiększeniem ilości wydalanego moczu poprzez indukowanie diurezy osmotycznej (Pasterczyk i in. 2018). Zablokowanie SGLT-2 pozwala na nieodwracalną eliminację glukozy z ustroju, ograniczając glukotoksyczność niezależnie od insuliny, tym samym nie powodując ryzyka hipoglikemii. Dodatkowo flozyny są dość dobrze tolerowane przez pacjentów, a do najczęstszych działań niepożądanych należy zwiększenie ryzyka grzybic okolic genitalnych, którym można przeciwdziałać poprzez zachowanie wzmożonej higieny. W związku z bardzo korzystnym profilem działań, leki te stały się ważnymi elementami terapii cukrzycy typu 2, zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z innymi lekami hipoglikemizującymi.

Spośród innych leków przeciwcukrzycowych inhibitory SGLT-2 wyróżniają mnogie działania plejotropowe. Poza działaniem hipoglikemizującym flozyny wpływają na spadek masy ciała, który zwykle rozpoczyna się szybko i stabilizuje się w przeciągu kilku miesięcy, osiągając zwykle redukcję rzędu 2-3 kg. Dodatkowo leki te powodują utrzymujący się spadek ciśnienia tętniczego, zarówno skurczowego jak i rozkurczowego, o średniej wartości odpowiednio 5 mmHg i 2 mmHg. Najbardziej prawdopodobnymi mechanizmami przyczyniającymi się do redukcji ciśnienia jest indukowana flozynami natriureza, która poprawia gospodarkę sodową organizmu, oraz zmniejszenie sżywności tętnic (van Baar i in. 2018). Do innych działań inhibitorów SGLT-2 należą umiarkowane zmniejszenie stężenia trójglicerydów w osoczu krwi przy jednoczesnym wzroście poziomu cholesterolu HDL i LDL, poprawa funkcji nerek u pacjentów z cukrzycą, czy obniżenie urykemii o 10-15% (Heerspink i in., 2016). Badania kliniczne, początkowo wśród pacjentów z cukrzycą typu 2, doprowadziły również do opisanego działania kardioprotekcyjnego tych leków, w szczególności dapagliflozyny i empagliflozyny.

4. Wpływ inhibitorów SGLT-2 na ryzyko sercowo-naczyniowe

Pierwszym dużym, prospektywnym badaniem randomizowanym, które pozwoliło opisać kardioprotekcyjne działanie flozyn była próba EMPA-REG OUTCOME (Zinman i in. 2015). Warto podkreślić, że badanie nie było ukierunkowane na udowodnienie korzystnego działania flozyn, a jedynie oszacowanie bezpieczeństwa kardiologicznego empagliflozyny zgodnie z wytycznymi amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (Rynkiewicz i in. 2018). W badaniu wzięło udział 7020 pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 ze współistniejącą chorobą sercowo-naczyniową, których losowo przydzielono do grup poddanych terapii z użyciem 10 mg empagliflozyny raz dziennie, 25 mg empagliflozyny raz dziennie lub placebo. Po średnio 3 latach obserwacji wykazano, że ryzyko śmierci z powodów sercowo-naczyniowych w grupie badanej było znacznie niższe niż w grupie przyjmującej placebo (3.7% vs 5.9%, względne zmniejszenie ryzyka o 38%). Ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu lub hospitalizacji z powodu zaostrzenia objawów choroby niedokrwiennej serca było porównywalne w obu grupach, jednak szczególną uwagę zwrócił znaczny spadek ryzyka hospitalizacji z powodu niewydolności serca wśród pacjentów leczonych empagliflozyną w porównaniu z grupą kontrolną (2.7% vs 4.1%, względne zmniejszenie ryzyka o 32%). Wynikom tym nie towarzyszyły poważne działania niepożądane - jedynym znacząco częstszym powikłaniem terapii było zwiększenie ryzyka infekcji okolic genitalnych. Dodatkowo ostre uszkodzenie nerek wystąpiło u mniejszego odsetka pacjentów z grupy badanej.

Bardzo obiecujące wyniki próby EMPA-REG OUTCOME doprowadziły do rozpoczęcia badań klinicznych wśród osób z HF niezależnie od współwystępowania cukrzycy typu 2. Przełomowym badaniem oceniającym wpływ dapagliflozyny w tej grupie pacjentów była próba DAPA-HF (McMurray i in. 2019), w której wzięło udział 4744 pacjentów z HF rEF w klasie czynnościowej NYHA II-IV. Połowa badanych została losowo przydzielona do grupy przyjmującej 10 mg dapagliflozyny raz dziennie, druga połowa natomiast stanowiła grupę kontrolną. W trakcie obserwacji trwającej około 18 miesięcy punkt końcowy badania, w postaci hospitalizacji z powodu pogorszenia przebiegu HF lub śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych, wystąpił u 16.3% pacjentów z grupy przyjmującej dapagliflozynę oraz u 21.2% osób z grupy kontrolnej (współczynnik ryzyka 0.74), z czego w grupie badanej rzadziej notowano zarówno incydenty zaostrzenia HF wymagające hospitalizacji (10.0% vs 13.7%), jak i zgony z przyczyn sercowo-naczyniowych (9.6% vs 11.5%). Częstość występowania działań niepożądanych w postaci odwodnienia, dysfunkcji nerek i epizodów hipoglikemii była porównywalna w obu grupach, a skuteczność działania leku nie zależała od współwystępowania cukrzycy typu 2.

Kolejnym nie mniej istotnym badaniem klinicznym była próba EMPEROR-Reduced (Packer i in. 2020), która obejmowała 3730 pacjentów z HF rEF w klasie czynnościowej NYHA II-IV, z których połowa została przydzielona do grupy przyjmującej 10 mg empagliflozyny raz dziennie. Podobnie jak w przypadku dapagliflozyny, zaobserwowano znacznie niższą liczbę hospitalizacji z powodu HF lub zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (19.4% vs 24.7%). Dodatkowo u pacjentów przyjmujących empagliflozynę wykazano spowolnienie tempa spadku wskaźnika filtracji kłębuszkowej (GFR) oraz istotnie mniejsze ryzyko wystąpienia głębokiego upośledzenia pracy nerek wymagającego przewlekłych dializ lub przeszczepu nerki. Spadek ryzyka sercowo-naczyniowego oraz działanie nefroprotekcyjne empagliflozyny występowały niezależnie od współistnienia cukrzycy typu 2 u pacjentów.

Najnowszym dużym badaniem klinicznym oceniającym wpływ sotagliflozyny, inhibitora SGLT-2 i SGLT-1, na HF jest badanie SOLOIST-WHF (Bhatt i in. 2021), w którym udział wzięło 1222 pacjentów ze współistniejącą cukrzycą typu 2, z których każdy był hospitalizowany z powodu zaostrzenia objawów HF z koniecznością dożylnego podażu diuretyków. Następnie w trakcie pobytu w szpitalu lub do 3 dni po wypisie pacjenci zostali losowo przyporządkowani do grupy leczonej sotagliflozyną oraz grupy przyjmującej placebo. W związku z utratą finansowania badania nastąpiły zmiany w jego metodologii - za punkt końcowy ustalono całkowitą liczbę zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych oraz liczbę hospitalizacji z powodu zaostrzenia HF. Z tego samego powodu podjęto decyzję o zaangażowaniu mniejszej niż przewidywano grupy pacjentów. Wśród pacjentów leczonych sotagliflozyną liczba zgonów, w porównaniu do grupy placebo, była niższa (245 vs 355).

Wskaźnik zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych wyniósł 10.6 w grupie sotagliflozyny oraz 12.5 w grupie placebo. Działania niepożądane w postaci biegunki i ciężkiej hipoglikemii były częstsze w grupie badanej, natomiast liczba pacjentów z hipotensją i ostrym uszkodzeniem nerek była podobna w obu grupach. Badanie pozwoliło wykazać korzystny wpływ szybkiego włączenia leczenia flozyną po hospitalizacji u pacjentów z pogarszającym się przebiegiem HF. Wczesny początek terapii okazał się istotnym elementem poprawy wyników leczenia, na co wskazywała duża liczba zgonów i zaostżeń HF w grupie placebo w ciągu 90 dni od randomizacji. Badanie nie pozwoliło natomiast rozstrzygnąć, czy zahamowanie kotransportera SGLT-1 przez sotagliflozynę miało jakikolwiek wpływ na wynik badania.

5. Inhibitory SGLT-2 w terapii HFmrEF oraz HFpEF

Jak wspomniano wcześniej, poprawa rokowania poprzez leczenie farmakologiczne została wykazana jedynie u pacjentów z HFrEF. Przełom nastąpił po publikacji wyników badania EMPEROR-Preserved (Anker i in. 2021), w którym udział wzięło 5988 pacjentów z HFpEF oraz HFmrEF w klasie czynnościowej NYHA II-IV. Podobnie jak w badaniu EMPEROR-Reduced, grupa badana została poddana terapii 10 mg empagliflozyny raz dziennie, a obserwacja trwała średnio 26.2 miesiąca. Efekty leczenia były podobne do wyników badania przeprowadzonego wśród pacjentów z HFrEF - względne ryzyko hospitalizacji z powodu zaostżenia HF lub zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych było niższe o 21% w grupie leczonej empagliflozyną, natomiast ryzyko samej hospitalizacji zmniejszyło się o 29% w porównaniu do pacjentów przyjmujących placebo. Zaobserwowano również wolniejsze tempo utraty GFR w grupie badanej, potwierdzono więc nefroprotecyjne działanie inhibitora SGLT-2 wśród tych chorych. Korzyści z leczenia były jednolite u pacjentów z HFmrEF oraz HFpEF, a także niezależne od współwystępowania cukrzycy typu 2. Empagliflozyna stała się tym samym pierwszym lekiem o potwierdzonej w badaniach klinicznych skuteczności w terapii niewydolności serca niezależnie od jej podtypu klinicznego.

6. Potencjalne mechanizmy kardioprotekcyjnego działania inhibitorów SGLT-2

Spektakularne wyniki badań oceniających wpływ flozyn na ryzyko sercowo-naczyniowe skłoniły badaczy do próby wyjaśnienia tak znacznej skuteczności empagliflozyny i dapagliflozyny u pacjentów z HF. Jednym z proponowanych mechanizmów jest poprawa metabolizmu energetycznego mięśnia sercowego i zwiększenie wydajności pracy serca. Wraz z pogarszaniem się funkcji serca w przebiegu HF dochodzi do spadku efektywności utleniania glukozy w mitochondriach kardiomiocytów, powodując tym samym zmniejszenie ilości dostępnej energii potrzebnej do pracy mięśnia sercowego. Próbą kompensacji niedoborów energetycznych jest wzrost oksydacji ciał ketonowych w niewydolnym sercu. W trakcie terapii inhibitorami SGLT-2 obserwuje się wzrost ketonemii, co pozwala na dostarczenie do kardiomiocytów dodatkowego źródła energii i tym samym poprawę bilansu energetycznego serca (Lopaschuk i in. 2020).

Nie mniej istotne wydaje się działanie flozyn na przebudowę mięśnia sercowego. Proces ten, będący istotnym czynnikiem w patofizjologii HF, polega na występowaniu patologii na poziomie molekularnym i komórkowym, takich jak przerost kardiomiocytów czy włóknienie pozakomórkowe. Prowadzi to do zmian w wielkości, geometrii i funkcji jam serca, pogarszając tym samym rokowanie. Wykazano, że wśród osób z cukrzycą i chorobą niedokrwienną serca przyrost wskaźnika masy lewej komory był znacznie mniejszy w grupie pacjentów leczonych empagliflozyną w porównaniu do osób przyjmujących placebo. Flozyny tym samym mogą spowalniać proces remodelingu serca, spowalniając rozwój objawowej HF (Verma i in. 2019).

Dodatkowo wśród możliwych mechanizmów działania flozyn w terapii HF wymienia się zmiany hemodynamiczne związane ze wspomnianym wcześniej obniżeniem ciśnienia tętniczego, indukacją diurezy osmotycznej oraz zmniejszeniem sztywności naczyń. Na podstawie analizy regresji wyników badania EMPA-REG OUTCOME wykazano, że najważniejszymi czynnikami związanymi z poprawą rokowania był wzrost hematokrytu oraz stężenia hemoglobiny, a w mniejszym stopniu również spadek stężenia kwasu moczowego, glukozy oraz hemoglobiny glikowanej (Inzucchi i in. 2018).

Kolejnym proponowanym mechanizmem kardioprotekcyjnym flozyn jest ich wpływ na modyfikację procesów zapalnych. Cytokiny prozapalne powodują dysfunkcję endotelium oraz wzmożenie włóknienia macierzy zewnątrzkomórkowej, a ich stężenie koreluje ze stopniem nasilenia HF. Kwas β -hydroksymasłowy, którego stężenie wzrasta przy terapii inhibitorami SGLT-2, jest skutecznym inhibitorem inflammasomu NLRP3, będącego jednym z promotorów przewlekłego stanu zapalnego w niewydolnym sercu (Youm i in. 2015). Wyniki badania przeprowadzonego na modelu mysim wskazują również, że empagliflozyna może hamować NLRP3 poprzez przywrócenie prawidłowego stężenia wapnia w kardiomiocytach niezależnie od stężenia ciał ketonowych w osoczu (Byrne i in. 2020).

7. Podsumowanie

Wykorzystanie inhibitorów SGLT-2 w terapii niewydolności serca pozwala znacznie zredukować częstość hospitalizacji i śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych. Bardzo korzystny profil działań przy dobrej tolerancji leczenia sprawił, że leki te stały się częścią standardowego postępowania w leczeniu HF_rEF, czego dowodem jest uzyskanie najwyższej klasy zaleceń dla leczenia flozynami w wytycznych Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Wraz z wynikami badania EMPEROR-Preserved empagliflozyna stała się również jednym dotychczas skutecznym w badaniach klinicznych lekiem w terapii HF_pEF. Mimo że głównym działaniem inhibitorów SGLT-2 jest wykorzystywana w terapii cukrzycy typu 2 indukcja glukozurii, leki te wywołują szereg kardio- i nefroprotekcyjnych efektów plejotropowych, które nie są jeszcze do końca poznane.

8. Literatura

- Anker SD, Butler J, Filippatos G et al. (2021) Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*; 385: 1451-1461.
- Bhatt, DL, Szarek M, Steg PG et al. (2021) Sotagliflozin in Patients with Diabetes and Recent Worsening Heart Failure. *N Engl J Med*; 384(2): 117–128.
- Byrne NJ, Matsumura N, Maayah ZH et al. (2020) Empagliflozin Blunts Worsening Cardiac Dysfunction Associated With Reduced NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain-Like Receptor Protein 3) Inflammasome Activation in Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*; 13(1): e006277
- Chioncel O, Lainscak M, Seferovic PM et al. (2017) Epidemiology and one-year outcomes in patients with chronic heart failure and preserved, mid-range and reduced ejection fraction: an analysis of the ESC Heart Failure Long-Term Registry. *Eur J Heart Fail*; 19(12): 1574-1585.
- Heerspink HJ, Perkins BA, Fitchett DH Husain et al. (2016) Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Circulation*; 7(5): 10–30.
- Inzucchi SE, Zinman B, Fitchett D et al.. (2018) How does empagliflozin reduce cardiovascular mortality? Insights from a mediation analysis of the EMPA- REG OUTCOME trial. *Diabetes Care*; 41(2): 356–363.
- McDonagh TA, Metra M, Adamo M et al. (2021) 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*; 42(36): 3599–3726.
- McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE et al. (2019) Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med*; 381(21): 1995–2008.
- Lopaschuk GD, Verma S (2020) Mechanisms of Cardiovascular Benefits of Sodium Glucose Co-Transporter 2 (SGLT2) Inhibitors: A State-of-the-Art Review. *JACC: Basic to Translational Science*; 5(6): 632-644.
- Packer M, Anker SD, Butler J et al. (2020) Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med*; 383(15): 1413–1424.
- Pasterczyk K, Mulawka P, Gajda P i in. (2018) Flozyny 2018 — krajobraz po EMPA-REG OUTCOME. *Choroby Serca i Naczyń*; 15(3): 159–164.

- Rynkiewicz A, Sadowski J, Nowek P i in. (2018) Próba kliniczna EMPA-REG OUTCOME z zastosowaniem empagliflozyny — nowa era w terapii cukrzycy typu 2. *Choroby Serca i Naczyń*; 15(2): 61–70.
- Schwinger RH (2021) Pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*; 11(1): 263.
- Van Baar, MJ, Van Ruiten CC, Muskiet MH et al. (2018) SGLT2 Inhibitors in Combination Therapy: From Mechanisms to Clinical Considerations in Type 2 Diabetes Management. *Diabetes Care*; 41(8), 1543–1556.
- Verma S, Mazer CD, Yan AT et al. (2019) Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease: The EMPA-HEART CardioLink-6 Randomized Clinical Trial. *Circulation*; 140(21): 1693–1702.
- Youm YH, Nguyen KY, Grant RW et al. (2015) The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine*; 21(3), 263–269.
- Zinman B, Wanner C, Lachin JM et al. (2015) Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*; 373(22): 17–18.