

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

Postępy Biologii Komórki

VOL. 47, ISSUE 1/2020
(1–98)

www.pbkom.pl

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

Redaguje Kolegium – Editors:

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

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

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

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

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

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

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

Andrzej K. KONONOWICZ – *komórki roślinne, regulacja ekspresji genów u Pro- i Eukaryota, inżynieria genetyczna akononow@biol.uni.lodz.pl*

Krzysztof LEWANDOWSKI – *hematologia, onkologia, komórki macierzyste krzysztof.lewandowski@skl.am.poznan.pl*

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

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

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

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Andrzej ŁUKASZYK – przewodniczący, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŻNICKI, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office:

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Świecickiego 6, 60-781 Poznań, tel. 61 854 64 53, fax 61 854 64 40 mnowicki@ump.edu.pl

Redaktor techniczny – Zuzanna Podemska-Jedrzejczak zpodemsk@ump.edu.pl

@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – *Foundation for Cell Biology and Molecular Biology*

Indexed in: Biological Abstracts, Science Citation Index Expanded (SciSearch), Journal Citation Reports/Science Edition, BIOSIS Previews, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey, AGROS.

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Poznań, 2020-03-01

ROLA PŁYTEK KRWI W KARDIOLOGII KLINICZNEJ I EKSPERYMENTALNEJ

THE ROLE OF PLATELETS IN CLINICAL AND EXPERIMENTAL CARDIOLOGY

Anna KOMOSA¹, Piotr RZYMSKI²,
Barbara PONIEDZIAŁEK², Maciej LESIAK¹

¹I Klinika Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

²Zakład Medycyny Środowiskowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Streszczenie: Płytki krwi odgrywają kluczową rolę w procesie aktywacji kaskady krzepnięcia krwi oraz formowaniu zakrzepu. Zaburzenia ich funkcji manifestujące się nadreaktywnością prowadzą do poważnych konsekwencji klinicznych – incydentów zakrzepowo-zatorowych takich jak zawały serca czy udary mózgu. Leczenie przeciwplatekowe stanowi od lat podstawę leczenia choroby niedokrwiennej serca. Z punktu widzenia klinicznego istotne są nie tylko zaburzenia dotyczące funkcji trombocytów, ale również ich liczby. Płytkowe skazy krwotoczne wynikają z nieprawidłowej liczby płytek krwi oraz z zaburzeń ich funkcji. Istotną rolę w procesie aktywacji płytek krwi wydają się odgrywać również, egzo- jak i endogenne reaktywne formy tlenu (RFT), pochodne tlenu cząsteczkowego. Badania eksperymentalne prowadzone w modelach *in vitro* i *in vivo*, jak i obserwacje kliniczne prowadzone na wybranych grupach pacjentów, wskazują na istotną funkcję RFT jako mediatorów różnych szlaków aktywacji i agregacji trombocytów. Wydaje się, że działania terapeutyczne, zmniejszające poziom RFT i co za tym, idzie stresu oksydacyjnego, mogą potencjalnie przyczyniać się do spadku reaktywacji płytek krwi, a w konsekwencji również ryzyka wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych. Celem tego opracowania jest zwrócenie uwagi na istotę podejścia multidyscyplinarnego do zagadnienia aktywacji płytek krwi. Wydaje się, że uwzględnienie znaczenia procesów redox jest istotne nie tylko pod względem identyfikacji czynników etiologicznych zdarzeń zakrzepowo-zatorowych w kardiologii, ale może odgrywać istotną rolę w utrzymaniu hemostazy. Kliniczne znaczenie RFT w aktywacji płytek krwi oraz celowość zastosowania antyoksydantów w farmakoterapii chorób układu sercowo-naczyniowego wciąż nie zostało potwierdzone i wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Słowa kluczowe: płytki krwi, reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny

Summary: Platelets play a crucial role in the process of blood coagulation cascade activation and thrombus formation. Function disorders that manifest as hyper reactivity lead to serious clinical consequences- thromboembolic events such as myocardial infarction or strokes. Antiplatelet therapy has been core treatment of coronary heart disease for years. Both, platelet function disorders and abnormal platelet count are of great importance from clinical point of view. Platelet hemorrhagic diathesis result from invalid platelet number and function disorders. Egzo- and endogenic reactive oxygen species (ROS), molecular oxygen derivative, seem also to play a significant role in process of platelet activation. Experimental studies carried out on *in vitro* and *in vivo* models, and clinical observation of selected groups of patients, point out important pathways of platelet activation and aggregation mediated by ROS. It seems that therapeutic approach on ROS level reduction hence oxidative stress, may potentially contribute to decrease of platelet activation and decrease adverse cardio-vascular events as a consequence. The aim of this paper is to point out the importance of a multidisciplinary approach to the platelet activation issues. It appears that consideration of redox processes is significant not only in identification of etiology of thromboembolic events in cardiology, but also may be relevant in maintaining hemostasis. The clinical significance of ROS in platelet activation and usefulness of applying antioxidants in pharmacotherapy of cardiovascular diseases has not been evidenced yet and further research in this matter is required.

Keywords: platelets, reactive oxygen species, oxidative stress

WSTĘP

Płytki krwi pełnią kluczową rolę w procesie hemostazy. Proces ten polega na zahamowaniu krwawienia zapobiegając utracie krwi. Podstawową funkcją płytek krwi jest zapewnienie hemostazy pierwotnej, a więc formowanie czopu płytkowego w miejscu uszkodzenia śródbłónka naczynia. Trombocyty są również istotną składową hemostazy wtórnej, a więc procesów krzepnięcia krwi [18]. Zaburzenia ich funkcji manifestujące się nadreaktywnością prowadzą do poważnych konsekwencji klinicznych – incydentów zakrzepowo-zatorowych takich jak zawałów serca czy udarów mózgu [13]. Leczenie przeciwplateletowe stanowi podstawę leczenia choroby niedokrwiennej serca [2]. Dowody naukowe wskazują na skuteczność kwasu acetylosalicylowego (aspiryny) w prewencji wtórnej, a więc u pacjentów, którzy już przeżyli incydent niedokrwienności. U tych chorych ryzyko wystąpienia zawału serca, udaru mózgu lub innych incydentów zakrzepowo-zatorowych dzięki stosowaniu aspiryny zostało zredukowane nawet o 25% [4].

Zakres normy liczby płytek krwi oznaczany rutynowo w morfologii krwi obwodowej wynosi 150-400 x 10³/L. W warunkach fizjologicznych średni czas życia trombocytu wynosi ok. 10 dni. Następnie płytki są eliminowane z organizmu w śledzionie, wątrobie i szpiku kostnym. Proces ten odbywa się dzięki właściwościom żernym makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego w procesie fagocytozy.

Z punktu widzenia klinicznego istotne są nie tylko zaburzenia funkcji trombocytów, ale również ich liczby. Płytkowe skazy krwotoczne wynikają z nie-

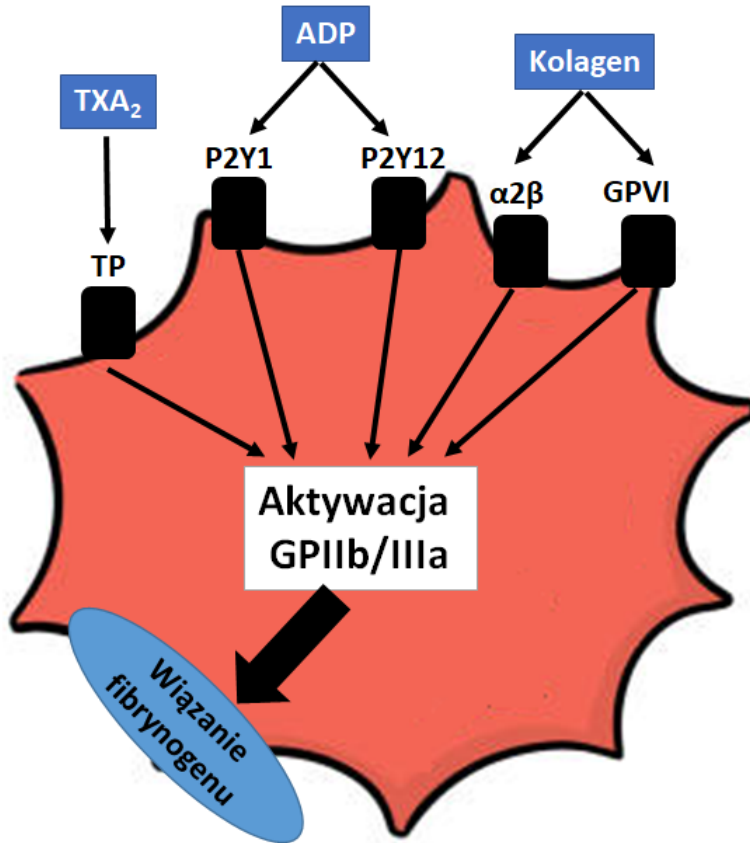
prawidłowej liczby płytek krwi oraz z zaburzeń ich funkcji (trombocytopatie). Małopłytkowość, a więc zbyt mała liczba płytek krwi, może być wywołana niedostateczną produkcją trombocytów (małopłytkowość centralna) lub zbyt szybką eliminacją (małopłytkowość obwodowa). Objawy kliniczne w postaci wybroczyn na skórze i błonie śluzowej oraz krwawień manifestują się zwykle, gdy liczba płytek krwi spada poniżej $30 \times 10^3/L$. Najbardziej poważne są krwawienia z przewodu pokarmowego i do centralnego układu nerwowego. W przypadku nadpłytkowości pierwotnych samoistnych lub w przebiegu zespołu mieloproliferacyjnego dochodzi zarówno do krwawień, jak i zmian zakrzepowych w naczyniach. Objawy występują zwykle, gdy liczba płytek krwi przekroczy $500 \times 10^3/L$. Nadpłytkowości wtórne występujące m.in. w przebiegu chorób nowotworowych są zwykle bezobjawowe i ustępują w miarę skutecznej terapii choroby podstawowej.

FIZJOLOGIA I PATOFIZJOLOGIA PŁYTEK KRWI

Płytki krwi, obok komórek śródbłonna, stanowią najważniejszą składową procesu krzepnięcia. Trombocyty to najmniejsze elementy morfotyczne krwi, które mają średnicę zaledwie 2-4 μ m i nie posiadają jądra. Powstają w wyniku procesu podziału cytoplazmy komórek szpiku kostnego – megakariocytów. W spoczynku mają formę płaskich dysków o gładkich krawędziach. W wyniku aktywacji dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu i zmiany kształtu trombocytów. Przyjmują one formę sferyczną z licznymi wypustkami ułatwiającymi agregację [35]. Błone trombocytów tworzą trzy warstwy mikrotubuli, przez które uwalniane są substancje z ziarnistości wewnątrz komórki. Z ziarnistości α uwalniane są białka adhezyjne: czynniki wzrostu (GF), czynnik tkankowy (TF), czynnik von Willebranda (vWF) oraz czynniki krzepnięcia i fibrynolizy. W ziarnistościach gęstych δ zmagazynowane są jony wapnia, ATP, ADP oraz serotonina. Receptory dla czynników aktywujących oraz hamujących funkcję płytek krwi zlokalizowane są na zewnętrznej stronie błony komórkowej [33].

ROLA PŁYTEK KRWI W PROCESIE FORMOWANIA ZAKRZEPY

Aktywacja płytek krwi zapoczątkowana jest przez związanie się agonistów takich jak trombina, tromboksan A₂, kolagen czy ADP z odpowiednimi receptorami powierzchniowymi (Ryc. 1). Wywołuje to opisaną powyżej zmianę kształtu komórki oraz aktywację glikoproteiny IIb/IIIa (płytkowego receptora dla fibrynogeny; GPIIb/IIIa), która wiąże się z fibrynogenem.



RYCINA 1. Schematyczny opis aktywacji płytki krwi przez wybranych agonistów i specyficzne dla nich receptory

FIGURE 1. A diagram describing platelet activation via agonists and specific receptors

Umożliwia to przyłączanie się kolejnych płytek krwi i tworzenie skupisk, a więc ich agregację. Aktywowane trombocyty uwalniają zawartość ziarnistości. Substancje zgromadzone w ziarnistościach α inicjują procesy koagulacji, ale również stanu zapalnego odgrywającego istotną rolę w procesie formowania skrzepliny tętnicznej. ADP, ATP oraz inne substancje uwolnione z ziarnistości δ wzmacniają proces aktywacji i agregacji. Dochodzi również do ekspozycji fosfolipidów na powierzchni płytek krwi. Prowadzi to do powstania trombiny, która odgrywa kluczową rolę w formowaniu skrzepliny w tętnicy [34].

Płytki krwi odgrywają kluczową rolę w procesie aktywacji kaskady krzepnięcia krwi oraz formowaniu zakrzepu. W sytuacji uszkodzenia śródbłonna uczestniczą w procesie jego naprawy. Uwalnianie miejscowych czynników wzrostu oraz

stymulacja procesu zapalnego przez trombocyty odgrywa istotną rolę w procesie tworzenia blaszki miażdżycowej [23]. Aktywowane płytki krwi uwalniają mediatory zapalne inicjując procesy chemotaksji oraz adhezji endoteliocytów. Dochodzi do aktywacji lokalnego procesu zapalnego i następczej migracji monocytów oraz granulocytów. W warunkach fizjologicznych proces zapalny zostaje ograniczony z użyciem tlenu azotu, prostaglandyny PGI₂ oraz ADP-azy, wydzielanych przez komórki śródbłonna naczyń [9].

Aktywacja płytek krwi to proces wieloetapowy, na który składają się inicjacja, ekstensja i perpetuacja. Kolejno dochodzi do zmiany kształtu komórki, adhezji (przylegania do śródnabłonka za pośrednictwem czynnika von Willebrandta), degranulacji i agregacji płytek. Aktywacja trombocytów jest inicjowana przez czynniki powierzchniowe naczyń, prowadzące do stymulacji receptorów, w których zachodzi najpierw konwersja dwufosforanu adenozy (ADP) w monofosforan adenozy (AMP) a następnie dalsza przemiana do adenozy, która pobudza agregację płytek krwi. Zasadniczą rolę odgrywają tu receptory związane z GPVI (P2Y₁ i P2Y₁₂) oraz receptor związany z kanałem wapniowym (P2X₁) [3].

W warunkach fizjologicznych endoteliocyty naczynia hamują proces aktywacji płytek poprzez uwalnianie tlenu azotu, prostaglandyny PGI₂ oraz ADP-azy. Kiedy jednak dojdzie do uszkodzenia naczynia, osoczowy czynnik vWF wiąże się z kolagenem, a następnie łączy się z płytkowym kompleksem glikoprotein (GP) GPIb/IX/V. W wyniku związania kolagenu z GPVI następuje adhezja płytek krwi do ściany naczynia. Kompleks GPIb/IX/V oraz GPVI regulują interakcje płytek krwi z krwinkami białymi, co stanowi istotę patogenezy stanu zapalnego oraz powstawania blaszki miażdżycowej w obrębie naczyń [1].

LEKI PRZECIWPŁYTKOWE

Aspiryna blokuje uwalnianie tromboksanu A₂ poprzez nieodwracalny proces acetylacji cyklooksygenazy-1, która umożliwia konwersję kwasu arachidonowego do tromboksanu A₂. Tromboksan A₂ jest silnym agonistą płytek krwi, powoduje degranulację ziarnistości płytek i przyspiesza ich agregację. Antyagregacyjny efekt działania aspiryny jest jednak ograniczony z uwagi na istnienie innych szlaków aktywacji trombocytów.

Receptor płytkowy P2Y₁ rozpoczyna proces aktywacji płytek krwi, natomiast receptor P2Y₁₂ odgrywa kluczową rolę we wzmocnieniu tego procesu. Potęgowane jest nie tylko samo zjawisko agregacji, ale również jej konsekwencje w postaci aktywacji płytek krwi, sekrecji zawartości ich ziarnistości oraz nasileniu aktywności prozakrzepowej trombocytów. Z uwagi na złożony efekt pobudzenia receptora P2Y₁₂ stał się on idealnym punktem uchwytu leków hamujących aktywność płytek krwi. Wprowadzenie do praktyki klinicznej inhibitorów tego receptora;

klopidogrelu, a następnie silniej działających prasugrelu i tikagreloru wiąże się z istotną redukcją złożonego punktu końcowego niedokrwiennego w terapii pacjentów z chorobą niedokrwinną serca [28]. Wykazano, że niedostateczna inhibicja płytek krwi u pacjentów poddanych zabiegom przezskórnej angioplastyki wieńcowej zwiększa ryzyko zakrzepicy w w stenozie oraz nawracających zdarzeń niedokrwienych układu sercowo-naczyniowego [20, 31].

Zrozumienie fizjologii płytek krwi i procesów aktywujących ich funkcję jest kluczowe w kontekście zapobiegania niekorzystnym zdarzeniom klinicznym.

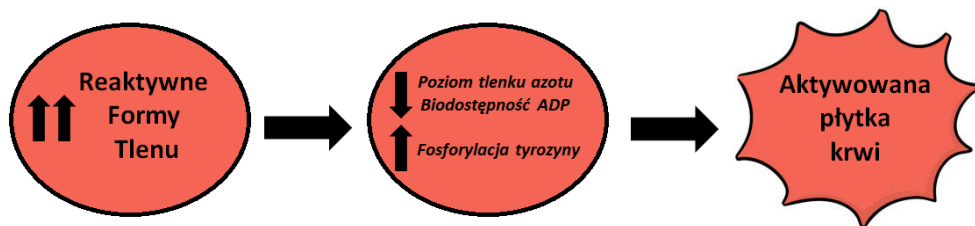
ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Wiele opracowań naukowych wyjaśnia mechanizmy aktywujące płytki krwi. Istotną rolę w tym procesie wydają się odgrywać również, egzo- jak i endogenne reaktywne formy tlenu (RFT), pochodne tlenu cząsteczkowego [29, 16]. RFT charakteryzują się obecnością przynajmniej jednego niesparowanego elektronu (Tab. 1). W rezultacie są to molekuly wysoce reaktywne i mogące destrukcyjnie działać na komponenty komórkowe. Należy jednak podkreślić, iż RFT są normalnym produktem metabolizmu komórkowego i w największym stopniu powstają na skutek działania łańcucha oddechowego. Dopiero poziom RFT, który przekracza możliwości antyoksydacyjne, na które w komórkach składa się układ enzymów (dysmutaza ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy glutationowej) i drobnocząsteczkowych antyoksydantów, prowadzi do zjawiska zwanego stresem oksydacyjnym. Jego rezultatem może być uszkodzenie struktury DNA, peroksydacja lipidów czy karbonylacja białek [5, 22, 6]. Stres oksydacyjny jest stanem towarzyszącym patofizjologii wielu różnych chorób, w tym schorzeń sercowo-naczyniowych. Ocena parametrów, które go określają, może więc mieć znaczenie kliniczne – nie tylko w ocenie stanu różnych grup pacjentów, ale także skuteczności czy inwazyjności stosowanych działań terapeutycznych [11, 32].

TABELA 1. Cztery najważniejsze reaktywne formy tlenu występujące w komórkach i ich połowiczny czas rozpadu

TABLE 1. Four most important intracellular reactive oxygen species and their half-life

NAZWA	SYMBOL	POŁOWICZNY CZAS ROZPADU [S]
Anionorodnik ponadtlenkowy	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6}
Nadtlenek wodoru	H_2O_2	10^{-3}
Rodnik hydroksykłowy	$\cdot OH$	10^{-9}
Tlen singletowy	1O_2	10^{-5}



RYCINA 2. Schemat przedstawiający główne szlaki aktywacji płytek krwi na skutek sygnalizującego działania reaktywnych form tlenu

FIGURE 2. A diagram showing platelet main activation pathways through reactive oxygen species signalling

Badania eksperymentalne prowadzone w modelach *in vitro* i *in vivo*, jak i obserwacje kliniczne prowadzone na wybranych grupach pacjentów, wskazują na istotną rolę RFT jako mediatorów różnych szlaków aktywacji i agregacji trombocytów [16] (Ryc. 2). Ekspresja enzymów antyoksydacyjnych i glutationu w płytkach krwi wskazuje zatem, iż ich rola nie ogranicza się tylko do ochrony przed cytotoksycznym działaniem RFT, ale obejmuje także regulację funkcji sygnalizacyjnych RFT [30]. Potwierdzają to badania płytek krwi z usuniętym genem kodującym dysmutazę ponadtlenkową, które charakteryzowały się wyższym stopniem aktywacji [7]. Z kolei, w obecności N-acetylocysteiny, która ulega przekształceniu w glutation, obserwowano spadek agregacji płytek krwi [19].

Jak wykazano, anionorodnik ponadtlenkowy wpływa na aktywację trombocytów indukowaną kwasem arachidonowym, kolagenem, ADP oraz trombiną [36, 17, 15]. Ponadto, wzrostowi poziomu anionorodnika ponadtlenkowego towarzyszy spadek wewnątrz-płytkowego stężenia tlenu azotu, co dodatkowo sprzyja agregacji. Wreszcie, anionorodnik ponadtlenkowy zwiększa dostępność ADP, co sprzyja rekrutacji płytek i formowaniu zakrzepu [15]. Z kolei, nadtlenek wodoru również sprzyjał aktywacji płytek krwi indukowanej kwasem arachidonowym oraz kolagenem, a także poprzez fosforylację $\beta 3$ tyrozyny [27, 10]. Wszystko to podkreśla wartość oceny stanu redoks płytek krwi nie tylko w zakresie badań nauk podstawowych, ale także i znaczenia klinicznego [12].

W związku z tym, działania terapeutyczne, zmniejszające poziom RFT i co za tym, idzie stresu oksydacyjnego, mogą potencjalnie przyczynić się do spadku reaktywacji płytek krwi, a w konsekwencji również ryzyka wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych [14, 26]. Protekcyjne działanie antyoksydantów na aktywność płytek krwi wykazano m.in. dla witaminy E, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, polifenolowych ekstraktów z pomidora czy ekstraktów z grzybów hodowlanych [8, 21, 25].

PODSUMOWANIE

Celem tego opracowania jest zwrócenie uwagi na istotę podejścia multidyscyplinarnego do zagadnienia aktywacji płytek krwi. Wydaje się, że uwzględnienie znaczenia procesów redox jest istotne nie tylko pod względem identyfikacji czynników etiologicznych zdarzeń zakrzepowo-zatorowych w kardiologii, ale może odgrywać istotną rolę w utrzymaniu hemostazy. Kliniczne znaczenie RFT w aktywacji płytek krwi oraz celowość zastosowania antyoksydantów w farmakoterapii chorób układu sercowo-naczyniowego wciąż nie zostały potwierdzone i konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

LITERATURA

- [1] ANDREWS RK, GARDINER EE, SHEN Y, et al. Platelet interaction in thrombosis. *IUBMB Life* 2004; **56**: 13-18.
- [2] ANTITHROMBOTIC TRIALISTS COLLABORATION: Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; **324**: 71-86.
- [3] AUTHI K.S. Ora1: a channel to safer antitrombotic therapy. *Blood* 2009; **113**: 1872.
- [4] BAIGENT C, BLACKWELL L, COLLINS R, i wsp. Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration: Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 2009; **373**: 1849-1860.
- [5] BARZILARI A, YAMAMOTO K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2004; **3**: 1109-1115.
- [6] FEDOROVA M, BOLLINENO RC, HOFFMAN R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytic strategies. *Mass Spec Rev* 2013; **33**: 79-97.
- [7] FIDLER TP, ROWLEY JW, ARAUJO C, et al. Superoxide dismutase 2 is dispensable for platelet function. *Thromb Haemost.* 2017; **117** (10): 1859-1867.
- [8] FREEDMAN JE, KENAEE JF. JR. Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *J Nutr.* 2001; **131** (2): 374S-7S.
- [9] GAWAZ M, LANGER H, MAY AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3378-3384.
- [10] IRANI K, PHAM Y, COLEMAN LD, et al. Priming of platelet α Ib β 3 by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of β 3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1698-1706.
- [11] KOMOSA A, PEREK B, RZYMSKI P, LESIAK M, SILLER-MATULA J.M, GRYGIER M, PUŚLECKI M, MISTERSKI M, OLASIŃSKA-WIŚNIEWSKA A, ROPACKA-LESIAK M, KRASIŃSKI Z, NIEDZIELSKI P, MULAREK-KUBZDELA T, PONIEDZIAŁEK B. Transcatheter Aortic Valve Replacement Is Associated with Less Oxidative Stress and Faster Recovery of Antioxidant Capacity than Surgical Aortic Valve Replacement. *J. Clin. Med.* 2019; **8**: 1364.
- [12] KOMOSA A, RZYMSKI P, PEREK B, ROPACKA-LESIAK M, LESIAK M, SILLER-MATULA JM, PONIEDZIAŁEK B. Platelets redox balance assessment: current evidence and methodological considerations. *Vascul Pharmacol* 2017; **93-95**: 6-13.
- [13] KOMOSA A, SILLER-MATULA JM, LESIAK M, MICHALAK M, KOWAL J, MĄCZYŃSKI M, SINIAWSKI A, MULAREK-KUBZDELA T, WIŚNIEWSKI S, GRAJEK S. Association between high on-treatment platelet reactivity and occurrence of cerebral ischemic events in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res.* 2016 Feb; **138**: 49-54

- [14] KRASIŃSKA B, OSIŃSKA A, OSIŃSKA M, KRASIŃSKA A, RZYMSKI P, TYKARSKI A, KRASIŃSKI Z. Standardised tomato extract as an alternative to acetylsalicylic acid in patients with primary hypertension and high cardiovascular risk - a randomised, controlled trial. *Arch Med Sci* 2018; **14** (4): 773-780.
- [15] KRÖTZ F, SOHN HY, GLOE T, et al. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 2002; **100**: 917-924.
- [16] KRÖTZ F, SOHN HY, POHL U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; **24**: 1988-1996.
- [17] LEO R, PRACTICO D, IULIANO L, et al. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 1997; **95**: 885-891.
- [18] LEWANDOWSKI K. Wybrane problem trombofilii. *Acta Haematologica Polonica* 2010; **41**(2): 201-207.
- [19] LOSCALZO J. N-Acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin. *J Clin Invest.* 1985; **76**: 703-708.
- [20] MATETZKY S, SHENKMAN B, GUETTA V, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; **109**: 3171-3175.
- [21] McDONALD DM, O'KANE F, McCONVILLE M, et al. Platelet redox balance in diabetic patients with hypertension improved by n-3 fatty acids. *Diabetes Care* 2013; **36**: 998-1005.
- [22] NIKI E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors* 2008; **34**: 71-180.
- [23] PAGE C.P.: Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacology* 1989; **17**: 51-59.
- [24] PIGNATELLI P, MENICHELLI D, PASTORI D, VIOLI F. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. *Kardiol Pol* 2018; **76** (4): 713-722.
- [25] PONIEDZIAŁEK B, MLECZEK M, NIEDZIELSKI P, SIWULSKI M, GAŚECKA M, KOZAK L, KOMOSA A, RZYMSKI P. Bio-enriched Pleurotus mushrooms for deficiency control and improved antioxidative protection of human platelets? *Eur Food Res Technol* 2017; **243** (12): 2187-2198.
- [26] PONIEDZIAŁEK B, SIWULSKI M, WIATER A, KOMANIECKA I, KOMOSA A, GAŚECKA M, MAGDZIAK Z, MLECZEK M, NIEDZIELSKI P, PROCH J, ROPACKA-LESIAK M, LESIAK M, HENAO E, RZYMSKI P. The Effect of Mushroom Extracts on Human Platelet and Blood Coagulation: In vitro Screening of Eight Edible Species. *Nutrients* 2019; **11**: 3040.
- [27] PRACTICO D, IULIANO L, PULCINELLI FM, et al. Hydrogen peroxide triggers activation of human platelets selectively exposed to nonaggregating concentrations of arachidonic acid and collagen. *J Lab Clin Med* 1992; **119**: 364-370.
- [28] PRICE MJ, ENDEMANN S, GOLLAPUDI RR, et al., Prognostic significance of postclopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *Eur. Heart J.* 2008; **29**: 992-1000.
- [29] QIAO J, ARTHUR JF, GARDINER EE, ANDREWS RK, ZENG L, XU K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox Biol.* 2018; **14**: 126-130.
- [30] REY C, VERICEL E, NEMOZ G, CHEN W, CHAPUY P, LAGRADE M. Purification and characterization of glutathione peroxidase from human blood platelets. Age-related changes in the enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1994; **1226**: 219-224.
- [31] SILLER-MATULA JM, TRENK D, SCHROER K, et al., How to improve the concept of individualised antiplatelet therapy with P2Y12 receptor inhibitors—is an algorithm the answer? *Thromb. Haemost.* 2015; **113** (1): 37-52.
- [32] SMUKOWSKA-GORYNIA A, RZYMSKI P, MARCINKOWSKA J, et al. Prognostic Value of Oxidative Stress Markers in Patients with Pulmonary Arterial or Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, Article ID 3795320, 10 pages, 2019.
- [33] SMYTH SS, WHITEHEART S, ITALIANO JE, COLLIER BS. Platelet morphology, biochemistry and function. W: Williams Hematology. KAUSHANSKY K, BEUTLER E, SELIGSOHN U, LICHTMAN MA, KIPPS TJ, PRCHAL JT. (RED.). MCGRAW-HILL, New York 2010; 1735-1814.

- [34] TRELIŃSKI J, CHOJNOWSKI K. Hemostaza i tromboza. W: Wielka Interna. ANTCZAK A, MYŚLIWIEC M, PRUSZCZYK P. (RED.). HEMATOLOGIA, DMOZYŃSK A. Medical Tribune Polska, Warszawa 2011; 68-81.
- [35] VARGA-SZABO D, PLEINES I, NIESWANDT B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 403-412.
- [36] AMAGISHI SI, EDELSTEIN D, DU XL, et al. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001; **50**: 1491-1494.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 13.12.2019

Przyjęto: 05.01.2020

Anna Komosa

e-mail: komosa.ania@ump.edu.pl

POTRÓJNIE NEGATYWNY RAK PIERSI – PERSPEKTYWY ROZWOJU DIAGNOSTYKI I TERAPII

TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER – RECENT
DEVELOPMENTS IN DIAGNOSIS AND TREATMENT

Natalia SIMINIAK¹, Dariusz IŻYCKI², Rafał CZEPCZYŃSKI¹

¹Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych

²Zakład Immunologii Nowotworów

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Pomimo dynamicznego rozwoju metod diagnostycznych i terapeutycznych rak piersi stanowi nadal istotny problem kliniczny. Dotyczy to zwłaszcza podtypu raka potrójnie ujemnego, którego komórki wykazują brak receptorów estrogenowych i progesteronowych, a także receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER-2). Potrójnie ujemny rak piersi charakteryzuje się znacznym potencjałem proliferacyjnym, jest wysoce agresywny i szybko generuje przerzuty. Brak receptorów hormonalnych wyklucza skuteczność leczenia hormonalnego, natomiast brak receptora HER-2 uniemożliwia zastosowanie immunoterapii skierowanej na ten receptor. Skuteczność standardowego leczenia, opierającego się na wielolekowej chemioterapii, jest ograniczona. W najnowszych rekomendacjach uwzględniono terapię inhibitorami polimerazy poli(ADP-rybozy), biorącej udział w mechanizmie naprawy DNA, u pacjentek z potwierdzoną mutacją BRCA. Możliwość nowych metod terapii wskazują także badania nad heterogenicznością potrójnie negatywnego raka piersi, dzięki czemu do schematów leczenia wprowadzono m.in. inhibitory receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), inhibitory czynnika wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF) oraz inhibitory kinazy serynowo-treoninowej mTOR. Jednakże istotnym problemem klinicznym w terapii potrójnie negatywnego raka piersi jest lekooporność, w mechanizmie jej powstawania sugeruje się możliwość obniżonej ekspresji semaforyny 3A.

Rozwój medycyny nuklearnej umożliwia zastosowanie pozytronowej tomografii emisyjnej do wizualizacji zmian, w tym nawrotów i przerzutów, w sytuacji gdy wyniki innych badań obrazowych są wątpliwe. Ostatnio wykazano obecność antygenu błonowego gruczołu krokowego (PSMA) w komórkach śródbłónka raka piersi, szczególnie potrójnie ujemnego. Stwarza to potencjalną możliwość wykorzystania znakowanych ligandów PSMA zarówno w diagnostyce, jak i w postaci radioimmunofarmaceutyków w terapii izotopowej tego nowotworu.

Słowa kluczowe: rak piersi, TNBC, chemioterapia, radioimmunoterapia

Summary: Despite dynamic development of diagnostics and treatment methods in recent years, breast cancer remains an important clinical problem. It particularly refers to triple negative subtype, in which cells present no estrogen and progesterone receptors as well as no human epithelial growth factor receptor (HER-2). Triple negative breast cancer (TNBC) has a high proliferation potential, is highly aggressive and rapidly generates metastases. Lack of hormone receptors excludes possibility of successful hormone therapy and lack of HER-2 makes immunotherapy oriented on that molecule ineffective. The efficacy of standard treatment based on multiple chemotherapy is limited. Recent guidelines recommend a use of inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase, which is involved in DNA repair, in patients with BRCA mutations. Recent studies on heterogeneity of TNBC indicate novel treatment methods, including inhibitors of epithelial growth factor receptor (EGFR), inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors (VEGF) and serine-threonine kinase mTOR inhibitors. However, drug resistance consist an important problem in TNBC treatment and decreased expression of semaphorin 3A is suggested to be involved.

The developments in nuclear medicine enable positron emission tomography to be used for visualization of relapse and metastases, especially when other imaging modalities provide conflicting results. Recently the presence of prostate specific membrane antigen (PSMA) has been shown in endothelial cells of breast cancer, particularly TNBC. Therefore potential use of radiolabeled PSMA ligands in breast cancer diagnosis and radioimmunotherapy is considered.

Keywords: breast cancer, TNBC, chemotherapy, radioimmunotherapy

EPIDEMIOLOGIA I CHARAKTERYSTYKA

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem kobiet według American Cancer Society [31] i drugą co do częstości przyczyną zgonów nowotworowych kobiet w Polsce. Zgodnie z danymi Krajowego Rejestru Nowotworów zachorowalność w ciągu ostatnich trzech dekad wzrosła ponad dwukrotnie [29]. Przyczyna większości zachorowań na raka piersi jest nieznana. Najważniejszym czynnikiem ryzyka jest starszy wiek, a w dalszej kolejności: nosicielstwo mutacji niektórych genów (przede wszystkim *BRCA1* i *BRCA2*), rodzinne występowanie raka piersi, zwłaszcza w młodszym wieku. Do najważniejszych czynników o znaczeniu rokowniczym należą: wielkość guza; typ histologiczny raka i jego stopień złośliwości; obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachy oraz liczba węzłów zajętych przerzutami; stan receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PR); naciekanie okołoguzowych naczyń chłonnych i żylnych; stan HER2, wskaźnik proliferacji Ki67 oraz podtyp biologiczny (ang. *intrinsic subtype*). W ostatnich latach wykazano rokownicze znaczenie oznaczanych przy zastosowaniu różnych technologii tak zwanych profili lub sygnatur molekularnych. Metody te mogą dostarczyć istotnych informacji uzupełniających wynik badania patomorfologicznego, szczególnie odnośnie do celowości zastosowania chemioterapii (CHT) u chorych na raka hormonozależnego. Metody te, określane są także jako wielogenowe testy predykcyjne.

Wyróżnia się 4 główne podtypy biologiczne (Tab.1), które są podstawą wyboru leczenia systemowego: rak luminalny A, luminalny B, HER2-dodatni (nieluminalny) i rak potrójnie ujemny (TNBC).

TABELA 1. Podział podtypów biologicznych raka piersi ze względu na ocenę patomorfologiczną obecność: receptorów ER (receptor estrogenowy), PR (receptor progesteronowy), HER2 (ang. *Human Epithelial Growth Factor Receptor*), Ki-67 (wskaźnik proliferacji)

TABLE 1. Biological subtypes of breast cancer, based on morphology findings: presence of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), Human Epithelial Growth Factor Receptor 2 (HER2) and Ki-67 (proliferation index)

Luminalny A	ER+, PR+, HER2-, Ki-67<14%
Luminalny B	ER/PR+, HER2+/-, Ki-67 >14%
HER2-dodatni	ER-, PR-, HER2+
Potrójnie negatywny (TNBC)	ER-, PR-, HER2-

LECZENIE POTRÓJNIE NEGATYWNEGO RAKA PIERSI

Potrójnie negatywny rak piersi (ang. *Triple Negative Breast Cancer*, TNBC) należący do grupy bazalopodobnych raków piersi występuje u około 20% pacjentek z rakiem piersi. TNBC stanowi 80% wszystkich raków tej grupy. Ze względu na brak ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych, a także niską ekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu HER2, TNBC charakteryzuje pierwotną opornością na hormonoterapię oraz niewrażliwość na immunoterapię za pomocą Trastuzumabu i Pertuzumabu. Duża heterogenność komórek nowotworowych oraz wysoki potencjał proliferacyjny pogarsza rokowanie, z powodu dużego potencjału tworzenia odległych przerzutów [2]. Leczenie cytostatykami opiera się na wielolekowych schematach chemioterapii, głównie antracyklinami oraz taksoidami [6, 7]. Ostatnie doniesienia wskazują na zasadność zastosowania platyny w terapii neoadjuwantowej, u chorych zaawansowanych z mnogimi przerzutami [20]. U nosicielek mutacji *BRCA1/2* zastosowanie przedoperacyjnej CHT z udziałem karboplatyny pozwala uzyskać wyższy odsetek odpowiedzi klinicznej, ale bez znamienego wpływu na wskaźniki przeżycia. Włączenie terapii neoadjuwantowej przed operacją w 20% przypadków umożliwia całkowitą remisję, jednakże brak odpowiedzi jest jednoznaczny z wysokim ryzykiem nawrotów i lekooporności w przeciągu pierwszych trzech lat [22]. U chorych na trójujemnego raka piersi, po wcześniejszej uzupełniającej CHT z udziałem antracyklin i ewentualnie taksoidów, karboplatyna i docetaksel charakteryzują się podobną skutecznością przy lepszej tolerancji karboplatyny, natomiast w podgrupie chorych z dziedziczną mutacją *BRCA* zastosowanie karboplatyny pozwala uzyskać wyższy odsetek odpowiedzi.

OPORNOŚĆ NA LECZENIE

Wyjaśnienie dokładnego mechanizmu oporności jest trudne i wielopłaszczyznowe. W powstawaniu oporności uczestniczą między innymi: mikrośrodowisko guza, komórki macierzyste jak i masowe nowotworu oraz różne alternatywy ścieżek sygnalizacyjnych w obrębie komórek. Ponadto, podtyp TNBC charakteryzuje się heterogennością molekularną, co dodatkowo utrudnia określenie jednego mechanizmu chemiooporności [10].

Znaczne różnice w odpowiedzi klinicznej na leczenie jednoznacznie wskazują na obecność różnic molekularnych w obrębie komórki nowotworu. Powszechnie wiadomo, że pacjenci z nowotworami niskozróżnicowanymi oraz szybko generującymi przerzuty są najbardziej narażeni na lekooporność [33]. Jednym z mechanizmów branych pod uwagę jest ekspresja semaforyny 3A (SEMA3A), białka błonowego i wydzielniczego, które początkowo zaliczano do molekuł sygnalizacyjnych, biorących udział w nakierowywaniu aksonów [17]. Wykazano obniżoną ekspresję SEMA3A w raku jajnika, raku żołądka, raku prostaty, czy glejaku wielopostaciowym [17, 18, 34]. Ponadto, obniżona ekspresja korelowała ze stopniem złośliwości czy głębokości inwazji, ale także z generowaniem przerzutów i zróżnicowaniem komórek. SEMA3A charakteryzuje działanie antyangiogenne i może wykazywać właściwości antyonkogenne, takie jak promowanie apoptozy, hamowanie migracji komórek guza, jak i proliferacji [27]. W raku żołądka obniżoną ekspresję SEMA3A określono jako prawdopodobny negatywny czynnik prognostyczny, natomiast w raku prostaty obecność SEMA3A wiązała się z dobrym rokowaniem, np. niskim PSA przedoperacyjnym [21, 36].

W raku piersi wykazano obniżoną ekspresję semaforyny 3A, w porównaniu z prawidłową tkanką gruczołu piersiowego [32]. Konieczne są jednak dalsze badania w celu określenia roli ekspresji semaforyny 3A w mechanizmie lekooporności, jak również jej występowania w obrębie podtypów raka piersi.

NOWE METODY TERAPII

Terapie celowane są głównym wyzwaniem farmakologii przeciwnowotworowej i najbardziej obiecujące w zakresie skuteczności leczenia. Mutacje genów BRCA, które biorą udział w mechanizmie naprawy DNA, wiążą się z ponad 10-krotnym wzrostem ryzyka zachorowania na raka piersi. W podtypie potrójnie negatywnego raka piersi mutacje BRCA1 występują najczęściej [5, 9]. Polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP) to rodzina enzymów naprawiających DNA w mechanizmie wycinania zasad, której aktywność znacznie wzrasta u pacjentów nowotworowych z zaburzeniami rekombinacji homologicznej spowodowanej

mutacją BRCA [12, 19]. Hamując aktywność PARP komórki nowotworowe stają się wrażliwe na leki cytotoksyczne oraz podatne na śmierć komórkową, ponieważ mechanizm naprawy DNA jest zaburzony zarówno w mechanizmie wycinania zasad, jak i rekombinacji homologicznej [1]. W 2019 roku organizacje FDA oraz EMA w swych rekomendacjach zaaprobowwały stosowanie inhibitora PARP – olaparibu w leczeniu pacjentek z mutacją BRCA, nie tylko w HER-negatywnym raku piersi, ale również w raku jajnika [13]. Mutacja w obrębie BRCA wiąże się najbardziej z ryzykiem wystąpienia podtypu potrójnie negatywnego, lecz jedynie 10% pacjentek z rakiem piersi jest nosicielem tej mutacji [9].

Receptor naskórkowy (EGFR) występuje w około 60% przypadków potrójnie negatywnego raka piersi. Badania sugerują wykorzystanie inhibitorów EGFR w leczeniu TNBC, stosując przeciwciała monoklonalne, albo inhibitory kinazy tyrozynowej. Do terapii pacjentek wprowadzono także inhibitory czynnika wzrostu śródbłónka naczyń VEGF, ograniczając neowaskualizację w obrębie guza, a także inhibitory kinaz mTOR, stosowanych w celu zapobiegania generowania przerzutów [28].

HETEROGENICZNOŚĆ POTRÓJNIE NEGATYWNEGO RAKA PIERSI

Podtyp potrójnie negatywny raka piersi od lat był uważany za heterogeniczny molekularnie. W ciągu ostatnich lat wyróżniono jego cztery podtypy: luminalny z receptorem androgenowym (AR), mezenchymalny, bazalny immunosupresyjny oraz bazalny immunoaktywny. Wykorzystanie różnic molekularnych w leczeniu wydaje się obiecujące, jednakże obecnie European Society of Medical Oncology (ESMO) uwzględnia jedynie podtyp luminalny AR jako prawdopodobnie wymagający odrębnej terapii [6].

Receptor androgenowy (AR) należy do rodziny receptorów steroidowych, fizjologicznie odpowiada za rozwój męskich narządów płciowych czy spermatogenezę. Pomimo braku receptorów estrogenowych w badaniu immunohistochemicznym, ich molekularną oznakę wykazano w 1% komórek raka podtypu luminalnego AR. Może to wskazywać na częściową odpowiedź na leczenie hormonalne, stosowane w podtypie ER-dodatnim [5]. Zaobserwowano znaczenie sygnalizacji androgenowej w stymulacji rozwoju komórek raka piersi w różnych liniach komórkowych, co potencjalnie umożliwia skuteczne leczenie antyandrogenowe. Jednakże niewystarczająca liczba dotychczas przeprowadzonych badań uniemożliwia rutynowe stosowanie takiego leczenia.

W przypadku raka potrójnie negatywnego McGhan i wsp. opisali grupę 119 pacjentek, u których wykazano ekspresję AR aż w 23% materiałów tkankowych

[25]. Ekspresję AR zaobserwowali oni szczególnie u pacjentek starszych i z przerzutami do węzłów chłonnych. Gucałp i wsp. opisali II fazę kliniczną oceny leczenia antyandrogenowego bicalutamidem u pacjentek z TNBC. Wskaźnik korzyści klinicznej CBR (ang. *Clinical Benefit Rate*) wyniósł 19%, średnia życia bez progresji 12 tygodni, a leczenie było dobrze tolerowane [14]. Kolejna analiza terapii antyandrogenowej w II fazie badań klinicznych przy pomocy leku abirateron, obejmowała 34 pacjentki, z czego u jednej wystąpiła remisja całkowita oraz u pięciu ponad 6-miesięczna stabilizacja choroby [3]. Ocena zależności ekspresji AR u pacjentek z TNBC jest kluczowa, w celu opracowania nowej skutecznej terapii celowanej.

MEDYCYNA NUKLEARNA W RAKU PIERSI

Badania nad nowymi metodami leczenia, nie opierają się wyłącznie na terapiach systemowych. Medycyna nuklearna jest wykorzystywana w onkologii zarówno w celach diagnostycznych jak i leczniczych. Niestety rola pozytronowej tomografii emisyjnej w połączeniu z tomografią komputerową (PET/CT) w określeniu sposobu postępowania w raku piersi jest ograniczona, głównie ze względu na wysokie koszty. Badanie PET/CT z użyciem ^{18}F -FDG jest wskazane głównie w rozpoznawaniu nawrotów po radykalnym leczeniu, kiedy wyniki innych badań obrazowych są wątpliwe. Jednakże intensywny rozwój medycyny nuklearnej zarówno w zakresie dostępności radiofarmaceutyków, jak i nowych procedur, powoduje zwiększenie obszaru jej wykorzystania. Ostatnim ważnym przełomem w medycynie nuklearnej było udowodnienie wartości PSMA (ang. *Prostate Specific Membrane Antigen*) w raku prostaty, zarówno w diagnostyce PET przy użyciu cząsteczek PSMA znakowanych galem-68 lub fluorem-18, jak i w leczeniu za pomocą cząsteczek znakowanych emiterami promieniowania beta lub alfa [30].

Terapia izotopowa jest najczęściej wykorzystywana jako terapia uzupełniająca po leczeniu chirurgicznym raka tarczycy, ma na celu zlikwidowanie potencjalnych pozostałości komórek nowotworowych [15]. Podobny schemat został wykorzystany przy próbie leczenia izotopowego raka prostaty za pomocą ^{177}Lu -PSMA-617. Analiza skuteczności tego leczenia u prawie 150 pacjentów wykazała wysokie wskaźniki odpowiedzi i bezpieczeństwa [30].

Antygen błonowy gruczołu krokowego (PSMA) to glikoproteina, która występuje w nabłonku wydzielniczym prostaty, ale jej wysoka ekspresja jest obserwowana również w komórkach raka gruczołu krokowego. Już w 1999 roku Chang i wsp. udowodnili immunohistochemicznie obecność PSMA również w komórkach śródbłonka raka piersi oraz raka nerki, pęcherza moczowego, czerniaka i innych nowotworów [8]. Wskazano prawdopodobną rolę PSMA w neowaskularyzacji nowotworowej i nie wykazano jego ekspresji w tkankach nienowotworowych.

W obrębie raka piersi Tolkach i wsp. potwierdzili ekspresję PSMA u 60% chorych. Najwyższą ekspresję wykazywał podtyp potrójnie negatywnego raka piersi, gdzie u wszystkich 33 pacjentek potwierdzono obecność PSMA [35]. Morgenroth i wsp. zbadali śródbłonkową ekspresję PSMA w komórkach potrójnie negatywnego raka piersi, transfekowanych u myszy, przeprowadzając badanie μ PET [26]. Wysoki współczynnik akumulacji wiązania znakowanego ligandu PSMA z receptorem został zaobserwowany w komórkach podtypu TNBC, w przeciwieństwie do komórek podtypu ER dodatniego.

Wcześniejsze wykorzystanie ekspresji PSMA do leczenia izotopowego raka prostaty, a także pierwsze opublikowane spostrzeżenia dotyczące obecności tego antygenu na komórkach raka piersi skłaniają do podjęcia w przyszłości podobnych badań klinicznych dotyczących terapii TNBC. Wydaje się, że z uwagi na prawdopodobnie najwyższą ekspresję antygenu PSMA, ten typ raka piersi będzie w przyszłości mógł być leczony przy pomocy liganda będącego radiofarmaceutykiem. Ostatnio opublikowano wyniki pierwszego badania klinicznego, w którym zastosowano terapię znakowanym ligandem PSMA – 177-Lu-PSMA u chorej na potrójnie negatywnego raka piersi [35]. Ze względu na wysoki stopień zaawansowania choroby oraz dużą dynamikę progresji choroby pacjentka nie ukończyła leczenia. Podsumowując, wstępne wyniki badań potwierdzają obecność antygenu PSMA w komórkach potrójnie negatywnego raka piersi, co budzi nadzieję na zastosowanie znakowanych radioaktywnie ligandów tego antygenu w obrazowaniu PET, jak i w zindywidualizowanej terapii.

RAK PIERSI U MĘŻCZYZN

Rak gruczołu piersiowego jest niezwykle rzadki u mężczyzn, stanowi około 1% wszystkich nowotworów i występuje z częstością 100 razy mniejszą niż u kobiet. Nieczęsto dochodzi do wczesnej diagnozy, ze względu na sporadyczność występowania i ograniczoną świadomość zarówno lekarzy jak i pacjentów. Czynniki ryzyka raka piersi u mężczyzn obejmują; predyspozycję genetyczną, wiek, czynniki środowiskowe oraz obciążony wywiad rodzinny [1]. Występująca rodzinnie mutacja BRCA2 predysponuje u mężczyzn nie tylko do występowania raka piersi, ale również raka trzustki, prostaty oraz pęcherzyka żółciowego [4]. Nowotwory pacjentów, u których potwierdzono mutację BRCA2, charakteryzuje wysoki stopień złośliwości, obecność receptorów hormonalnych i wielokrotnie wiąże się z zajęciem węzłów chłonnych [16]. Leczenie raka piersi u mężczyzn opiera się głównie na chirurgicznym usunięciu gruczołu piersiowego i adiuwantową chemioterapią. Jednakże analizy nad inhibitorami PARP zwiększają możliwości terapeutyczne u mężczyzn z mutacją BRCA2. Opublikowano próby leczenia pacjentów olaparibem z BRCA2-dodatnim rakiem prostaty [24], jednakże wię-

cej badań jest potrzebnych by potwierdzić skuteczność leczenia inhibitorami PARP w raku piersi u mężczyzn. Badano skuteczność leczenia antyestrogenowego – tamoksifenem i wykazano statystycznie wyższy czas całkowitego przeżycia w porównaniu z zastosowaniem inhibitorów aromatazy. Interpretacje wyników leczenia wskazują terapię tamoksifenem jako korzystne leczenie u pacjentów z rakiem piersi z obecną ekspresją receptorów hormonalnych [11].

LITERATURA

- [1] BI L, LI J, SHI Z, ZHU Z, LU Z. Male accessory breast cancer successfully treated with endocrine therapy: A case report. *Oncol Lett* 2015; **10**: 2495-2498.
- [2] BOYLE P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* 2012; **23**/suppl_6: vi7-vi12
- [3] BONNEFOI H, GRELLETY T, TREDAN O, SAGHATCHIAN M, DALENC F, MAILLIEZ A, L'HARIDON T, ET AL. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Ann Oncol* 2016; **27**/5: 812-818
- [4] BREAST CANCER LINKAGE CONSORTIUM. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**:1310.
- [5] BURSTEIN MD, TSMELZON A, POAGE GM, COVINGTON KR, CONTRERAS A, FUQUA SAW, SAVAGE MI, ET AL. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2015; **21**/7: 1688-98.
- [6] CARDOSO F, KYRIAKIDES S, OHNO S, PENAULT-LLORCA F, POORTMANS P, RUBIO IT, ZACKRISSON S, SENKUS E. On behalf of the ESMO Guidelines Committee. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2019; **30**/8: 1194-1220.
- [7] CARDOSO F, SENKUS E, COSTA A, PAPADOPOULOS E, AAPRO M, ANDRÉ F, HARBECK N, ET AL. 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4). *Ann Oncol* 2018; **29**/8: 1634-1657.
- [8] CHANG SS, REUTER VE, HESTON WDW, BANDER NH, GRAUER LS, GAUDIN PB. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 1999; **59**/13: 3192-3198.
- [9] CHEN H, WU J, ZHANG Z, TANG Y, LI X, LIU S, CAO S, LI X. Association between *BRC1* status and triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 909.
- [10] DENT R, TRUDEAU M, PRITCHARD KI, HANNA WM, KAHN HK, SAWKA CA, LICKLEY LA, ET AL. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; **13**/15: 4429-4434.
- [11] EGGEMANN H, IGNATOV A, SMITH BJ, ALTMANN U, VON MINCKWITZ G, RÖHL FW, JAHN M, COSTA SD. Adjuvant therapy with tamoxifen compared to aromatase inhibitors for 257 male breast cancer patients; *Breast Cancer Res Treat* 2013; **137**, 465-470.
- [12] FARMER H, MCCABE N, LORD C, ET AL. Targeting the DNA repair defect in *BRC1* mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; **434**: 917-921.
- [13] FRANZESE E, CENTONZE S, DIANA A, CARLINO F, GUERRERA LP, DI NAPOLI M, DE VITA F ET AL. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 2019; **73**: 1-9.
- [14] GUCALP A, TOLANEY S, ISAKOFF SJ, ET AL. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 5505-5512.

- [15] HAUGEN BR, ALEXANDER EK, BIBLE KC, DOHERTY GM, MANDEL SJ, NIKIFOROV YE, PACINI F, ET AL. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016; **26/1**: 1-113.
- [16] IBRAHIM M, YADAV S, OGUNLEYE F, ZAKALIK D. Male BRCA mutation carriers: clinical characteristics and cancer spectrum. *BMC Cancer* 2018; **18/1**: 179.
- [17] IŻYCKA N, STERZYŃSKA K, JANUCHOWSKI R, NOWAK-MARKWITZ E. Semaphorin 3A (SEMA3A), protocadherin 9 (PCDH9), and S100 calcium binding protein A3 (S100A3) as potential biomarkers of carcinogenesis and chemoresistance of different neoplasms, including ovarian cancer — review of literature. *Ginekol Pol* 2019; **90/4**: 223-227.
- [18] JIANG H, QI L, WANG F, SUN Z, HUANG Z, XI Q. Decreased semaphorin 3A expression is associated with a poor prognosis in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Int J Mol Med* 2015; **35**: 1374-1380.
- [19] JUAREZ-SALINAS H, SIMS J, JACOBSON M. Poly(ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells. *Nature* 1979; **282**: 740-741.
- [20] LEBERT JM, LESTER R, POWELL E, SEAL M, MCCARTHY J. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr Oncol* 2018; **25**(Suppl 1): S142-S150.
- [21] LI K, CHEN MK, LI LY, LU MH, SHAO CK, SU ZL, HE D, ET AL. The predictive value of semaphorins 3 expression in biopsies for biochemical recurrence of patients with low- and intermediate-risk prostate cancer. *Neoplasma* 2013; **60/6**: 683-689.
- [22] LIEDTKE C, MAZOUNI C, HESS KR, ANDRE F, TORDAI A, MEJIA JA, SYMMANS WF, ET AL. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; **26**:1275-1281.
- [23] LORD CJ, MCDONALD S, SWIFT S, TURNER NC, ASHWORTH A. A high throughput RNA interference screen for DNA repair determinants of PARP inhibitor sensitivity. *DNA Repair* 2008; **7/12**: 2010-2019.
- [24] MATEO J, CARREIRA S, SANDHU S, MIRANDA S. DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2015; **373/18**: 1697-708.
- [25] MCGHAN LJ, MCCULLOUGH AE, PROTHEROE CA, DUECK AC, LEE JJ, NUNEZ-NATERAS R, CASTLE EP, ET AL. Androgen receptor-positive triple negative breast cancer: a unique breast cancer subtype. *Ann Surg Oncol* 2014; **21**: 361-367.
- [26] MORGENTHAU A, TINKIR E, VOGG ATJ, SANKARANARAYANAN RA, BAAZAOU F, MOTTAGHY FM. Targeting of prostate-specific membrane antigen for radio-ligand therapy of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2019; **21**: 116.
- [27] MORRIS L, VEERIAH S, CHAN T. Genetic determinants at the interface of cancer and neurodegenerative disease. *Oncogene* 2010; **29**: 3453-3464.
- [28] NOWACKA-ZAWISZA M., KRAJEWSKA W. Potrójnie negatywny rak piersi: molekularna charakterystyka i potencjalne strategie terapeutyczne. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; **67**: 1090-1097.
- [29] Nowotwory Złośliwe w Polsce 2016, Krajowy Rejestr Nowotworów: <http://onkologia.org.pl/>
- [30] RAHBAR K, AHMADZADEHFAR H, KRATOCHWIL C, HABERKORN U, SCHÄFFERS M, ESSLER M, BAUM RP, ET AL. German multicenter study investigating 177lu-PSMA-617 radioligand therapy in advanced prostate cancer patients. *J Nucl Med* 2017; **58**: 85-90.
- [31] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A: Cancer statistics 2019. *CA A Cancer J Clin* 2019; **69**: 7-34.
- [32] STATON CA, SHAW LA, VALLURU M, HOH L, KOAY I, CROSS SS, REED MW, BROWN NJ. Expression of class 3 semaphorins and their receptors in human breast neoplasia. *Histopathology* 2011; **59**: 274-282.
- [33] SUN YS, ZHAO Z, YANG ZN, XU F, LU HJ, ZHU ZY, SHI W, ET AL. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 2017; **13/11**: 1387-1397.
- [34] TANG C, GAO X, LIU H, JIANG T, ZHAI X. Decreased expression of SEMA3A is associated with poor prognosis in gastric carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; **7/8**: 4782-4794.

- [35] TOLKACH Y, GEVENSLEBEN H, BUNDSCHUH R, ET AL. Prostate-specific membrane antigen in breast cancer: a comprehensive evaluation of expression and a case report of radionuclide therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2018; **169**: 447-455.
- [36] YACOUB M, COULON A, CELHAY O, IRANI J, CUSSENOT O, FROMONT G. Differential expression of the semaphorin 3A pathway in prostatic cancer. *Histopathology* 2009; **55**: 392-398.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 18.12.2019

Przyjęto: 14.01.2020

Natalia Siminiak

e-mail: nsiminiak@gmail.com

A REVIEW OF SENESCENCE-ASSOCIATED THERAPIES IN GLIOBLASTOMA TREATMENT

PRZEGLĄD TERAPII ZWIĄZANYCH ZE STARZENIEM KOMÓRKOWYM W TERAPII GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO

Marek KOTAS¹, Michał TYLISZCZAK¹, Patrycja ZUZIĄK¹,
Julita KULBACKA², Agnieszka CHWIŁKOWSKA²

¹Faculty of Medicine, Wrocław Medical University

²Faculty of Pharmacy with Division of Laboratory Diagnostics,
Department of Molecular and Cellular Biology, Wrocław Medical University

Summary: Glioblastoma multiforme, the most aggressive glioma, is a tumor characterized by frequent recurrence and unfavorable prognosis. There is growing literature concerning therapy-induced senescence in glioblastoma, with many compounds found to exert a senescence-promoting effect, offering new potential treatment possibilities. However, some studies indicate that senescence and senescence-associated secretory phenotype may play a role in glioblastoma progression and recurrence. Taken together, those findings underscore the importance of senescence in glioblastoma pathophysiology and show the need for the development of novel senescence-associated approaches, such as senescence-associated secretory phenotype reprogramming and two-step senescence-focused cancer therapy.

Keywords: cellular senescence, glioblastoma, cancer therapy, neoplasm recurrence, local

Streszczenie: Glejak wielopostaciowy, najbardziej agresywna postać glejaka, charakteryzuje się skłonnością do częstych nawrotów oraz niekorzystnym rokowaniem. W ostatnich latach opublikowano wiele badań dotyczących terapii wywołującej starzenie komórkowe w komórkach glejaka, co daje nadzieję na opracowanie nowych sposobów leczenia tego nowotworu. Z drugiej strony, niektóre badania wskazują na związek starzenia komórkowego z progresją glejaka oraz ze skłonnością do nawrotów. Podsumowując, analiza najnowszych doniesień podkreśla, że starzenie komórkowe pełni ważną rolę w patofizjologii glejaka wielopostaciowego, a także pokazuje potrzebę opracowania nowych podejść terapeutycznych związanych ze starzeniem, takich jak przeprogramowywanie fenotypu wydzielniczego komórek starzejących czy dwustopniowa terapia starzeniowa.

Słowa kluczowe: glejak niedojrzały, nowotwory – farmakoterapia, wznowa miejscowa nowotworu

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common malignant central nervous system tumor in adults [50], yet it still lacks successful treatment options. Mutations in either IDH1 or IDH2 are revealed in over 70 % of grade II–III gliomas and secondary glioblastomas. Isocitrate dehydrogenase (IDH)-wildtype GBM has an especially grim prognosis, as even with standard treatment and supra-total resection the median survival ranges from 14 to 20 months [59]. It is thus clear that novel therapeutic approaches are needed, and one of such approaches is pro-senescence therapy. In recent years, there has been a number of articles that furthered our understanding of the role cellular senescence plays in pathophysiology and treatment of malignant gliomas. In this review paper, we summarize latest research on therapy-induced senescence (TIS) in glioblastoma and discuss the role senescence likely plays in GBM recurrence, as well as potential ways to counter its deleterious effects.

CHARACTERISTICS OF CELLULAR SENEESCENCE

Cellular senescence is a state of stable cell cycle arrest that occurs in diploid cells and limits their proliferative lifespan [7]. *In vivo* senescent cells do not differ morphologically from normal cells, but *in vitro* they are characterized by a set of particular changes, which include cell enlargement, flattening, vacuolization and sometimes multinucleation. There is however a collection of biomarkers that can be used to define senescent cells *in vitro* as well *in vivo* [25]. The most significant one is immunohistochemical detection of senescence-associated β -galactosidase (Sa β GAL) activity, which is increased in the lysosomal content of senescent cells. This test must be carried out on subconfluent cell populations, since Sa β GAL activity might be spontaneously induced in confluent populations [9]. Metabolic changes are known to occur, such as elevation of glucose consumption and lactate production, though they are not routinely used as biomarkers [13, 7]. Physiology of senescent cells also differs, as they increase expression of certain proteins, such as cell cycle inhibitors p16^{INK4a}, p21, p27 and p53 which can be used as markers of senescence [42, 7]. In addition, senescent cells secrete a number of extracellular factors called SASP (senescence-associated secretory phenotype) [25], which will be described later.

PATHWAYS AND TRIGGERS OF SENEESCENCE

There are many triggers that induce senescence, and they can be divided into a few categories. “Programmed senescence” is the result of polyploidy, developmental cues, cell fusion or influence of SASP. “Damage-induced senescence” may be triggered by reactive oxygen species, DNA damage, oncogenic signaling, tumor suppressor inactivation and also by SASP. Depending on the triggers, diffe-

rent enzymatic cascades are recruited, however they all converge on dephosphorylation of one of various CDK enzymes, leading to hypophosphorylation of the RB protein which in turn results in the triggering of senescence [25, 7].

THE ROLE OF SENESENCE

Physiological purpose of cellular senescence comes down to homeostasis maintenance and proper tissue and organ development. It is achieved by limiting proliferation and by withdrawal of stressed or damaged cells through morphological and functional changes that occur during the senescence process [26, 7]. These effects are desirable during tissue regeneration and embryonic life, but senescence can also have harmful consequences. If the rate of elimination of senescent cells is lower than their rate of growth, it leads to their accumulation. This process can occur as tissues age, but it may also lead to disease development [25, 7]. To understand the detrimental role senescent cells may play in disease – including tumorigenesis – we must examine the effects of SASP.

WHAT IS SASP?

The term “senescence-associated secretory phenotype” (SASP) refers to a set of particular chemokines, cytokines and other substances by which senescent cells affect its microenvironment. The composition of SASP, and hence its influence, may vary depending on the type of cells that underwent senescence as well as the factor that induced it, though the molecular mechanism of this phenomenon is still not well understood [34, 7]. The main purpose of SASP is microenvironment manipulation by senescent cells, rebuilding the extracellular matrix and activating the immune system in order to limit the proliferation of damaged cells [37, 20]. However, antiproliferative effect on tumor cells is not always achieved and SASP may even promote tumorigenesis by boosting vascularization and tumor proliferation. This phenomenon is called maladaptive senescence and may occur during chemotherapy, which in addition to causing senescence in both normal and tumor cells also impairs their elimination by the immune system [7]. The possibility of manipulating the senescence process, and thus SASP features, creates original ways of approaching antitumor therapies.

GLIOBLASTOMA THERAPY-INDUCED SENESENCE

Many compounds applied in glioblastoma therapy have been found to induce senescence in various glioblastoma cell lines, both established and primary. In some studies only cell cycle arrest and senescence markers were observed, while in others signs of apoptosis have been detected as well. Notably, cells that survived treatment by apoptosis-inducing agents often displayed markers of senescence [52, 44, 61]. In this part, we provide a short review of mentioned studies.

TEMOZOLOMIDE

Temozolomide (TMZ) is a DNA methylating drug that induces apoptotic cell death [41]. It is the first-line chemotherapeutic treatment option in glioblastoma multiforme. TMZ has been found to induce senescence through activation of the DDR (DNA damage response) in glioma cell lines [1]. TMZ-induced senescence *in vitro* required functional p53 and NF- κ B pathways. Additionally, some studies found compounds that potentiate the effects of TMZ on cancer cells. Afatinib (pan-EGFR inhibitor) strengthened the cytostatic and senescence-inducing ability of TMZ in U87MG and U251 cells with amplified EGFR signaling [49]. Therapeutic efficacy of TMZ might be enhanced by the combined treatment with levetiracetam in glioblastoma primary [38] and established cell lines [23], as described below, in the section concerning HDAC inhibitors.

CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITORS

CDK4/6 inhibitors, such as ribociclib, abemaciclib and palbociclib, are a novel group of compounds that target the corresponding cell-cycle regulatory kinases. They are currently tested in a clinical setting against various tumors. In particular, abemaciclib and ribociclib are investigated as potential single-agents in the treatment of recurrent GBM, with the former in a phase II and the latter in an early-phase clinical trial [35]. To our knowledge, their ability to induce senescence has not been studied in a GBM model. Given that there is data indicative of senescence induction by ribociclib in particular [30] and other CDK4/6 inhibitors (e.g. palbociclib) in general [19], such research may be warranted. Of the three compounds, only palbociclib has been tested in terms of its senescence-inducing effects on GBM cells [24]. The study was conducted on patient-derived, stem cell-enriched GBM cell lines. Palbociclib was found to rapidly inhibit proliferation without changes in cell viability, and prolonged exposure (14 days) resulted in an increase of senescence-associated markers and SASP development. However, those senescent-like cells resumed proliferation in 7-14 days following drug withdrawal, and the authors concluded that palbociclib induces a senescent-like quiescence in patient-derived glioma stem cell-enriched cell lines.

Recently, long-term treatment with TG02 (a multi-CDK inhibitor, most potent against CDK-9) was found to induce positive Sa β Gal staining in the LN-229 GBM cell line, but not in any of the other thirteen studied glioblastoma lines [31].

MDM2 INHIBITORS

Nutlin-3a, the compound most commonly used in anti-cancer studies, binds to the MDM2 protein, inhibiting its interaction with p53 and causing p53 pathway activation. *In vitro* studies showed that this drug induced cell-cycle arrest with an increase in senescence markers and apoptosis in p53 wild-type U87 GBM cell lines, but not in p53 mutated T98G cells, which is in line with its established mechanism

of action [52, 57]. Furthermore, this effect was found to be mediated by the down-regulation of DYRK1A-EGFR axis by p53, while upregulation of EGFR attenuated the effects of nutlin-3a both in vitro and in a mouse xenograft model [57].

AURORA KINASE INHIBITORS

Aurora kinases (AurK) A, B and C play an important role in multiple mitotic events. AMG900, a pan-AurK inhibitor with potential antineoplastic activity, was found to induce senescence in A172, U-87MG and U-118MG GBM cell lines through p53 and p21 activation [32]. In another study, five patient-derived glioma stem cell lines were treated with AurK inhibitor danusertib. In two of those lines, a 48h danusertib treatment decreased viability, mitogenic index and clonogenic potential while inducing positive Sa β Gal staining [8]. This response did not correlate with TP53 mutation status but only occurred in cell lines with the highest chromosomal content. Three remaining lines, classified as resistant, had lower initial ploidy levels when compared to danusertib-sensitive cells, but showed a similar increase in ploidy following drug treatment. Second 48h danusertib treatment of resistant lines further increased chromosomal content and induced changes similar to those observed in sensitive cells, including Sa β Gal+ staining, in one of the remaining lines. Based on those findings, the authors suggest that a ploidy threshold may determine GBM sensitivity to AurK inhibitor treatment.

HISTONE DEACETYLASE AND DEMETHYLASE INHIBITORS

Various studies have found that the inhibition of enzymes with histone deacetylase (HDAC) or histone demethylase activity may influence senescence. Treatment of U87MG GBM cells with tenovin-1 and EX527, small-molecule sirtuin inhibitors, increased p53 expression and induced cellular senescence [58]. Another sirtuin inhibitor, R/S-N-3-cyanophenyl-N'-(6-tert-butoxycarbonylamino-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-4-yl)urea, has been shown to induce G1 cell cycle arrest and positive Sa β Gal staining in U373 GBM cell line [36]. HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) at 1 μ M and 2.5 μ M concentrations inhibited U87MG cell growth via cell cycle arrest and p53-, p38-mediated senescence [16]. Interestingly, high concentrations of SAHA (> 5 μ M) triggered apoptosis accompanied by caspase-8 and caspase-9 pathways activation. Other research showed the ability of sodium butyrate (also a HDAC inhibitor) to induce senescence in A172 GBM lines [27]. This effect was accompanied by a reduction in cellular motility and invasiveness, while p21, p27 and p53 levels were elevated. Final HDAC inhibitor, levetiracetam (widely known for its antiepileptic effects), was found to potentiate the effects of TMZ treatment in a synergetic way, although only about 7% of cells stained Sa β Gal+ after 72h long combined treatment [23]. Lastly, lysine-specific demethylase (LSD1) inhibition by various compounds (OG-L002, SP2509 and GSK2879552) induced senescence in U87MG, U251 and T98G GBM cell lines through HIF-1 α level reduction [33].

CNF1

Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) is a bacterial Rho GTPase-activating protein produced by some strains of extraintestinal *E. coli*. It was found to induce senescence in GL261 GBM cells both in vitro and in a mouse intracranial xenograft model, reducing tumor volume without causing adverse effects in neighboring neural cells [48]. CNF1 enters the cell via 67LR-mediated, clathrin-independent endocytosis and is subsequently cleaved. Then, its catalytic part is released from the endosome [46]. Activation of Rho GTPase reorganizes the actin cytoskeleton in such a way that it can no longer guide cytokinesis, which leads to a multinucleated phenotype in proliferating cells exposed to the toxin [46]. Additionally, CNF1 induces neuronal remodeling and has been reported to exert a beneficial effect in various brain pathologies, such as Parkinson's and Alzheimer's disease [46].

PHYTOCHEMICALS

Different plant-derived compounds have been found to possess antitumor activity, including the ability to induce senescence. Thymoquinone, found in black cummin, upregulated the prostate apoptosis response-4 protein, leading to senescence and an increase in p53 and p21 levels in the U87MG line [43]. Artesunate, artemisin analogue (derived from the *Artemisia annua L*) inhibited growth, migration and distant seeding of U251, U87, U138 and SK-N-SH GBM cell lines via inhibition of the mevalonate pathway and induction of p21 expression [55]. Flavokawain B (FKB), a kava chalcone, induced senescence in approximately 60% of U251, U87 and T98 GBM cell lines after 48h long treatment. This effect was potentially related to autophagy, as autophagy inhibition by FKB treatment caused U251 cells to undergo apoptosis instead of senescence [54]. Resveratrol, a polyphenol present in grapes and other plants, was found to reduce cell viability and tumor volume as well as induce positive Sa β Gal+ staining in U87 and U118 cell lines, which was caused by mono-ubiquitination of histone H2B (uH2B) [11]. Another polyphenol – epigallocatechingallate (EGCG), found in green tea – reduced telomere length and induced positive Sa β Gal staining after long-term, low-dose treatment of U251 GBM cells [47]. On the 98th day of treatment with 10 μ g/mL of EGCG, the telomere length was three times shorter when compared to day one and around 50% of cells stained Sa β Gal+. Finally, matrine – an alkaloid extracted from *sophora flavescens* – was found to reduce cell viability and increase senescence markers in U251, U87 and P3 (primary) GBM cells [62]. IC₅₀ values for 72 h incubation time ranged between 0.2 and 0.3 mmol/l for cancer cells. In immortalized normal human astrocytes IC₅₀ was equal to 0.483 mmol/l.

PI3K/mTOR PATHWAY INHIBITION

One study found that PQR309, an inhibitor of pan-PI3K and mTOR, induces growth arrest and senescence in various IDH wild-type GBM cell lines. Additionally, the authors evaluated if molecular profiling could be used to predict cell sensitivity to PI3K/mTOR inhibition [2]. Genetic analysis showed that PQR309 sensitivity was correlated with NF1 mutation, while CDKN2C loss was linked to PQR309 resistance. In addition, pAKT^{Thr308}, pAKT^{Ser473} and pGSK3 β levels were strongly negatively correlated with clonogenicity assay EC₅₀ values, while p4E-BP1^{Thr37/46} levels exhibited positive correlation.

TELOMERE TARGETING

Loss of telomeres is a known cause of cellular senescence [7]. One study found that treatment with BRACO-19, a ligand for telomeric G4, induced apoptosis and p53- p21-mediated senescence in U87 and U251 GBM cell lines, but not in normal primary astrocytes [61]. These changes were accompanied by a reduction in telomerase activity and the displacement of telomerase from nucleus to cytoplasm. Naturally-occurring polyphenol, epigallocatechingallate (already described above), also exerted its effects through telomere shortening [47].

OTHER SENESENCE-INDUCING AGENTS

UNC2025, a MER receptor tyrosine kinase (MERTK) inhibitor, has been reported to decrease cell viability and colony formation in U251, and A172 GBM cell lines in a dose-dependent manner. The highest dose (200 nM) of the drug induced apoptosis in approximately 80% of A172 and 60% of U251 cells. After five days of 200 nM UNC2025 treatment, almost all surviving cells showed various markers of senescence, and SASP-associated factors IL-6 and IL-8 were significantly elevated [44]. In another study four potential protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibitors were tested. Banasavadi-Siddegowda *et al.* found CMP5, a potential protein arginine methyltransferase 5 inhibitor, to induce senescence in GBM cells *in vitro* and in a zebrafish xenograft glioma model [4]. Study of U87MG-luc cells *in vitro* showed that treatment with high doses of progesterone induced positive Sa β -Gal staining [3]. *In vivo*, it limited the rate of tumor growth and extended survival in U87MG-luc-inoculated mice without signs of organ toxicity [3]. Thus, it was concluded that progesterone may induce premature senescence. Other research showed that protein kinase D2 silencing or its inhibition by CRT0066101 induced senescence in both p53 wild-type (U87MG, A172) and p53 mutant (GM133, T98G, U251) cell lines [5]. Finally, subcytotoxic copper sulfate concentrations were found to induce U87-MG GBM cell senescence by downregulation of the Bmi-1 pathway [21].

POTENTIAL TARGETS FOR PRO-SENESCENCE THERAPY

There has been a number of studies that identified potential targets for pro-senescence treatment in glioblastoma, mainly through gene knockdown or silencing techniques. Below, we provide a review of studies that describe such targets which, to our knowledge, have not yet been tested with pharmacological inhibitors.

IDH1 SILENCING

According to latest WHO classification, IDH mutation status is an important prognostic marker in glioblastoma [51]. IDH-wildtype tumors depict a less favorable prognosis and thus the research of IDH-targeting therapies seems warranted. Wahl et al. measured the effects of IDH1 knockdown (via siRNA and, independently, via doxycycline-induced shRNA) on radiation sensitivity in both p53 mutant and p53 wild-type GBM cell lines, with IDH1kd cells showing significant radiosensitization [53]. A similar effect was observed in mice inoculated with U87 GBM cells with doxycycline-inducible shRNA IDH1 knockdown. This indicates that pharmacological inhibition of IDH-1 may improve the outcomes of GBM radiotherapy.

INTEGRIN $\alpha v\beta 3$ /PAK4 SIGNALING

A study on six glioblastoma cell lines showed that si-RNA mediated knockdown of $\beta 3$ induced growth arrest and senescence in GBM cells, but not in breast, colorectal, lung and pancreatic carcinomas [10]. PAK4 was identified as a downstream mediator of this effect, which was found to be p-21 dependent but p-53 independent. Overall, the study revealed integrin $\alpha v\beta 3$ /PAK4 axis as a potential target for therapy-induced senescence.

FETUIN-A DEPLETION

Fetuin-A, a liver-derived serum protein, has been shown to modulate the growth of the LN229 GBM cell line [28]. Furthermore, LN229 cells have the ability to support their own growth in culture in the absence of serum through ectopic fetuin-A synthesis [28]. Reduction of cellular fetuin-A levels via knockdown of its ectopic production or by asialofetuin treatment (which attenuated fetuin-A uptake) triggered senescence in LN229 cells, thus identifying a new potential therapeutic approach.

Bcl11B KNOCKDOWN

B cell CLL/lymphoma 11B (Bcl11b) is a C₂H₂ zinc finger transcription factor that was found to be upregulated in glioma cells [22]. The study by Liao *et al.* has showed that Bcl11b knockdown repressed growth and induced positive Sa β Gal

staining in U87 and U251 GBM cell lines [22]. This effect was accompanied by p21 upregulation and downregulation of the Sox-2 gene and Bmi-1 protein.

MCL1 SILENCING

siRNA-mediated silencing of the myeloid cell leukemia-1 (MCL1) gene in patient-derived glioblastoma cell lines was found to decrease the expression of Bcl-2, Bmi-1, Akt, and PI3K and to increase Bax and PTEN expression [56]. Furthermore, it inhibited cell proliferation as well as induced apoptosis and senescence, although only 14.26% of MCL1 silenced cells expressed positive Sa β Gal staining.

14-3-3 β DEPLETION

14-3-3 β is a 14-3-3 scaffolding protein isoform and its expression in astrocytomas correlates with malignancy grade [39]. 14-3-3 β depletion by siRNA gene silencing managed to induce senescence in U87 and A172 GBM cells. This effect was accompanied by an upregulation in p27 expression, while the expression of other cell cycle regulators remained unchanged [39].

THE DARK SIDE OF GLIOBLASTOMA SENESENCE AND POTENTIAL WAYS TO COUNTER IT

It is now clear that the induction of senescence may be a double-edged sword: while on one hand, cancer cells growth arrest and the secretion of some SASP cytokines is certainly beneficial, there is increasing evidence that senescence plays an important part in tumor recurrence and long-term adverse effects of chemotherapy [40, 7]. In glioblastoma, its deleterious consequences may be especially important, since both TMZ treatment [1] and radiotherapy [18, 60] (i.e. standard clinical GBM treatment) are known to induce senescence. IL-6 and IL-8 secretion was significantly increased in TMZ [18, 1, 60]- and radiotherapy-induced senescent cells. Moreover, a study on U87MG and LN229 murine xenograft models revealed that radiotherapy-induced senescent cells stimulated vascular formation and recruitment of Ly6G⁺ inflammatory cells, which in turn promoted the conversion of glioblastoma cells to glioblastoma stem cells through the NOS2-NO-ID4 axis [17]. A study by Jeon *et al.* reports that co-injection of irradiated and non-irradiated GBM cells into immuno-deficient mice resulted in faster tumor growth when compared to non-irradiated U87MG and LN229 control samples [18]. In all of the papers discussed above, SASP expression was correlated with NF κ B activation.

Furthermore, glioma stem cells cultured in neurospheres were observed to differentiate into non-stem glioma cells (NSGCs) in the presence of serum. Those NSGCs subsequently entered senescence and started secreting pro-inflammatory and

pro-angiogenic factors [29] (VEGF-C, VEGF-A, IL-6, IL-8). As senescent NSGCs were also detected in a mouse xenograft model, it is likely that they are clinically relevant and may promote glioblastoma progression. Finally, extracellular vesicles isolated from patient-derived GBM stem cells induced changes in gene expression of human astrocytes that may be indicative of pro-oncogenic SASP acquisition [12].

All of those studies highlight the important role senescence seems to play in glioblastoma pathophysiology, irrespective of whether we actively try to induce it or not. We should therefore seek ways to counter those adverse effects of senescence, preferably while simultaneously preserving desired ones. There are currently two strategies under investigation: senolysis and SASP-reprogramming [40, 7]. Although the literature on these topics is growing, it is still scarce, especially concerning glioblastoma specifically.

The concept of two-step senescence-focused cancer therapy is to follow up pro-senescence chemotherapy with senolytic therapy which aims to target senescent cells specifically [40]. It should, in theory, take advantage of beneficial, short-term senescence effects while evading detrimental long-term consequences. Step one – the induction of senescence in glioblastoma cells – has been extensively reviewed earlier in this paper. As for step two, a study by Sulli *et al.* found that circadian clock nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β agonists SR9009 and SR9011 were lethal to cancer cells and senescent cells, including GBM cells, while normal cells were spared [45]. In a murine model, they impaired GBM growth and improved survival without notable toxic effects, which presents a very interesting therapeutic opportunity. Another paper showed that TMZ-induced senescence was significantly reduced in LN229 and A172 cells when they were post-treated with artesunate, while the number of apoptotic cells increased, suggesting ART might exert a senolytic effect [6], although the subject deserves further study.

The other approach – SASP reprogramming – seeks to attenuate the adverse effects of senescence by reducing the secretion of pro-oncogenic SASP molecules [7]. Two studies report that ginsenosides, F1 and Rg3, suppress IL-6 and IL-8 secretion by senescent astrocytes [15, 14]. In both cases the effect was accompanied by suppression of p-38MAPK activity and a reduction in NF κ B nuclear translocation.

CONCLUSIONS

In the last few years, there has been a substantial increase in our understanding of the role senescence plays in glioblastoma and of senescence in general. We now know many more senescence-inducing compounds, a few of them currently in clinical trials, and some yet untested targets for pharmacological action.

However, with the emergence of SASP and senescence as likely co-culprits of glioblastoma recurrence, it now seems likely that successful glioblastoma therapy will require further study of various ways to combat the deleterious effects of senescence, such as SASP reprogramming or senolytic therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported financially by the Subsidy Funds of Department of Molecular and Cellular Biology SUB.D260.20.009.

REFERENCES

- [1] AASLAND D, GOTZINGER L, HAUCK L, BERTE N, MEYER J, EFFENBERGER M, ET AL. Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in glioblastoma cells via activation of ATR–Chk1, p21, and NF-kB. *Cancer Res.* 2019; **79**(1): 99-113.
- [2] VON ACHENBACH C, WELLER M, KAULICH K, GRAMATZKI D, ZACHER A, FABBRO D, ET AL. Synergistic growth inhibition mediated by dual PI3K/mTOR pathway targeting and genetic or direct pharmacological AKT inhibition in human glioblastoma models. *J Neurochem.* 2019;
- [3] ATIF F, YOUSUF S, ESPINOSA-GARCIA C, SERGEEVA E, STEIN DG. Progesterone Treatment Attenuates Glycolytic Metabolism and Induces Senescence in Glioblastoma. *Sci Rep.* 2019; **9**(1): 988.
- [4] BANASAWADI-SIDDEGOWDA YK, WELKER AM, AN M, YANG X, ZHOU W, SHI G, ET AL. PRMT5 as a druggable target for glioblastoma therapy. *Neuro Oncol.* 2018; **20**(6): 753-63.
- [5] BERNHART E, DAMM S, HEFFETER P, WINTERSPERGER A, ASSLABER M, FRANK S, ET AL. Silencing of protein kinase D2 induces glioma cell senescence via p53-dependent and -independent pathways. *Neuro Oncol.* 2014; **16**(7): 933-45.
- [6] BERTE N, LOKAN S, EICH M, KIM E, KAINA B. Artesunate enhances the therapeutic response of glioma cells to temozolomide by inhibition of homologous recombination and senescence. *Oncotarget.* 2016; **7**(41): 67235-50.
- [7] CALCINOTTO A, KOHLI J, ZAGATO E, PELLEGRINI L, DEMARIA M, ALIMONTI A. Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiol Rev.* 2019; **99**(2): 1047-78.
- [8] CILIBRASI C, GUZZI A, BAZZONI R, RIVA G, CADAMURO M, HOCHEGGER H, ET AL. A Ploidy Increase Promotes Sensitivity of Glioma Stem Cells to Aurora Kinases Inhibition. *J Oncol.* 2019; **2019**: 1-15.
- [9] DEBACQ-CHAINIAUX F, ERUSALIMSKY JD, CAMPISI J, TOUSSAINT O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009; **4**(12): 1798-806.
- [10] FRANOVIC A, ELLIOTT KC, SEGUIN L, CAMARGO MF, WEIS SM, CHERESH DA. Glioblastomas require integrin αvβ3/PAK4 signaling to escape senescence. *Cancer Res.* 2015; **75**(21): 4466-73.
- [11] GAO Z, XU MS, BARNETT TL, XU CW. Resveratrol induces cellular senescence with attenuated mono-ubiquitination of histone H2B in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; **407**(2): 271-6.
- [12] HALLAL S, MALLAWARATCHY DM, WEI H, EBRAHIMKHANI S, STRINGER BW, DAY BW, ET AL. Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells Stimulate Normal Astrocytes to Acquire a Tumor-Supportive Phenotype Via p53 and MYC Signaling Pathways. *Mol Neurobiol.* 2019; **56**(6): 4566-81.
- [13] HERNANDEZ-SEGURA A, NEHME J, DEMARIA M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 2018; **28**(6): 436-53.

- [14] HOU J, CUI C, KIM S, SUNG C, CHOI C. Ginsenoside F1 suppresses astrocytic senescence-associated secretory phenotype. *Chem Biol Interact.* 2018; **283**(October 2017): 75-83.
- [15] HOU J, KIM S, SUNG C, CHOI C. Ginsenoside Rg3 prevents oxidative stress-induced astrocytic senescence and ameliorates senescence paracrine effects on glioblastoma. *Molecules.* 2017; **22**(9): 1-14.
- [16] HSU CC, CHANG WC, HSU TI, LIU JJ, YEH SH, WANG JY, ET AL. Suberoylanilide hydroxamic acid represses glioma stem-like cells. *J Biomed Sci.* 2016; **23**(1): 1-12.
- [17] JEON HY, HAM SW, KIM JK, JIN X, LEE SY, SHIN YJ, ET AL. Ly6G+ inflammatory cells enable the conversion of cancer cells to cancer stem cells in an irradiated glioblastoma model. *Cell Death Differ.* 2019; **26**(10): 2139-56.
- [18] JEON HY, KIM JK, HAM SW, OH SY, KIM J, PARK JB, ET AL. Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype. *Tumor Biol.* 2016; **37**(5): 5857-67.
- [19] KLEIN ME, DICKSON MA, ANTONESCU C, QIN LX, DOOLEY SJ, BARLAS A, ET AL. PDLIM7 and CDH18 regulate the turnover of MDM2 during CDK4/6 inhibitor therapy-induced senescence. *Oncogene.* 2018; **37**(37): 5066-78.
- [20] LAU L, DAVID G. Pro- and anti-tumorigenic functions of the senescence-associated secretory phenotype. *Expert Opin Ther Targets.* 2019; **0**(0): 1.
- [21] LI Y, HU J, GUAN F, SONG L, FAN R, ZHU H, ET AL. Copper induces cellular senescence in human glioblastoma multiforme cells through downregulation of Bmi-1. *Oncol Rep.* 2013; **29**(5): 1811-8.
- [22] LIAO CK, FANG KM, CHAI K, WU CH, HO CH, YANG CS, ET AL. Depletion of B cell CLL/Lymphoma 11B Gene Expression Represses Glioma Cell Growth. *Mol Neurobiol.* 2016; **53**(6): 3528-39.
- [23] MARUTANI A, NAKAMURA M, NISHIMURA F, NAKAZAWA T, MATSUDA R, HIRONAKA Y, ET AL. Tumor-inhibition effect of levitracetam in combination with temozolomide in glioblastoma cells. *Neurochem J.* 2017; **11**(1): 43-9.
- [24] MORRIS-HANON O, MARAZITA MC, ROMORINI L, ISAJA L, FERNANDEZ-ESPINOSA DD, SEVLEVER GE, ET AL. Palbociclib Effectively Halts Proliferation but Fails to Induce Senescence in Patient-Derived Glioma Stem Cells. *Mol Neurobiol.* 2019; **56**(11): 7810-21.
- [25] MUÑOZ-ESPÍN D, SERRANO M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; **15**(7): 482-96.
- [26] MYRIANTHOPOULOS V, EVANGELOU K, VASILEIOU PVS, COOKS T, VASSILAKOPOULOS TP, PANGALIS GA, ET AL. Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics.* 2018.
- [27] NAKAGAWA H, SASAGAWA S, ITOH K. Sodium butyrate induces senescence and inhibits the invasiveness of glioblastoma cells. *Oncol Lett.* 2018; **15**(2): 1495-502.
- [28] NANGAMI GN, SAKWE AM, IZBAN MG, RANA T, LAMMERS PE, THOMAS P, ET AL. Fetuin-A (alpha 2HS glycoprotein) modulates growth, motility, invasion, and senescence in high-grade astrocytomas. *Cancer Med.* 2016; **5**(12): 3532-43.
- [29] OUCHI R, OKABE S, MIGITA T, NAKANO I, SEIMIYA H. Senescence from glioma stem cell differentiation promotes tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; **470**(2): 275-81.
- [30] RADER J, RUSSELL MR, HART LS, NAKAZAWA MS, BELCASTRO LT, MARTINEZ D, ET AL. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013; **19**(22): 6173-82.
- [31] LE RHUN E, VON ACHENBACH C, LOHMANN B, SILGINER M, SCHNEIDER H, MEETZE K, ET AL. Profound, durable and MGMT-independent sensitivity of glioblastoma cells to cyclin-dependent kinase inhibition. *Int J Cancer.* 2019; **145**(1): 242-53.
- [32] RYU J, PYO J, LEE CW, KIM JE. An Aurora kinase inhibitor, AMG900, inhibits glioblastoma cell proliferation by disrupting mitotic progression. *Cancer Med.* 2018; **7**(11): 5589-603.
- [33] SACCÀ CD, GORINI F, AMBROSIO S, AMENTE S, FAICCHIA D, MATARESE G, ET AL. Inhibition of lysine-specific demethylase LSD1 induces senescence in Glioblastoma cells through a HIF-1 α -dependent pathway. *Biochim Biophys Acta – Gene Regul Mech.* 2019; **1862**(5): 535-46.
- [34] SALAMA R, SADAIE M, HOARE M, SALAMA R, SADAIE M, HOARE M, ET AL. Cellular senescence and its effector programs Cellular senescence and its effector programs. 2014; 99-114.

- [35] SCHETTINI F, DE SANTO I, REA CG, DE PLACIDO P, FORMISANO L, GIULIANO M, ET AL. CDK 4/6 Inhibitors as Single Agent in Advanced Solid Tumors. *Front Oncol.* 2018; 8.
- [36] SCHNEKENBURGER M, GOFFIN E, LEE JY, JANG JY, MAZUMDER A, Ji S, ET AL. Discovery and Characterization of R/S-N-3-Cyanophenyl-N'-(6-tert-butoxycarbonylamino-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-4-yl)urea, a New Histone Deacetylase Class III Inhibitor Exerting Antiproliferative Activity against Cancer Cell Lines. *J Med Chem.* 2017; **60**(11): 4714-33.
- [37] SCHOSSERER M, GRILLARI J, BREITENBACH M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2017; **7**(November).
- [38] SCICCHITANO BM, SORRENTINO S, PROIETTI G, LAMA G, DOBROWOLNY G, CATIZONE A, ET AL. Levetiracetam enhances the temozolomide effect on glioblastoma stem cell proliferation and apoptosis. *Cancer Cell Int.* 2018; **18**(1): 1-18.
- [39] SEO S BIN, LEE JJ, YUN HH, IM CN, KIM YS, KO JH, ET AL. 14-3-3 β Depletion Drives a Senescence Program in Glioblastoma Cells Through the ERK/SKP2/p27 Pathway. *Mol Neurobiol.* 2018; **55**(2): 1259-70.
- [40] SIEBEN CJ, STURMLECHNER I, VAN DE SLUIS B, VAN DEURSEN JM. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol.* 2018; **28**(9): 723-37.
- [41] STROBEL H, BAISCH T, FITZEL R, SCHILBERG K, SIEGELIN MD, KARPEL-MASSLER G, ET AL. Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines.* 2019; **7**(3): 69.
- [42] STURMLECHNER I, DURIK M, SIEBEN CJ, BAKER DJ, DEURSEN JM VAN. Cellular senescence in renal ageing. *Nat Publ Gr.* 2016; **13**(2): 1-13.
- [43] SUBBURAYAN K, THAYYULLATHIL F, PALLICHANKANDY S, RAHMAN A, GALADARI S. Par-4-dependent p53 up-regulation plays a critical role in thymoquinone-induced cellular senescence in human malignant glioma cells. *Cancer Lett.* 2018; **426**: 80-97.
- [44] SUFIT A, LEE-SHERICK AB, DERYCKERE D, RUPJI M, DWIVEDI B, VARELLA-GARCIA M, ET AL. MERTK inhibition induces polyploidy and promotes cell death and cellular senescence in glioblastoma multiforme. *PLoS One.* 2016; **11**(10): 1-20.
- [45] SULLI G, ROMMEL A, WANG X, KOLAR MJ, PUCA F, SAGHATELIAN A, ET AL. Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence. *Nature.* 2018; **553**(7688): 351-5.
- [46] TANTILLO E, COLISTRA A, VANNINI E, CERRI C, PANCAZZI L, BARONCELLI L, ET AL. Bacterial toxins and targeted brain therapy: New insights from cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) [Internet]. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. 2018. p. 1632.
- [47] UDROIU I, MARINACCIO J, SGURA A. Epigallocatechin-3-gallate induces telomere shortening and clastogenic damage in glioblastoma cells. *Environ Mol Mutagen.* 2019; **60**(8): 683-92.
- [48] VANNINI E, OLIMPICO F, MIDDEI S, AMMASSARI-TEULE M, DE GRAAF EL, McDONNELL L, ET AL. Electrophysiology of glioma: a Rho GTPase-activating protein reduces tumor growth and spares neuron structure and function. *Neuro Oncol.* 2016; **18**(12): 1634-43.
- [49] VENGOJI R, MACHA MA, NIMMAKAYALA RK, RACHAGANI S, SIDDIQUI JA, MALLYA K, ET AL. Afatinib and Temozolomide combination inhibits tumorigenesis by targeting EGFRvIII-cMet signaling in glioblastoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; **38**(1): 266.
- [50] VILLA C, MIQUEL C, MOSSES D, BERNIER M, LUISA DI STEFANO A, VILLA C, ET AL. The 2016 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System Management of primary Central Nervous System Quarterly Medical Review. *Press Med.* 2018; **47**: 187-200.
- [51] VILLA C, MIQUEL C, MOSSES D, BERNIER M, LUISA DI STEFANO A, VILLA C, ET AL. The 2016 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System Management of primary Central Nervous System Quarterly Medical Review. *Press Med.* 2018; **47**: 187-200.
- [52] VILLALONGA-PLANELLAS R, COLL-MULET L, MARTÍNEZ-SOLER F, CASTAÑO E, ACEBES JJ, GIMÉNEZ-BONAFÉ P, ET AL. Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme. *PLoS One.* 2011; **6**(4).

- [53] WAHL DR, DRESSER J, WILDER-ROMANS K, PARSELS JD, ZHAO SG, DAVIS M, ET AL. Glioblastoma therapy can be augmented by targeting IDH1-mediated NADPH biosynthesis. *Cancer Res.* 2017; **77**(4): 960-70.
- [54] WANG J, QI Q, ZHOU W, FENG Z, HUANG B, CHEN A, ET AL. Inhibition of glioma growth by flavokawain B is mediated through endoplasmic reticulum stress induced autophagy. *Autophagy.* 2018; **14**(11): 2007-22.
- [55] WEI S, LIU L, CHEN Z, YIN W, LIU Y, OUYANG Q, ET AL. Artesunate inhibits the mevalonate pathway and promotes glioma cell senescence. *J Cell Mol Med.* 2019; jcmm.14717.
- [56] WU DM, HONG XW, WEN X, HAN XR, WANG S, WANG YJ, ET AL. MCL1 gene silencing promotes senescence and apoptosis of glioma cells via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *IUBMB Life.* 2019; **71**(1): 81-92.
- [57] XU X, LIU Q, ZHANG C, REN S, XU L, ZHAO Z, ET AL. Inhibition of DYRK1A-EGFR axis by p53-MDM2 cascade mediates the induction of cellular senescence. *Cell Death Dis.* 2019; **10**(4): 282.
- [58] YOON KB, PARK KR, KIM SY, HAN SY. Induction of nuclear enlargement and senescence by sirtuin inhibitors in glioblastoma cells. *Immune Netw.* 2016; **16**(3): 183-8.
- [59] YOON S-J, PARK J, JANG D-S, KIM HJ, LEE JH, JO E, ET AL. Glioblastoma Cellular Origin and the Firework Pattern of Cancer Genesis from the Subventricular Zone. *J Korean Neurosurg Soc.* 2019;
- [60] ZHANG L, CHENG F, WEI Y, ZHANG L, GUO D, WANG B, ET AL. Inhibition of TAZ contributes radiation-induced senescence and growth arrest in glioma cells. *Oncogene.* 2019; **38**(15): 2788-99.
- [61] ZHOU G, LIU X, LI Y, XU S, MA C, WU X, ET AL. Telomere targeting with a novel G-Quadruplex-Interactive ligand BRACO-19 induces T-Loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. *Oncotarget.* 2016; **7**(12): 14925-39.
- [62] ZHOU W, WANG J, QI Q, FENG Z, HUANG B, CHEN A, ET AL. Matrine induces senescence of human glioblastoma cells through suppression of the IGF1/PI3K/AKT/p27 signaling pathway. *Cancer Med.* 2018; **7**(9): 4729-43.

Editor – Michał Nowicki

Received: 19.02.2020

Accepted: 26.03.2020

Marek Kotas

Bratnia 57, 43-200 Pszczyna

e-mail: kotasmarek@interia.pl

phone: 533638899

MODELOWA PAPROĆ *CERATOPTERIS RICHARDII* W BADANIACH NAD FUNKCJONOWANIEM KOMÓREK ROŚLINNYCH

MODEL FERN *CERATOPTERIS RICHARDII* IN RESEARCH ON THE
FUNCTIONING OF THE PLANT CELLS

Mateusz BARTZ

Zakład Biologii Rozwoju Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział
Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie: *Ceratopteris richardii* jest gatunkiem należącym do paproci cienkozarodniowych, których rozwój odbywa się w dwuetapowym cyklu przemiany pokoleń. Dominującym pokoleniem jest diploidalny sporofit produkujący zarodniki, natomiast drugim, krótkotrwałym pokoleniem jest haploidalny gametofit, wytwarzający gamety. Biologia tej paproci oraz możliwość pozyskiwania mutantów sprawiły, że została ona zaproponowana jako modelowy system do badań różnorodnych procesów rozwojowych, takich jak fotomorfogeneza, determinacja płci, apogamia i aposporia, czy reakcja grawitropijna. W pracy przeglądowej zebrano rozproszone starsze i najnowsze dane literaturowe poświęcone analizie różnych aspektów funkcjonowania i rozwoju *C. richardii*. Zaprezentowany aktualny stan wiedzy stanowi dodatkowo dobry punkt wyjścia do dalszych badań, zwłaszcza do podjęcia tematyki związanej z regulacją procesów na poziomie komórki i całego organizmu.

Słowa kluczowe: *Ceratopteris richardii*, organizm modelowy, merystem, determinacja płci, reakcja grawitropijna

Summary: *Ceratopteris richardii* is a species belonging to the leptosporangiate ferns, whose development occurs in a two-stage cycle of alternating generations. The dominant generation is a diploid sporophyte producing spores, while the second, short-lived generation is a haploid gametophyte which produces gametes. Owing to the biology and possibility to obtain viable mutants, this fern species was proposed as a model system for studying various developmental processes such as photomorphogenesis, sex determination, apogamy and apospory, and gravitropic reaction. This review gathers in one place scattered older and the latest literature data devoted to various aspects of *C. richardii* functioning and development. The current state of knowledge presented in this paper is also a good starting point for further research, especially related to the regulation of processes at the level of the cell and the entire organism.

Keywords: *Ceratopteris richardii*, model organism, meristem, sex determination, gravitropic reaction

WSTĘP

Paprocie (*Monilophyta*) należą do roślin waskularnych, które pojawiły się na Ziemi ponad 300 milionów lat temu, przed roślinami nasiennymi. W okresie karbońskim, nazywanym okresem paproci, tworzyły dominującą część roślinności. Obecnie do *Monilophyta* zalicza się ponad 10 000 gatunków, które występują na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktyki, choć faworyzują wilgotne regiony klimatu tropikalnego i umiarkowanego [23, 79]. Paprocie charakteryzuje znaczna różnorodność form wzrostu – wśród nich występują m.in. paprocie drzewiaste, wodne czy epifityczne [89]. Oprócz znaczenia ekologicznego, niektóre gatunki paproci mają również wartość ekonomiczną jako rośliny ozdobne lub źródło cennych metabolitów [79]. Paprocie wykorzystywane są też w badaniach podstawowych procesów biologicznych, prowadzonych na różnych poziomach, w tym komórkowym czy molekularnym. Jako grupa siostrzana do roślin nasiennych, o odrębnej pozycji filogenetycznej, są szczególnie istotne dla kompleksowego zrozumienia ewolucyjnego pochodzenia i dywersyfikacji cech roślin nasiennych. Do szczegółowych analiz w grupie zarodnikowych roślin waskularnych jako gatunek modelowy wybrano *Ceratopteris richardii*, który należy do najliczniejszej współcześnie grupy paproci cienkozarodniowych [46, 72, 79]. Obecnie *C. richardii* jest powszechnie wykorzystywany w badaniach mechanizmów determinacji płci, fotomorfogenezy, zachowania komórek w mikrogravitacji i stresach środowiskowych (np. zasolenia, obecności metali ciężkich) oraz analizie regulacji różnych procesów rozwojowych.

ORGANIZM MODELOWY

Ceratopteris richardii Brongn. (*Pteridaceae*) należy do paproci cienkozarodniowych i jest blisko spokrewniony z trzema innymi gatunkami: *Ceratopteris cornuta*, *C. pteridoides* i *C. thalictroides* [60, 77, 79]. W literaturze *C. richardii* znany jest także pod nazwą C-Fern. Rozwój oraz biologia paproci z rodzaju *Ceratopteris* sprawiły, że były one sukcesywnie wykorzystywane w badaniach stając się modelowymi systemami do analizy różnorodnych procesów rozwojowych [21]. Zaletą *Ceratopteris richardii* jest stosunkowo krótki cykl życiowy, który może przebiegać w ściśle kontrolowanych warunkach i trwa od trzech do czterech miesięcy [9, 45, 47]. *C. richardii* umożliwia prowadzenie badań zarówno w fazie diploidalnego sporofitu jak i – co należy podkreślić – haploidalnego, wolnożyjącego gametofitu. Jest to niewątpliwą zaletą w porównaniu do gatunków modelowych roślin nasiennych, u których gametofit uległ silnej redukcji i uzależnieniu od sporofitu [24]. Dojrzały sporofit *C. richardii* produkuje $\sim 10^6$ haploidalnych zarodników, które przechowywane w odpowiednich warunkach zachowują

żywołność przez wiele lat [9, 47, 77]. Możliwość pozyskania tak dużej liczby zarodników jest atutem w przypadku badań molekularnych, biochemicznych czy genetycznych, wymagających znacznych ilości materiału do analiz. Zarodniki *C. richardii* są podatne na mutagenезę, dzięki czemu uzyskano znaczną liczbę mutantów. Przykładem może być mutant *clumped chloroplast 1 (cp1)* wyizolowany na drodze mutagenезy indukowanej promieniowaniem X, u którego chloroplasty wraz z większością pozostałych organelli skupiają się w jednym miejscu w obrębie komórki. Analizy genetyczne wykazały, że przyczyną takiego fenotypu jest mutacja recesywna pojedynczego genu, wpływająca na nietypowy podział chloroplastu, którego ultrastruktura pozostaje jednak niezmienniona [90].

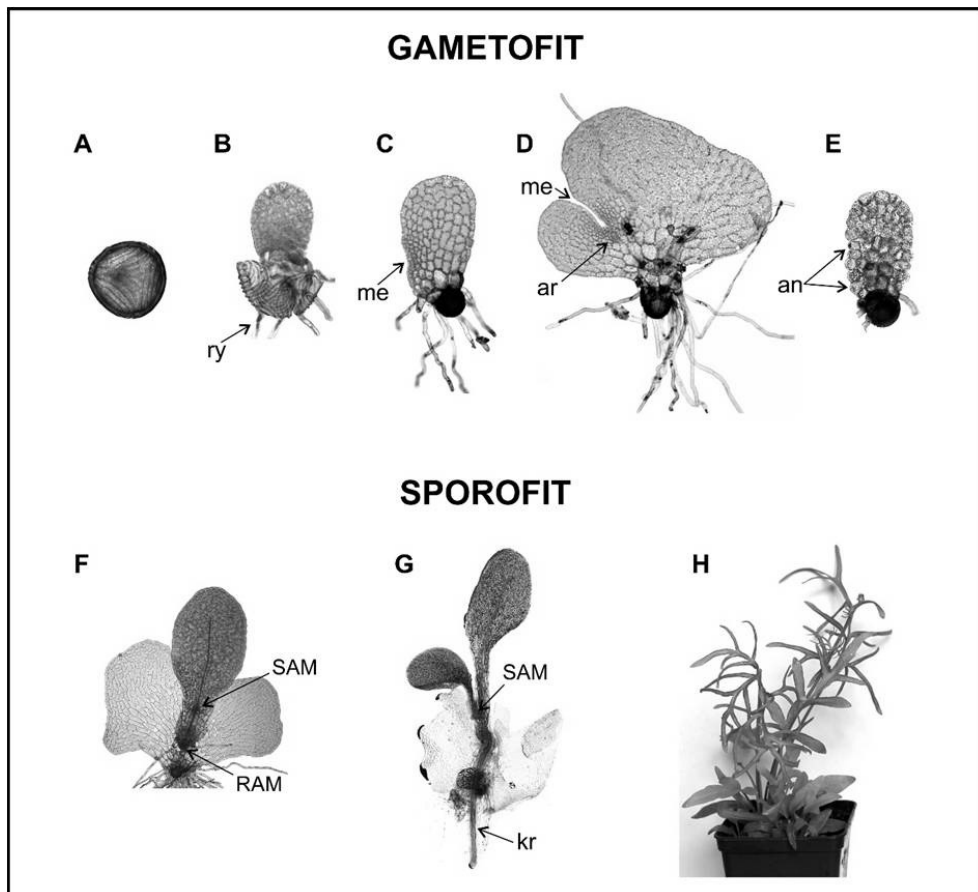
Powstające z zarodnika wolnożyjące gametofity są haploidalne, co umożliwia łatwą identyfikację zarówno mutacji dominującej jak i recesywnej [20]. Rozwój gametofitu przebiega w krótkim czasie, dojrzałość płciową osiąga on już po około dwóch tygodniach. W populacji występują gametofity hermafrodytyczne i męskie. Obecność osobników hermafrodytycznych dodatkowo umożliwia samozapłodnienie, w wyniku którego powstają sporofity, będące homozygotami w każdym *locus*. Niewielki rozmiar dojrzałych płciowo gametofitów (1-2 mm) pozwala na hodowlę znacznej liczby osobników na pojedynczej szalce Petriego [9, 45]. Także diploidalne sporofity dojrzałość reprodukcyjną uzyskują dość wcześnie, kiedy osobniki mają jeszcze niewielkie rozmiary. Sporofity mogą być również propagowane wegetatywnie z tworzących się na blaszce liściowej pąków lub rozmnózek. Dodatkową zaletą *C. richardii* w badaniach genetycznych jest obecność procesu aposporii, który polega na rozwoju diploidalnych gametofitów bezpośrednio ze sporofitu oraz procesu apogamii, w wyniku którego z gametofitu zostaje zaindukowany haploidalny sporofit [20]. Ciekawe możliwości stwarza również występowanie genetycznie odmiennych populacji allopatrycznych, których mieszańce mogą być wykorzystywane do poznania mechanizmów powstawania barier reprodukcyjnych u paproci [70].

Ważną cechą organizmów modelowych jest znajomość sekwencji genomu, co umożliwia poznanie funkcji poszczególnych genów oraz porównanie możliwych podobieństw i zmian w genomach różnych grup roślin. U *C. richardii* ze względu na duży rozmiar (11Gb) genom nie został jeszcze całkowicie zsekwencjonowany [81], choć liczba sekwencji zdeponowanych w bazach genowych cały czas rośnie [15, 21, 65, 81]. Ponadto sporządzono mapę genetyczną *C. richardii*, pokazującą lokalizację genów na chromosomach [69]. Opracowano również metody pozwalające na transformację tej modelowej paproci. Pierwsza metoda przejściowej transformacji polegała na inkubacji zarodników z dwuniciowym RNA (dsRNA) [84]. Wykorzystano także metodę biolistyczną, bombardując gametofity *C. richardii* konstruktami DNA [75]. Dopracowano także protokół stabilnej transformacji bombardując 14 dniowe eksplantanty sporofitowe zaindukowane z kalusa [73]. Stabilną transformację uzyskano również za pośrednictwem *Agrobacterium*

[12]. Znajomość metod transformacji *C. richardii* znacznie ułatwi analizy funkcjonalne genów, pozwalając na pełne wykorzystanie potencjału tego gatunku pa-proci jako organizmu modelowego [12].

CYKL ŻYCIOWY

Ceratopteris richardii rozwija się w dwuetapowym cyklu przemiany pokoleń, gdzie każde z pokoleń stanowi niezależną, wolnożyjącą i zdolną do fotosyntezy roślinę. Pokolenie dominujące jest reprezentowane przez diploidalny sporofit ($2n$), który w wyniku mejozy produkuje haploidalne zarodniki, a pokolenie generatywne stanowi krótkotrwały, haploidalny gametofit ($n=39$), wytwarzający gamety (Ryc. 1) [2, 9, 58]. Co ciekawe, wykazano, że zwykle autotroficzny gametofit przy niskim dostępie światła może stać się oportunistycznie heterotroficzny, pobierając niezbędny do wzrostu cukier z otaczającego go środowiska [1]. Rozwój gametofitu *C. richardii* rozpoczyna się od kiełkowania jednokomórkowego, bezchlorofilowego zarodnika, zawierającego materiał zapasowy w postaci białkowych i lipidowych ciał zapasowych [76]. Pierwszy podział prowadzi do wycięcia ryzoidu (chwytnika), który wyrasta po pęknięciu ściany zarodnika w miejscu trójdzielnej bruzdy aperturowej. Pozostała po wycięciu ryzoidu komórka dzieli się następnie równoległymi względem siebie podziałami, w wyniku czego powstaje 3-4 komórkowa, nitkowata forma gametofitu. Forma ta jest krótkotrwała: wszystkie komórki nitki zaczynają się dzielić w dwóch płaszczyznach, tworząc jęczyczkowaty gametofit. W populacji gametofitów *C. richardii* występuje wyraźne zróżnicowanie morfologiczne na osobniki hermafrodytyczne o asymetrycznie sercowatym pokroju plechy oraz męskie, mające formę jęczyzka. U osobników hermafrodytycznych tworzy się merystem zlokalizowany po jednej ze stron plechy i dlatego też nazywany brzeżnym (marginalnym). Podziały komórek w regionie merystemu prowadzą początkowo do pojawienia się wyraźnego wgłębienia z boku plechy, a ostatecznie do utworzenia asymetrycznie sercowatego gametofitu. Poniżej wgłębienia merystematycznego tworzą się archegonia (rodnie), natomiast anterydia (plemnie) powstają wyłącznie poza regionem merystemu – na obrzeżu plechy oraz po bokach wgłębienia. Dojrzewające archegonia produkują pojedynczą komórkę jajową, która jest zdolna do zapłodnienia przez niecałe dwa dni, natomiast w anterydiach tworzą się spermatozoidy, które po uwolnieniu do środowiska są żywotne jedynie przez ~20 min. Dlatego też do czasu zapłodnienia ciągle produkowane są nowe gametangia [9, 24]. Spermatozoidy zaopatrzone są w liczne wici, które umożliwiają im dotarcie do komórki jajowej w obecności wody. Komórki rodni wydzielają dodatkowo substancję chemiczną, która ma za zadanie przyciągnąć szybko pływające spermatozoidy (chemotaksja dodatnia) [58, 64].



RYCINA 1. Morfologia wybranych stadiów rozwojowych gametofitu i sporofitu *Ceratopteris richardii* w trakcie cyklu życiowego. Pokolenie haploidalne – zarodnik (A), młody gametofit o języczkowatym kształcie (B), języczkowaty gametofit z zakładającym się merystem brzeżnym (C), asymetrycznie sercowaty gametofit z funkcjonującym merystem (D), gametofit męski (E). Pokolenie diploidalne – młody sporofit z pojedynczym liściem (F), z dwoma liśćmi i widocznym korzeniem (G), pokrój dojrzałego osobnika (H). Pomędzy zdjęciami nie jest zachowana proporcja wielkości. Legenda: ry – ryzoid, me – merystem brzeżny, ar – archegonium, an – anterydium, SAM – merystem wierzchołkowy pędu, RAM – merystem wierzchołkowy korzenia, kr – korzeń

FIGURE 1. Morphology of selected developmental stages of *Ceratopteris richardii* during the life cycle. Haploid generation – spore (A), young tongue-shaped gametophyte (B), tongue-shaped gametophyte upon the marginal meristem formation (C), asymmetrical heart-shaped gametophyte with a functioning meristem (D), male gametophyte (E). Diploid generation – young sporophyte with a single leaf (F), with two leaves and a visible root (G), habit of a mature sporophyte (H). The size ratio between photos is not maintained. Abbreviations: ry – rhizoid, me – lateral meristem, ar – archegonium, an – antheridium, SAM – shoot apical meristem, RAM – root apical meristem, kr – root

Wzrost gametofitów hermafrodytycznych kończy się wraz z zapłodnieniem komórki jajowej i powstaniem zygoty [3, 9, 10, 46]. Początkowo młody sporofit rośnie korzystając z zasobów zgromadzonych przez gametofit, który zamiera po wytworzeniu przez sporofit kilku pierwszych liści (Ryc. 1). Sporofity wykazują heterofilię (różnolistość). Jako pierwsze tworzą się małe liście wegetatywne (trofofile), początkowo całobrzegie, następnie o coraz bardziej podzielonej blaszce, aż ostatecznie tworzone są liście zarodnikowe (sporofile) o silnie powycinanej blaszce liściowej [24, 45, 50]. Na zawiniętych do wnętrza brzegach sporofili, po stronie odosiowej, rozwijają się sporangia, a w każdym z nich tworzy się 16 haploidalnych zarodników [45, 49]. Ze wzrostem liści związane jest również powstawanie korzeni, które u *C. richardii* są głównie pochodzenia pędowego i znajdują się poniżej każdego liścia [50, 51]. Cały cykl rozwojowy *Ceratopteris richardii* trwa ~120 dni [45, 47].

MERYSTEM

Rozwój i wzrost gametofitów i sporofitów *C. richardii* związany jest z obecnością merystemu, w którym, podobnie jak u większości gatunków paproci, znajduje się pojedyncza komórka apikalna. Początkowo wzrost nitkowatego gametofitu prowadzony jest przez pojedynczą komórkę apikalną, która zostaje następnie zastąpiona przez wielokomórkowy merystem zlokalizowany na jednym z brzegów plechy [9, 10, 24, 71]. Analiza aktywności podziałowej we wczesnych etapach rozwoju gametofitu nie potwierdziła jednak specyficznej funkcji komórki apikalnej, gdyż dzieliła się ona podobnie do pozostałych komórek plechy [11]. Nie oznacza to jednak, że komórki w szczytowej części gametofitu nie mogą odgrywać istotnej roli w sygnalizacji na wczesnych etapach rozwoju. Dalszy rozwój osobnika wymaga wykształcenia merystemu brzeżnego w wyniku stopniowej specyfikacji komórek merystematycznych. Proces ten może być warunkowany zmianami w dystrybucji kalozy, wyznaczającej na brzegu plechy obszar o zachowanych właściwościach merystematycznych. W merystemie brzeżnym funkcjonuje pojedyncza, prostokątna komórka inicjalna, której regularne podziały według stałego wzoru [11] prowadzą do utworzenia gametofitu o asymetrycznie sercowatym kształcie.

Pojedyncza komórka apikalna funkcjonuje również w sporoficie *C. richardii*, w merystemie wierzchołkowym pędu [24, 50]. Ma ona kształt tetraedryczny (piramidalny) i w wyniku regularnych podziałów odcina komórki pochodne, zwane merofitami. Podziały w obrębie merofitów prowadzą do wyznaczenia komórki apikalnej liścia oraz zlokalizowanej poniżej, w warstwie subepidermalnej, komórki macierzystej, z której powstanie tetraedryczna komórka apikalna korzenia [50,

51, 52]. Co ciekawe, ten sam wzór podziałów komórkowych jest zachowany od rozwoju zarodkowego, gdzie dochodzi do specyfikacji komórek inicjalnych, które kontynuują wzrost pędu i korzenia [53]. Także wzrost blaszki liściowej związany jest z obecnością szczytowo zlokalizowanych dwóch komórek inicjalnych, które mogą się dzielić według kilku alternatywnych wzorów [49].

Co ważne, za utrzymanie podziałów apikalnych komórek merystematycznych, zarówno w merystemie wierzchołkowym pędu sporofitu jak i w gametoficie przed powstaniem merystemu brzeżnego odpowiedzialny jest jeden z homologów genu *LEAFY* (*CrLFY1*) [71]. Wykazano również funkcjonowanie genu *CrWOXB*, który promuje podziały komórek oraz odpowiada za rozwój organów u obu pokoleń [98]. Sugeruje to uniwersalność mechanizmów regulujących utrzymanie stanu merystematycznego zarówno w pokoleniu haploidalnym jak i diploidalnym.

DETERMINACJA PŁCI

Gametofity *C. richardii* są pokoleniem wolnożyjącym, o wyraźnym dymorfizmie płciowym, dlatego też były intensywnie wykorzystywane do rozszyfrowania molekularnego mechanizmu determinacji płci u roślin. Dojrzały sporofit produkuje jednakowe zarodniki, które mogą tworzyć gametofity dowolnej płci, co sugeruje, że determinacja płci jest niezależna od genotypu natomiast podlega kontroli środowiskowej [54]. Związkiem odpowiedzialnym za determinację ścieżki rozwojowej osobnika jest hormon zwany anterydiogenem (A_{CE}). Jest on syntetyzowany i wydzielany przez gametofity hermafrodytyczne, które rozwinęły się w populacji jako pierwsze. Zarodniki, które kiełkują nieco później, ze względu na obecność anterydiogenu w podłożu rozwijają się jako gametofity męskie, a przy ciągłej obecności hormonu ich płeć zostaje nieodwracalnie zdeterminowana. Równocześnie u osobników hermafrodytycznych komórki tworzące strefę merystematyczną są niewrażliwe na działanie A_{CE} , dlatego też w tej części plechy nie tworzą się gametangia męskie, natomiast mogą się one tworzyć poza tą strefą [2, 10, 58, 78]. Gęstość kiełkujących zarodników decyduje o stosunku osobników hermafrodytycznych do męskich ze względu na stężenie hormonu w środowisku [58]. Anterydiogen spowalnia również wzrost męskich i hermafrodytycznych gametofitów typu dzikiego oraz męskich osobników mutantu *him1* (*highly male1*); mutant ten charakteryzuje się rozwojem męskich gametofitów niezależnie od obecności hormonu [36].

Analiza fenotypów pojedynczych, podwójnych i potrójnych mutantów pozwoliła na ustalenie sieci wzajemnych oddziaływań i poznanie mechanizmu determinacji płci (Tab. 1), jak również na opracowanie modelu szlaku prowadzącego do wyboru płci (Ryc. 2) [9, 87]. Model ten opiera się na interakcjach dwóch klas

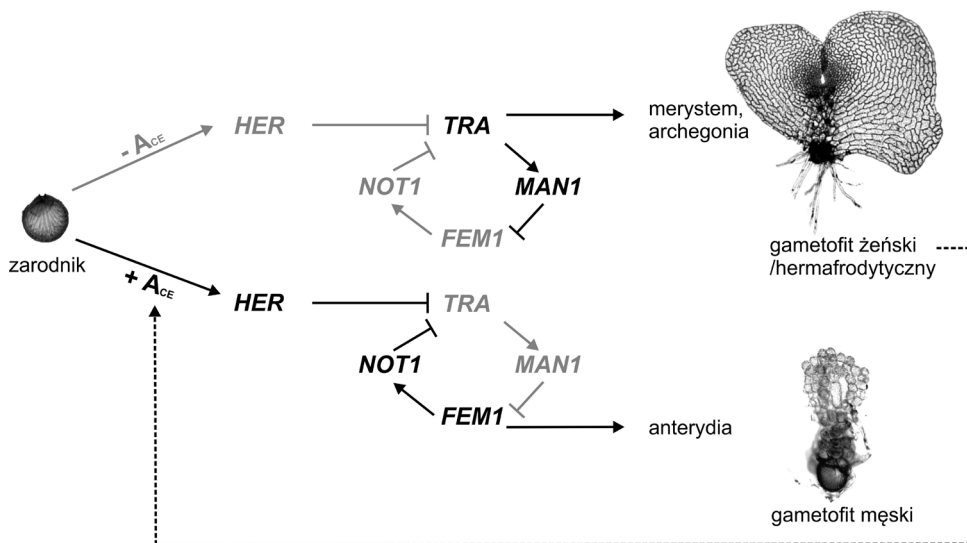
genów: *FEMINIZATION (FEMI)*, determinujących rozwój gametofitów męskich oraz *TRANSFORMER (TRA)* determinujących rozwój gametofitów żeńskich. W pojedynczym osobniku tylko jedna z wymienionych klas genów ulega ekspresji ze względu na ich wzajemnie antagonistyczne oddziaływanie [6, 7, 8, 10, 30]. Gen *TRA* reguluje pozytywnie inny gen, *MANY-ANTHERIDIAL (MANI)*, który bezpośrednio hamuje aktywność genu *FEMI* [8]. Natomiast gen *FEMI* wpływa na ekspresję genu *NOTCHLESS1 (NOTI)*, który bezpośrednio hamuje ekspresję *TRA* [85, 87]. Za regulację aktywności tych dwóch klas genów odpowiada anterydiogen, który indukuje ekspresję genu *HERMAPHRODITIC (HER)*. Tak więc, kiedy w środowisku występuje anterydiogen, geny *HER* zostają aktywowane hamując geny *TRA*, możliwa jest wtedy ekspresja genu *FEMI* i rozwój osobnika męskiego.

TABELA 1. Główne klasy mutantów płci gametofitów *C. richardii* [87]
TABLE 1. Main classes of sex mutants of *C. richardii* gametophytes [87]

NAZWA MUTANTA	FENOTYP MUTANTA
<i>her (hermaphroditic)</i>	rozwija się zawsze jako osobnik hermafrodytyczny, niezależnie od obecności A_{CE}
<i>tra (transformer)</i>	rozwija się zawsze jako osobnik męski, niezależnie od obecności A_{CE} w środowisku
<i>fem (feminization)</i>	rozwija się zawsze jako osobnik żeński
<i>man (many antheridia)</i>	w obecności A_{CE} rozwija się jako osobnik męski, natomiast przy braku A_{CE} jako osobnik hermafrodytyczny, ale wytwarzający dziesięciokrotnie większą liczbę anterydiów niż osobnik typu dzikiego
<i>not (notchless)</i>	charakteryzuje się zmniejszoną liczbą anterydiów i zaburzonym funkcjonowaniem merystemu brzeżnego, związanym z brakiem wgłębienia lokalizującego merystem

Natomiast brak anterydiogenu umożliwia ekspresję genów *TRA* i w związku z tym hamowanie genu *FEMI*, co skutkuje rozwojem osobnika o cechach żeńskich [6, 7, 8, 9, 10, 85]. Jest to przykład epigenetycznego mechanizmu odpowiedzialnego za determinację płci osobnika (Ryc. 2). Oprócz wymienionych wyżej genów wykazano też inne, które są zależne od A_{CE} , np. pokazano, że gen *ANII (ANTHERIDIOGEN-INDUCED 1)* ulega przejściowej ekspresji w trakcie rozwoju osobnika męskiego [96]. GANGER i współaut. [34] potwierdzili rolę *ANII* w procesie determinacji płci, sugerując jednocześnie udział tego genu podczas całego rozwoju gametofitu męskiego. Wydaje się jednak, że ze względu na wysoki poziom ekspresji *ANII* w gametofitach hermafrodytycznych, gen ten może być zaangażowany nie tylko w rozwój osobników męskich [34]. Niedawno Atallah i współaut.

[3] opisali transkryptom *C. richardii* w trakcie determinacji płci gametofitu pod wpływem anterydiogenu, wskazując na istotne różnice w profilach ekspresji genów pomiędzy osobnikami męskimi a hermafrodytycznymi. Większość z genów zaangażowanych w rozwój osobnika i odpowiedź hormonalną wykazywała wyższą odpowiedź w gametofitach męskich, co jest związane bezpośrednio z działaniem A_{CE} . Zidentyfikowano również geny biorące udział w przebudowie chromatyny i epigenetycznej regulacji determinacji płci [3].



RYCINA 2. Schemat prezentujący mechanizm determinacji płci u *Ceratopteris richardii* uwzględniający potencjalne interakcje pomiędzy genami w obecności (+) i przy braku (-) hormonu – anterydiogenu (A_{CE}) w środowisku. Szczegółowy opis zamieszczony w tekście. Nazwy zaznaczone na czarno – na włączone geny, które są włączone w trakcie determinacji danej płci, natomiast zaznaczone na szaro – na wyłączone geny. Strzałki oznaczają promowanie aktywności danego genu, linie zakończone płasko jego tłumienie. Przerywana linia wskazuje na sugerowane w literaturze źródło A_{CE} w środowisku. *HER* (HERMAPHRODITIC), *TRA* (TRANSFORMER), *FEM1* (FEMINIZATION), *NOT1* (NOTCHLESS1), *MAN1* (MANY-ANTHERIDIAI)

FIGURE 2. A diagram showing the mechanism of sex determination in *Ceratopteris richardii* with potential interactions between genes in the presence (+) and absence (-) of hormone, antheridiogen (A_{CE}). Detailed description included in the text. Names in black indicate genes that are switched on during the determination of the sex, while marked in gray show genes that are switched off. The activity of the gene is shown by the arrows – suppression of the gene activity is shown by the flat-ended lines. A dashed line indicates the potential A_{CE} source in the environment. *HER* (HERMAPHRODITIC), *TRA* (TRANSFORMER), *FEM1* (FEMINIZATION), *NOT1* (NOTCHLESS1), *MAN1* (MANY-ANTHERIDIAI)

Mimo zdeterminowania płci na wczesnym etapie rozwoju, gametofity męskie zachowują możliwość zmiany ścieżki rozwoju, jeśli zostaną uwolnione spod wpływu anterydiogenu i mają zachowane jeszcze komórki niezróżnicowane w anterydia. U takich osobników jedna z niezróżnicowanych komórek plechy zaczyna się dzielić, tworząc sercowaty hermafrodytyczny gametofit, z funkcjonującym merystemem i gametangiami. Im dłużej męskie gametofity są eksponowane na działanie anterydiogenu, tym mniejszy procent osobników może jednak ulec takiej konwersji [2, 22, własne obserwacje].

Oprócz badania wpływu podstawowego hormonu – anterydiogenu na determinację płci u *C. richardii* testowano także rolę innych znanych hormonów w tym procesie; wyniki tych badań zostały przedstawione w rozdziale Hormony.

Dodatkowym czynnikiem, modyfikującym wrażliwość gametofitów na anterydiogen, jest światło [55]. Światło niebieskie, które u osobników typu dzikiego nie zmienia odpowiedzi na anterydiogen, u mutantów *her1* w obecności hormonu promuje rozwój gametofitów męskich. Natomiast światło czerwone działa antagonistycznie do niebieskiego: jednoczesne traktowanie mutantu *her1* światłem niebieskim i czerwonym ogranicza tworzenie osobników męskich [55].

Sprawdzono również, jaki wpływ na rozwój gametofitów *C. richardii* ma zróżnicowany poziom dostępnych składników odżywczych. Zakładano, że przy ograniczonym dostępie składników odżywczych promowany będzie rozwój osobników męskich, gdyż nakłady energetyczne potrzebne do ich rozwoju są mniejsze niż w przypadku osobników hermafrodytycznych. Badania pokazały jednak, że poziom dostępnych składników odżywczych nie decyduje o indukcji męskich gametofitów [4] i że nie ma zależności pomiędzy zawartością makroelementów, takich jak węgiel, azot i fosfor, których zmniejszona dostępność w podłożu zwykle wpływa ograniczająco na wzrost roślin, a plastycznością płci osobnika [37, 38, 39]. Osobniki hermafrodytyczne odznaczały się wyższą zawartością azotu i niższą zawartością węgla w porównaniu z osobnikami męskimi, co można tłumaczyć zwiększonym zapotrzebowaniem wciąż rosnącego gametofitu hermafrodytycznego [37]. Dodatkowo gametofity hermafrodytyczne na pożywkach ze zmniejszoną zawartością azotu i węgla miały zredukowany rozmiar, inwestując prawdopodobnie niewielkie zasoby pierwiastków w wytworzenie funkcjonalnych struktur rozrodczych [38].

Badania pokazały również, że wielkość zarodnika nie jest skorelowana z płcią tworzącego się osobnika, natomiast wpływa na rozmiar powstającego gametofitu [36].

W ostatnim czasie sugerowano także wpływ bakterii glebowej, *Pseudomonas nitroreducens*, na determinację płci i rozwój gametofitów *C. richardii*. Dodanie tej bakterii do hodowli gametofitów powodowało zredukowanie liczby osobników męskich w populacji oraz zwiększony wzrost plechy, a także wydłużenie ryzoidów i zmniejszenie ich liczby u obu płci. Badania te podkreślają złożoność interakcji pomiędzy gametofitem a jego środowiskiem, w tym obecnością bakterii glebowych [35].

HORMONY

Istotnymi czynnikami regulującymi wzrost i rozwój roślin są hormony, dlatego też ich wpływ był szeroko badany u *C. richardii*.

Jednym z ważniejszych hormonów jest auksyna. Jej wpływ analizowano dodając do hodowli gametofitów syntetyczne auksyny, kwas naftylo-1-octowy (NAA) i kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (2,4,5-T), oraz związki zaburzające prawidłowe działanie i transport auksyny, takie jak kwas 2-(p-chlorofenoksy) izobutyloowy (PCIB), kwas trijodobenzoowy (TIBA) i kwas naftyloftalamowy (NPA) [40]. Egzogenna auksyna hamowała aktywację merystemu brzeżnego oraz tworzenie gametangiów, a powstałe osobniki przypominały wielkością i kształtem gametofity męskie. Strefa inicjacji nowych ryzoidów oprócz części bazalnej obejmowała również części marginalne gametofitu [40, 83]. W przypadku zastosowania PCIB gametofity przybierały kolisty kształt, bez widocznego funkcjonującego merystemu, TIBA wywoływał natomiast opóźnioną w stosunku do kontroli aktywację merystemu, a przy traktowaniu NPA pojawiał się drugi merystem brzeżny, powodując zróżnicowanie kształtów gametofitów. Na podstawie analizy fenotypu gametofitów rosnących na pożywkach suplementowanych syntetyczną auksyną lub inhibitorami opracowano hipotetyczny model auksynowej regulacji powstawania merystemu brzeżnego i jego aktywności w trakcie rozwoju gametofitu *C. richardii*. Model ten zakłada, że początkowo merystem apikalny odpowiada za produkcję auksyny, która jest transportowana ku bazalnej części gametofitu, hamując aktywność merystemów. Następnie merystem apikalny traci aktywność, a jego funkcję losowo przejmuje jeden z merystemów brzeżnych. Potwierdzenie tego modelu wymaga jednak dalszych badań [40]. W stadium sporofitu wykazano hamujący wpływ egzogennej auksyny (kwas indolilo-3-octowy/IAA oraz kwas indolilo-3-masłowy/IBA) na wzrost korzenia głównego i korzeni bocznych, natomiast nie odnotowano jej wpływu na inicjację nowych korzeni bocznych. Traktowanie sporofitu NPA dało podobny efekt, jak w przypadku auksyny. Wyniki te sugerują, że u *C. richardii* egzogennie stosowana auksyna nie stymuluje wzrostu korzeni i nie indukuje tworzenia korzeni bocznych. Może być to związane z istnieniem odmiennego mechanizmu kontrolującego rozwój korzeni bocznych u roślin zarodnikowych (w tym paproci) niż u młodszych ewolucyjnie roślin nasiennych [52].

Oprócz auksyny ważną rolę w utrzymaniu aktywności merystemu brzeżnego gametofitów może pełnić drugi hormon – kwas abscysynowy (ABA), który prawdopodobnie jest produkowany przez region merystematyczny i transportowany w obrębie plechy. Podawany egzogennie ABA działa antagonistycznie do A_{CE} , uniemożliwiając tym samym rozwój męskich gametofitów w populacji oraz powstawanie anterydiów na gametofitach hermafrodytycznych. W efekcie tworzą się wyłącznie osobniki żeńskie, u których obecny jest merystem oraz archego-

nia [41]. Natomiast mutanty *abr*, niewrażliwe na ABA, w obecności anterydiogenu tworzą „super męskie” gametofity, charakteryzujące się zwiększoną liczbą powstających anterydiów [10, 30, 42]. Wyniki te spowodowały, że ABA został zaproponowany jako specyficzny inhibitor blokujący aktywność A_{CE} , a tym samym czynnik związany z ochroną regionu merystematycznego u osobników hermafrodytycznych [10, 41, 94]. Niewrażliwość na ABA jest związana z uszkodzeniem genu *GAMETOPHYTE INSENSITIVE TO ABA 1 (GAI1)* i powoduje, że u mutantów *C. richardii* wszystkie gametofity rozwijają się jako męskie, niezależnie od obecności A_{CE} lub ABA w pożywce [66]. W związku z tym zaproponowano poszerzenie modelu determinacji płci o ABA i gen *GAI1*. ABA aktywuje ekspresję genu *GAI1*, który tłumia działanie anterydiogenu i genów *HER* oraz indukuje geny *TRA*. Mechanizm ten nie jest jednak jeszcze do końca poznany [86]. Znaczenie ABA było również sprawdzane w kontekście przejścia gametofitu męskiego w hermafrodytyczny w wyniku zniesienia działania A_{CE} . Gametofity męskie wystawione na obecność egzogenego ABA nie wykazywały przyspieszonej konwersji w osobniki hermafrodytyczne, a co więcej wysokie stężenie tego hormonu ($>100 \mu\text{M/L}$) blokowało zmianę, prowadząc częściej do starzenia się męskich osobników [34].

Wpływ i znaczenie anterydiogenu dla rozwoju gametofitów *C. richardii* zostały opisane w rozdziale poświęconym determinacji płci. Natomiast warto zwrócić tutaj uwagę na sam charakter tego związku. Pomimo iż u większości paproci anterydiogeny są klasyfikowane jako gibereliny, w przypadku *C. richardii* związek ten nie został nadal zidentyfikowany. Aktywność biologiczna i natura chemiczna A_{CE} oraz wrażliwość na inhibitory syntezy giberelin (ancymidol, AMO-1618 i unikonazol-P) sugerują przynależność tego specyficznego gatunkowo związku do grupy giberelin [9, 58, 93]. Wskazuje na to również analiza transkryptomu gametofitów, która wykazała, że w gametofitach hermafrodytycznych, produkujących A_{CE} , występuje zwiększona ekspresja genu *COPALYL DIPHOSPHATE SYNTHASE/KAURENE SYNTHASE (CPS/KS)* odpowiedzialnego za kodowanie enzymu kluczowego dla biosyntezy giberelin [3].

Na rozwój gametofitu *C. richardii* mają również wpływ cytokiny [82]. Wykorzystane w analizach 6-benzylaminopuryna, kinetyna i 2-izopentyladenina już przy niewielkim stężeniu (10^{-12} M) indukowały zmiany morfologii rosnących w ciemności gametofitów. U osobników traktowanych hormonem następowało zmniejszenie długości i poszerzenie plechy w wyniku częstszych podziałów peryklinalnych oraz przesunięcie strefy indukcji ryzoidów do części subapikalnej gametofitu. Przy wyższych stężeniach hormonu (10^{-9} - 10^{-8} M) pojawiało się wgłębienie merystemu brzeżnego, charakterystyczne dla gametofitów hermafrodytycznych rozwijających się w obecności światła. Wyniki te sugerują, że cytokiny mogą zastąpić bodziec fotomorfogenetyczny, jakim jest zmiana długości światła,

decydując o kierunku podziałów komórkowych, elongacji oraz różnicowaniu się komórek. Cytokiny nie indukują jednak kiełkowania zarodników w ciemności, nie stwierdzono również ich wpływu na syntezę chlorofilu. W przypadku gametofitów rosnących w świetle białym nie zaobserwowano znaczących zmian po traktowaniu cytokininami [82].

FOTOMORFOGENEZA

Zarodniki paproci stanowią dogodny system eksperymentalny do badań procesu fotomorfogenez. Analizy wykazały, że do kiełkowania zarodników *C. richardii*, podobnie jak u wielu innych paproci, wymagana jest ich ekspozycja na światło białe lub czerwone. W ciemności lub w świetle niebieskim zarodniki nie kiełkują, natomiast daleka czerwień odwraca efekt światła czerwonego [26]. Zidentyfikowano kilka klas mutantów związanych z fotomorfogenezą, jednak najlepiej poznanym i scharakteryzowanym jest mutant *dark germinating 1 (dkg1)*, który kiełkuje wyłącznie w ciemności [25, 56, 80]. Mutant *dkg1* tworzy wydłużoną, paskowatą plechę, na szczycie której formuje się merystem brzeżny wraz z archegoniami i anterydiami, co odróżnia mutant od gametofitu typu dzikiego, rozwijającego się w obecności światła białego [25, 55, 56]. Natomiast osobniki typu dzikiego, rosnące w ciemności, mają fenotyp podobny do mutantu *dkg1*: tworzą wydłużoną plechę w kształcie paska, w obrębie której można wyróżnić trzy strefy – merystem apikalny, strefę pod merystemem charakteryzującą się wydłużaniem komórek oraz strefę bazalną, w obrębie której nie obserwuje się wzrostu. Zachowanie komórek gametofitu w poszczególnych strefach warunkowane jest światłem o różnej długości. Czynnikiem decydującym o elongacji komórek jest światło niebieskie, które powoduje reorientację mikrotubul kortykalnych i wpływa na wzrost komórek. Każda z komórek należących do strefy elongacji odbiera od otoczenia sygnał niezależnie od pozostałych [67]. Światło białe i czerwone indukują asymetryczny podział komórek marginalnych położonych w strefie elongacji, a mniejsze komórki powstałe w wyniku tego podziału rozwijają się w ryzoidy. Dalszy wzrost ryzoidu jest już związany z ciągłą ekspozycją na światło białe, czerwone lub niebieskie [68].

REAKCJA GRAWITROPIJNA

Jednokomórkowe zarodniki *C. richardii* ze względu na duży rozmiar (średnica 150-300 μm) oraz początkowo prostą budowę rozwijających się z nich gametofitów okazały się dobrym modelem do badania komórkowych mechanizmów percepcji grawitacji [18, 77]. Pierwsze badania dotyczyły wpływu grawitacji na

kierunek wzrostu ryzoidów. W warunkach standardowych ponad 90% ryzoidów rośnie zgodnie z przyciąganiem ziemskim. Kiełkowanie zarodników w klinostacie, przy ciągłej zmianie orientacji, powoduje, że ryzoidy nie wykazują preferencji w kierunku wzrostu. Co ciekawe, reorientacja kiełkującego zarodnika wpływa na zmianę kierunku wzrostu ryzoidów tylko przez krótki okres czasu, ograniczony do pierwszych 5 godzin po rozpoczęciu kiełkowania. Po tym czasie ryzoidy, również te nowo powstałe, rosną w ustalonym początkowo kierunku. Wyznaczono na tej podstawie okno czasowe, w którym dochodzi do nieodwracalnej determinacji polarności ryzoidu przez grawitację, odzwierciedlonej w migracji jądra komórkowego i kierunku wzrostu ryzoidów [32]. Kolejne badania skupiły się na wpływie grawitacji na ustalenie polarności zarodnika oraz opisanie fizjologicznego podłoża tego procesu [21, 31]. Nieodwracalne ustanowienie dwóch biegunów w rozwoju zarodnika pod wpływem siły grawitacji następuje w ciągu pierwszych 18-24 godzin kiełkowania. Po około 48 godzinach ekspozycji na światło dochodzi do asymetrycznego podziału, wyznaczającego mniejszą komórkę tworzącą pierwszy ryzoid oraz większą komórkę, rozwijającą się w plechę gametofitu. Światło białe stanowi tutaj drugorzędny czynnik po grawitacji i tylko w niewielkim stopniu wpływa na polarność zarodnika [31]. Ustalenie polarności zarodnika związane jest ze specyficznym ruchem jonów wapnia, który jest przeciwny do wektora grawitacji: jony wapnia wypływają w górnej części zarodnika, natomiast wpływają u dołu. Zastosowanie nifedypiny, związku blokującego kanały wapniowe, powoduje utratę wrażliwości komórki na działanie grawitacji, zaburzając jej polaryzację [21]. Rotacja zarodnika o 180° szybko powoduje ponowne ustanowienie kierunku przepływu jonów Ca^{2+} względem nowego wektora grawitacji [77, 88], prawdopodobnie w wyniku miejscowych zmian aktywności kanałów i pomp wapniowych, rozmieszczonych w błonie komórkowej zarodnika [77]. Wykazano, że błonowe Ca^{2+} -ATPazy nie uczestniczą w ustalaniu polarności zarodnika, biorą jednak udział w szczytowym wroście ryzoidu [16, 17]. Na wyznaczenie polarności mają wpływ Ca^{2+} -ATPazy charakterystyczne dla retikulum endoplazmatycznego [77], co zostało potwierdzone wysokim poziomem transkryptów w 10 godzinie kiełkowania zarodnika [15]. *C. richardii* jest również wykorzystywany jako jeden z roślinnych gatunków modelowych do badań w środowisku mikrogravitacji. Między innymi posłużył do porównania mechanizmu migracji jądra komórkowego oraz ekspresji genów na wczesnym etapie kiełkowania zarodnika w warunkach mikrogravitacji (lotu kosmicznego) i w warunkach normalnego rozwoju (ziemska grawitacja) [18, 74, 77]. Proponowanym grawisensorem w gametoficie *C. richardii* są chloroplasty zakotwiczone wzdłuż błony komórkowej [57]. Hipotezę tę zweryfikowano analizując mutanty *clumped chloroplast 1 (cpl)*, których chloroplasty nie mogą się przemieszczać i akumulują się w postaci grud wokół jądra komórkowego. Gametofity *cpl* rosnące w ciemności wykazują grawitropizm ujemny, który tylko w niewielkim stopniu jest hamowany przez reorientację

chloroplastów [57]. Warto podkreślić, że jest to propozycja odmiennego systemu odpowiedzi grawitropijnej niż u roślin nasiennych, w którym w percepcję bodźca zaangażowany jest inny typ plastydów niż amyloplasty. System ten wymaga jednak dalszych badań.

STRES ŚRODOWISKOWY I CHEMICZNY

Modelowy gatunek posłużył również do poszukiwania mechanizmów odporności roślin na szkodliwe związki hamujące ich wzrost i rozwój. Jednym z głównych czynników powodujących słaby wzrost roślin na kwaśnych glebach jest toksyczność glinu. Badania prowadzone w tym kierunku na gametofitach *C. richardii* pozwoliły na selekcję trzech mutantów (H α AT3, H α AT7, H α AT29) wykazujących tolerancję na dostępność kationów glinu w podłożu o pH 4,4 [97]. Innym istotnym czynnikiem, hamującym wzrost roślin, jest zasolenie gleb. U *C. richardii* wyselekcjonowano mutanty (*stl1* i *stl2*), u których procent skiełkowanych zarodników był wyższy niż u typu dzikiego a gametofity osiągały większe rozmiary w warunkach zasolenia. Co ciekawe, gametofit mutantów odznaczał się większą tolerancją na wysoki poziom zasolenia podłoża od sporofitu [48, 91, 92, 95]. Wyselekcjonowano również mutanty *C. richardii*, charakteryzujące się tolerancją na różnego rodzaju herbicydy, m.in. na parakwat (dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-bipirydyniowy) [19, 43, 44], glifosat czy acifluorfen. Powyższe przykłady ukazują przydatność modelowej paproci w badaniach podstawowych mechanizmów zaangażowanych w odpowiedź organizmów roślinnych na pojawiający się w środowisku czynnik stresowy, zwiększających tolerancję na związki ograniczające ich przeżywalność i wzrost, a które mogą być wykorzystane w procesie ulepszenia roślin uprawnych.

ŚCIANA KOMÓRKOWA

Ściana komórkowa pełni u roślin wiele istotnych funkcji, odgrywając często kluczową rolę w pojawiających się ewolucyjnych innowacjach budowy organizmu roślinnego [5]. Dlatego też prowadzi się badania składu ściany komórkowej u paproci, jako starej filogenetycznie i ważnej ewolucyjnie grupy, umożliwiając tym samym analizy porównawcze w stosunku do roślin nasiennych. Dodatkowo u paproci możliwe jest porównanie zmian w składzie ściany komórkowej pomiędzy pokoleniem diploidalnym a haploidalnym [33, 59]. Wykorzystując metodę immunolokalizacji komponentów ściany ustalono, że zarówno w tkankach gametofitu jak i sporofitu typowymi składnikami są związki takie jak homogalakturnan, mannan i ksyloglukzan. W sporoficie ze względu na obecność zróżnicowa-

nych tkanek wykryto dodatkowo ksylany, obecne we wtórnych ścianach komórek ksylemu oraz galaktan, obecny wyłącznie w komórkach floemu. W przypadku ryzoidów gametofitów i włośników korzeni wykazano obecność arabinogalaktanu (AGP) oraz ksyloglukanu. Analizy biochemiczne wykazały, że skład ściany komórkowej paproci jest podobny do składu ściany roślin okrytonasiennych [33, 59]. Szczegółowe badania dostarczyły dowodów na zaangażowanie AGP w prawidłowy rozwój gamet u paproci. Arabinogalaktany oraz (1,5)- α -L-arabinan są głównymi komponentami wewnętrznej warstwy ściany komórki jajowej, zaangażowanymi w proces dojrzewania, zapłodnienia oraz wczesnej embriogenezy [62]. Znacznie bardziej skomplikowana jest struktura ściany komórkowej powstającej w procesie spermatogenezy, która rozdziela najpierw rozwijające się, a następnie dojrzałe gamety męskie. Opisano powstawanie pięciu ścian, które zbudowane są z różnych polisacharydów: 1) kalozy oraz ksylanów, 2) celulozy oraz ksylanów, 3) wyłącznie z kalozy, 4) celulozy usieciowanej przez galaktoksyloglukan, oraz 5) z arabinogalaktanu. Każda ze ścian pełni odmienną funkcję w trakcie dojrzewania męskich gamet [63]. Obecność AGP jest także niezbędna do powstawania i prawidłowego rozwoju wici spermatozoidów [61].

APOGAMIA I AOSPORIA

Modelowa paproć *Ceratopteris richardii* znajduje również zastosowanie w badaniu procesów apogamii i aposporii [13, 14, 28]. Został opracowany specjalny system eksperymentalny umożliwiający indukcję apogamii, czyli pozyskiwanie haploidalnego sporofitu z komórek gametofitu [28]. Polega on na hodowli gametofitów na pożywkach z wysoką zawartością cukru (2,5% glukoza/sacharoza), przy jednoczesnym zapobieganiu procesowi zapłodnienia. W tym celu wykorzystywane są różne sposoby, jak fizyczne usuwanie osobników męskich z populacji, odwracanie szalki Petriego, aby zminimalizować dostępność wody, czy stosowanie mutantów *her1*, które nie tworzą gametofitów męskich lub *fem1*, które rozwijają się jako osobniki żeńskie [27]. Hodowla na optymalnym podłożu sprawia, że gametofity proliferują, zwiększa się liczba ryzoidów, a anterydia tworzą się w grupach w brzeżnych częściach plechy. Po 25-30 dniach na gametoficie zaczynają pojawiać się wyrostki, które przypominają struktury sporofitu i mogą przyjmować kształt liści, łodyg, a nawet korzeni. Charakteryzują się trójwymiarową strukturą, obecnością tkanki przewodzącej oraz aparatów szparkowych, czyli cechami charakterystycznymi dla sporofitu. Zawartość DNA oraz liczba chromosomów pozostaje jednak na poziomie haploidalnym, co potwierdza, że są to sporofity powstałe w procesie apogamii. Takie haploidalne sporofity nie dojrzewają i nie są w stanie wytwarzać zarodników. Co ciekawe, w puli game-

tofitów hodowanych w warunkach standardowych również dochodzi do powstania pojedynczych apogamicznych sporofitów, pokazując, jak plastyczny jest rozwój *C. richardii* [27]. Do badania mechanizmu apogamii na poziomie molekularnym wykorzystano metodę transformacji przy użyciu *Agrobacterium* [12, 14]. Pokazano, że ektopowa ekspresja genów promujących proces apogamii, *CrANT* (*AINTEGUMENTA*) lub *BnBBM* (*BABY BOOM*) indukuje spontaniczne tworzenie apogamicznych sporofitów. Natomiast wyciszenie ekspresji *CrANT* zmniejsza liczbę tworzących się osobników w indukowanej cukrem apogamii [14]. Wyniki te wskazują na uniwersalność genów *CrANT* i *BBM* w promowaniu tworzenia nowych sporofitów bez procesu zapłodnienia u roślin naczyniowych.

Drugim procesem modyfikującym cykl życiowy jest aposporia, w wyniku której z wegetatywnych tkanek sporofitu tworzy się diploidalny gametofit, zachowujący zdolność do rozmnażania generatywnego. Indukowana aposporia jest więc stosowana do produkcji poliploidalnych osobników, wykorzystywanych następnie do analiz genetycznych [29]. Aposporię u *C. richardii* można zaindukować hodując odcięte liście sporofitu na pożywce z dodatkiem 0,01% [27] lub 0,5% [13] sacharozy/glukozy. Po około 49 dniach tworzą się diploidalne gametofity zdolne do rozmnażania [27]. Oprócz procesu aposporii dochodzi także do regeneracji sporofitu, zwłaszcza przy wysokim stężeniu cukru (2,5% sacharoza/glukoza) [13].

Testowano również wpływ jednego z hormonów – etylenu, na proces aposporii i regenerację *C. richardii* [13]. Aby zwiększyć poziom etylenu wewnątrz komórek roślinnych stosowano etefon (kwas 2-chloroetylofosfonowy), natomiast jako inhibitor używano tiosiarczanu srebra (STS). Badania wykazały, że etylen wpływa na zwiększenie liczby eksplantantów zaangażowanych w regenerację i aposporię, jak również na całkowitą liczbę powstałych po regeneracji sporofitów i aposporycznych gametofitów. Jednak zbyt wysokie stężenie etefonu (100 mg/L) jak i stosowanie STS (20 μ M) działają hamująco na proces aposporii i regeneracji [13].

PODSUMOWANIE

Ceratopteris richardii, należący do paproci cienkozarodniowych, jest gatunkiem modelowym szeroko wykorzystywanym do badań różnorodnych procesów rozwojowych i komórkowych. Jedną z kluczowych zalet *Ceratopteris* jest obecność dwóch niezależnych i wolnożyjących pokoleń umożliwiających analizę i porównanie mechanizmów regulatorowych w osobniku diploidalnym i haploidalnym. Ponadto *C. richardii* stanowi prosty i łatwy system eksperymentalny, oferujący badaczowi szeroki zakres możliwości. Pomimo dużego rozmiaru genomu, który nie został jeszcze całkowicie zsekwencjonowany, dostępna jest już w bazach spora liczba sekwencji. Opracowanie stabilnych metod transformacji

genetycznej *C. richardii* umożliwiają dodatkowo analizy funkcjonalności wybranych genów. Dalsze badania z wykorzystaniem tego gatunku pozwolą na poznanie mechanizmów regulacji procesów na poziomie genetycznym, komórkowym i organizmowym, a ze względu na pozycję filogenetyczną paproci także na uzyskanie odpowiedzi na ważne pytania dotyczące ewolucji i rozwoju roślin lądowych.

PODZIĘKOWANIA

Chciałbym podziękować dr hab. Edycie Goli za merytoryczną dyskusję oraz cenne uwagi pomocne w przygotowaniu niniejszego artykułu.

Artykuł finansowany przez Uniwersytet Wrocławski, Subwencja 2020 – Działalność badawcza (501) – Nauki biologiczne (73).

LITERATURA

- [1] ALONGI DA, HILL JP, GERMINO MJ. Opportunistic heterotrophy in gametophytes of the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Botany* 2009; **87**: 799-806.
- [2] ATALLAH N, BANKS JA. Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Front Plant Sci* 2015; **6**: 100.
- [3] ATALLAH NM, VITEK O, GAITI F, TANURDZIC M, BANKS JA. Sex determination in *Ceratopteris richardii* is accompanied by transcriptome changes that drive epigenetic reprogramming of the young gametophyte. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 2018; **8**: 2205-2214.
- [4] AYRAPETOV A, GANGER MT. Nutrient levels do not affect male gametophyte induction by antheridiogen in *Ceratopteris richardii*. *Am Fern J* 2009; **99**: 273-278.
- [5] BANASIAK A. Evolution of the cell wall components during terrestrialization. *Acta Soc Bot Pol* 2014; **83**: 349-362.
- [6] BANKS JA. Sex-determining genes in the homosporous fern *Ceratopteris*. *Development* 1994; **120**: 1949-1958.
- [7] BANKS JA. Sex determination in the fern *Ceratopteris*. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 175-180.
- [8] BANKS JA. The TRANSFORMER genes of the fern *Ceratopteris* simultaneously promote meristem and archegonia development and repress antheridia development in the developing gametophyte. *Genetics* 1997; **147**: 1885-1897.
- [9] BANKS JA. Gametophyte development in ferns. *Annu Rev Plant Biol* 1999; **50**: 163-186.
- [10] BANKS JA, HICKOK L, WEBB MA. The programming of sexual phenotype in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Int J Plant Sci* 1993; **154**: 522-534.
- [11] BARTZ M, GOLA EM. Meristem development and activity in gametophytes of the model fern, *Ceratopteris richardii*. *Dev Biol* 2018; **444**: 107-115.
- [12] BUI LT, CORDLE AR, IRISH EE, CHENG CL. Transient and stable transformation of *Ceratopteris richardii* gametophytes. *BMC Res Notes* 2015; **8**: 214.
- [13] BUI LT, HURST A, IRISH EE, CHENG CL. The effects of sugars and ethylene on apospory and regeneration in *Ceratopteris richardii*. *Am J Plant Sci* 2012; **3**: 953.
- [14] BUI LT, PANDZIC D, YOUNGSTROM CE, WALLACE S, IRISH EE, SZÖVÉNYI P, CHENG CL. A fern *AINTEGUMENTA* gene mirrors *BABY BOOM* in promoting apogamy in *Ceratopteris richardii*. *Plant J* 2017; **90**: 122-132.

- [15] BUSHART TJ, CANNON AE, UL HAQUE A, SAN MIGUEL P, MOSTAJERAN K, CLARK GB, ..., ROUX SJ. RNA-seq analysis identifies potential modulators of gravity response in spores of *Ceratopteris* (Parkeriaceae): Evidence for modulation by calcium pumps and apyrase activity. *Am J Bot* 2013; **100**: 161-174.
- [16] BUSHART TJ, CLARK GB, PORTERFIELD DM, ROUX SJ. Testing the role of Ca²⁺-ATPases in the gravity-directed trans-cell current of calcium in single-celled spores of *Ceratopteris richardii*. *Gravit Space Biol Bull* 2010; **23**: 81-82.
- [17] BUSHART TJ, ROUX SJ. Conserved features of germination and polarized cell growth: A few insights from a pollen-fern spore comparison. *Ann Bot* 2007; **99**: 9-17.
- [18] CANNON AE, SALMI ML, CANTERO A, ROUX SJ. Generation of transgenic spores of the fern *Ceratopteris richardii* to analyze Ca²⁺ transport dynamics during gravity-directed polarization. In Fernández H ed. *Current Advances in Fern Research*. Springer, Cham, 2018; 285-303.
- [19] CARRLL EW, SCHWARZ OJ, HICKOK LG. Biochemical studies of paraquat-tolerant mutants of the fern *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol* 1988; **87**: 651-654.
- [20] CHASAN R. *Ceratopteris*: A model plant for the 90s. *Plant Cell* 1992; **2**: 113-115.
- [21] CHATTERJEE A, PORTERFIELD DM, SMITH PS, ROUX SJ. Gravity-directed calcium current in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Planta* 2000; **210**: 607-610.
- [22] CHERUIYOT DJ, SCHWARTZ BW. Conversion of male gametophytes to hermaphrodites in the fern *Ceratopteris richardii*. *Bios* 2007; **78**: 58-61.
- [23] CHRISTENHUSZ MJ, BYNG JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 2016; **261**: 201-217.
- [24] CONWAY SJ, DI STILIO VS. An ontogenetic framework for functional studies in the model fern *Ceratopteris richardii*. *Dev Biol* 2020; **457**: 20-29.
- [25] COOKE TJ, HICKOK LG, VANDERWOUDE WJ, BANKS JA, SCOTT RJ. Photobiological characterization of a spore germination mutant *dkgl* with reversed photoregulation in the fern *Ceratopteris richardii*. *Photochem Photobiol* 1993; **57**: 1032-1041.
- [26] COOKE TJ, RACUSEN RH, HICKOK LG, WARNE TR. The photocontrol of spore germination in the fern *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Physiol* 1987; **28**: 753-759.
- [27] CORDLE AR, BUI LT, IRISH EE, Cheng CL. Laboratory-induced apogamy and apospory in *Ceratopteris richardii*. In Fernández H, Kumar A, Revilla MA eds. *Working with ferns*. Springer, New York, 2011; 25-36.
- [28] CORDLE AR, IRISH EE, CHENG CL. Apogamy induction in *Ceratopteris richardii*. *Int J Plant Sci* 2007; **168**: 361-369.
- [29] DE YOUNG B, WEBER T, HASS B, BANKS JA. Generating autotetraploid sporophytes and their use in analysing mutations affecting gametophyte development in the fern *Ceratopteris*. *Genetics* 1997; **147**: 809-814.
- [30] EBERLE J, NEMACHECK J, WEN CK, HaASEBE M, BANKS JA. *Ceratopteris*: a model system for studying sex-determining mechanisms in plants. *Int J Plant Sci* 1995; **156**: 359-366.
- [31] EDWARDS ES, ROUX SJ. Influence of gravity and light on the developmental polarity of *Ceratopteris richardii* fern spores. *Planta* 1998; **205**: 553-560.
- [32] EDWARDS ES, ROUX SJ. Limited period of graviresponsiveness in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Planta* 1994; **195**: 150-152.
- [33] EECKHOUT S, LEROUX O, WILLATS WG, POPPER ZA, VIANE RL. Comparative glycan profiling of *Ceratopteris richardii* 'C-Fern' gametophytes and sporophytes links cell-wall composition to functional specialization. *Ann Bot* 2014; **114**: 1295-1307.
- [34] GANGER MT, GIROUARD JA, SMITH HM, BAHNY BA, EWING SJ. Antheridiogen and abscisic acid affect conversion and *ANII* expression in *Ceratopteris richardii* gametophytes. *Botany* 2015; **93**: 109-116.
- [35] GANGER MT, HILES R, HALLOWELL H, COOPER L, MCALLISTER N, YOUNGDAHL D, ..., EWING SJ. A soil bacterium alters sex determination and rhizoid development in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii*. *AoB PLANTS* 2019; **11**: 1-12.

- [36] GANGER M, STUREY T. Antheridiogen concentration and spore size predict gametophyte size in *Ceratopteris richardii*. *Botany* 2012; **90**: 175-179.
- [37] GOODNOE TT, HILL JP. Absolute and relative content of carbon and nitrogen differ by sex in *Ceratopteris richardii* gametophytes. *Botany* 2016; **94**: 405-410.
- [38] GOODNOE TT, HILL JP. Plasticity of female reproductive resource allocation depends on the presence or absence of prior environmental sex determination in *Ceratopteris richardii*. *Ecol Evol* 2018; **8**: 6133-6143.
- [39] GOODNOE TT, HILL JP, AHO K. Effects of variation in carbon, nitrogen, and phosphorus molarity and stoichiometry on sex determination in the fern *Ceratopteris richardii*. *Botany* 2016; **94**: 249-259.
- [40] GREGORICH M, FISHER R. Auxin regulates lateral meristem activation in developing gametophytes of *Ceratopteris richardii*. *Botany* 2006, **84**: 1520-1530.
- [41] HICKOK LG. Abscisic acid blocks antheridiogen-induced antheridium formation in gametophytes of the fern *Ceratopteris*. *Can J Bot* 1983; **61**: 888-892.
- [42] HICKOK LG. Abscisic acid resistant mutants in the fern *Ceratopteris*: characterization and genetic analysis. *Can J Bot* 1985; **63**: 1582-1585.
- [43] HICKOK LG, SCHWARZ OJ. An in vitro whole plant selection system: paraquat tolerant mutants in the fern *Ceratopteris*. *Theor Appl Genet* 1986; **72**: 302-306.
- [44] HICKOK LG, SCHWARZ OJ. Genetic characterization of a mutation that enhances paraquat tolerance in the fern *Ceratopteris richardii*. *Theor Appl Genet* 1989; **77**: 200-204.
- [45] HICKOK LG, WARNE TR, BAXTER SL, MELEAR CT. Education: Sex and the C-Fern: Not just another life cycle. *Bioscience* 1998; **48**: 1031-1037.
- [46] HICKOK LG, WARNE TR, FRIBOURG RS. The biology of the fern *Ceratopteris* and its use as a model system. *Int J Plant Sci* 1995; **156**: 332-345.
- [47] HICKOK LG, WARNE TR, SLOCUM MK. *Ceratopteris richardii*: applications for experimental plant biology. *Am J Bot* 1987; **74**: 1304-1316.
- [48] HICKOK LG, VOGELIEN DL, WARNE TR. Selection of a mutation conferring high NaCl tolerance to gametophytes of *Ceratopteris*. *Theor Appl Genet* 1991; **81**: 293-300.
- [49] HILL JP. Meristem development at the sporophyll pinna apex in *Ceratopteris richardii*. *Int J Plant Sci* 2002; **163**: 341-351.
- [50] HOU G, HILL JP. Developmental anatomy of the fifth shoot-borne root in young sporophytes of *Ceratopteris richardii*. *Planta* 2004; **219**: 212-220.
- [51] HOU G, HILL JP, BLANCAFLOR EB. Developmental anatomy and auxin response of lateral root formation in *Ceratopteris richardii*. *J Exp Bot* 2004; **55**: 685-693.
- [52] JOHNSON GP, RENZAGLIA KS. Embryology of *Ceratopteris richardii* (Pteridaceae, tribe Ceratopterideae), with emphasis on placental development. *J Plant Res* 2008; **121**: 581-592.
- [53] JUAREZ C, BANKS J. Sex determination in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 68-72.
- [54] KAMACHI H, IWASAWA O, HICKOK LG, NAKAYAMA M, NOGUCHI M, INOUE H. The effects of light on sex determination in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii*. *J Plant Res* 2007; **120**: 629-634.
- [55] KAMACHI H, MATSUNAGA E, NOGUCHI M, INOUE H. Novel mutant phenotypes of a dark-germinating mutant *dkg1* in the fern *Ceratopteris richardii*. *J Plant Res* 2004; **117**: 163-170.
- [56] KAMACHI H, TAMAOKI D, KARAHARA I. Plasma membrane-anchored chloroplasts are necessary for the gravisensing system of *Ceratopteris richardii* prothalli. *J Plant Res* 2017; **130**: 397-405.
- [57] KAŻMIERCZAK A. Determinacja płci u paproci jednokozarodnikowych. *Postępy biologii komórki* 2007; **34**: 103-122.
- [58] LEROUX O, EECKHOUT S, VIANE RL, POPPER ZA. *Ceratopteris richardii* (C-Fern): a model for investigating adaptive modification of vascular plant cell walls. *Front Plant Sci* 2013; **4**:367.
- [59] LLOYD R. Systematics of the genus *Ceratopteris* (Parkeriaceae). I. Sexual and vegetative reproduction in Hawaiian *Ceratopteris thalictroides*. *Am Fern J* 1973; **63**: 12-18.

- [60] LOPEZ RA, RENZAGLIA KS. Multiflagellated sperm cells of *Ceratopteris richardii* are bathed in arabinogalactan proteins throughout development. *Am J Bot* 2014; **101**: 2052-2061.
- [61] LOPEZ RA, RENZAGLIA KS. Arabinogalactan proteins and arabinan pectins abound in the specialized matrices surrounding female gametes of the fern *Ceratopteris richardii*. *Planta* 2016; **24**: 947-957.
- [62] LOPEZ RA, RENZAGLIA KS. The *Ceratopteris* (fern) developing motile gamete walls contain diverse polysaccharides, but not pectin. *Planta* 2018; **247**: 393-404.
- [63] LOPEZ-SMITH RA, RENZAGLIA KS. Sperm cell architecture, insemination, and fertilization in the model fern, *Ceratopteris richardii*. *Sex Plant Reprod* 2008; **21**: 153-167.
- [64] MARCHANT DB, SESSA EB, WOLF PG, HEO K, BARBAZUK WB, SOLTIS PS, SOLTIS DE. The c-fern (*Ceratopteris richardii*) genome: insights into plant genome evolution with the first partial homosporous fern genome assembly. *Sci Rep* 2019; **9**: 1-14.
- [65] MCADAM SA, BRODRIBB TJ, BANKS JA, HEDRICH R, ATALLAH NM, CAI C, ..., GEIGER D. Abscisic acid controlled sex before transpiration in vascular plants. *PNAS* 2016; **113**: 12862-12867.
- [66] MURATA T, KADOTA A, WADA M. Effects of blue light on cell elongation and microtubule orientation in dark-grown gametophytes of *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Physiol* 1997; **38**: 201-209.
- [67] MURATA T, SUGAI M. Photoregulation of asymmetric cell division followed by rhizoid development in the fern *Ceratopteris* prothalli. *Plant Cell Physiol* 2000; **41**: 1313-1320.
- [68] NAKAZATO T, JUNG MK, HOUSWORTH EA, RIESEBERG LH, GASTONY GJ. Genetic map-based analysis of genome structure in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Genetics* 2006; **173**: 1585-1597.
- [69] NAKAZATO T, JUNG MK, HOUSWORTH EA, RIESEBERG LH, GASTONY GJ. A genome wide study of reproductive barriers between allopatric populations of a homosporous fern, *Ceratopteris richardii*. *Genetics* 2007; **177**: 1141-1150.
- [70] PLACKETT AR, CONWAY SJ, HAZELTON KDH, RABBINOWITSCH EH, LANGDALE JA, DI STILIO VS. *LEAFY* maintains apical stem cell activity during shoot development in the fern *Ceratopteris richardii*. *eLife* 2018; **7**: e39625.
- [71] PLACKETT AR, DI STILIO VS, LANGDALE JA. Ferns: the missing link in shoot evolution and development. *Front Plant Sci* 2015; **6**: 972.
- [72] PLACKETT AR, HUANG L, SANDERS HL, LANGDALE JA. High-efficiency stable transformation of the model fern species *Ceratopteris richardii* via microparticle bombardment. *Plant Physiol* 2014; **165**: 3-14.
- [73] ROUX SJ, CHATTERJEE A, HILLIER S, CANNON T. Early development of fern gametophytes in microgravity. *Adv Space Res* 2003; **31**: 215-220.
- [74] RUTHERFORD G, TANURDZIC M, HASEBE M, BANKS JA. A systemic gene silencing method suitable for high throughput, reverse genetic analyses of gene function in fern gametophytes. *BMC Plant Biol* 2004; **4**: 6.
- [75] RUTTER M, RAGHAVAN V. DNA synthesis and cell division during spore germination in *Lygodium japonicum*. *Ann Bot* 1978; **42**: 957-965.
- [76] SALMI ML, BUSHART T, ROUX SJ. Cellular, molecular, and genetic changes during the development of *Ceratopteris richardii* gametophytes. In Fernández H, Kumar A, Revilla MA eds. *Working with ferns*. Springer, New York, 2011; 11-24.
- [77] SCHNELLER J. Antheridiogens. In Ranker T and Haufler C eds. *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press, 2008; 134-158.
- [78] SCHUETTPELZ E, PRYER KM. Evidence for a Cenozoic radiation of ferns in an angiosperm-dominated canopy. *PNAS* 2009; **106**: 11200-11205.
- [79] SCOTT RJ, HICKOK LG. Inheritance and characterization of a dark-germinating, light-inhibited mutant in the fern *Ceratopteris richardii*. *Can J Bot* 1991; **69**: 2616-2619.
- [80] SESSA EB, BANKS JA, BARKER MS, DER JP, DUFFY AM, GRAHAM SW, ..., PRYER KM. Between two fern genomes. *GigaScience* 2014; **3**: 2047-217X.

- [81] SPIRO MD, TORABI B, CORNELL CN. Cytokinins induce photomorphogenic development in dark-grown gametophytes of *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 1252-1260.
- [82] STILTS CE, FISHER R. Synthesis of plant auxin derivatives and their effects on *Ceratopteris richardii*. *J Chem Educ* 2007; **84**: 999.
- [83] STOUT SC, CLARK GB, ARCHER-EVANS S, ROUX SJ. Rapid and efficient suppression of gene expression in a single-cell model system, *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol* 2003; **131**: 1165-1168.
- [84] STRAIN E, HASS B, BANKS JA. Characterization of mutations that feminize gametophytes of the fern *Ceratopteris*. *Genetics* 2001; **159**: 1271-1281.
- [85] SUSSMILCH FC, ATALLAH NM, BRODRIBB TJ, BANKS JA, MCADAM SA. Abscisic acid (ABA) and key proteins in its perception and signaling pathways are ancient, but their roles have changed through time. *Plant Signal Behav* 2017; **12**: e1365210.
- [86] TANURDZIC M, BANKS JA. Sex-determining mechanisms in land plants. *Plant Cell* 2004; **16**: 61-71.
- [87] UL HAQUE A, ROKKAM M, DE CARLO AR, WERELEY ST, ROUX SJ, IRAZOQUI PP, PORTERFIELD DM. A MEMS fabricated cell electrophysiology biochip for in silico calcium measurements. *Sens Actuators B Chem* 2007; **123**: 391-399.
- [88] VASCO A, MORAN RC, AMBROSE BA. The evolution, morphology, and development of fern leaves. *Front Plant Sci* 2013; **4**: 345.
- [89] VAUGHN KC, HICKOK LG, WARNE TR, FARROW AC. Structural analysis and inheritance of a clumped chloroplast mutant in the fern *Ceratopteris*. *J Hered* 1990; **81**: 146-151.
- [90] VOGELIEN DL, HICKOK LG, AUGER RM, STODOLA AJW, HENDRIX D. Solute analysis and water relations of gametophyte mutants tolerant to NaCl in the fern *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Environ* 1993; **16**: 959-966.
- [91] WARNE TR, HICKOK LG. Single gene mutants tolerant to NaCl in the fern *Ceratopteris*: characterization and genetic analysis. *Plant Sci* 1987; **52**: 49-55.
- [92] WARNE TR, HICKOK LG. Evidence for a gibberellin biosynthetic origin of *Ceratopteris* antheridiogen. *Plant Physiol* 1989; **89**: 535-538.
- [93] WARNE TR, HICKOK LG. Control of sexual development in gametophytes of *Ceratopteris richardii*: antheridiogen and abscisic acid. *Bot Gaz* 1991; **152**: 148-153.
- [94] WARNE TR, HICKOK LG, KINRAIDE TB, VOGELIEN DL. High salinity tolerance in the *stl2* mutation of *Ceratopteris richardii* is associated with enhanced K⁺ influx and loss. *Plant Cell Environ* 1996; **19**: 24-32.
- [95] WEN CK, SMITH R, BANKS JA. ANI1: A sex pheromone-induced gene in *Ceratopteris* gametophytes and its possible role in sex determination. *Plant Cell* 1999; **11**: 1307-1317.
- [96] WRIGHT SR, HICKOK LG, WARNE TR. Characterization of mutants of *Ceratopteris richardii* selected on aluminum (Al₂(SO₄)₃-Na₂EDTA). *Plant Sci* 1990; **68**: 257-262.
- [97] YOUNGSTROM CE, GEADELMANN LF, IRISH EE, CHENG CL. A fern *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* gene functions in both gametophyte and sporophyte generations. *BMC Plant Biol* 2019; **19**: 416.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 19.03.20

Przyjęto: 17.04.20

Mateusz Bartz

ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

e-mail: mateusz.bartz@uwr.edu.pl

tel.: +48 71 375 4095; fax: +48 71 375 4118

INTERLEUKINA 13 JAKO IMMUNOMODULATOR W RÓŻNYCH STANACH CHOROBYCH

INTERLEUKIN 13 AS AN IMMUNOMODULATOR IN VARIOUS DISEASES

Beata SZYMAŃSKA¹, Anna CHRZĄSTEK^{1,2}, Agnieszka PIWOWAR¹

¹Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

²Studenckie Naukowe Koło Toksykologiczne, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie: IL-13 jest cytokiną pleiotropową o działaniu przeciwzapalnym i immunoregulacyjnym. Potwierdzono jej udział w różnych stanach chorobowych takich jak: infekcje pasożytnicze, astma, atopia, zespół nerczycowy, choroby przewodu pokarmowego, zapalenia stawów. Coraz więcej dowodów naukowych przemawia za tym, iż przewlekły stan zapalny może również odgrywać kluczową rolę w patogenezie i rozwoju chorób nowotworowych. Dane z piśmiennictwa wskazują na jej rolę w patogenezie takich nowotworów jak: rak piersi, jajnika, trzustki, jelita grubego, głowy i szyi, pęcherza moczowego czy chłoniak ziarniczny. Celem niniejszego przeglądu była analiza danych z piśmiennictwa dotyczących znaczenia IL-13 jako immunomodulatora przeciwzapalnego w różnych stanach chorobowych, z uwzględnieniem chorób nowotworowych, oraz potencjalnych mechanizmów jej działania. Wyniki niektórych badań wskazują na sprzeczną rolę IL-13 w promowaniu i zwalczaniu progresji procesu nowotworowego. Istotnym jest jej udział w ucieczce komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego gospodarza. Badania nad rolą IL-13, zwłaszcza pro- lub antynowotworową stanowią istotny aspekt prognostyczny i/lub diagnostyczny. Rozważane jest także zastosowanie inhibitorów IL-13 w celowanej immunoterapii.

Słowa kluczowe: interleukina 13, immunomodulator, stan zapalny, nowotwory

Summary: IL-13 is a pleiotropic cytokine with anti-inflammatory and immunoregulatory activity. It has been confirmed to participate in various diseases such as: parasitic infections, asthma, atopy, nephrotic syndrome, gastrointestinal tract diseases, arthritis. There is growing scientific evidence that chronic inflammation can also play a key role in the pathogenesis and development of cancer. Data from the literature indicates its role in the pathogenesis of such cancers as: breast, ovarian, pancreatic, colorectal, head and neck, bladder and Hodgkin lymphoma cancers. The purpose of this review was to analyze literature data on the importance of IL-13 as an anti-inflammatory immunomodulator

in various diseases, including cancer, and its potential mechanisms of action. The results of some studies indicate a contradictory role of IL-13 in promoting and fighting the progression of cancer. Its participation in the escape of cancer cells from the host's immune surveillance is important. Studies on the role of IL-13, especially pro- or anti-cancer, are an important prognostic and / or diagnostic aspect. The use of IL-13 inhibitors in targeted immunotherapy is also being considered.

Keywords: interleukin 13, immunomodulation, inflammation, cancers

WSTĘP

Cytokiny są cząsteczkami, które pełnią funkcję regulatorową wielu procesów fizjologicznych oraz służą jako mediatory reakcji obronnych organizmu. Biorą udział we wzroście, różnicowaniu, migracji oraz apoptozie komórek. Cytokiny jako immunomodulatory mogą znacząco wpływać na rozwój stanów chorobowych, w tym również karcynogenezy. Regulują one proliferację komórek nowotworowych, naciekanie guzów przez leukocyty, pobudzają tworzenie naczyń krwionośnych, uczestniczą w przebudowaniu macierzy pozakomórkowej oraz tworzeniu przerzutów odległych [10, 27, 47].

Pomiar stężenia niektórych z nich w różnych płynach ustrojowych pomocny jest w diagnozowaniu i monitorowaniu przebiegu procesu chorobowego. Przykładowo, z badań własnych wynika, iż pomiar stężenia IL-8 i IL-18 w moczu może być przydatny w diagnozowaniu raka pęcherza moczowego [48]. Wykazano, że pomiar IL-6 w płynie mózgowo-rdzeniowym może być przydatnym wskaźnikiem w diagnostyce bakteryjnych zapaleń opon i mózgu u dorosłych oraz ocenie nasilenia stanu zapalnego, a pośrednio stanu klinicznego chorego [39]. Pomiar surowiczej IL-16 znalazł zastosowanie w diagnostyce schorzeń dermatologicznych [58]. IL-17 i IL-23 uznano jako wskaźnik dynamiki przebiegu chorób autoimmunizacyjnych tarczycy, a IL-33 odgrywa rolę w patofizjologii zaburzeń układu sercowo-naczyniowego [13, 34]. Interleukinę 6 i 10, oraz TNF- α (czynnik martwicy nowotworu α) uznano za przydatne markery w nieinwazyjnej diagnostyce i ocenie aktywności procesu zapalnego u chorych z nieswoistym zapaleniem jelit [12].

Znacząca większość przebadanych interleukin (np. IL-6, IL-12, IL-8 czy IL-18) ma charakter prozapalny, a ich udział w przebiegu różnych chorób jest podkreślany [42]. Mniej informacji dotyczy interleukin o przeciwnym, czyli przeciwzapalnym działaniu. W ostatnich latach duże zainteresowanie skierowano na IL-13. Dane wskazują na jej rolę w patogenezie chorób nowotworowych takich jak: rak pęcherza moczowego, piersi, jajnika, trzustki, jelita grubego, nowotwory głowy i szyi, chłoniaka ziarniczego [22, 35, 46, 56, 59, 62]. Ponadto wskazuje się jej udział w innych stanach chorobowych takich jak: infekcje pasożytnicze, alergie, astma, atopowe zapalenie skóry, zespół nerczycowy, choroby przewodu po-

karmowego, zapalenia stawów [16, 22, 67, 69]. Celem niniejszego przeglądu było przeniechanalizowanie danych z piśmiennictwa dotyczących znaczenia interleukiny 13 jako immunomodulatora przeciwzapalnego w różnych stanach chorobowych oraz potencjalnych mechanizmów jej działania.

BUDOWA I FUNKCJE INTERLEUKINY 13

W 1989 roku po raz pierwszy opisano IL-13 jako białko P600 pochodzące z aktywowanych mysich limfocytów pomocniczych typu 2 (Th2). Miejscem syntezy IL-13 oprócz Th2 są również limfocyty B, komórki tuczne, bazofole, komórki NK, komórki dendrytyczne oraz naturalne komórki limfoidalne typu 2 (ILC2) [44, 77].

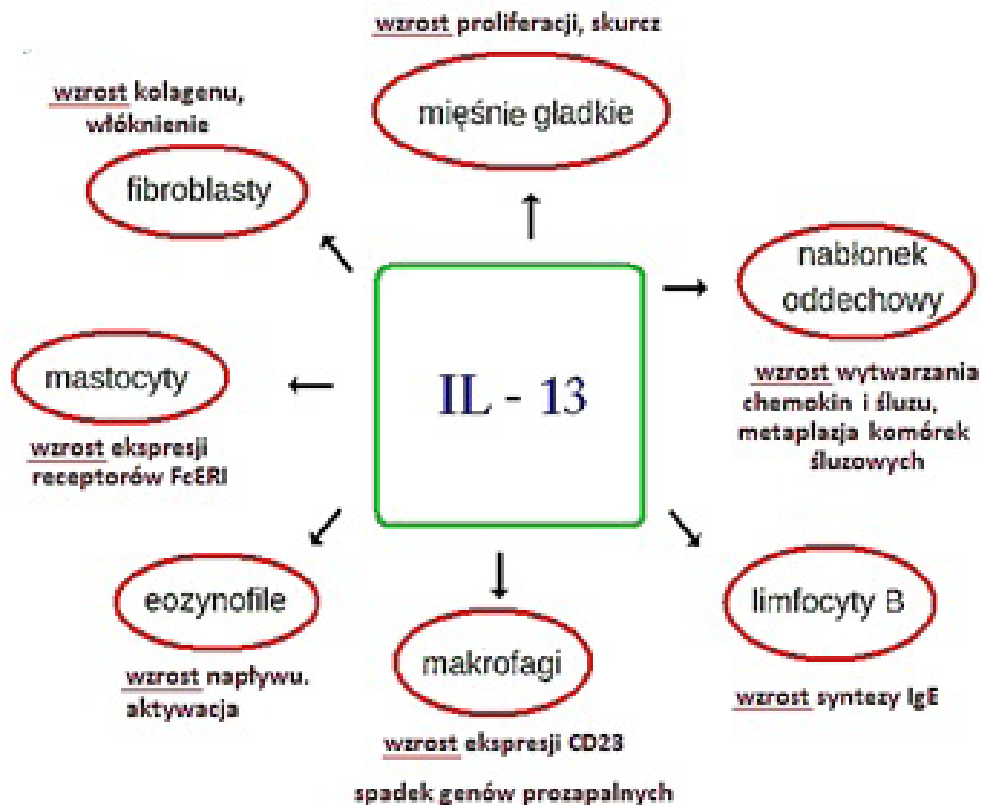
IL-13 jest białkiem o strukturze trzeciorzędowej, którego łańcuch polipeptydowy składa się ze 132 aminokwasów, w tym 20 aminokwasów sekwencji sygnałowej, a jej rdzeń stanowią cztery łańcuchy mające postać α -helisy [55]. IL-13 wykazuje 25% homologię z IL-4, a największe podobieństwo występuje w pierwszym i ostatnim regionie α -helikalnym, który jest kluczowy dla aktywności IL-4. W przeciwieństwie do IL-4, IL-13 zawiera tylko 2 mostki dwusiarczkowe zamiast 3. Gen kodujący IL-13 złożony jest z 3 intronów oraz 4 egzonów i znajduje się w pobliżu genu IL-4 na długim ramieniu chromosomu 5 w regionie 31. W tym regionie chromosomalnym znajdują się również geny kodujące IL-3, IL-5, IL-9 i GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów). Duże podobieństwo funkcji, transdukcji sygnału, struktury genu, a także lokalizacji genów IL-13 i IL-4 sugerują, iż mogły one powstać w wyniku duplikacji genu [31, 51, 72, 73].

Mimo wielu podobieństw istnieją również znaczne różnice między omawianymi interleukinami (IL-13 i IL-4). Jedną z nich jest swoistość gatunkowa obu cytokin. Ludzka IL-13 wykazuje silniejsze działanie wobec komórek ludzkich, a więc jest gatunkowo bardziej selektywna niż mysia IL-13, która w jednakowy sposób reaguje z komórkami ludzkimi i mysimi [72].

Działanie przeciwzapalne IL-13 wiąże się z hamowaniem wytwarzanych przez makrofagi i monocyty prostaglandyn, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , czynnika jądrowego (NF- κ B) oraz reaktywnych form tlenu. IL-13 posiada zdolność bezpośredniego oddziaływania na eozynofile aktywując je, wpływając na wydłużenie okresu ich przeżycia, a także nasilenie ich napływu do miejsc zapalnych. Udowodniono, że IL-13 może indukować przekształcanie fibroblastów w miofibroblasty, a także wzmacniać ekspresję aktyny oraz aktywność mitotyczną komórek mięśni gładkich układu oddechowego. IL-13 odgrywa ważną rolę w procesie adhezji poprzez nasilenie ekspresji niektórych integryn w monocytach i makrofagach (CD11b, CD11c, CD18, CD29). Zwiększa proliferację i skurcze komórek mięśni gładkich *in vitro* i indukuje syntezę kolagenu typu I w ludzkich fibrobla-

stach skóry. Oddziaływając na ludzkie limfocyty B prowadzi do ich namnażania oraz indukcji przełączania izotypów IgG4 i IgE oraz ekspresji antygenów powierzchniowych, m.in. receptora FcεRII (inaczej CD23, receptor o niskim powinowactwie do immunoglobuliny IgE) oraz cząsteczki MHC klasy II (antygeny zgodności tkankowej) [28, 31]. Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie główne wskazywane aspekty działania IL-13.

Badania nad IL-13 pokazują, iż odgrywa ona rolę na wielu poziomach regulacji immunologicznej [17, 70, 71]. Udział IL-13 ma kluczowe znaczenie w przebiegu ścieżki immunoregulacyjnej, w której komórki NKT (ang. *Natural Killer T-cells*) tłumią nadzór immunologiczny komórek guza. Komórki NKT są stymulowane przez komórki guza do wydzielania IL-13, aby hamować cytotoksyczne limfocyty T (CTL) przeciwko komórkom nowotworowym [71]. Unieczynnienie limfocytów NKT skutkujące zmniejszoną syntezą IL-13, a bezpośrednie zahamowanie działania IL-13 może stanowić obronę przed wznową nowotworu. W związku z tym



RYCINA 1. Schemat działania IL-13

RYCINA 1. IL-13 action diagram

zastosowanie inhibitorów IL-13 i/lub receptorów tej interleukiny może okazać się użytecznym narzędziem w immunoterapii chorób nowotworowych, co stanowi interesujący aspekt przyszłych badań [73].

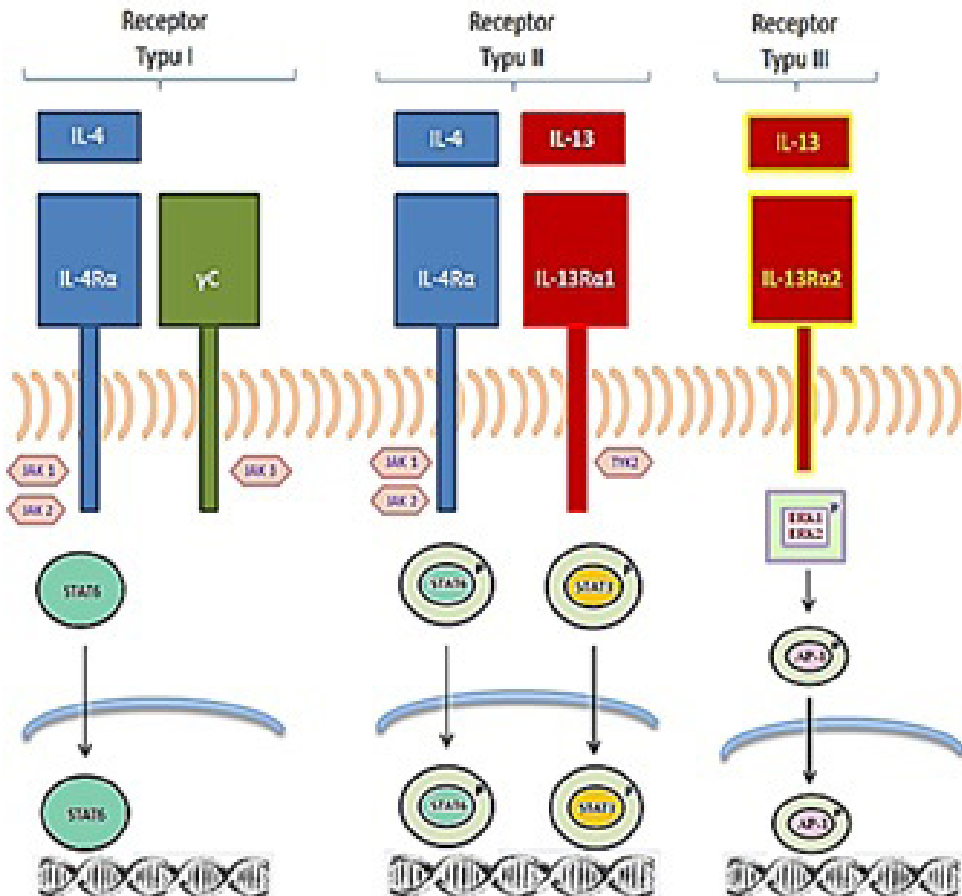
RECEPTORY ORAZ SZLAKI SYGNALIZACYJNE INTERLEUKINY 13

IL-13 i IL-4 mogą oddziaływać na komórki efektorowe poprzez dwa typy kompleksów receptorowych o różnych konfiguracjach. Zarówno I jak i II typ receptorów posiada w swej strukturze podjednostkę (łańcuch) IL-4R α [50]. Receptor typu I zbudowany jest z podjednostki IL-4R α skompleksowanej z łańcuchem γ C, który ulega ekspresji na powierzchni komórek krwiotwórczych. Kompleks receptora typu II składa się z podjednostki IL-4R α , skompleksowanej z łańcuchem IL-13R α 1 i znajduje się na wielu komórkach innych niż hematopoetyczne, takich jak komórki nabłonka oskrzeli, komórki mięśni gładkich, fibroblasty i keratynocyty [1].

IL-13 wiąże się z niskim powinowactwem do łańcucha IL-13 α 1 ($K_d \sim 2$ -10 nM), ale przez skompleksowanie z podjednostką IL-4R α powstaje receptor (typu II), wiążący IL-13 z wysokim powinowactwem ($K_d \sim 300$ -400 pM). Sygnalizacja IL-4 odbywa się zarówno przez kompleksy receptorowe typu I, jak i typu II, podczas gdy IL-13 sygnalizuje tylko przez kompleks typu II [68].

Rycina 2 przedstawia schematyczną budowę receptorów i szlaki sygnalizacyjne interleukin IL-13 i IL-4.

Wszystkie podjednostki (łańcuchy) IL-4R α , γ C i IL-13R α 1 zawierają regiony bogate w prolinę, dzięki czemu mogą wiązać kinazy janusowe JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2. W komórkach krwiotwórczych związanych z ekspresją łańcucha γ C, następuje aktywacja JAK3, natomiast wiązanie IL-4 z receptorem typu I powoduje aktywację JAK1, JAK2 i JAK3 [5, 8, 31]. Wiązanie IL-4 i IL-13 z receptorem typu II aktywuje JAK1, JAK2 i TYK2. Aktywacja JAK powoduje fosforylację cytoplazmatycznych tyrozyn, prowadząc do rekrutacji STAT6 (ang. *signal transducer and activator of transcription 6*) do receptora, a następnie jego fosforylacji i aktywacji. Aktywacja STAT6 jest dominującym szlakiem sygnalizacyjnym w odpowiedzi na oddziaływanie IL-4 lub IL-13 z receptorem. Chociaż aktywacja STAT6 w odpowiedzi na IL-13 i IL-4 została dobrze udokumentowana, mechanizmy molekularne odpowiedzialne za zakończenie sygnalizacji JAK/STAT pozostają słabo poznane. Aktywowane dimery STAT6 przemieszczają się do jądra, wiążą specyficzne kanoniczne elementy DNA i inicjują transkrypcję dalszych genów [7, 38, 75]. Udowodniono, że IL-13 może także aktywować szlak STAT3. Domena cytoplazmatyczna podjednostki (łańcucha) IL-13R α 1 zawiera dwie reszty tyrozynowe, które mogą służyć jako miejsca rekrutacji dla STAT3. Alternatywnie, STAT3 może być aktywowany przez IL-13 za pośrednictwem IL-13R α 2 [57, 60, 74].



RYCINA 2. Schemat budowy receptorów i szlaków sygnalizacyjnych IL-13 i IL-4 [50]

FIGURE 2. Diagram of the structure of IL-13 and IL-4 receptors and signaling pathways [50]

IL-13 wiąże się również z receptorem IL-13Ra2 ze stosunkowo wysokim powinowactwem ($K_d \sim 50\text{-}500 \text{ pM}$), którego funkcje są jednak w dużej mierze nieznanne. Receptor IL-13Ra2 występuje w dwóch postaciach, pierwsza rozpuszczalna, powstaje w wyniku alternatywnego splicingu (cięcia i składania pierwotnego transkryptu) nie ma zdolności sygnalizacyjnej i nazywany jest receptorem wabikiem, podczas gdy druga większa forma obejmująca błonę, powoduje aktywację dalszych efektorów. W pewnych okolicznościach sygnalizacja IL-13 poprzez IL-13Ra2 powoduje fosforylację ERK1/2 (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) w sposób niezależny od STAT6 i tworzenie dimerycznego czynnika transkrypcyjnego AP-1 (ang. *activator protein 1*). Ufosforylowany AP-1

przemieszcza się do jądra i wiąże się z określonymi elementami DNA. Indukcja AP-1 może również aktywować inne czynniki, w tym czynnika wzrostu beta 1 (TGF- β 1) w makrofagach [70]. W innym badaniu ustalono, że IL-13R α 2 może tworzyć heterodimeryczny kompleks z członkiem rodziny białek podobnych do chitynazy, Chi3-11 (ang. *Chitinase 3-like 1*) i wykorzystywać ten kompleks do indukowania syntezy produkcji TGF- β 1 [30].

UDZIAŁ IL-13 W PROCESACH NOWOTWOROWYCH

Interleukina-13 odgrywa istotną rolę w procesie nowotworzenia poprzez wpływ na nadzór immunologiczny guza. Pierwotnie opisano ją jako cytokinę pochodzącą z limfocytów T, która hamuje wytwarzanie cytokin zapalnych, wydzielaną z komórek odpornościowych. Chociaż opis ten jest ciągle aktualny, wiedza na temat funkcji IL-13 rozwinęła się znacząco w ciągu ostatnich kilku lat. IL-13 może przyczyniać się zarówno do wzrostu nowotworu, hamowania jego apoptozy oraz może wpływać na zdolność tworzenia przerzutów [2, 19].

RAK SUTKA

Srabovic i wsp. [65] zbadali poziom ekspresji interleukiny 13 w pierwotnej tkance nowotworowej raka sutka w odniesieniu do niezmienionej tkanki piersi u tych samych pacjentek i do tkanki od pacjentek z łagodną nienowotworową zmianą sutka wykorzystując metodę immunohistochemiczną. IL-13 była obecna w tkance nowotworowej oraz w otaczającej niezmienionej chorobowo tkance u tych samych pacjentek oraz w tkance u pacjentek z łagodną zmianą sutka. Ponadto ekspresja IL-13 była istotnie wyższa w komórkach nowotworowych raka sutka w porównaniu z tkanką analizowaną u pacjentek z łagodnymi zmianami chorobowymi tego narządu. Wystąpiła korelacja między ekspresją IL-13 a wielkością guza u pacjentek z rakiem sutka z niezajętymi węzłami chłonnych. Uzyskane wyniki zasugerowały możliwy udział IL-13 w karcynogenezie.

Podobne badania przeprowadzili Kwon i wsp. [43], którzy dla oceny wartości prognostycznej w inwazyjnym raku sutka, zbadali ekspresję receptora IL-13R α 2. Aktywność receptora zaobserwowano w 11% próbek i stwierdzono zależność z receptorami dla estrogenów i progesteronu. Nie stwierdzono istotnego związku między ekspresją receptora IL-13R α 2 a innymi zmianami kliniczno-patologicznymi jak wielkość guza, przerzuty do węzłów chłonnych, typy histologiczne, stopień histologiczny, HER2 status (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*), wskaźnik znakowania Ki-67 (marker komórkowej proliferacji) czy poziomy limfocytów naciekających nowotwór, czy też wiekiem pacjentek. Pacjentki z nasiloną ekspresją IL-13R α 2 wykazywały gorsze rokowanie w porównaniu do zdrowych kobiet.

W innym badaniu, związanym z rakiem sutka mierzono obecność krążących komórek nowotworowych (ang. *circulating tumor cells*, CTC), które w wypadku tego typu raka są wskaźnikiem rokowania przebiegu choroby przed rozpoczęciem leczenia ogólnoustrojowego. Badanie uzupełniono o pomiar panelu cytokin: IL-5, IL-6, IL-8, IL-4 i IL-13. U pacjentek z ujemnym wynikiem CTC oraz z brakiem ekspresji receptora progesteronu, ekspresja IL-8 i IL-13 była zwiększona. Wzrost IL-13 wykryto w stadium o wysokiej złośliwości raka i z brakiem ekspresji receptora progesteronu. Ze względu na ten fakt, autorzy zasugerowali że wysoka ekspresja IL-13 związana jest z gorszym rokowaniem i za możliwość wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych [40].

RAK PŁUC

Dla oceny znaczenia prognostycznego IL-13 w niedrobnokomórkowym raku płuc (ang. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) Xie i wsp. [78] zbadali ekspresję receptora IL-13R α 2 (immunohistochemicznie) w tkankach nowotworowych. Zaobserwowali znaczne nasilenie ekspresji w zmienionych chorobowo tkankach oraz jej brak w tkankach zdrowych. Analizowali także zależności między ekspresją IL-13R α 2 a parametrami kliniczno-patologicznymi choroby. Zwiększona ekspresja IL-13R α 2 była częściej wykrywana w gruczolakoraku płuc niż w innych typach histologicznych NSCLC oraz korelowała ze słabym zróżnicowaniem guza, zmianami w węzłach chłonnych i stadium złośliwości.

NOWOTWORY PRZEWODU POKARMOWEGO

Formentini i wsp. [20] badali czy IL-13 wywiera autokryny wpływ stymulujący na wzrost ludzkiego raka trzustki i czy jej ekspresja koreluje ze skłonnością do przerzutów do węzłów chłonnych. Badania przeprowadzone na liniach ludzkiego raka trzustki (linie komórkowe: ASPC-1, CAPAN-1, MIA PaCa-2, PANC-1, COLO-357 i T3M4). IL-13 wzmagała wzrost komórek ASPC-1, CAPAN-1 i COLO-357. Było to związane z nasiloną fosforylacją kinazy białkowej aktywowanej mitogenem p44/42 (MAPK). Aktywność 3-kinazy fosfotydyloinozytoli (PI3Ks) była również indukowana w komórkach MIA PaCa-2, PANC-1 i T3M4 nieodpowiadających na IL-13. Wszystkie komórki ekspymowały i wydzielały IL-13. Dodatkowo w badaniach klinicznych prowadzonych u chorych z gruczolakorakiem przewodowym trzustki, analiza immunohistochemiczna wyciętych pierwotnych próbek gruczolakoraka ujawniła wysoki poziom IL-13 w 30 z 70 badanych próbek i jego receptora transbłonowego (IL-4R) odpowiednio w 28 z 70 analizowanych wycinków raka. 94% badanych chorych, wykazujących wysoką koekspresję IL-13 i IL-4R miało przerzuty do węzłów chłonnych. Autorzy wnioskowali, że endogenna ekspresja IL-13 w komórkach nowotworowych promuje przerzuty do węzłów chłonnych.

Gabitass i wsp. [26] przeprowadzili kompleksową analizę krążących komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego (ang. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) i komórek regulatorowych T (Treg) u pacjentów z rakiem trzustki, przełyku i żołądka oraz zbadali, czy MDSC są niezależnym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia pacjentów. Ocenili również panel cytokin w osoczu, a w szczególności IL-13. MDSC i Treg były podwyższone w raku trzustki, przełyku i żołądka w porównaniu z grupą kontrolną, a liczba MDSC korelowała z poziomami Treg. Zwiększenie odsetka MDSC wiązało się ze zwiększonym ryzykiem zgonu, a w analizie wieloczynnikowej poziom MDSC był niezależnym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia chorych. We wszystkich trzech typach raka stwierdzono znaczący wzrost IL-13 w osoczu chorych, który korelował z poziomami MDSC.

CHŁONIAK ZIARNICZY

Dobrze poznany jest udział IL-13 we wzroście chłoniaka ziarniczego (ang. *Hodgkin's lymphom*, HL). W chorobie tej komórki nowotworowe RS (ang. *Reed-Sternberg*) stanowią niewielką część masy guza (0,1-1%), a większość pozostałego zrębu tkankowego guza składa się z naciekających reaktywnych komórek, w tym komórek Th2. Koekspresja IL-13 i jej receptora IL-13R α 1 występuje w komórkach RS. IL-13 pośredniczy w autokrynnej stymulacji proliferacji komórek chłoniaka ziarniczego i hamowaniu ich śmierci. STAT6 jest fosforylowany po aktywacji IL-4R i IL-13R odpowiednio przez IL-4 i IL-13, co jest ważnym czynnikiem wzrostu komórek HL. Wykazano, że neutralizujące przeciwciała przeciwko IL-13, IL-4 i ich receptorom – IL-13R α 1 i IL-4R α lub siRNA (ang. *small interfering RNA*) przeciwko STAT6 zmniejszają proliferację i indukują śmierć komórki poprzez hamowanie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-xL (ang. *B-cell lymphoma-extra large*) *in vitro* [63].

Skinnider i wsp. [62] aby określić ekspresję IL-13 u pacjentów z chłoniakiem ziarnicznym, skrawki tkanek od pacjentów z klasycznym HL, z guzkową przewagą limfocytów HL (NLPHL) i z chłoniakiem niezziarnicznym (NHL) poddali hybrydyzacji *in situ*. U 86% pacjentów z klasycznym HL, 25% do prawie 100% komórek Hodgkina i Reeda Sternberga (HRS) wykazało ekspresję IL-13. Przeciwnie, w żadnym przypadku NLPHL i tylko w 17% przypadków NHL ujawniono ekspresję IL-13 w komórkach nowotworowych. Stwierdzono także dodatnią ekspresję receptora IL-13R α 1 w 89% przypadków klasycznego HL. Dane te wskazują, że ekspresja IL-13 i IL-13R α 1 jest wspólną cechą komórek HRS w HL, zgodną z hipotezą, że IL-13 może odgrywać rolę we wzroście autokrynnym w klasycznym HL.

Natomiast Gaiolla i wsp. [26] mierząc stężenia IL-6, IL-10 i IL-13 w surowicy przed i po leczeniu HL oraz określając ich potencjalny związek z parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi zaobserwowali, iż poziom IL-13 w surowicy był

niewykrywalny u obydwu grupach pacjentów (przed i po leczeniu) oraz w grupie kontrolnej. Podobnie Fiumara i wsp. [18] dokonali pomiaru stężenia IL-13 w surowicy chorych ze zdiagnozowanym HL. Spośród przebadanych pacjentów 70% pod względem histologicznym miało postać stwardnienia guzkowego, a 36% chorych było w stadium III lub IV choroby. Tylko w 10% badanych próbek surowicy poziom IL-13 był wykrywalny. Jedynie 3 pacjentów z najwyższymi poziomami IL-13 miało postać stwardnienia guzkowego, 2 miało HD stopnia IIA, a jedna miała HD stopnia IIB. Poziomy IL-13 nie korelowały z płcią, stadium choroby, podtypem histologicznym, inwazyjnością choroby czy obecnością przerzutów pozawęzłowych. Spośród pacjentów, u których stwierdzono podwyższony poziom IL-13, tylko u jednego pacjenta zaobserwowano progresję choroby, 4 miesiące po zakończeniu leczenia w stadium IIB. 2 z 12 pacjentów z dominującymi limfocytami HD miało podwyższony poziom IL-13 w surowicy. Źródło IL-13 u 2 pacjentów z przewagą limfocytów HD nie zostało zidentyfikowane, chociaż możliwość wytwarzania IL-13 przez komórki złośliwe nie można wykluczyć.

RAK JELITA GRUBEGO

Kornmann i wsp. [41] badając (immunohistochemicznie) ekspresję białek IL-4, IL-13, IL-4R i IL-13R w tkankach pochodzących od chorych z pierwotnym rakiem jelita grubego w stadium I-III zaobserwowali, iż w komórkach nowotworowych wysoka immunoreaktywność IL-4, IL-13, IL-4R i IL-13R występowała u 33%, 50%, 36% i odpowiednio 42% przebadanych wycinkach. Pacjenci z wysoką ekspresją IL-4, IL-4R i IL-13R charakteryzowali się niższą częstością przerzutów do węzłów chłonnych. Wysoka immunoreaktywność IL-13 była związana z lepszym rokowaniem i wydłużonym czasem przeżycia chorych. Ekspresja IL-4, IL-4R lub IL-13R nie wpływała na przeżywalność pacjentów. Autorzy zasugerowali, że ekspresja IL-4, IL-4R i IL-13R jest związana z procesem lokalnych przerzutów w raku jelita grubego, podczas gdy ekspresja IL-13 ma wpływ na przeżycie chorych.

Barderas i wsp. [3] przeprowadzali badania na słabo i wysoko przerzutowych komórkach ludzkiego raka okrężnicy z wykorzystaniem linii komórkowych KM12C i KM12SM. W porównaniu ze słabo przerzutowymi komórkami nowotworowymi (KM12C), komórki wysoce przerzutowe (KM12SM) wykazały zwiększoną ekspresję cytokin immunosupresyjnych – interleukin: IL-13 i IL-4, oprócz zwiększonej ekspresji powierzchniowej IL-13R α 2 o wysokim powinowactwie receptora IL-13, co sugeruje, że IL-13R α 2 pośredniczy w działaniu IL-13 w komórkach raka okrężnicy. Wyciszenie IL-13R α 2 w wysoce przerzutowych komórkach doprowadziło do zmniejszenia zdolności adhezyjnej, ujawniając rolę tego receptora w adhezji komórkowej, migracji, inwazji i kolonizacji przerzutów. Na poparcie tej obserwacji autorzy stwierdzili, iż sygnalizacja IL-13 aktywowała onkogenne cząsteczki sygnałowe kinazy 3-fosfoinozytydowej, AKT (ang. *serine/threonine protein kinase*) i SRC (ang. *protein-tyrosine kinase*) w wysoce przerzutowych komórkach.

Równolegle prowadzone przez tych samych autorów badania klinicznie, wykazały wysoką ekspresję IL-13R α 2 w histopatologicznych analizach wycinków raka okrężnicy, związaną z późniejszymi etapami postępu choroby i słabymi rokowaniami u pacjentów. Wyniki potwierdziły zatem kluczową rolę ekspresji IL-13R α 2 w inwazji raka okrężnicy i przerzutach.

RAK GŁOWY I SZYI

Kaskas i wsp. [37] porównywali stężenia cytokin i chemokin – m.in. IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, indukowalnego białka IP-10, rozpuszczalnego liganda CD40, białka zapalnego makrofagów 1 β (MIP-1 β) w surowicy krwi u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi (ang. *head and neck squamous cell cancer*, HNSCC) z grupą zdrowych ochotników w celu identyfikacji potencjalnych biomarkerów choroby. Pierwotne miejsca guzów w grupie pacjentów obejmowały jamę nosową, jamę ustną, część ustną gardła, gardło dolne i krtań. Autorzy wykazali znaczący spadek poziomu IL-13 oraz IFN- γ i MIP-1 β oraz istotne podwyższenie stężenia IP-10 w surowicy u pacjentów z HNSCC, niezależnie od pierwotnego miejsca guza.

RAK JAJNIKA

Fujisawa i wsp. [21] zbadali wpływ IL-13 na inwazyjność i możliwość wystąpienia przerzutów raka jajnika przez oddziaływanie na receptor IL-13R α 2, analizując szlak sygnałowy ERK1/2, AP-1 oraz ekspresję MMP na liniach komórkowych ludzkiego raka jajnika (SKOV-3, ES-2, C-33A, OVCAR-3) z ekspresją IL-13R α 2 i na liniach komórkach jajnika (IGROV-1) ze stłumioną ekspresją receptora IL-13R α 2. Równolegle badania przeprowadzono na mysich modelach tego nowotworu. IL-13 znacząco zwiększała inwazyjność komórek, z ekspresją IL-13R α 2, ale nie wykazała nasilenia inwazyjności w komórkach ze stłumioną ekspresją receptora IL-13R α 2. IL-13 wzmacniała aktywność szlaku ERK1/2, AP-1 i ekspresję MMP tylko w komórkach z ekspresją IL-13R α 2. W modelu zwierzęcym ludzkiego raka jajnika (na myszach), komórki guza z ekspresją IL-13R α 2 dawały przerzuty do węzłów chłonnych i otrzewnej wcześniej niż komórki guza ze stłumioną ekspresją IL-13R α 2. Myszy z rakiem jajnika z aktywnym IL-13R α 2 umarły wcześniej niż myszy z nowotworem bez ekspresji IL-13R α 2. Wstrzyknięcie dootrzewnowe IL-13 dodatkowo skróciło przeżycie myszy z nowotworem IL-13R α 2 o wysokiej ekspresji. Guzy i przerzuty do węzłów chłonnych korelowały z wyższymi poziomami MMP i wyższą aktywacją ERK1/2. Badanie dostarczyło dowodów, iż IL-13 pośredniczy w inwazji i przerzutach poprzez sygnalizację IL-13R α 2, ERK1/2, AP-1 i szlaki MMP w komórkach raka jajnika. Autorzy sugerują, iż IL-13R α 2 może stanowić cel dla ukierunkowanej immunoterapii dla zahamowania inwazji i przerzutów nie tylko w raku jajnika, ale również może kontrolować progresję choroby w wielu różnych typach nowotworów ludzkich.

RAK SKÓRY

Skóra mimo stałego cyklu odnowy jest narażona na działanie czynników środowiskowych i może ulegać stałemu uszkodzeniu. Nie wiadomo, w jaki sposób utrzymywana jest homeostaza wraz z mechanizmami ochronnymi przed uszkodzeniami. Wśród podstawowych komórek nabłonkowych (ang. *basal epithelial cells*, EC) znajduje się populacja rezydentnych śródnabłonkowych limfocytów (ang. *resident intraepithelial lymphocytes*, IEL), które zapewniają ochronny nadzór immunologiczny gospodarza. Dalessandri i wsp. [14] wykazali, że IEL komunikują się krzyżowo z EC poprzez syntezę i wydzielanie IL-13. EC skóry są aktywowane przez IL-13 pochodzącą z IEL, umożliwiając odpowiedź EC na stres indukowany czynnikami zewnętrznymi. Przy braku IL-13 lub IEL skóra ma zmniejszoną zdolność do naprawy uszkodzeń i zwiększoną podatność na rozwój komórek nowotworowych. IL-13 kontroluje szybkość przemieszczania się EC przez naskórek, co może wyjaśniać znaczenie IL-13 dla integralności naskórka i jego supresyjnego wpływu na proces karcynogenezy w skórze. Badania pokazują, że IL-13 działa jako łącznik molekularny między IEL i EC i odgrywa kluczową rolę obronną gospodarza w regulacji homeostazy tkanek EC.

GLEJAK WIELOPOSTACIOWY

Glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma multiforme*, GBM) jest jedną z najgroźniejszych postaci raka, ze wskaźnikiem przeżycia zaledwie 13% do 27% w ciągu 2 lat od rozpoznania, pomimo zastosowanego optymalnego leczenia. Hsi i wsp. [32] przedstawili hipotezę, że obecność unikalnego receptora wabika IL-13R α 2 zapobiega apoptozie komórek GBM. Receptor ten ma wysokie powinowactwo do IL-13, wiąże cytokinę i kompetycyjnie hamuje wewnątrzkomórkową kaskadę sygnalizacyjną zainicjowaną przez IL-13. W komórkach bez receptora wabika IL-13R α 2, IL-13 inicjuje wytwarzanie 15-lipoksygenazy-1 (15-LOX-1), która odgrywa rolę w apoptozie komórkowej. Sposób w jaki 15-LOX-1 indukuje apoptozę pozostaje jednak niejasny. Uważa się, że w procesie apoptozy pośredniczą steroidowe receptory jądrowe szeroko rozpowszechnione w komórkach, aktywowane przez proliferatory peroksyosomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR γ). Autorzy zasugerowali, że w GBM, IL-13 może indukować 15-LOX-1, która reguluje apoptozę komórek poprzez sygnalizację za pośrednictwem PPAR γ oraz, że ekspresja IL-13R α 2 zapobiega apoptozie i przyczynia się do wzrostu guza, co potwierdzili w badaniach *in vitro* i *in vivo*, przeprowadzonych na liniach komórkowych ludzkiego GBM (U87 i A172) oraz atymicznych nagich myszach NUDE (myszy nie wytwarzają komórek T i dlatego są immunoniekompetentne), u których wywołano wzrost guzów przez wstrzyknięcie podskórne komórek U87. Wyciszenie IL-13R α 2 za pomocą krótkiego interferującego RNA znacząco indukuje ekspresję 15-LOX-1, promuje apoptozę i zmniejsza wzrost guza GBM *in vivo*. Odkrycia te określiły mechanizm eliminowania blokady endogennej sygnalizacji IL-13 i promowania apoptozy oraz charakteryzują rolę 15-LOX-1 w apoptozie GBM. Identy-

fikacja mechanizmu szlaku sygnalizacyjnego, który może być ukierunkowany na interwencję farmakologiczną, będzie miała wpływ na opracowanie nowych i skutecznych metod leczenia GBM.

RAK NERKI

Chang i wsp. [9] zbadali wartości prognostyczne IL-4 i IL-13 pochodzących z guza od pacjentów z miejscowym jasnokomórkowym rakiem nerki (ang. *clear-cell renal cell carcinoma*, ccRCC) po nefrektomii. Badania wykazały, że wysoka ekspresja IL-4 i IL-13 była związana z wystąpieniem nawrotów choroby i skróconym czasem przeżycia pacjentów. Uznano, że ocena ekspresji IL-4 i IL-13 w tkance guza zapewnia możliwość optymalizacji postępowania pooperacyjnego i opracowania nowych terapii celowanych dla pacjentów z ccRCC.

RAK PĘCZERZA MOCZOWEGO

Ekspresję IL-13 badano immunohistochemicznie w wycinkach tkanek nowotworowych od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego w różnych stadiach klinicznej złośliwości oraz od pacjentów z łagodną postacią raka. Wyniki pokazały wysoką, istotnie różną, ekspresję IL-13 w tkankach raka o wysokiej złośliwości w porównaniu z tkankami pochodzącymi z łagodnych guzów (odpowiednio 86% w porównaniu z prawie 27%). Autorzy konkludują, iż wyższa ekspresja IL-13 u pacjentów z rakiem pęcherza sugeruje, iż cytokina ta bierze udział w progresji nowotworu i jest związana z a kliniczną postacią raka tego narządu [54].

Margel i wsp. [49] wychodząc z założenia, że proces nowotworowy raka pęcherza moczowego często powiązany jest z procesem zapalnym, przeprowadzili pomiar szeregu mediatorów immunologicznych w moczu pacjentów. Oznaczono stężenie białek szoku termicznego (HSP60, HSP70, HSP90), TNF- α , TGF- β oraz interleukin: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 lub IL-13. Analiza wykazała, że stężenie IL-8, IL-10 i IL-13 były wyższe w moczu chorych na raka pęcherza moczowego w porównaniu do grupy kontrolnej, a IL-13 okazała się najlepszym parametrem pod względem diagnostycznym. Nie wykazali jednak istotnych różnic między stężeniem IL-13 w moczu chorych z rakiem naciekającym mięśniówkę pęcherza (MIBC) a rakiem nienaciekającym (NMIBC), choć wyższe wartości otrzymano w MIBC.

W badaniu klinicznym Malek-Zadeh i wsp. [45] oceniali (metodą immunoenzymatyczną i RT-PCR) ekspresję IL-13 jako cytokiny przeciwzapalnej w surowicy pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Zaobserwowali znaczącą różnicę w ekspresji mRNA i stężeniu IL-13 między pacjentami a grupą kontrolną. Zwiększona ekspresja obserwowana była w niższych stadiach raka w porównaniu z bardziej zaawansowanymi. Nie stwierdzono wpływu wieku, palenia papierosów czy picia alkoholu na stężenie IL-13 w surowicy chorych. Autorzy wskazują, iż nadekspresja IL-13 jako silnej immunosupresyjnej cytokiny może odgrywać rolę mediatora przeciwzapalnego w raku pęcherza moczowego.

ROLA IL-13 W PATOGENEZIE NIENOWOTWOROWYCH STANÓW CHOROBY

Poza chorobami nowotworowymi IL-13 łączona jest również z rozwojem innych schorzeń takich jak infekcje pasożytnicze, astma, atopowe zapalenie skóry, zespół nerczycowy, choroby przewodu pokarmowego, zapalenia stawów, a uzyskane wyniki z badań prowadzonych w tych jednostkach chorobowych są interesujące [11, 19, 36, 61].

INFEKCJE PASOŻYTNICZE

Wspólną cechą infekcji pasożytniczych jest manifestacja odpowiedzi immunologicznej typu komórkowej z udziałem Th2. Wytwarzane przez Th2 interleukiny (IL -13, IL-4, IL-5) indukują wytwarzanie i uwalnianie IgE przez limfocyty B. Sugeruje się, że wydzielanie między innymi IL-13, odgrywa znaczącą rolę w tzw. alarmie cytokinowym pochodzącym z uszkodzonego nabłonka i może brać udział w stymulowaniu komórek dendrytycznych (ang. *dendritic cells*, DCs), co wskazywane jest jako mechanizm molekularnej odpowiedzi komórek gospodarza na uszkodzenie tkanek przez pasożyty oraz gojenie się ran [33].

IL-13 działa na wielu płaszczyznach w reakcji przeciw pasożytniczej. Stymuluje produkcję śluzu w komórkach kubkowych, indukuje lokalne uwalnianie eotaksyny w celu przyciągnięcia eozynofili, zwiększając wytwarzanie IgE, ponadto zwiększa motorykę jelit i wydalanie pasożytów z organizmu. Mimo korzystnego działania IL-13 w obronie gospodarza podczas infekcji pasożytniczej w jelitach, niekontrolowana aktywność IL-13 może prowadzić do rozwoju niekorzystnych stanów zapalnych. Nieswoiste zapalenia jelit, jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego (ang. *colitis ulcerosa*, CU) czy choroba Leśniowskiego-Crohna (CD), są przewlekłymi nawracającymi schorzeniami przewodu pokarmowego, charakteryzującymi się zapaleniami jelit i uszkodzeniami kosmków jelitowych [66].

Badania Fuss i wsp. [24] pokazały, że komórki T blaszki właściwej jelit (LPT, lamina propria T) u pacjentów z UC wytwarzają znacznie większe ilości IL-13 i nieduże interferonu- γ (IFN- γ) w porównaniu do zdrowych kontroli, podczas gdy porównywalne komórki od pacjentów z CD wytwarzają duże ilości IFN- γ i małe ilości IL-13. Autorzy wykazali, że IL-13 jest wytwarzana przez nieklasyczne komórki NKT (tj. zdefiniowane jako komórki NKT wykazujące brak „klasycznego” receptora komórek T) oraz, że zarówno ludzkie linie komórkowe NKT (721.221-CD1d) jak i komórki T blaszki właściwej pozyskane od chorych z UC są cytotoksyczne dla komórek nabłonkowych okrężnicy *in vitro* oraz, że tę cytotoksyczność zwiększa IL-13. Wyniki badania pokazują, że UC jest związany z nietypową odpowiedzią Th2, w której pośredniczą nieklasyczne komórki NKT wytwarzające IL-13 i mające potencjał cytotoksyczny dla komórek nabłonkowych.

ZESPÓŁ NERCZYCOWY

Idiopatyczny zespół nerczycowy na podłożu zmian minimalnych (ang. *minimal change disease*, MCD) to glomerulopatia niezapalna przebiegająca pod postacią zespołu nerczycowego. W celu zbadania niejasnego mechanizmu tej choroby Zeybek i wsp. [79] zmierzili poziom IL-13, CD80, CD28, metaloproteinazy macierzy-2 (MMP-2) i granzymu B w moczu dzieci z MCD. Stężenie IL-13 w moczu dzieci w grupie z aktywnym stadium choroby było istotnie wyższe niż w grupie dzieci z remisją i w grupie kontrolnej. Stwierdzono również korelację między stężeniem IL-13 oraz CD80. Badacze postawili tezę, iż IL-13 bierze udział w patogenezie MCD u dzieci i należy rozważyć zastosowanie inhibitorów tej cytokiny w leczeniu przypadków opornych na leki steroidowe i immunosupresyjne.

ASTMA

Obecnie astmę postrzega się jako zespół kliniczny (a nie jako pojedynczą jednostkę chorobową) z udziałem wielu mechanizmów patologicznych. Docenia się fakt, że eozynofilia pozostaje kluczową cechą astmy. Eozynofile stanowią niski odsetek leukocytów w prawidłowym stanie zdrowia, jednak podczas choroby, IL-4, IL-5 i IL-13 mogą indukować szybką eozynofilozę, wydłużać przeżycie eozynofili i ich przemieszczanie się do miejsca uszkodzenia. Stwierdza się podwyższone poziomy IL-13 w zwierzęcych modelach eozynofilowego zapalenia oraz we krwi i tkankach pacjentów ze zdiagnozowanymi zaburzeniami eozynofilowymi. Dane z badań klinicznych ujawniły rolę tej cytokiny w nadzorowaniu eozynofilią w astmie i innych stanach związanych ze wzrostem liczby eozynofili [4, 76].

Doran i wsp. [15] zaobserwowali znacznie wyższe poziomy IL-13 w surowicy u pacjentów z ciężką astmą w porównaniu ze zdrowymi osobami. U pacjentów z postacią umiarkowaną do ciężkiej, stężenie IL-13 w surowicy była silnie dodatnio skorelowane z liczbą eozynofili we krwi. IL-13 występuje obficie w eozynofilach i po uwolnieniu może bezpośrednio koordynować odpowiedź zapalną z udziałem innych immunomodulatorów. Jest zatem możliwe, że podwyższone poziomy IL-13 w surowicy mogą być częściowo konsekwencją uwalniania jej zarówno z dróg oddechowych, jak i eozynofilów we krwi.

Okolo 5-10% chorych na astmę na całym świecie cierpi na ciężką postać tej choroby. Badania eksperymentalne i kliniczne wykazały, że IL-13 jest ważną cytokiną w przewlekłym zapaleniu dróg oddechowych i została przedstawiona jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu astmy. Dwa różne ludzkie przeciwciała monoklonalne (ang. *monoclonal antibodies*, mAb) przeciwko IL-13 (tralokinumab i lebrikizumab) blokowały wiązanie IL-13 z receptorami IL-13R α 1 i IL-13R α 2 (na modelach zwierzęcych). Również oceniono skuteczność tralokinumabu i lebrikizumabu w leczeniu pacjentów z ciężką astmą, ale wyniki nie spełniły oczekiwanych rezultatów. W badaniach nie zgłoszono jednak poważnych niepożądanych reakcji związanych

z leczeniem tymi przeciwciałami. Negatywne wyniki kliniczne kontrastowały z pozytywnymi wynikami uzyskanymi na eksperymentalnych modelach zwierzęcych, budząc wątpliwości co do zastosowania immunoterapii w leczeniu astmy u ludzi [50].

TWARDZICA UKŁADOWA

Twardzina układowa (ang. *systemic sclerosis*, SSc) jest przewlekłą chorobą tkanki łącznej o nieznaną w pełni etiologią. Charakteryzuje się nadmiernym i postępującym zwłóknieniem skóry i narządów wewnętrznych. Obecnie żadna terapia nie okazała się skuteczna w modyfikacji przebiegu SSc, co jest odzwierciedleniem złożonej patogenezy tego schorzenia. Cytokiny pochodzące z komórek T są zaangażowane w indukcję zwłóknienia. Rola profibrotycznej cytokiny IL-13 i jej regulacja wydają się ważne w patogenezie SSc i innych zaburzeń zwłóknieniowych [23]. Badania sugerują, że aktywacja układu odpornościowego jest kluczowym elementem w patogenezie tej choroby. U pacjentów z SSc wykazano zwiększoną ekspresję cytokin zależnych od stymulacji Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 i IL-17) zarówno w preparatach komórek skóry, jak i w surowicy krwi chorych [29].

Medsker i wsp [52] stwierdzili, że nadmierne ilości IL-13 są wytwarzane przez komórki T CD8 efektora krwi obwodowej u pacjentów z rozproszoną skórą twardzicą układową (ang. *diffuse cutaneous SSc*, dcSSc). Wydzielanie IL-13 jest regulowane przez aktywność czynnika transkrypcji GATA-3 (ang. *GATA Binding Protein 3*). Zaobserwowano, że poziomy GATA-3 w komórkach T CD8 były znacznie wyższe u pacjentów z dcSSc i wczesną chorobą zapalną. Wyciszenie GATA-3 za pomocą małego interferującego RNA (siRNA) znacznie zmniejszyło syntezę IL-13 przez komórki T CD8, wykazując związek przyczynowy między GATA-3 i IL-13. W oparciu o uzyskane wyniki autorzy zasugerowali, że zwiększona ekspresja GATA-3 w komórkach T CD8 może być bardzo istotnym wskaźnikiem zaburzeń immunologicznych u pacjentów z dcSSc, a GATA-3 może być nowym celem terapeutycznym, w tej obecnie nieuleczalnej chorobie.

ATOPOWE ZAPALENIE SKÓRY

Atopowe zapalenie skóry (ang. *atopic dermatitis*, AD) jest częstym stanem zapalnym skóry związanym z aktywnością Th2. IL-4 i IL-13 są kluczowymi cytokinami zaangażowanymi w powstawanie chorób alergicznych. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że w przypadku reakcji zapalnej leżącej u podstaw AD, IL-13 ulega miejscowej nadekspresji i ma znaczący wpływ na fizjologię skóry, w tym rekrutację komórek zapalnych, zmianę mikrobiomu skóry i obniżenie wydolności bariery naskórkowej [6].

W celu określenia roli IL-13 w patogenezie AD, Metwally i wsp. [53] wykazali wzrost ekspresji mRNA IL-13 we krwi obwodowej pacjentów z różnym stopniem AD w porównaniu z osobami zdrowymi. Stwierdzili ponadto silną korelację mię-

dzy poziomami IgE w surowicy a ekspresją mRNA IL-13 niezależnie od stopnia nasilenia choroby. Wysoki poziom ekspresji mRNA IL-13 w AD i jego korelacja z poziomem IgE w surowicy oraz z obrazem choroby wskazuje na udział IL-13 w patogenezie choroby i jest ważnym induktorem IgE.

ZAPALENIA STAWÓW

IL-13 jako cytokina przeciwzapalna stała się obiektem zainteresowania w przypadku chorób związanych z przewlekłym stanem zapalnym stawów. Spadaro i wsp. [64] wykazali związek między stężeniem IL-13 w surowicy i płynie maziowym, a obrazami klinicznymi łuszczycowego zapalenia stawów (ŁZS), reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) i chorobą zwyrodnieniową stawów (ang. *atopic dermatitis*, OA). Poziomy IL-13 w płynie maziowym były istotnie wyższe u pacjentów z ŁZS i RZS niż u pacjentów z OA, bez istotnych różnic pomiędzy ŁZS a RZS. Poziomy IL-13 w surowicy był niższe u pacjentów z ŁZS niż u pacjentów z RZS. Tylko pacjenci z ŁZS mieli wyższy poziom IL-13 w płynie maziowym niż w surowicy. Stosunek IL-13 płyn maziowy/surowica był wyższy w grupie ŁZS niż w grupie z RZS lub OA. Autorzy sugerują, iż różne profile wydzielania IL-13 w wymienionych schorzeniach mogą być powiązane z obrazami klinicznymi, odzwierciedlającymi różne patogenne mechanizmy związane z zapalnymi i zwyrodnieniowymi chorobami stawów.

Na podstawie danych z piśmiennictwa w tabeli 1 przedstawiono udział IL-13 w różnych typach raka oraz w innych nienowotworowych schorzeniach.

PODSUMOWANIE

Przedstawione i przeanalizowane dane z piśmiennictwa jednoznacznie wskazują na istotną rolę interleukiny 13 w patogenezie, przebiegu i predykcji wielu procesów chorobowych. Z uwagi na fakt, iż IL-13 jest cytokiną przeciwzapalną i immunomodulującą, to bezsprzeczny jest jej udział w patogenezie chorób u podłoża których leży stan zapalny (np. w astmie, atopowym zapaleniu skóry, SSc czy MCD). Wyniki badań wskazują również na znaczenie IL-13 w patogenezie i przebiegu chorób nowotworowych. Na podstawie większości przedstawionych typów nowotworów, wzrost ekspresji IL-13 czy aktywności jej receptorów (szczególnie IL-13R α 2) związany był z progresją lub/i złym rokowaniem choroby. Zaangażowana w nadzór immunologiczny guza, IL-13 przyczynia się do jego ucieczki przed apoptozą i nasila jego rozrost oraz przerzutowanie. Wskazywana jest także rola tej interleukiny jako potencjalnego celu terapeutycznego związanego z zastosowaniem specyficznych inhibitorów dla IL-13 lub/i jej receptorów.

TABELA 1. Udział IL-13 w chorobach

TABLE 1. Participation of IL-13 in diseases

AUTOR (ROK)	RODZAJ CHOROBY	METODA BADANIA	REZULTATY
Srabovic i wsp. (2013)	rak sutka	immunohistochemiczna	↑ekspresji IL-13 w guzie
Kwon i wsp. (2018)	rak sutka	immunohistochemiczna	↑ekspresji receptora IL-13R α 2 w tkance nowotworowej
Konig i wsp. (2016)	rak sutka	ELISA	↑stężenia IL-13 w surowicy
Xie i wsp. (2015)	niedrobnokomórkowy rak płuc	immunohistochemiczna	↑ekspresji receptora IL-13R α 2 w tkance nowotworowej
Formentini i wsp. (2009)	rak trzustki	linie ludzkiego raka trzustki (ASPC-1, CAPAN-1, MIA PaCa-2, PANC-1, COLO-357 i T3M4)	↑komórek ASPC-1, CAPAN-1 i COLO-357; wszystkie komórki ekspresywały i wydzielały IL-13
Formentini i wsp. (2009)	rak trzustki	immunohistochemiczna	koekspresja IL-13 z receptorem IL-4R
Gibbitas i wsp. (2011)	rak trzustki, przełyku i żołądka	ELISA	↑stężenia IL-13 w surowicy chorych
Skinneider i wsp. (2002)	chłoniak ziarniczy	immunohistochemiczna	↑ekspresji IL-13 w komórkach raka
Gaiolla i wsp. (2011)	chłoniak ziarniczy	ELISA	brak wykrywalności IL-13 w surowicy chorych i zdrowych
Fiumara i wsp. (2001)	chłoniak ziarniczy	ELISA	u 10% chorych wykryto IL-13 w surowicy
Kornman i wsp. (2012)	rak okrężnicy	immunohistochemiczna	↑ekspresji IL-13 i IL-4 w guzie; nadaktywność receptorów IL-4R i IL-13R α 1
Barderas i wsp. (2012)	rak okrężnicy	linie komórkowe KM12C (słaboprzerzutowe); KM12SM (wysokoprzerzutowe)	↑ekspresji IL-13i IL-4 na liniach KM12SM; ↑ekspresji receptora IL-13R α 2
Barderas i wsp. (2012)	rak okrężnicy	immunohistochemiczna	↑ekspresji receptora IL-13R α 2 w tkance nowotworowej
Kaskas i wsp. (2014)	rak głowy i szyi	ELISA	↓stężenia w surowicy
Fujisawa i wsp. (2012)	rak jajnika	linie komórkowe ludzkiego raka jajnika (SKOV-3, ES-2, C-33A, OVCAR-3) z ekspresją IL-13R α 2 i linie komórkach jajnika (IGROV-1) ze słumioną ekspresją receptora IL-13R α 2.	wzrost inwazyjności komórek z ekspresją receptora IL-13R α 2

AUTOR (ROK)	RODZAJ CHOROBY	METODA BADANIA	REZULTATY
Fujisawa i wsp.(2012) Dalessardi i wsp.(2016)	rak jajnika rak skóry	model zwierzęcy (myszy) immunohistochemiczna	komórki guza z ekspresją IL-13R α 2 dawały przerzuty do węzłów chłonnych i otrzewnej wcześniej niż komórki guza ze stłumioną ekspresją IL-13R α 2. Myszy z rakiem jajnika z aktywnym IL-13R α 2 umierały wcześniej
		model zwierzęcy (myszy) cytometria przepływowa immunohistochemiczna immunofluorescencyjna	supresyjny wpływ IL-13 na proces karcynogenezy w skórze
Hsi i wsp. (2011)	glejak wielopostaciowy	linie komórkowe ludzkiego glejaka (U87 i A172) oraz na atymicznych nagich myszach NUDE	IL-13 reguluje apoptozę komórek nowotworowych; ekspresja IL-13R α 2 zapobiega apoptozie i przyczynia się do wzrostu guza
Chang i wsp. (2015)	rak jasnokomórkowy nerki	immunohistochemiczna	↑ekspresji IL-13 i IL-4 w komórkach nowotworowych
Margel i wsp. (2016)	rak pęcherza moczowego	ELISA	↑stężenia IL-13 w moczu chorych
MalekZadeh i wsp.(2011)	rak pęcherza moczowego	ELISA RT-PCR	↑stężenia IL-13 w surowicy chorych
Mousa i wsp. (2010)	rak pęcherza moczowego	immunohistochemiczna	↑ekspresji IL-13 w komórkach raka
Fuss i wsp. (2004)	wrzdziejące zapalenie jelita grubego (<i>colitis ulcerosa</i>)	immunohistochemiczna	↑ekspresji IL-13 w komórkach T blaszki właściwej jelit
Fuss i wsp. (2004)	choroba Leśniowskiego-Crohna	immunohistochemiczna	↓aktywności IL-13 w komórkach T blaszki właściwej jelit
Zeybec i wsp. (2014)	zespół nerczycowy na podłożu zmian minimalnych	ELISA	↑stężenia IL-13 w moczu chorych
Doran i wsp. (2017)	astma	ELISA	↑stężenia IL-13 w surowicy chorych; IL-13 korelowała z poziomem eozynofili
Fuschiotti i wsp. (2011)	twardzica układowa	immunohistochemiczna ELISA	↑ekspresji IL-13 w chorych tkankach ↑stężenia IL-13 w surowicy chorych
Bieber i wsp. (2019)	atopowe zapalenie skóry	immunohistochemiczna	↑ekspresji IL-13 w chorych tkankach
Metwally i wsp. (2004)	atopowe zapalenie skóry	PCR	↑ekspresji mRNA IL-13 we krwi obwodowej chorych
Spadaro i wsp. (2002)	zapalenia stawów	ELISA	↑stężenia IL-13 w płynie maziowym i surowicy chorych

PODZIĘKOWANIA

Publikacja została sfinansowana w ramach projektu finansowanego ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w programie „Regionalna inicjatywa doskonałości” (RID) na lata 2019-2022, nr. 4318-420/2019.

LITERATURA

- [1] AKAIWA M, YU B, UMESHITA-SUYAMA R, TERADA N, SUTO H, KOGA T, ET AL. Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *Cytokine* 2001; 13: 75-84.
- [2] ANDREWS A, HOLLOWAY JW, PUDDICOMBE SM, HOLGATE ST, DAVIES DE. Kinetic analysis of the interleukin-13 receptor complex. *Biol Chem* 2002; 277: 46073-46078.
- [3] BARDERAS R, BARTOLOME RA, FERNANDEZ-ACERIERO MJ, TORRES S, CASAL JI. High expression of IL-13 receptor $\alpha 2$ in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. *Cancer Res* 2012; 72: 2780-2790.
- [4] BERRY MA, PARKER D, NEALE N, WOODMAN L, MORGAN A, MONK P, ET AL. Sputum and bronchial submucosal IL-13 expression in asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1106-1109.
- [5] BHATTACHARJEE A, SHUKLA M, YAKUBENKO VP, MULYA A, KUNDU S, CATHCART MK. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med* 2013; 54, 1-16.
- [6] BIEBER T. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy* 2019;:1-9. doi: 10.1111/all.13954.
- [7] BRADDOCK M, HANANIA NA, SHARAFKHANEH A, COLICE D, CARLSSON M. Potential Risks Related to Modulating Interleukin-13 and Interleukin-4 Signalling: A Systematic Review. *Cytokine* 2015; 75: 89-116.
- [8] CAO H, ZHANG J, LIU H, WAN L, ZHANG H, HUANG Q ET AL. IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7: 61183-61198.
- [9] CHANG Y, HU I, HUIMIN AN H, QIANG FU Q, LIAN CHEN L, ZONGMING LIN Z, XU J. Expression of IL-4 and IL-13 predicts recurrence and survival in localized clear-cell renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 1594-1603.
- [10] CHECHLIŃSKA M. Rola cytokin w procesach nowotworzenia. *Nowotwory* 2003; 53: 648-659.
- [11] CHEN Q, GEBA GP, ELIAS JA, ZHU Z, WWAN Z, HOMER RJ. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 2008; 118: 779-788.
- [12] CIEĆKO-MICHALSKA I, WIERZBICKA-TUTKA I, SZCZEPANEK M, FEDAK D, MACH T. Czy stężenie cytokin może być markerem aktywności nieswoistych chorób zapalnych jelit oraz służyć do ich różnicowania? *Przegl Lek*, 2016; 73: 5.
- [13] CZYŻEWSKA-BUCZYŃSKA A, ŻUK N, ROMANOWSKA-MICHERDA K, WITKIEWICZ W. Biologiczna rola interleukiny 33 i znaczenie w patofizjologii układu sercowo-naczyniowego. *Post Hig Med Dośw* 2014; 68: 834-841.
- [14] DALESSANDRI T, CRAWFORD G, HAYES M, CASTRO SEOANE R, STRID J. IL-13 from intraepithelial lymphocytes regulates tissue homeostasis and protects against carcinogenesis in the skin. *Nat Commun* 2016; 7: 1-12. doi: 10.1038/ncomms12080.
- [15] DORAN E, CAI F, HOLWEG CJ, WONG K, BRUMM J, ARRON JR. Interleukin-13 in Asthma and Other Eosinophilic Disorders. *Front Med* 2017; 4: 1-14.
- [16] FICHTNER-FEIGL S, STROBER W, KAWAKAMI K, PURI RK, KITANI A. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha 2$ receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis. *Nat Med* 2006; 12: 99-106.

- [17] FICHTNER-FEIGL S, TERABE M, KITANI A, YOUNG CA, FUSS I, GEISSLER EK, SCHLITT HJ, BERZOFKY JA, STROBER W. Restoration of tumor immunosurveillance via targeting of interleukin-13 receptor-alpha 2. *Cancer Res* 2008; **68**: 3467-3475.
- [18] FIUMARA P, CABANILLAS F, YOUNES A. Interleukin-13 levels in serum from patients with Hodgkin disease and healthy volunteers. *Blood* 2001; **98**: 2877- 2878.
- [19] FOESTER J, MOŁĘDA A. Feasibility Analysis of Interleukin-13 as a Target for a Therapeutic Vaccine. *Vaccines* 2019; **7**: 20.
- [20] Formentini A, Prokopchuk O, Strater J, Kleff J, GROCHOLA LE, LEDER G, HENNE-BRUNS D, KORC M, KORNMANN M. Interleukin-13 exerts autocrine growth-promoting effects on human pancreatic cancer, and its expression correlates with a propensity for lymph node metastases. *Int J Colorectal Dis* 2009; **24**: 57-67.
- [21] FUJISAWA T, JOSHI BH, PURI RK. IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-13R α 2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer. *Int J Cancer* 2012; **131**: 344-356.
- [22] FUJISAWA T, NAKASHIMA H, NAKAJIMA A, JOSHI BH, PURI RK. Targeting IL-13R α 2 in human pancreatic ductal adenocarcinoma with combination therapy of IL-13-PE and gemcitabine. *Int J Cancer* 2011; **128**: 1221-1231.
- [23] Fuschiotti P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytocine* 2011; **56**: 544-549.
- [24] Fuss Ij, Heller F, Boirivant M, Leon F, YOSCHIDA M, FICHTNER-FEIGL S, ET AL. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; **9**: 740-750.
- [25] Gabitass Rf, ANNELS NE, STOCKEN DD, PANDHA HA, MIDDLETON GW. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 2011; **60**: 1419-1430.
- [26] GAIOLLA RD, DOMINGUES MA, NIERO-MELO L, ELGUI DE OLIVEIRA DE. Serum levels of Interleukins 6, 10, and 13 before and after treatment of classic Hodgkin Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2011; **135**: 483-489.
- [27] GOŁAB J, JAKÓBISIAK M, LASEK W, STOKŁOSA T. Podstawowe właściwości cytokin. *Immunologia* 2014; **21**:157-158.
- [28] GOUR N, WILLS-KARP M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine* 2015; **75**: 68-78.
- [29] GUMOWSKA-SROKA O, KOTYLA PJ. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of systemic sclerosis and new therapeutic perspectives. *Forum Reumatol* 2018; **4**: 212-218.
- [30] HE CH, LEE CG, DELA CRUZ CS, LEE CM, ZHOU Y, AHANGARI F ET AL. Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor alpha2. *Cell Rep* 2013; **4**: 830-841.
- [31] HERSHEY GK. 13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *J Allergy Clin. Immunol.*, 2003; **111**: 677-690.
- [32] Hsi Lc, KUNDU S, PALOMO J, XU B, FICCO R, VOLDEBAUM MA, CATHCART MK. Silencing IL-13R α 2 promotes glioblastoma cell death via endogenous signaling. *Mol Cancer Ther* 2011; **10**: 1149-1160.
- [33] HUSSAART L, YAZDANBAKHSH M, GUIGAS B. Priming dendritic cells for Th2 polarization: Lessons learned from helminths and implications for metabolic disorders. *Front Immunol* 2014; **5**: 499. doi: 10.3389/fimmu.2014.00499.
- [34] IDŹIKOWSKA E, BOSSOWSKI A, NOISZEWSKA K. Analiza stężenia IL-17 i IL-23 w dynamice chorób autoimmunizacyjnych tarczycy u młodocianych. *Endokrynol Ped* 2012; **3**: 17-26.
- [35] JOSHI BH, PURI RK. IL-13 receptor-alpha2: a novel target for cancer therapy. *Immunotherapy* 2009; **1**: 321-327.
- [36] KASAIAN MT, DOUGLAS K, MILLER DK. IL-13 as a therapeutic target for respiratory disease. *Biochem Pharmacol* 2008; **76**: 147- 155.
- [37] KASKAS NM, MOORE-MEDLIN T, MCCLURE GB, EKSHYAN O, VANCHIERE JA, NATHAN CA. Serum biomarkers in head and neck squamous cell cancer. *JAMA Otolaryngol – Head Neck Surg* 2014; **140**: 5-11.
- [38] KAWAKAMI K, TAGUACHI J, MURATA T, PURI RK. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 2001; **97**: 2673-2679.

- [39] KĘPA L, OCZKO-GRZESIK B, BOROŃ-KACZMARSKA A. Stężenie interleukiny-6 (IL-6) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z ropnymi, bakteryjnymi zapaleniami opon i mózgu – obserwacje własne. *Przeegl Epidemiol* 2014; **68**: 743-746.
- [40] KONIG A, VILLSMAIER T, RACK B, FRIESE K, JANNI W, JESCHKE U, ET AL. Determination of Interleukin-4, -5, -6, -8 and -13 in Serum of Patients with Breast Cancer Before Treatment and its Correlation to Circulating Tumor Cells. *Anticancer Res* 2016; **36**: 3123-3130.
- [41] KORNMANN M, LINK KH, FRICKE H, HENNE-BRUNS D, FORMENTINI A, BRAUN P. Expression of interleukin-4 and interleukin-13 and their receptors in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2012; **27**: 1369-1376.
- [42] KRAJEWSKI W, KOŁODZIEJ A, DEMBOWSKI J, ZDROJOWY R. Genetic and immunologic determinants of intravesical BCG therapy in non-muscle-invasive urothelial bladder cancer. *Post Hig Med Dosw* 2014; **68**: 291-300.
- [43] KWON HJ, CHOI JE, BAE YK. Interleukin-13 receptor alpha 2 expression in tumor cells is associated with reduced disease-free survival in patients with luminal subtype invasive breast cancer. *Tumor Biol* 2018; **40**: doi1010428318783657.
- [44] LASEK W. Bioterapeutyki i immunomodulatory w leczeniu chorób alergicznych. Biologic medications and immunomodulators in the treatment of allergic diseases. *Alergia* 2015; **1**: 27-30.
- [45] MALEK-ZADEH K, NIKBAKHT M, SADEGHI IA, SINGH SK, SOBTI RC. Overexpression of IL-13 in patients with bladder cancer. *Cancer Invest* 2010; **28**: 201-207.
- [46] MANDAL D, LEVINE AD. Elevated IL-13Ralpha2 in intestinal epithelial cells from ulcerative colitis or colorectal cancer initiates MAPK pathway. *Inflamm Bowel Dis* 2010; **16**: 753-764.
- [47] MARCHEWKA Z, GIELNIAK M, PIWOWAR A. Rola wybranych mediatorów procesu zapalnego w patogenezie chorób nowotworowych. *Post Hig Med Dośw* 2018; **72**: 175-183.
- [48] MARCHEWKA Z, SZYMAŃSKA B, PIWOWAR A. Ocena stężenia w moczu i przydatności diagnostycznej interleukiny-8 i interleukiny-18 w diagnostyce raka pęcherza – doniesienie wstępne. *Diagn Laborat* 2018; **54**: 91-98.
- [49] MARGEL D, PESVNER-FISCHER M, BANIEL J, YOSSEPOWITCH O, COHEN IR. Stress proteins and cytokines are urinary biomarkers for diagnosis and staging of bladder cancer. *Eur Urol* 2011; **59**: 113-119.
- [50] MARONE G, GRANATA F, PUCINO V, PECORARO A, HEFFLER E, LOFFREDO S, GUY W, SCADDING GW, VARRICCHI G. The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Front Pharmacol* 2019 <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01387>.
- [51] MAY RD, FUNG M. Strategies targeting the IL-4/IL-13 axes in disease. *Cytokine* 2015; **75**: 89-116.
- [52] Medsger Ta, Ivanco DE, KARDAVA L, MOREL PA, LUCAS MR, FUSCHITTI F. GATA-3 up-regulation in CD8+ T cells as a biomarker of immune dysfunction in systemic sclerosis, resulting in excessive interleukin-13 production. *Arthritis Rheum* 2011; **63**: 1738-1747.
- [53] Metwally Ss, MOSAAD Ym, ABDEL-SAMEE ER, EL-GAYYAR MA, ABDEL-AZIZ AM, EL-CHENNAW I. IL-13 gene expression in patients with atopic dermatitis: relation to IgE level and to disease severity. *Egypt J Immunol* 2004; **14**: 171-177.
- [54] MOUSA Hm, JASSEM AN, HUSSAIN Mj. The IHC Expression of IL-13 in Bladder Tumour. *Al-Kufa University Journal for Biology* 6544 -ISSN: 23118854 & Online -Print ISSN: 2073 *Special Second International Scientific Conference for the Life Sciences Faculty of Education for Women/University-ofKufa/2016*. <https://www.researchgate.net/publication/327403159>.
- [55] MOY Fj, DIBLASIO E, WILHELM J, POWERS R. Solution structure of human IL-13 and implication for receptor binding. *J Mol Biol* 2001; **310**: 219-230.
- [56] OHSHIMA K, AKAIWA M, UMESHITA R, SIZUMIYA J, IZUHARA K, KIKUCHI M. Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. *Histopathology* 2001; **38**: 368-375.
- [57] PHAM TH, BAK Y, OH JW, HONG J, LEE S, HONG Jt ET AL. Inhibition of IL-13 and IL-13Ralpha2 Expression by IL-32theta in Human Monocytic Cells Requires PKCdelta and STAT3 Association. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: E1949. doi: 10.3390/ijms20081949.

- [58] PURZYCKA-BOHDAN D, NIEDOSZYTKO B, ŻMIJEWSKI M, SZCZERKOWSKA-DOBOSZ A, ZABLOTNA M, NOWICKI R. Rola interleukiny 16 w patogenezie wybranych chorób skóry. *Przegl Dermatol* 2014; **101**: 65-72.
- [59] RAHAMAN SO, SHARMA P, HARBOR PC, AMAN MJ, VOGELBAUM MA, HAQUE SJ. IL-13R(alpha)2, a decoy receptor for IL-13 acts as an inhibitor of IL-4-dependent signal transduction in glioblastoma cells. *Cancer Res* 2002; **62**:1103-1109.
- [60] RAHAMAN SO, VOGELBAUM MA, HAQUE SJ. Aberrant Stat3 signaling by interleukin-4 in malignant gliomacells: Involvement of IL-13Ralpha2. *Cancer Res* 2005; **65**: 2956-2963.
- [61] SAHA SK, BERRY MA, PARKER D, SIDDIQUI S, MORGAN A, MAY R, ET AL. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **121**: 685-691.
- [62] SKINNIDER BF, ELIA AJ, GASCOYNE RD, TRUMPER LH, VON BONIN F, KAPP U, PATERSON B, SNOW BE, MAK TW. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; **97**: 250-255.
- [63] SKINNIDER BF, MAK TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; **99**: 4283-4297.
- [64] SPADARO A, RINALDI T, RICCIERI V, VALESINI G, YACCARI E. Interleukin 13 in synovial fluid and serum of patients with psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; **61**: 174-176.
- [65] SRABOVIC N, MUJAGIC Z, MUJANOVIC- MUSTEDANAGIC J, MUMINOVIC Z, SOFTIC A, BEGIC L. Interleukin 13 expression in the primary breast cancer tumor tissue. *Biochem Medica* 2013; **21**: 131-138.
- [66] STROBER W, FUSS JI. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; **140**: 1756-1767.
- [67] SU I, CHUNG SI, JASON A, THIRUMALAI R, WHITE AO, CHUNG EJ, HUDAK KE, SCROGGINS BT, ARRON JR, WYNN TA, CITRIN DE. IL-13 is a therapeutic target in radiation lung injury. *Sci Rep* 2016; **6**: 39714. doi: 10.1038/srep39714.
- [68] SUZUKI A, LELAND P, JOSHI BH, PURI RK. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine* 2015; **75**: 79-88.
- [69] TABATA Y, GURJIT K, HERSHEY K. IL-13 Receptor Isoforms: Breaking Through the Complexity. *Curr Allergy and Asthma Reports* 2007; **7**: 338-345.
- [70] TERABE M, MATSUI S, NOBEN-TRAUTH N, CHEN H, WATSON C, DONALDSON DD. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 2000; **1**:515-520.
- [71] Terabe M, Matsui S, Park J, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson Dd, Chen W, WAHL SM, LEDBETTER S, PRATT B, LETTERIO JJ, PAUL WE, BERZOFKY JA. Transforming growth factor- β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 2003; **198**: 1741-1752.
- [72] TOMASIAK-ŁOZOWSKA MM, BODZENTA-ŁUKASZYK A, TOMASIAK M, SKIEPKO R, ZIĘTKOWSKI Z. The role of interleukin 13 and interleukin 5 in asthma. *Post Hig Med Dosw* 2010; **64**: 146-155.
- [73] VAN DYKEN SJ, LOKSLEY RM. Interleukin-4-and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: Roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol* 2013; **31**: 317-343.
- [74] WANG IM, LIN H, GOLDMAN S J, KOBAYASHI M. STAT-1 is activated by IL-4 and IL-13 in multiple cell types. *Mol Immunol* 2004; **41**: 873-884.
- [75] WILLS-KARP M, FINKELMAN FD. Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal* 2008; **1**: 55. doi: 10.1126/scisignal.1.51.pe55.
- [76] WOODRUFF PG, MODREK B, CHOY DF, JIA G, ABBAS AR, ELLWANGER A, ET AL. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; **180**: 388-395.
- [77] WYNN TA. IL-13 Effector Functions. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**:425-456.
- [78] XIE M, WU X, ZHANG J, HE CH. IL-13 receptor $\alpha 2$ is a negative prognostic factor in human lung cancer and stimulates lung cancer growth in mice. *Oncotarget* 2015; **6**: 32902-32913.

- [79] ZEYBEK C, HACIHAMDIOGLU DO, YAVUZ ST, PEKEL A, AKGUN C, BULUM B, ET AL. The roles of urine interleukin-13, CD80, CD28, matrix metalloproteinase-2 and granzyme B in the pathogenesis of childhood minimal change nephrotic syndrome. *J Clin Exp Invest* 2014; **5**: 354-361.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 19.03.2020

Przyjęto: 18.04.2020

Beata Szymańska

Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław

tel.: +48 71 784 04 57

fax: +48 71 784 04 52

email: beata.szymanska@umed.wroc.pl

ORIGIN, PHYSIOCHEMICAL COMPOSITION AND BIO-MEDICAL IMPORTANCE OF PROPOLIS

Fauzia KANWAL¹, Shabbir HUSSAIN¹, Muhammad Amin ABID²,
Khurram Shahzad MUNAWAR^{3,4}, Tauqeer AHMAD^{3,4}, Muhammad SULEMAN⁵,
Anees ABBAS⁴, Mohsin JAVED⁶, Muhammad RIAZ³, Muhammad IQBAL⁷,
Muhammad MAZHAR⁷, Sidra ARSHAD⁶

¹Department of Chemistry, Lahore Garrison University, Lahore, Pakistan

²Department of Chemistry, University of Sahiwal, Sahiwal, Pakistan

³Department of Chemistry, University of Sargodha, Sargodha, Pakistan

⁴Department of Chemistry, University of Mianwali, Pakistan

⁵Department of Chemistry, Riphah International University Faisalabad Campus,
Pakistan

⁶Department of Chemistry, University of Management and Technology,
Lahore, Pakistan

⁷Department of Chemistry, GC University Faisalabad, Faisalabad, Pakistan

Summary: Current studies were performed to evaluate the medicinal importance of propolis and its origin and physicochemical composition depending upon the nature of vegetations present in various localities. The propolis contains a myriad of chemical compounds such as flavonoids, esters, phenolic acid, amino acids and terpenoids. Different analytical techniques (e.g., TLC, GC, HPLC, MS, NMR and GC-MS) are used for the characterization of various constituents of Propolis. Propolis finds biomedical importance and numerous clinical applications as it possesses large quantities of anti-oxidants, anti-bacterial, anti-fungal, anti-viral and anti-inflammatory agents and also displays anticancer potential.

Keywords: propolis, analysis, medicinal, nutritional, physicochemical

INTRODUCTION

Propolis (bee glue) is a natural resinous product which is collected from plants by bees for the adaptation and construction of their nests (de Groot, 2013). It majorly consists of honeycomb paraffin and plant extracted stuff like spermaceti and evaporative composite (Bankova et al., 2000). It has been reported that honeybee hives serve as a “treasure island” and rich source of honey, propolis, royal jelly, bee pollen, beeswax, and bee venom. Increasingly, it is being realized that honey and its bioactive components are involved in prevention and inhibition of cancer by targeting multiple proteins in cancer cells (Farooqi et al., 2019). In the past decade much research has been focused on the physical and chemical constellation of propolis and its significance. The resin of green propolis has important constituents such as cinnamic acids and chemical compounds containing phenyl groups (Gambichler et al., 2004; Salatino et al., 2005). Above 68 °F (20°C), propolis becomes sticky but below this temperature, it is found fragile (El Sohaimy & Masry, 2014). Propolis is used as a resin ingredient (de Groot, 2013), in musical instruments (Burdock, 1998), for sealing the surfaces of bridges (Nair et al., 2008), in chewing gum (Ercan et al., 2015) and also for conversion of oils and fats into automobile wax (Ahuja & Ahuja, 2011).

Keeping in view the importance of propolis and its large number of applications, current studies were performed to review its chemical composition and biomedical importance.

ANALYTICAL TECHNIQUE FOR CHARACTERIZATION OF PROPOLIS

Propolis can be characterized by different analytical techniques which involve purification and separation of chemical constituents of propolis. They include TLC (thin-layer chromatography), GC (gas-chromatography) and HPLC (high-performance liquid chromatography), MS (mass spectroscopy), NMR (nuclear magnetic resonance) and GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry). These techniques help to determine the compounds of propolis, including flavonoids, phenols, terpenes, sugars, esters, hydrocarbons and minerals (Muscat, 2013).

CHEMICAL COMPOSITION

The studies on chemical composition studies of 100g propolis extract in 900mL of 70% ethyl alcohol have shown that the propolis sample contains huge quantities of aromatic acids, esters and the components which responsible for the

anti-fungal ,anti-bacterial, anti- inflammatory, anti-viral, and anti-cancer activities of propolis (Sahinler & Kaftanoglu, 2005). Propolis medication has shown a great improvement in the recovery of the body weight loss and treatment of kidney weight in diabetic patients. It has also strong automotive effect on control of metabolism(Abo-Salem et al., 2009). The propolis extract has also been reported to contain flavonoids, amino acids, terpenes and derivatives of cinnamic acid (Khayyal et al., 1993). Most phenolic compounds were indicated during using ultraviolet and IR spectroscopic analyses (Cabral, 2016; Gonzalez et al., 2019); pharmacological flavonoids were also identified in propolis (Bonvehí & Coll, 1994). The basic structure of flavonoids has been displayed in figure 1. Many chemical contents of propolis were characterized by using high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (Zeitoun et al., 2019). The propolis contains 156 components of which phenolics are most important owing to their participation in various biochemical activities (V Bankova et al., 1994). Flavonoids without β -ring substituents are the peculiar property of temperate zone of propolis; they include chrysin, pinocembrin, galangin (a flavonol) and pinobanksin (an antioxidant). Caffeic acid phenethyl ester is a major component of temperate propolis having versatile biochemical activities, such as inhibition of cell proliferation, hindrance of nuclear factor κ -B (kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), induction of apoptosis and cell cycle arrest (Huang et al., 2014). Figure 2 shows the important chemical ingredients of propolis. Table 1 displays the components present in various extracts of propolis.

Propolis can be analyzed for the presence of some mineral contents and toxic trace elements by near infrared spectroscopy with a remote reflectance fibre-optic probe. This procedure can be applied to a variety of samples for the determination of Pb, Cu, Ni, Cr, Zn, P, Mg, K, Fe, Ca, Al and is able to detect the toxic elements e.g., Pb, Cu, Zn in a very short time of 3-4 minutes. The method finds applications in the commercialization of propolis in order to ensure its safety before use (González-Martín et al., 2015).

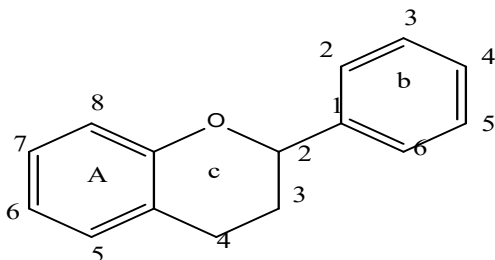


FIGURE 1. Basic structure of flavonoids (Russo & Speranza Sánchez, 2006)

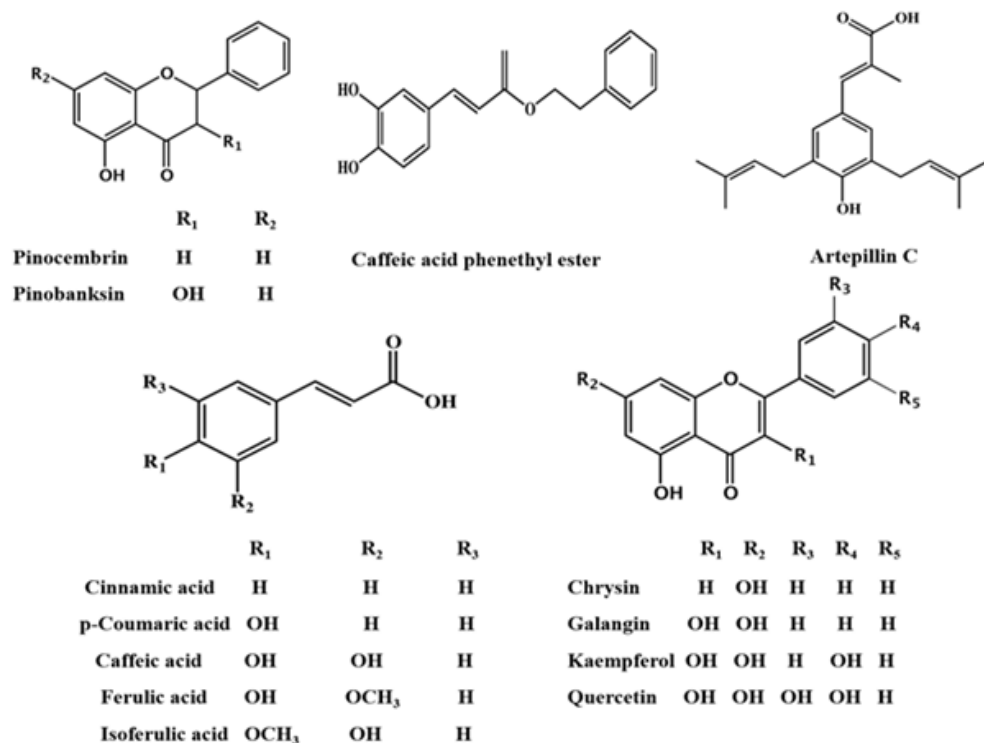


FIGURE 2. Chemical components in propolis (Cui-ping et al., 2014)

TABLE 1. Chemical components present in various solvent extracts of propolis (Cauch-Kumul & Campos, 2019)

Methanol	Water	Ethanol	Chloroform	Ether	Dichloromethane	Acetone
Phenols	Saponins	Tannins	Terpenoids	Alkaloids	sterols	Flavonoids
Anthocyanin	Anthocyanin	polyphenols	Flavonoids	coumarone	Terpenoids,	-
lactones, flavones	polypeptides	polyacetylene	-	terpenoids	tannins	-
xanthoxylin	tannins	Terpenoids	-	-	polyphenols	-
terpenoids	lectins	alkaloids	-	-	alkaloids	-
polyphenols	terpenoids	sterols	-	-	polyacetylene	-

BIOMEDICAL POTENTIAL OF PROPOLIS

Propolis has been used in traditional medicine (Simone-Finstrom & Spivak, 2010). Propolis is largely investigated for the possible development of new medications integrated with control of *Candida albicans* and modulation of immune system (Gavanji & Larki, 2017). It has a large number of beneficial biological activities including antiviral, antifungal and antibacterial potential. Its use as a dietary supplement helps in the prevention of diseases and is used as a part of numerous biopharmaceuticals (de Groot, 2013).

The antimicrobial effects are owed to chrysis, volatile compounds (coumaric acid), proto catechuic acid and terpenoids. The inter-action of ethanoic propolis along with calcium hydroxide is thought to be responsible for intracranial medication and antibacterial activity. In upcoming era, the effect of propolis would be focused on other anaerobic bacteria which are involved in endodontic infections.

During teeth injury, propolis is one of the best remedy for vitality of the periodontal ligament (PDL) cells; it also acts better than Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), as more PDL cells survive milk and serum. Propolis works as a best storage medium for transport needed to carry the teeth to dental clinic. Propolis decreases the number of positive TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) of giant cells and has an inhibitory effect on the initial phase of osteoclast genesis. Propolis increases osteoprotegerin expression and decreases the number of osteoclasts therefore inhibiting osteoclast genesis. This inhibitory effect is dose-dependent (Kousedghi et al., 2012).

ANTIMICROBIAL EFFECTS

Edible films based on ethanol extract (different concentrations) of propolis and hydroxypropylmethylcellulose were tested for antifungal studies against *Penicillium italicum* and *Aspergillus niger*. A significant antifungal potential of the composite films was observed especially against *Aspergillus niger* (Pastor et al., 2010).

The antimicrobial effects are owed to chrysis, volatile compounds (coumaric acid), proto catechuic acid and terpenoids. The inter-action of ethanoic propolis along with calcium hydroxide is thought to be responsible for intracranial medication and antibacterial activity. In upcoming era, the effect of propolis would be focused on other anaerobic bacteria which are involved in endodontic infections. One study showed that flavonoid in propolis may inhibit bacterial growth in the vibration perception threshold (VPT) testing by reducing host responses to bacterial antigens (Kousedghi et al., 2012).

ANTIVIRAL POTENTIAL

For antiviral effects, specific esters derivatives of cinnamic acids were studied for their inhibitory potential against influenza virus. For this purpose, some substances were synthesized which are related with petroleum ether fractions (Serkedjieva et al., 1992).

ANTIOXIDANT ACTIVITIES

Antioxidant activities of alcoholic and aqueous extracts (EEP) of propolis from different origins have been studied extensively worldwide (Noureddine et al., 2017). Propolis in dry form have been found to show significant antioxidant properties (Marquele et al., 2006).

CYTOTOXIC ACTIVITY

There were investigations on breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells, glioblastoma U251 cells and Jurkat leukemic T-cells to see the effects of *Lebanese propolis* on the cell cycle distribution. It was concluded that significant anti-proliferative activity and cytotoxicity is exhibited by L. propolis (Noureddine et al., 2017).

SKIN TISSUE ENGINEERING AND IN WOUND DRESSING

Electrospinning of propolis/polyurethane blend solution can be used to prepare successfully biocompatible propolis loaded polyurethane (propolis/PU) nanofibers. Due to adhesive properties of propolis, its increasing amount in the blend can be used to point-bond the composite nanofibers. The mechanical strength and hydrophilicity of the fibrous membrane can be improved by incorporating small quantity of propolis through PU matrix. Fibroblast cells were seeded on the matrix in order to assay the cell behavior and cytocompatibility on the composite scaffolds. It was found that cell compatibility was improved by incorporating propolis into PU fibers. Furthermore, significant antibacterial potential was exhibited by composite nanofibers. So, a greater potential in skin tissue engineering and in wound dressing was observed by as-synthesized nanocomposite fibrous mat (Kim et al., 2014). There were investigations on the incorporation of the propolis extract into natural rubber matrix. It was concluded that the extent of propolis incorporation plays a decisive role in antimicrobial activity, wettability and surface morphology. Also the possibility of obtaining a non-adhesive, translucent and flexible membrane was verified. It was suggested that such kind of a system may be less toxic and significantly effective in burn dressing and other clinical uses (Silva et al., 2014). Silver nanoparticles and ethanolic extract of propolis were delivered by using an electrospun biocompatible (non-water-soluble but hydrophilic) polylactic acid nonwoven material. This combination was found highly effective in wound healing and excellent antibacterial protection. Also the presence of propolis extract and/or silver nanoparticles have resulted in the formation of denser mats with thicker polylactic acid microfibers (average diameter = 168 ± 29). By the addition of 20% wt and 10% wt ethanol, there was increase in the average diameter of the microfibers to 370 ± 30 and 318 ± 40 , respectively. The diameter was increased to 371 ± 25 and 282 ± 25 by adding 20% wt and 10% wt, respectively of propolisethanolic extract (Adomavičiūtė et al., 2017).

COSMETIC APPLICATIONS

Propolis can be used as a useful constituent of biocosmetics (de Groot, 2013). From the rheological and textural feature's point of view, lipsticks having absence/presence of propolis were tested and found to be beneficial and productive for the purpose of make-up. No dyes, fragrances, preservatives or synthetic compounds were used in the production of investigated lipsticks. The propolis was found effective additive for the production of cosmetics. The viscoelastic properties of the lipsticks were significantly protected by the presence of propolis in lipsticks. Moreover, the lipsticks with added propolis were found to be prone to crushing and more brittle. Low deformation conditions were used to test the properties of lipsticks from rheological point of view; some structural changes were indicated, probably due to the structure consolidation. The textural characteristics of these lipsticks were not significantly changed by increasing the temperature (30°C) (Goik et al., 2015). Viscoelasticity and texture of numerous pharmaceutical based gels based on propolis were studied. The construction of hydrogels is performed in such a manner that rate of formation of blood vessels and regeneration of tissues is taken place at a very accelerated rate (Osser et al., 2014). Propolis has a large number of varieties; the composition and variety of propolis depend upon the composition of plants (Park et al., 2000).

ANTI-DIABETIC EFFECTS

Conduction of tests in vitro as well as in vivo demonstrated that flavonoid may have anti-diabetic effects which are owed to the presence of a natural substance in propolis, which has become the cause of lowering postprandial glucose. The trend of occurrence of non-insulin dependent diabetes mellitus in the population of the developed county is increasing day by day (Kurek-Górecka et al., 2014).

NATUROPATHIC ALTERNATIVE TO ANTIBIOTICS

Propolis has become naturopathic medicine against antibiotics in treatment of minor burns (Gregory et al., 2002). Ethanolic extract of propolis (EEP), is well known for its remarkable anti-bacterial activity. It was prepared in culture medium with eight different antibiotics, having a fixed amount of a standard strain of bacteria (*Staphylococcus aureus*). Ethanolic extract of propolis (EEP) had a moderate effect on other, except ampicillin which has remarkable synergistic effect on the anti-bacterial activity of streptomycin and cloxacillin (Ikeno et al., 1991).

APPLICATION IN DENTISTRY

Propolis has been found to be advantageous in many aspects, including prevention of dental caries (Parolia et al., 2010) and targeting chemotherapy-induced mucositis (Abdulrhman et al., 2012). The applications of propolis-based preparations in various specialties of dentistry and oral cavity diseases have been investigated (VK, 2014).

PHARMACEUTICAL APPLICATIONS

Propolis has been extensively used due to its antimicrobial and pharmaceutical properties, whereas its use as an antifungal agent in agriculture has been assessed recently (Curifuta et al., 2012). Much of work has been done for the feed mixture on selected parameters of mineral profile of broiler chickens. Many researches are focusing on the effects of other natural substances and phyto additives on mineral profiles of broiler chickens (Petruska et al., 2012). Propolis has been inclusively employed by myriad of civilizations for the treatment of wounds, colds, and ulcers owing to its local anesthetic and antiseptic properties. Taiwanese green propolis has been reported not only for the protection of liver from the pathogenesis of fibrosis but also for the renal tissue against toxicity. Propolis extract has great anti-parasitic as well as the antiprotozoal activity (Khazaei, 2016).

PHARMACOLOGICAL ACTIVITY

In the start of nineteenth centuries, pharmaceutical uses of propolis were reported. The propolis vaseline having antibacterial behavior, was prepared and used as medication in Anglo Boer war. It finds uses in healing of wounds, tissue regeneration in surgery, for securing dressing to wounds, for inhalations. Yellow beeswax is used as an additive for the preparations of styptic creams, a sterile mixture of beeswax can be used to prevent hemorrhage during cranial surgery; the treatment of rheumatism and gout by the use of ointments, have been reported recently. In the present studies, clinical treatment of mycotic infection and eczema was also investigated. Advancements in ointments activity, drugs, therapy were evaluated (Ghisalberti, 1979).

MULTIFUNCTIONAL BEHAVIOR

The products containing propolis have increased uses as a dietary supplement and have extensive dermal contact. It has been largely reported as a natural remedy due to its antitumour, antiviral, antifungal and antibiotic potential. Although some allergic reactions of propolis have been reported, yet propolis is relatively non-toxic (Burdock, 1998). Investigation has revealed inhibitory effects on lymph proliferation and other prospective to the immune system (J. Sforcin, 2007). Increased numbers of cases of allergic contact dermatitis are reported especially in those individuals who use propolis in self treatment of numerous diseases or use in bio-cosmetics. The flavonoid aglycones and the other phenolic constituents present in bud secretion of poplar are effective for hypersensitivity (Hausen et al., 1987). Propolis extracts contain a complex mixture of natural ingredients so it displays a broad spectrum of biological potential. They are important from economical point of view and possess anticancer, antitumor, immunomodulatory, anti-inflammatory and antioxidant potential. They may be used for inexpensive treatment of cancer (Watanabe et al., 2011). Propolis shows inhibitory effects on protein synthesis

and cell division. It also demonstrates apoptotic effect *via* inhibiting telomerase expression (Gunduz et al., 2005). In blood, various concentrations of propolis were determined for total leukocyte count and granulocytes. A decrease in level of aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase was found. Hematological and biochemical protective effects of propolis were investigated. At the same time commercial demand of volatile components of propolis for its fragrance and biological activities played a vital role in food additives (Vassya Bankova et al., 2014). Many civilizations kept on using propolis because of being a natural drug. On industrial scale, it includes candies, shampoos, antiseptic mixtures, skin lotions, chocolate bars and toothpastes. In Second World War propolis emphasized a great role in treatment of wounds when no antibiotic was available at that time. Pharmacological properties like immune modulatory action, a low-cost potential anti-inflammatory agent, especially for muscles and articulations and other types of inflammations, infections, rheumatism and torsions were studied and remedies were being provided with excellent results (Ramos & Miranda, 2007).

The importance of propolis extracts in different fields of medicines has been generally recognized (Talas & Gulhan, 2009). For the sake of making progress by using natural products in medicine, it is essential to take into account of restrictive factors. Propolis has been known for centuries as herbal remedy for curing infections. The benefits of propolis are more which are not ignorable. Researchers have started to study it at monotonous level. Synergies can be predicted and understood by studying the mechanism of action of active constituents of propolis (Cheng & Wong, 1996). By use of propolis, the chances of detecting positive contact in medicaments, in cosmetics or in perfumes used are tested and results are recorded (Jappe et al., 2005). The most important function of propolis is to modulate the immune system (Borba et al., 2015). The major constituents of propolis i.e. caffeic acid and phenethyl ester have good anti-inflammation and anti-tumor activities (Chang et al., 2017). Owing to anti-septic, anti-inflammatory and anti-oxidant properties of propolis, manufacturers are being attracted towards its outstanding benefits. The addition of honey in propolis contents is becoming more common in the food industry along with medicinal benefits. We believe that the grounds are set in terms of utilization of propolis as a useful product (Matos et al., 2015). For the explanation of propolis mechanisms of action *in vitro* as well as *in vivo*, many attempts had been carried out but the most of propolis' targets and actions are still not clear. Further investigation should be made to obtain new drugs (Sforzin, 2016). It is expected that scientists would become able to connect a peculiar chemical type with a specific type for biological activity. They will formulate directions for promoters. For the study of traumatic injuries, common people would be able to use the beneficial properties of propolis. Advanced studies on the active constituents of propolis are firmly needed in order to identify their biological effects. More tasks including bioavailability, effective doses for management of disease and stable preparation are needed (Martinotti & Ranzato, 2015).

CONCLUSIONS

Propolis is a natural compound with remarkable known characteristics since ancient Greek time. It comprises of a wide range of chemical compounds with fast biological actions. It is rich in phenolic components and is considered as a useful product for different traditional medicines including herbal medicines. Propolis extracts possess antimicrobial activity, antioxidant activity, anti-diabetic effects and commonly find applications in clinical field. The chemical composition of propolis is co-related with biological activities; as a result this standard commodity should be used in complementary therapies.

REFERENCES

- [1] Abdulrhman, M., Samir Elbarbary, N., Ahmed Amin, D., Saeid Ebrahim, R., 2012. Honey and a mixture of honey, beeswax, and olive oil–propolis extract in treatment of chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized controlled pilot study. *Pediatric hematology and oncology*, **29**(3): 285-292.
- [2] Abo-Salem, O. M., El-Edel, R. H., Harisa, G., El-Halawany, N., Ghonaim, M. M., 2009. Experimental diabetic nephropathy can be prevented by propolis: effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. *Pak J Pharm Sci*, **22**(2): 205-210.
- [3] Adomavičiūtė, E., Pupkevičiūtė, S., Juškaitė, V., Žilnius, M., Stanys, S., Pavilionis, A., Briedis, V., 2017. Formation and investigation of electrospun PLA materials with propolis extracts and silver nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials*, **2017**.
- [4] Ahuja, V., Ahuja, A., 2011. Apitherapy-A sweet approach to dental diseases. Part II: Propolis. *Journal of Advanced Oral Research*, **2**(2): 1-8.
- [5] Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Pureb, O., Bocari, G., 1994. Volatile constituents of propolis. *Zeitschrift für Naturforschung c*, **49**(1-2): 6-10.
- [6] Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B., 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, **8**(1): 28.
- [7] Bankova, V. S., de Castro, S. L., Marcucci, M. C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, **31**(1): 3-15.
- [8] Bonvehí, J. S., Coll, F. V., 1994. Phenolic composition of propolis from China and from South America. *Zeitschrift für Naturforschung c*, **49**(11-12): 712-718.
- [9] Borba, R. S., Klyczek, K. K., Mogen, K. L., Spivak, M., 2015. Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology*, **218**(22): 3689-3699.
- [10] Burdock, G., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, **36**(4): 347-363.
- [11] Cabral, A. C. G. (2016). *Evaluation of risk factors associated with uncontrolled blood pressure of hypertensive patients under pharmacological antihypertensive treatment*. Universidade de Coimbra (Portugal).
- [12] Cauich-Kumul, R., Campos, M. R. S. (2019). Bee Propolis: Properties, Chemical Composition, Applications, and Potential Health Effects *Bioactive Compounds* (pp. 227-243): Elsevier.
- [13] Chang, H., Wang, Y., Yin, X., Liu, X., Xuan, H., 2017. Ethanolic extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. *BMC complementary and alternative medicine*, **17**(1): 471.

- [14] Cheng, P. C., Wong, G., 1996. Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee world*, **77**(1): 8-15.
- [15] Cui-ping, Z., Shuai, H., Wen-ting, W., Shun, P., Xiao-ge, S., Ya-jing, L., Fu-liang, H., 2014. Development of high-performance liquid chromatographic for quality and authenticity control of Chinese propolis. *Journal of food science*, **79**(7): C1315-C1322.
- [16] Curifuta, M., Vidal, J., Sánchez-Venegas, J., Contreras, A., Salazar, L. A., Alvear, M., 2012. The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Ciencia e investigación agraria*, **39**(2): 347-359.
- [17] de Groot, A. C., 2013. Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, **24**(6): 263-282.
- [18] El Sohaimy, S., Masry, S., 2014. Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian and Chinese propolis. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, **14**: 1116-1124.
- [19] Ercan, N., Erdemir, E. O., Ozkan, S. Y., Hendek, M. K., 2015. The comparative effect of propolis in two different vehicles; mouthwash and chewing-gum on plaque accumulation and gingival inflammation. *European journal of dentistry*, **9**(02): 272-276.
- [20] Farooqi, A. A., Romero, M. A., Aras, A., Qureshi, M. Z., Wakim, L. H., 2019. Honey-and Propolis-Mediated Regulation of Protein Networks in Cancer Cells. *Nutraceuticals and Natural Product Derivatives: Disease Prevention & Drug Discovery*: 137-144.
- [21] Gambichler, T., Boms, S., Freitag, M., 2004. Contact dermatitis and other skin conditions in instrumental musicians. *BMC dermatology*, **4**(1): 3.
- [22] Gavanji, S., Larki, B., 2017. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. *Chinese journal of integrative medicine*, **23**(3): 201-207.
- [23] Ghisalberti, E., 1979. Propolis: a review. *Bee world*, **60**(2): 59-84.
- [24] Goik, U., Ptaszek, A., Goik, T., 2015. The influence of propolis on rheological properties of lipstick. *International journal of cosmetic science*, **37**(4): 417-424.
- [25] González-Martín, M., Escuredo, O., Revilla, I., Vivar-Quintana, A., Coello, M., Riocerezo, C., Moncada, G., 2015. Determination of the mineral composition and toxic element contents of propolis by near infrared spectroscopy. *Sensors*, **15**(11): 27854-27868.
- [26] Gonzalez, M., García, M. E., Slanis, A., Bonini, A., Fiedler, S., Fariña, L., Dellacassa, E., Condurso, C., Lorenzo, D., Russo, M., 2019. Phytochemical findings evidencing botanical origin of new propolis type from north-west Argentina. *Chemistry & biodiversity*.
- [27] Gregory, S. R., Piccolo, N., Piccolo, M. T., Piccolo, M. S., Hegggers, J. P., 2002. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, **8**(1): 77-83.
- [28] Gunduz, C., Biray, C., Kosova, B., Yilmaz, B., Eroglu, Z., Şahin, F., Omay, S. B., Cogulu, O., 2005. Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity. *Leukemia research*, **29**(11): 1343-1346.
- [29] Hausen, B., Wollenweber, E., Senff, H., Post, B., 1987. Propolis allergy: (I). Origin, properties, usage and literature review. *Contact dermatitis*, **17**(3): 163-170.
- [30] Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G., Hu, F.-L., 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, **19**(12): 19610-19632.
- [31] Ikeno, K., Ikeno, T., Miyazawa, C., 1991. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Research*, **25**(5): 347-351.
- [32] Jappe, U., Schnuch, A., Uter, W., 2005. Rosacea and contact allergy to cosmetics and topical medications—retrospective analysis of multicentre surveillance data 1995–2002. *Contact dermatitis*, **52**(2): 96-101.
- [33] Khayyal, M., El-Ghazaly, M., El-Khatib, A., 1993. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs under experimental and clinical research*, **19**(5): 197-203.
- [34] Khazaei, S., 2016. Determination of chemical composition and potential anticancer activities of *Allium atroviolaceum* extract on selected cancer cell lines.

- [35] Kim, J. I., Pant, H. R., Sim, H.-J., Lee, K. M., Kim, C. S., 2014. Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, **44**: 52-57.
- [36] Kousedghi, H., Ahangari, Z., Eslami, G., Ayatollahi, A., 2012. Antibacterial activity of propolis and Ca(OH)₂ against *Lactobacillus*, *Enterococcus faecalis*, *Peptostreptococcus* and *Candida albicans*. *African Journal of Microbiology Research*, **14**: 3510-3515.
- [37] Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., Świerczek-Zięba, G., 2014. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, **19**(1): 78-101.
- [38] Marquele, F., Stracieri, K., Fonseca, M., Freitas, L., 2006. Spray-dried propolis extract. I: physicochemical and antioxidant properties. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, **61**(4): 325-330.
- [39] Martinotti, S., Ranzato, E., 2015. Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns & trauma*, **3**(1): 9.
- [40] Matos, D., Serrano, P., Menezes Brandão, F., 2015. A case of allergic contact dermatitis caused by propolis-enriched honey. *Contact dermatitis*, **72**(1): 59-60.
- [41] Muscat, M., 2013. Use of Propolis chemical and Asian tiger mosquito bites: case report and review.
- [42] Nair, P., Duncan, H., Pitt Ford, T., Luder, H., 2008. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *International endodontic journal*, **41**(2): 128-150.
- [43] Noureddine, H., Hage-Sleiman, R., Wehbi, B., Fayyad-Kazan, H., Hayar, S., Traboulsi, M., Alyamani, O. A., Faour, W. H., ElMakhour, Y., 2017. Chemical characterization and cytotoxic activity evaluation of Lebanese propolis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **95**: 298-307.
- [44] Osser, G., Atyim, P., Toth, C., Glisici, M., Mos, L., Dărăban, A., Iacob, A., Orodan, M., 2014. Texture and viscoelasticity of various pharmaceutical gels based on propolis. *Analele Universității din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului*, **23**: 857-860.
- [45] Park, Y., Ikegaki, M., de Alencar, S., de Moura, F., 2000. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Science*, **21**(2): 85-90.
- [46] Parolia, A., Thomas, M. S., Kundabala, M., Mohan, M., 2010. Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Science*, **2**(7): 210-215.
- [47] Pastor, C., Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2010. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydrate Polymers*, **82**(4): 1174-1183.
- [48] Petruska, P., Tusimová, E., Kalařová, A., Hascik, P., Kolesárová, A., Capcarová, M., 2012. Effect of propolis in chicken diet on selected parameters of mineral profile. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **1**(4): 593.
- [49] Ramos, A., Miranda, J. d., 2007. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, **13**(4): 697-710.
- [50] Russo, R. O., Speranza Sánchez, M., 2006. Los flavonoides en la terapia cardiovascular. *Revista Costarricense de Cardiología*, **8**(1): 13-18.
- [51] Sahinler, N., Kaftanoglu, O., 2005. Natural product propolis: chemical composition. *Natural Product Research*, **19**(2): 183-188.
- [52] Salatino, A., Teixeira, É. W., Negri, G., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2**(1): 33-38.
- [53] Serkedjjeva, J., Manolova, N., Bankova, V., 1992. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products*, **55**(3): 294-297.
- [54] Sforcin, J., 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*, **113**(1): 1-14.
- [55] Sforcin, J. M., 2016. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, **30**(6): 894-905.

- [56] Silva, A. J., Silva, J. R., de Souza, N. C., Souto, P. C., 2014. Membranes from latex with propolis for biomedical applications. *Materials Letters*, **116**: 235-238.
- [57] Simone-Finstrom, M., Spivak, M., 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, **41**(3): 295-311.
- [58] Talas, Z. S., Gulhan, M. F., 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**(7): 1994-1998.
- [59] VK, S., 2014. Propolis in dentistry and oral cancer management. *North American journal of medical sciences*, **6**(6): 250-259.
- [60] Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J., Sforcin, J. M., 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **63**(11): 1378-1386.
- [61] Zeitoun, R., Najjar, F., Wehbi, B., Khalil, A., Fayyad-Kazan, M., Dagher-Hamalian, C., Faour, W. H., El-Makhour, Y., 2019. Chemical Composition, Antioxidant and Anti-inflammatory Activity Evaluation of the Lebanese Propolis Extract. *Current pharmaceutical biotechnology*, **20**(1): 84-96.

Editor –Michał Nowicki

Received: 08.11.2019

Accepted: 16.12.2019

Shabbir Hussain

e-mail: dr.shabbirhussain@lgu.edu.pk, shabchem786@gmail.com

mob # +92-3214140130

Mohsin Javed

e-mail: mohsin.javed@umt.edu.pk

mob #+92-3329033142

Muhammad Riaz

e-mail: riaz_453@yahoo.com

mob # +92-3336616321

INFORMACJE

INFORMACJA o dostępności pełnych artykułów publikowanych w PBK oraz publikacji elektronicznej

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

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

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

1. Pracę przyjętą do „Postępów Biologii Komórki” Autor może umieścić na półce MetaPress w j. angielskim. Dostęp do tej wersji pracy jest bezpłatny i wiele osób korzysta z tej wersji. Szczególnie artykuły przeglądowe, a takie publikują „Postępy”, są bardzo cenione, gdy są dostępne bez dodatkowych opłat

2. Tytuł pracy, streszczenie oraz bibliografia pozostają takie same jak w wersji polskiej. Treść pracy w j. angielskim Autor przygotowuje tak, aby odpowiadało to wersji w j. polskim. Ilustracje kolorowe są mile widziane nawet, gdy w wersji polskiej były czarno/białe

3. Przetłumaczoną przez Autora wersję pracy: tekst (ryciny – oddzielnie) należy wysłać pocztą e-mailową do prof Michała Nowickiego na adres: mnowicki@ump.edu.pl

4. Prof Nowicki wysyła ten tekst do odpowiedniego korektora j. angielskiego. Korektor językowy powinien w ciągu 1-2 tyg. odesłać poprawiony tekst prof Nowickiemu, który będzie prosić Autora o akceptację korekty

5. Poprawiony tekst po akceptacji Autora prof Nowicki przekazuje do składu a następnie jest umieszczany na stronie *Advances in Cell Biology*

6. Autor nie ponosi kosztów korekty j. angielskiego ani publikacji rycin kolorowych, jak też wersji artykułu w j. angielskim

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

Warunki otrzymywania czasopisma

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

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Poznaniu

Nr konta w BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

- po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

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

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty na rok 2020 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Świecickiego 6, 60-781 Poznań; tel. (61) 854-64-58, fax. (61) 854-64-40

email: zpodemsk@ump.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

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

Cena prenumeraty rocznika wynosi na rok 2020

dla instytucji (bibliotek) 230 zł + 8% VAT

dla odbiorców indywidualnych 83 zł + 8% VAT

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2016

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland

+48 61 854-64-58, fax. +48 61 854-64-40, email: zpodemsk@ump.edu.pl

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland, BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

Price per year 80 dollars USA or 55 euro

Cennik dla Autorów rycin i druku w 2020 r.

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

Do ceny należy doliczyć 8% VAT.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

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

Sposób przygotowania artykułów:

1. list przewodni – kierowany przez autora prowadzącego korespondencję do kolegium redakcyjnego Postępów Biologii Komórki musi zawierać
 - i. informację, że artykuł, jak dotąd, nie został opublikowany w innym czasopiśmie (z wyjątkiem streszczenia), jak i nie został wysłany do innego czasopisma celem rozważenia możliwości jego publikacji
 - ii. oświadczenie autora zajmującego się korespondencją, że wszyscy współautorzy zapoznali się z treścią artykułu i zaakceptowali jego treść
 - iii. oświadczenie o występowaniu lub braku konfliktu interesów autora/autorów artykułu
 - iv. przedstawienie zakresu pracy (ang. contribution) włożonego przez każdego z autorów artykułu w przygotowanie manuskryptu
 - v. oświadczenie, że artykuł po przyjęciu do druku w PBK przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji
2. strona tytułowa musi zawierać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona i nazwiska autorów z afiliacją, liczbę słów znajdujących się w artykule (z zastrzeżeniami podanymi wyżej), liczbę tabel i rycin, słowa kluczowe (3 – 5 słów zgodnych z Medical Subject Headings), skrót tytułu pracy (maks. 40 znaków), informację o finansowaniu artykułu oraz dane autora prowadzącego korespondencję (adres pocztowy, e-mail, numer telefonu oraz numer faxu)
3. streszczenie artykułu w języku polskim i angielskim – maksymalnie 300 słów
4. w tytule i streszczeniu można wprowadzać jedynie powszechnie przyjęte skróty (np. DNA)
5. zasadniczy tekst (Times New Roman 12 pkt., odstęp 1,5 wiersza) należy podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały (należy przyjąć następujący sposób numeracji rozdziałów i podrozdziałów: 1, 1.1, 1.1.1, 1.1.2 itd.)
6. ostateczna wersja tekstu powinna być zapisane w formacie doc. lub docx.
7. tabele wraz z opisami należy umieszczać na końcu artykułu; jednostki miar muszą być zgodne z układem SI;
8. ryciny i schematy należy zapamiętywać w formacie tiff. lub jpg. w jakości minimum 300 dpi; w przypadku publikowania mikrofotografii należy zamieszczać na nich podziałkę (scale bar); wartość podziałki należy podać w opisie mikrofotografii; jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, a zamieszcza się je w niezmienionej formie, należy podać skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na ich reprodukcję;
9. objaśnienia i podpisy rycin, zdjęć i w tabelach powinny być podane w j. polskim i angielskim
10. sposób przygotowania literatury: skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus; cytowanie literatury w tekście – z zastosowaniem nawiasu kwadratowego (np. [5]); spis literatury należy zestawzić alfabetycznie według następującego wzoru:
[1] BEN-CHETRIT E, CHAN EK, SULLIVAN KF, TAN EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988; **167**: 1560-1571.
[2] BEUTLER B. Toll-like receptors and their place in immunology. *Nature* 2004; **430**: 498-518.
[3] ELSTON CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In Page DL and Anderson TJ eds. *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987;300-311.

Opłatność (kwoty brutto)

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

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

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

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

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

TREŚĆ – CONTENTS

KOMOSA A., RZYMSKI P., PONIEDZIAŁEK B., LESIAK M.:	3
Rola płytek krwi w kardiologii klinicznej i eksperymentalnej	
The role of platelets in clinical and experimental cardiology	
SIMINIAK N., IŻYCKI D., CZEPCZYŃSKIR.:	13
Potrójnie negatywny rak piersi – perspektywy rozwojodiagnostyki i terapii	
Triple negative breast cancer – recent developments in diagnosis and treatment	
KOTAS M., TYLISZCZAK M., ZUZIĄK P., KULBACKA J., CHWIŁKOWSKA A.:	23
A review of senescence-associated therapies in glioblastoma treatment	
Przegląd terapii związanych ze starzeniem komórkowym w terapii glejaka wielopostaciowego	
BARTZ M.:	37
Modelowa paproć <i>Ceratopteris richardii</i> w badaniach nad funkcjonowaniem komórek roślinnych	
Model fern <i>Ceratopteris richardii</i> in research on the functioning of the plant cells	
SZYMAŃSKA B., CHRZAŚTEK A., PIWOWAR A.:	59
Interleukina 13 jako immunomodulator w różnych stanach chorobowych	
Interleukin 13 as an immunomodulator in various diseases	
KANWAL F., HUSSAIN S., ABID M.A., MUNAWAR K.S., AHMAD T., SULEMAN M., ABBAS A., JAVED M., RIAZ M., IQBAL M., MAZHAR M., ARSHAD S.:	83
Origin, physiochemical composition and bio-medical importance of propolis	
Informacje	97