

## Czy proces apoptozy odgrywa rolę w patogenezie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc?

### Does apoptosis play a role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?

Agata Nowicka, Halina Batura-Gabryel, Witold Młynarczyk

Katedra i Klinika Ftyzjopneumonologii AM w Poznaniu  
Kierownik: prof. AM dr hab. W. Młynarczyk

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2004, 72, 405:408**

**Key words:** Apoptosis, COPD, pathogenesis

Ze względu na dużą częstość występowania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, prowadzonych jest wiele badań mających na celu określenie czynników patogenetycznych tego schorzenia. Podejmowane są również próby określenia znaczenia procesu apoptozy w etiopatogenezie POChP.

#### Patogeneza POChP

##### *Zapalenie neutrofilowe*

Dla POChP charakterystyczny jest przewlekły proces zapalny, o charakterze zapalenia neutrofilowego. Dotyczy on głównie drobnych oskrzeli. Komórkami biorącymi udział w reakcji zapalnej są tu granulocyty obojętnochłonne, limfocyty T (CD8+) oraz makrofagi. Makrofagi są pobudzane przez dym tytoniowy oraz inne substancje drażniące do uwalniania substancji chemotaktycznych dla neutrofilów, takich jak chemokiny typu CXC (interleukina 8-IL 8, growth-related oncogene- $\alpha$ -GRO- $\alpha$ ) i mediatorzy lipidowe (leukotrien-B<sub>4</sub>-LT B<sub>4</sub>). W płucach chorych na POChP stwierdza się również zwiększone stężenie czynnika martwicy guza- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ -TNF- $\alpha$ ), który może aktywować transkrypcję czynnika jądrowego- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B- NF- $\kappa$ B), rozpoczynającego transkrypcję genu IL-8. Czynniki chemotaktyczne dla neutrofilów powodują ich szybki transport z krążenia do światła oskrzeli, a następnie uwalnianie z neutrofilów proteaz powodujących niszczenie ścian pęcherzyków płucnych oraz hipersekrecję śluzu. (1)

##### *Zaburzenie równowagi między proteinazami i antyproteinazami*

W POChP stwierdza się zwiększoną aktywność enzymów proteolitycznych, prowadzącą do destrukcji ścian pęcherzyków płucnych, a w konsekwencji do rozedmy płuc. Uważa się, że

w destrukcji mięszu płuc biorą udział różne proteazy. Głównym składnikiem aktywności elastolitycznej płuc, a także czynnikiem stymulującym wydzielanie śluzu jest elastaza neutrofilowa. Udowodniono, że enzym ten stanowi główny mechanizm elastolityczny u pacjentów z niedoborem alfa-1-antytrypsyny, natomiast u pacjentów z POChP związaną z paleniem tytoniu większą rolę odgrywają inne mechanizmy. U tych pacjentów wykazano udział katepsyn oraz metaloproteinaz macierzy (MMP), głównie kolagenazy (MMP-1), gelatynazy B (MMP-9). U pacjentów z rozedmą płuc wykazano także zwiększoną aktywność MMP-2 i MMP-12. (1) Kolagenazy biorą udział w degradacji włókien kolagenu typu I i III (zlokalizowanego w zewnątrzkomórkowej macierzy śródmięszu płuc) oraz kolagenu typu II (umiejscowionego w chrząstkach dróg oddechowych). Gelatynazy (metaloproteinazy) mają zdolność rozkładu kolagenu typu IV, głównego strukturalnego składnika błon podstawnych, są także zdolne do rozkładu elastyny. (19)

Limfocyty Tc (CD8+) również biorą udział w niszczeniu mięszu płuc poprzez uwalnianie proteolitycznych perforyn i granzymów. (1)

W POChP zwiększeniu aktywności enzymów proteolitycznych towarzyszy niedobór i zmniejszona aktywność antyproteaz, takich jak alfa-1-antytrypsyna (alfa-1-AT), inhibitor leukoproteazy wydzielniczej (SLPI) oraz tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP) (1). Uważa się, że zwiększonemu stężeniu elastazy neutrofilowej towarzyszy zahamowanie produkcji SLPI (24).

##### *Stres oksydacyjny*

Wolne rodniki (pojedyncze atomy tlenu, rodniki ponadtlenkowe, nadtlenki wodoru, hydroperoksydy) dostają się do tkanki płucnej chorych na POChP wraz z dymem tytoniowym, są także uwalniane przez komórki zapalne (neutrofile i makrofagi).

Uczestniczą one w patomechanizmie POChP poprzez zmniejszenie aktywności antyproteaz, aktywację czynnika jądrowego  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) prowadzącą do wzmożonego uwalniania IL-8 oraz TNF- $\alpha$ , zwiększenie produkcji izoprostanów, zwiększenie sekrecji śluzu, skurcz oskrzeli oraz przesiąkanie naczyń. (18)

### **Przebudowa dróg oddechowych**

Dla POChP charakterystyczne jest objęcie przez proces zapalny zarówno dużych oskrzeli, jak i oskrzelików i miąższu płucnego. W centralnych drogach oddechowych dochodzi do przerostu gruczołów śluzowych, komórek kubkowych oraz mięśni gładkich. W obwodowych drogach oddechowych głównymi komórkami nacieku zapalnego są limfocyty T CD8+, makrofagi i neutrofile. Przerost komórek kubkowych i ich obecność w miejscach gdzie zwykle nie występują (oskrzeliki końcowe) prowadzi do upośledzenia mechanizmów oczyszczania śluzowo-rzęskowego. Dochodzi do przerostu mięśniówki gładkiej, a także do utraty części przyczepów przegród międzypęcherzykowych do oskrzelików. Zmiany te prowadzą do pogrubienia ścian oskrzeli i zwężenia ich światła. Za upośledzenie przepływu powietrza w drogach oddechowych odpowiedzialny jest również proces włóknienia. Zmiany zapalno-włókniste w przebiegu POChP nazywane są obliterative bronchiolitis. Dochodzi tu do powtarzających się cykli uszkodzenia i naprawy ściany dróg oddechowych, co jest przyczyną przebudowy ścian dróg oddechowych, powstawania tkanki bliznowatej, która trwale zwęża światło dróg oddechowych. (10, 18)

### **Apoptoza**

Jednym z czynników patogenetycznych POChP, głównie rozedmy płuc, może być apoptoza.

Apoptoza nazywana także programowaną śmiercią komórki jest fizjologiczną formą śmierci komórki umożliwiającą utrzymanie homeostazy ustroju. Proces ten odgrywa kluczową rolę zarówno w rozwoju prawidłowych tkanek (8) jak i powstawaniu takich schorzeń jak rak (w tym także rak płuca), choroby immunologiczne, neurodegeneracyjne czy infekcje wirusowe (w tym AIDS).

Komórki podlegające apoptozie ulegają obkurczeniu, w błonie komórkowej pojawiają się wyrzuszenia, dochodzi do kondensacji chromatydy i fragmentacji DNA. Efektem końcowym jest powstanie ciałek apoptotycznych otoczonych błoną komórkową, które są fagocytowane przez makrofagi oraz komórki sąsiadujące, co pozwala uniknąć reakcji zapalnej.

Komórki podlegają apoptozie po odebraniu sygnału apoptozy za pośrednictwem określonych struktur. Do podstawowych szlaków indukcji apoptozy należą: droga receptorowa (zewnątrzpochodna) i mitochondrialna (wewnątrzpochodna) (23). Droga receptorowa uzależniona jest od obecności receptorów powierzchniowych, zwanych receptorami śmierci, które indukują programowaną śmierć komórki poprzez wiązanie się ze swoimi naturalnymi ligandami. Do receptorów tych zaliczamy Fas (CD95/APO-1), TNF-R1, DR3 (APO-3), DR4 (APO-2) i DR5. (17, 6) Receptory te to białka przez błonowe, charakteryzujące się podobieństwem strukturalnym i funkcjonalnym. W swych regionach zewnątrzkomórkowych zawierają domenę bogatą w cysteinę, natomiast regiony wewnątrzkomórkowe nazywane domenami śmierci biorą udział w wiązaniu z ligandami, co jest niezbędne dla indukcji procesu apoptozy. (6)

Do najlepiej poznanych induktorów apoptozy należy układ Fas/Fas-ligand.

Fas (CD 95) to białko powierzchniowe zbudowane z 319 aminokwasów z pojedynczą domeną przez błonową. Należy do rodziny receptora wzrostu nerwów- receptora czynnika martwicy guza (TNF) (białko błonowe typ I). (16) Ekspresję Fas wykazują takie tkanki jak tkanka grasicy, serca, płuc, wątroby i jajników, nie wykazuje jej natomiast tkanka mózgu czy śledziony.

Fas-ligand (Fas-L) to białko błonowe typu II należące do rodziny czynnika martwicy guza (TNF). Fas-ligand wykazuje ekspresję przede wszystkim na aktywowanych limfocytach T. Połączony z błoną komórkową ludzki Fas-ligand jest przekształcany do formy rozpuszczalnej (sFas-L). sFas-ligand to glikoproteina (26 kDa) składająca się z zewnątrzkomórkowego regionu Fas-ligand.

Inhibitorem apoptozy jest sFas- przypominający budową Fas pozbawiony domeny przez błonowej. sFas blokuje apoptozę poprzez zahamowanie wiązania Fas, Fas-L lub sFas-L przez błonę komórkową. Poziom sFas w surowicy wzrasta w toczeniu rumieniowatym oraz białaczkach T- i B- komórkowych. (27)

Stymulacja apoptozy przez Fas rozpoczyna się poprzez wiązanie cząsteczki Fas-L, co doprowadza do powstania DISC (death-inducing signaling complex). W jego skład oprócz cząsteczki Fas wchodzi: białko adaptacyjne FADD (Fas-associated death domain) oraz prokaspaza-8, nieaktywna forma (zymogen) kaspazy-8, należącej do rodziny kaspaz. Po aktywacji kaspazy-8 przesyłanie sygnału apoptozy zależne od Fas biegnie dwoma drogami: szlakiem proteolitycznym za pośrednictwem kaskady kaspaz oraz szlakiem mediatorów lipidowych. (6)

Szlak mitochondrialny przesyłania sygnału apoptozy zależy od zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej. W regulacji tego procesu biorą udział białka błonowe należące do rodziny Bcl-2 (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim), które doprowadzają do uwolnienia z mitochondrium do cytoplazmy cytochromu c, gdzie łączy się on z białkiem Apaf-1 i prokaspazą-9, doprowadzając do aktywacji kaskady kaspaz. (11, 23)

Kaspazy to proteazy cysteinowe, odgrywające kluczową rolę w procesie apoptozy. Wspólną cechą tych enzymów jest proteoliza białkowych substratów w miejscu reszty karboksylowej kwasu asparaginowego. (11, 23) Kaspazy podzielone zostały na kaspazy indukujące (kaspaza-8, -9, -12) oraz efektorowe (kaspaza-3, -6, -7). Enzymy te mają zdolność niszczenia białek enzymatycznych i efektorowych, co w końcowej fazie apoptozy doprowadza do całkowitej dezintegracji komórki. (23)

Udowodniono, że proces apoptozy jest jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój takich schorzeń płuc jak astma (26), pylica krzemowa (3, 4), rak płuca (22, 2), sarkoidoza (21, 7), zwłóknienie płuc (13, 14). Wiele doniesień sugeruje, że proces ten leży u podłoża rozedmy płuc u zwierząt (5, 9) i u ludzi (20, 19, 15, 12). Problem ten wzbudza jednak wiele kontrowersji. R. M. Senior podsumowując konferencję Mechanisms of COPD stwierdził, że apoptoza ścian mikronaczyń płucnych może poprzedzać rozwój rozedmy i może być związana z utratą przesyłania sygnału przez jeden z receptorów VEGF (vascular endothelial growth factor- czynnik wzrostu endotelium naczyń) na komórkach endotelium. Zadaje także pytanie, czy obecność limfocytów w rozedmowej tkance płucnej równocześnie z ekspresją Fas w nabłonku oskrzelików i pęcherzyków płucnych może świadczyć o działaniu systemu Fas-Fas-ligand, którego wynikiem jest wzmocniona apoptoza strukturalnych komórek płuc. (20)

Rolę VEGF oraz jego receptora KDR (kinase insert domain-containing receptor) w rozedmowej tkance płucnej badali Kasahara i wsp. Wykazali oni, że zmniejszenie ekspresji lub aktywności VEGF lub KDR w płucach poprzedza rozwój rozedmy spowodowanej apoptozą. (12) Również Segura-Valdez i wsp. wykazali wzmocnioną apoptozę w tkance płucnej pacjentów z POChP. Apoptoza dotyczy głównie komórek śródbłonka naczyń włosowatych i arterioli płuc, czasami również komórek nabłonka pęcherzyków, komórek śródmiąższowych oraz komórek zapalnych. Udowodnili oni, że apoptoza, przynajmniej częściowo, odpowiedzialna jest za utratę włókniczek i pęcherzyków płucnych w trakcie rozwoju rozedmy płuc. (19). Majo i wsp. stwierdzili, że apoptoza może być jednym z mechanizmów destrukcji płuc prowadzącym do powstania rozedmy, szczególnie u palaczy. (15)

Yasuda i wsp. wykazali, że wzrost poziomu sFas, inhibitora apoptozy, w surowicy związany jest z progresją przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. (27) Natomiast Takabatake i wsp. wykazali istotny statystycznie wzrost poziomu TNF-alfa i rozpuszczalnych receptorów TNF (sTNF-Rs) we krwi, nie wykazali natomiast wzrostu poziomu sFas-ligand w surowicy krwi i sFas w osoczu osób chorych na POChP w porównaniu z osobami zdrowymi. Uważają zatem że apoptoza indukowana przez system Fas-Fas-ligand nie jest niezależnym czynnikiem patogennym POChP. (25) Pod uwagę należy wziąć jednak fakt, że badano tu poziom aktywatorów i inhibitorów apoptozy we krwi, gdzie mogą być one niewykrywalne. Wcześniej cytowane prace (19, 20) odnosiły się do procesu apoptozy badanego lokalnie w tkance płucnej (pęcherzyki płucne, naczynia włosowate). Natomiast odmienne wyniki prac Yasudy i Takabatake mogą wynikać z faktu, że pierwszy w swych badaniach ujął chorych z zaostreniem POChP (wysokie CRP), natomiast drugi pod uwagę brał chorych w stanie stabilnym.

Rola procesu apoptozy jako czynnika patogennego POChP nie została do końca poznana. Wzbudza ona nadal wiele kontrowersji. Konieczne są dalsze badania, które wyjaśniłyby mechanizm procesu śmierci komórki w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc. Wyjaśnienie tych problemów mogłoby w przyszłości pomóc w poszukiwaniu nowych leków, które skutecznie hamowałyby proces progresji zmian w budowie drzewa oskrzelowego.

Ryc. 1 Proces apoptozy indukowany przez Fas

DD – death domain – domena śmierci  
 FADD – Fas associated death domain – domena śmierci  
 związana z Fas  
 DISC – death-inducing signaling complex – kompleks sygnalizujący indukujący śmierć  
 Fas-L – Fas-ligand

## Piśmiennictwo

1. Barnes PJ: Mechanisms in COPD: Differences From Asthma. *Chest* 2000 Feb;177(2):10S-14S
2. Boldrini L i wsp: Identification of Fas (APO-1/CD95) and p53 gene mutations in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2002 Jan;20(1):155-9
3. Borges VM i wsp: Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J Exp Med* 2001 Jul 16;194(2):155-64
4. Borges VM i wsp: Apoptosis underlies immunopathogenic mechanisms in acute silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002 Jul;27(1):78-84
5. Buckley S i wsp: Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats. *Am J Physiol* 1998; 274:L714-L720
6. Condo I, Testi R: Intracellular mediators of programmed cell death initiated at the cell surface receptor Fas. *Transplant Int* 2000, 13 [Suppl 1]: S 3- S 6
7. Domagała-Kulawik J i wsp: Expression of Fas antigen in the cells from bronchoalveolar lavage fluid (BALF). *Folia Histochem Cytobiol* 2000; 38(4): 185-8
8. Fellstrom B., Zezina L.: Apoptosis: friend or foe? *Transplantation Proceedings* 2001, 33, 2414-2416
9. Fine A. i wsp: Apoptosis in lung pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L423-L427
10. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2001, CV, Suplement
11. Gupta S.: Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sciences* 2001, 69: 2957-2964
12. Kasahara Y i wsp: Expression of 15-lipoxygenase and evidence for apoptosis in the lungs from patients with COPD. *Chest* 2000 May; 117 (5 Suppl 1): 260S
13. Kuwano K i wsp: Increased circulating levels of soluble Fas ligand are correlated with disease activity in patients with fibrosing lung diseases. *Respirology* 2002 Mar;7(1):15-21
14. Kuwano K i wsp: The involvement of Fas-Fas-ligand pathway in fibrosing lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 Jan;20(1):53-60
15. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG: Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001, 17:946-953
16. Peter ME, Krammer PH: Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas) – mediated apoptosis. *Current Opinion in Immunology* 1998, 10:545-551
17. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO: Advances in apoptosis research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 12736-12737
18. Płusa T, Jahnz-Różyk K: *Astma oskrzelowa i przewlekła obturacyjna choroba płuc*. MEDPRESS, Warszawa 2001, str. 99-100, 123-125
19. Segura-Valdez L i wsp: Upregulation of Gelatinases A and B, Collagenases 1 and 2, and Increased Parenchymal Cell Death in COPD. *Chest* 2000; 117:684-694
20. Senior RM: Mechanisms of COPD. Conference Summary. *Chest* 2000; 117:320S-323S
21. Shikuwa C i wsp: High concentrations of soluble fas ligand in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Respiration* 2002, 69(3):242-6
22. Shin MS i wsp: Alterations of Fas-pathway genes associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2002 Jun 13;21(26):4129-36
23. Smolewski P, Grzybowska O: Regulacja procesu apoptozy komórek w celach terapeutycznych- dotychczasowe doświadczenia i perspektywy rozwoju. *Acta Haematologica Polonica*. 2002, 33(4): 393-401
24. Stockley RA: New Approaches to the Management of COPD. *Chest* 2000 Feb;177(2):10S-14S
25. Takabatake N i wsp: Circulating levels of soluble Fas ligand and soluble Fas in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine* 2000; 94:1215-1220
26. Trautmann A i wsp: T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002 Feb;109(2):329-37
27. Yasuda N i wsp: An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Respiratory Medicine* 1998; 92:993-999

Wpłynęła: 10.07.2003

Adres: Klinika Ftizjopneumonologii AM, ul. Szamarzewskiego 84, 60-569Poznań