

Apoptoza w schorzeniach układu naczyniowego – implikacje kliniczne, przegląd piśmiennictwa

Apoptosis in vascular diseases – clinical implications, review of the literature

Tomasz Urbanek¹, Barbara Skop², Tadeusz Wilczok², Urszula Mazurek², Ryszard Wiaderkiewicz³

¹Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice (Department of General and Vascular Surgery Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

²Katedra Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji Śląskiej Akademii Medycznej, Sosnowiec (Department of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy Medical University of Silesia, Sosnowiec, Poland)

³Katedra Histologii i Embriologii Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice (Department of Histology and Embryology Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

Streszczenie

Od czasu odkrycia zjawiska programowanej śmierci komórki każdy rok przynosi coraz więcej informacji na temat roli, jaką spełnia apoptoza w procesach fizjologicznej przebudowy organizmu oraz w stanach chorobowych. Postęp technik biologii molekularnej pozwala obecnie na wykrycie bardzo wczesnych etapów śmierci apoptotycznej wzrasta także wiedza w zakresie czynników indukujących i regulujących to zjawisko, ze szczególnym uwzględnieniem schorzeń nowotworowych oraz zmian naczyniowych. W pracy przedstawiono przegląd piśmiennictwa dotyczący znaczenia programowanej śmierci komórki w chorobach układu naczyniowego.

Słowa kluczowe: apoptoza, choroby naczyń, patogeneza

Abstract

Since the time of the first apoptotic death descriptions a lot of new information concerning the importance of this process has been discovered. There are still more and more data about clinical implications of this knowledge in physiological conditions and pathological states. The technical progress concerning molecular biology allows to detect very early stages of this process — on the other hand, the knowledge concerning stimuli factors and regulatory mechanisms of PCD still increases. Special interest is focused on neoplastic and vascular diseases and also on research concerning apoptotic pathways and their modulatory mechanisms. In the paper, the review of the literature describing the role of apoptosis in the vascular diseases was presented.

Key words: apoptosis, vascular diseases, pathogenesis

Wstęp

Od czasu wprowadzenia w 1972 roku pojęcia „apoptoza”, określającego tak zwaną programowaną śmierć komórki, uzyskano wiele informacji na temat czynników wpływających na jej występowanie oraz mechanizmów regulujących [1, 2]. Istnieje także coraz więcej danych podkreślających znaczenie kliniczne powyższych odkryć [1, 2]. Do apoptotycznej śmierci komórki może docho-

Introduction

The term “apoptosis” describing programmed death of cells was firstly introduced in 1972. Since this time a lot of new information concerning apoptosis regulatory mechanisms and factors that can induce this process has been discovered [1, 2]. There are still more and more data about clinical implications of this knowledge [1, 2]. In the physiological conditions apoptotic death occurs during embry-

dzić w warunkach fizjologicznych w okresie rozwoju organizmu, jak też w trakcie przemian, których celem jest zachowanie homeostazy tkanek. Osobnym zagadnieniem jest występowanie programowanej śmierci komórki (PCD, *programmed cell death*) w przypadku procesów patologicznych zachodzących pod wpływem czynników środowiskowych oraz w różnego rodzaju stanach chorobowych [1]. Charakterystyczne cechy morfologiczne komórki apoptotycznej, począwszy od zmian w obrębie struktur błonowych, poprzez kondensację cytoplazmy i charakterystyczne zmiany w obrębie jądra komórkowego i chromatyny, prowadzące do powstania „ciałek apoptotycznych”, to najczęściej opisywane zjawiska w komórce podlegającej programowanej śmierci [2].

Obecnie postęp technik biologii molekularnej umożliwia wykrycie bardzo wczesnych etapów tego procesu. Równocześnie coraz więcej wiadomo także o mechanizmach regulujących i inicjujących apoptozę [3]. Coraz większe jest także znaczenie kliniczne tych informacji w zakresie poznania patogenezы wielu schorzeń oraz skuteczności leczenia [1, 3]. Szczególne zainteresowanie wiąże się z chorobami nowotworowymi oraz schorzeniami układu naczyniowego. Uwagę zwracają obecnie badania nad możliwościami oraz szlakami aktywacji PCD oraz analiza możliwości oddziaływania na czynniki regulujące to zjawisko. Zmiany w ekspresji pro- i anti-apoptotycznych genów (np. genów z rodziny Bcl-2) oraz aktywacja receptorów śmierci komórki to obecnie tylko niektóre ze znanych mechanizmów powodujących uczynienie procesu programowanej śmierci w komórce [4]. Podobnie, w zakresie wewnątrzkomórkowego etapu egzekucji apoptozy, do niedawna zależnej głównie od mechanizmów kontrolowanych przez enzymy z grupy proteaz (kaspazy), obecnie potwierdza się istnienie także innych szlaków [4]. W pracy przedstawiono przegląd aktualnych stanowisk dotyczących znaczenia PCD (apoptozy) w wybranych chorobach układu naczyniowego.

Żyłaki kończyn dolnych, przewlekła niewydolność żylna

Jak wykazano u chorych z przewlekłą niewydolnością żylną, przyczyną dolegliwości (w tym także często stopniowo powiększających się żylaków kończyn) jest niewydolność zastawek żylnych, powodująca powstanie przepływu wstecznego — „reflusu”. Teorie tłumaczące zjawisko występowania przewlekłej niewydolności żylny nadal nie pozwalają jednak w pełni odpowiedzieć na pytanie, co jest pierwotnym czynnikiem powodującym rozwój schorzenia. Mimo przypadków histopatologicznie potwierdzonej agenezji lub aplazji zastawek żylnych, u zaznaczonego odestka chorych nadal nie wiadomo, czy do niewydolności zastawkowej dochodzi jedynie na skutek uszkodzenia zastawki żylny, czy też jest to jedynie efekt postępującego uszkodzenia ściany żyły i jej poszerzenia (także w miejscu występującej zastawki). Biorąc pod uwagę opisywane zmiany w zakresie budowy ściany naczynia — zaburzenia dotyczące struktury oraz zawartości składników ściany żyły, ze

onal development and seems to be necessary for tissue homeostasis preservation too. Programmed cell death (PCD) is also noticed in various diseases or as a result of the influence of many environmental factors [1]. Characteristic morphology of apoptotic cells are already well described starting with membrane changes, through chromatin condensation and nucleus alterations to the presence of typical “apoptotic bodies” [2].

The technical progress concerning molecular biology allows to detect very early stages of this process — at the same time, the knowledge concerning stimulating factors and regulatory mechanisms of PCD still increases [3]. Special interest is focused on neoplastic and vascular diseases and also on research concerning apoptotic pathways and their modulatory mechanisms [1, 3]. Among many factors leading to the apoptotic cell death, an expression of pro- and anti-apoptotic genes (*e.g.* Bcl-2 family genes) and death receptor activation are well known mechanisms, however many other pathways are under investigation [4]. Concerning intracellular apoptosis execution, beside protease (caspase) activation, other ways are also recognized [4]. In the paper, a review of the literature describing the role of apoptosis in the vascular diseases was presented.

Varicose veins, chronic vein insufficiency

Incompetence of vein valves in patients with chronic vein insufficiency is the major factor responsible for the occurrence of the symptoms. Among various theories, the question concerning etiology of this pathological valve dysfunction is still discussed. Certainly, some cases of congenital agenesis or aplasia of the valves are recognized. However, in many patients it is still unknown if the valve insufficiency is the reason for the vein injury or if it occurs due to continuous dilatation of the vein wall that can lead to its incompetency. According to the described vein wall pathology, including structural morphological and matrix changes with special interest in collagen and elastin content, one of the important factors in the vessel wall homeostasis preservation is smooth muscle cell (SMC) viability and number reduction (SMCs are responsible for matrix component production and control of the proper wall structure). The reason for the SMC population decrease can be apoptosis, however in the available literature very incoherent data are presented [5]. According to Bujan *et al.* in the varicose vein wall an increased number of apoptotic cells within the internal and medial layers of the resected proximal varicose veins segments is present (using TUNEL — TdT-mediated X-dUTP nick end-labelling assay methods) [5]. There is also an important correlation between an increase of the frequency of apoptotic cells and patient age advancement. In the papers of Ascher, the frequency of PCD and expression of the Bcl-2 in patients with varicose veins was compared with the control group qualified for arterial reconstruction in the femoro-popliteal segment with an implementation of the autologous saphenous vein [6]. The apoptotic index (IxAP) describ-

szczególnym uwzględnieniem zmian liczby komórek mięśni gładkich, włókien kolagenu i elastyny — wydaje się, że jednym z czynników, które mogą być odpowiedzialne za powyższe zmiany (zwłaszcza w zakresie redukcji liczby komórek mięśni gładkich odpowiadających między innymi za produkcję składników substancji międzykomórkowej i utrzymanie prawidłowej budowy ściany naczyniowej), jest zjawisko programowanej śmierci komórki — apoptozy [5]. W dostępnej literaturze napotyka się jednak sprzeczne doniesienia. W badaniach, które przeprowadzili Bujan i wsp., wykazano znacznie większą częstość występowania komórek apoptotycznych w ścianie żyłaków w obrębie zarówno błony środkowej, jak i pogrubiałej błony wewnętrznej. Stosowano w tym celu metody wykrywające charakterystyczną dla apoptozy fragmentację DNA (TUNEL — *TdT-mediated X-dUTP nick end-labelling*) w obrębie segmentów proksymalnych usuniętych odcinków układu żylnego powierzchnowego [5]. Stwierdzono także wzrost częstości występowania komórek apoptotycznych w grupie pacjentów w starszym wieku. W pracach Aschera odnotowano częstość występowania komórek apoptotycznych oraz ekspresję Bcl-2 w żyłkach kończyn dolnych do materiału uzyskanego w grupie kontrolnej chorych poddanych rekonstrukcji naczyniowej w odcinku udowo-podkolanowym [6]. Indeks apoptotyczny (IxAP) określający liczbę komórek apoptotycznych na 100 komórek badanych w obrębie żył niezmiennych żyłakowato w 48% przypadków wynosił > 3 , ale zmiany te dotyczyły głównie komórek przydanki. W obrębie żył zmienionych żyłakowato podobne zjawisko dotyczyło zaledwie 15% preparatów. W obrębie błony środkowej i wewnętrznej nie stwierdzono zwiększonej aktywności apoptotycznej w stosunku do żył osób z grupy kontrolnej (IxAP w obrębie błony środkowej — żyła prawidłowa $0,2 \pm 0,07$ vs. żyłki $0,19 \pm 0,09$; w obrębie błony wewnętrznej — żyła prawidłowa $0,44 \pm 0,09$ vs. żyłki $0,44 \pm 0,16$). Wykorzystując badania immunohistochemiczne, nie stwierdzono także różnic dotyczących ekspresji białek z rodziny Bcl-2 w powyższych grupach chorych. We wnioskach autorzy zasugerowali, że w przypadku żyłaków kończyn może dochodzić do zahamowania występowania zjawiska programowanej śmierci komórki. Rok później ci sami autorzy w badaniu będącym kontynuacją powyższych doświadczeń starali się odpowiedzieć na pytanie, jakie mechanizmy mogą być odpowiedzialne za powyższe zaburzenia [7]. W badaniach immunohistochemicznych udowodniono znacznie wyższą immunoreaktywność pro-apoptotycznej proteiny Bax w żyłach prawidłowych niż w żyłach zmienionych żyłakowato oraz brak ekspresji białka Bax w przydankach żył zmienionych żyłakowato. W komórce apoptotycznej jedną z pierwszych proteaz podlegających degradacji do specyficznych fragmentów (o wielkości ok. 85 kD) jest PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*) — enzymem fizjologicznie odpowiedzialny za przeżycie komórki oraz naprawę uszkodzeń DNA. Ekspresja PARP była zmniejszona w grupie pacjentów z żyłakami w obrębie błony wewnętrznej i środkowej usuniętej żyły. Ekspre-

ing the number of apoptotic cells among 100 cells in the healthy vein specimens was greater than 3 in 48% of cases — however, the observed changes concerned mostly the adventitia. In the varicose veins such a result was noticed only in 15% of specimens. In the investigated group, there was also no increase in the apoptotic activity in the internal and medial wall layer (medial layer IxAP — normal vein 0.2 ± 0.07 vs. varicose veins 0.19 ± 0.09 ; internal layer — normal vein 0.44 ± 0.09 vs. varicose veins 0.44 ± 0.16). Using immunohistochemical assay no changes concerning vein Bcl-2 protein expression was found in both groups of patients. The authors suggest that in patients with varicose veins the down-regulation of apoptosis occurs. One year later, the same authors continuing the above mentioned research confirmed, in the immunohistochemical investigation, an elevated level of pro-apoptotic protein Bax in the healthy veins and lack of its expression in the adventitia of the varicose veins [7]. In this paper also a decrease of PARP expression (*Poly ADP-ribose polymerase* — an enzyme that is physiologically responsible for cell survival and DNA injury repair and in apoptotic cells is one of the first target protein undergoing degradation to the specific 85 kD fragments) was documented in the internal and medial layers of the varicose vein wall. The expression of PARP and Bax was found in the adventitia of the control group but not in the patients with varicose veins.

The above mentioned investigations (very often presenting contradictory results) do not answer all the questions concerning varicose veins etiology and do not explain the role of apoptosis in primary chronic insufficiency. The reason for such differences can be significant morphological alterations within the investigated varicose veins — it is very difficult to achieve homogenous material of the same wall thickness, cell and intercellular matrix content (especially with the same collagen fibers content). Because of typical presence of the hypo- and hyperthrophic varicose vein segments and differences related to the patient age especially in patients with long-term history of varicose vein or postthrombotic syndrome the morphological assessment of the investigated specimens is very complicated. There is the necessity of an implementation of the chronic vein insufficiency model maximally eliminating the influence of the above mentioned factors.

Atherosclerotic changes (atherosclerotic plaque, unstable atherosclerotic plaque, myocardial infarction)

Programmed cell death is documented in the atherosclerotic changes concerning the vessel wall, however, significant differences at various stages of their development were noticed [8]. Despite the information postulating an important role of apoptosis, especially in a very advanced form of atherosclerotic plaque, after optimization of the assay methods, the frequency of apoptotic cells in the plaque does not exceed 2% [9]. There are, of course, significant differences related to the stage of

sję PARP oraz Bax stwierdzano w przydatce grupy kontrolnej, nie występowała ona jednak w grupie chorych z żylakami.

Powyższe badania, których efektem były często zupełnie sprzeczne wyniki, dowodzą, że obecnie poziom wiedzy jest jeszcze ciągle zbyt niski, by można było odpowiedzieć na zadane na początku pytania oraz określić znaczenie apoptozy w rozwoju zmian o charakterze przewlekłej niewydolności żylniej. Przyczyną tak odmiennych rezultatów mogą być znaczne różnice morfologiczne w obrębie ściany żylaków — badany materiał uzyskany ze ściany żyłki jest na ogół bardzo niejednorodny, jeśli chodzi o grubość ściany, zawartość komórek oraz substancji międzykomórkowej, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w obrębie włókien kolagenowych. W związku z tym typowe jest występowanie zmian o charakterze hiper- i hipotrofii ściany naczyniowej, co w znacznej mierze może wpływać na przedstawione powyżej wyniki. Istotne są także różnice związane z wiekiem, co wymaga ściślejszego rozgraniczenia młodych chorych z pierwotną niewydolnością żylną od pacjentów z wieloletnim wywiadem choroby żyłkowej lub zespołu pozakrzepowego. Właściwe byłoby więc opracowanie i stworzenie modelu przewlekłej niewydolności żylniej z maksymalnym wyeliminowaniem działania powyższych czynników.

Zmiany miażdżycowe (blaszka miażdżycowa, niestabilna blaszka miażdżycowa, zawał serca)

W trakcie badań dotyczących znaczenia PCD w rozwoju zmian miażdżycowych wykazano obecność komórek apoptotycznych w obrębie blaszki miażdżycowej, stwierdzając jednak znacznego stopnia różnice dotyczące poszczególnych etapów jej rozwoju [8]. Pomimo wstępnych doniesień sugerujących bardzo duży udział PCD, zwłaszcza w zaawansowanym stadium badania udowodniono, że w obrębie blaszki miażdżycowej komórki o cechach charakterystycznych dla śmierci programowanej stanowią zwykle stosunkowo niewielki odsetek (< 2%), a różnice wiążą się między innymi ze stopniem rozwoju (dojrzwiania) zmian miażdżycowych [9]. Zmiany złożone głównie z komórek mięśni gładkich charakteryzują się niewielką liczbą komórek wykazujących cechy apoptotyczne. Od wielu lat rozpatruje się rolę komórek reakcji zapalnej — w tym makrofagów — w patogenezie zmian miażdżycowych. W badaniach wykazano, że występowaniu nacieków złożonych z tych komórek towarzyszy większa liczba komórek apoptotycznych w badanym preparacie. Kock i wsp., badając materiał usunięty w trakcie endarterektomii tętnic szyjnych, poddali analizie zmiany zachodzące we wczesnych i późnych fazach rozwoju blaszki miażdżycowej [10]. W obrębie zmian wczesnych, występujących w postaci pasm tłuszczowych (*fatty streaks*), stwierdzono wzmożoną ekspresję proapoptotycznej proteiny Bax w obrębie komórek mięśni gładkich (*SMC, smooth muscle cells*) [10]. O ile jednak, wykorzystując metody oceniające występowanie apoptozy na podstawie fragmentacji DNA, nie potwierdzono występowania komórek

plaque growth. In the changes with prevalence of SMCs, a small number of apoptotic cells was found. For many years the role of inflammatory cells in atherosclerosis has been emphasized and in the pathology exams an increase of PCD has been recognized in the specimens where inflammatory cell infiltrations are present. In the analysis performed by Kock and co-workers the endarterectomized material from the early and late stages of atherosclerotic carotid artery plaque was investigated [10]. In the early forms (*fatty streaks*) an expression of the pro-apoptotic Bax protein in SMCs was found [10]. However, using DNA — laddering assay, no increase of apoptotic cell number in these changes was documented. On the other hand, such cells were noticed in the advanced changes, especially in the regions of inflammatory cell infiltration (*e.g.* macrophages). This infiltrations are considered to be one of the most important factors responsible for atherosclerotic plaque instability [9, 10]. In the very advanced form of atherosclerosis only a small rate of apoptotic SMCs is present and significantly higher number of PCD in inflammatory cell population (especially macrophages) is observed [11]. In the plaque, SMCs localize in the internal fibrotic part of the plaque within the arterial intima. Macrophages are visible in the internal wall layer as well as in the regions surrounding lipid-ladder core of the plaque (including also superficial “fibrous cap”) [11, 12]. In both SMCs and macrophages an increased rate of PCD is noticed, however, significant prevalence of apoptosis in the group of macrophages is recognized [11, 12]. Apoptotic changes (of smaller advancement) concerns also SMCs of the wall media surrounding the plaque or regions of the arterial wall near the vasa vasorum junctions [8, 10, 12].

Unfortunately, despite the presented arguments, the exact role of apoptosis in atherosclerotic change etiology is still unknown — is PCD the cause and pathogenic factor of atherosclerosis or is it the result of very advanced changes? The question can be partially answered evaluating the role of atherosclerosis risk factors (*e.g.* arterial hypertension or hypercholesterolemia) in the apoptosis induction [3, 8, 13]. Another important message is the difference between the viability of SMCs derived from the plaque in comparison with normal SMC cells. For the proper growth of the SMCs the presence of growth factors is required (*e.g.* — insulin-like growth factor, platelet derived growth factor) [14, 15]. In the cultured SMCs isolated from the plaque, PCD is noticed even in their presence. One of the proposed mechanisms can be an enhanced response of isolated SMCs to protein p53 expression [12, 14–16]. In cultured plaque SMCs also an important decrease of Bcl-2/Bax index is observed [16].

Due to high complication rate, there are still more and more clinical investigations concerning atherosclerotic plaque instability [16–18]. Thrombogenic structure exposure or peripheral microembolization can be clinically important consequences of the plaque rupture [17]. In the analysis of the symptomatic carotid endarterectomy plaque, the more frequent occurrence of plaque rup-

o cechach PCD w obrębie powyższych zmian, w zmianach zaawansowanych widoczny był znacznie większy odsetek komórek apoptotycznych, głównie w okolicach objętych infiltracją komórek zapalnych (np. makrofagów). Przyjmuje się, że nacieki złożone z komórek reakcji zapalnej są jednym z najistotniejszych czynników prowadzących do zmian strukturalnych odpowiedzialnych za niestabilność blaszki miażdżycowej [9, 10]. W postaciach zaawansowanych zmian miażdżycowych apoptozę stwierdza się także w obrębie komórek mięśni gładkich, przede wszystkim dotyczy ona jednak komórek reakcji zapalnej — głównie makrofagów [11]. Komórki mięśni gładkich w obrębie blaszki miażdżycowej są zlokalizowane głównie w wewnętrznej fibrotycznej części blaszki. Makrofagi umiejscawiają się zwykle zarówno w obrębie błony wewnętrznej, jak i w okolicy otaczającej lipidowy rdzeń blaszki (w tym także w obrębie włóknistej tkanki pokrywającej jej powierzchnię — *fibrous cap*) [11, 12]. W porównaniu z prawidłową ścianą naczyń w obu grupach komórek stwierdza się zwiększenie częstości śmierci apoptotycznej z istotną przewagą w zakresie makrofagów [11, 12]. Programowana śmierć komórki (zwykle jednak znacznie mniej nasilona) dotyczy także komórek mięśni gładkich błony środkowej otaczających blaszkę oraz okolic połączeń z naczyniami odżywczymi — *vasa vasorum* [8, 10, 12].

Mimo przedstawionych doniesień świadczących niewątpliwie o istotnej roli, jaką spełnia zjawisko PCD w patogenezie zmian miażdżycowych, nadal nie wiadomo, czy apoptozę należy traktować jako początkowy etap zmian, będący istotnym czynnikiem patogenetycznym, czy też jest to obraz będący efektem daleko zaawansowanych zmian miażdżycowych. W rozwikłaniu tego problemu przydatne mogą być badania rozpatrujące wpływ niektórych znanych czynników ryzyka miażdżycy, takich jak nadciśnienie tętnicze czy hipercholesterolemia, które, jak udowodniono, mogą inicjować śmierć apoptotyczną komórki [3, 8, 13]. O odmienności komórek mięśni gładkich izolowanych z blaszki miażdżycowej świadczy także ich zmniejszona skłonność do przeżycia w hodowli — do apoptotycznej śmierci komórki dochodzi mimo obecności niezbędnych czynników wzrostowych, takich jak insulinopodobny czynnik wzrostu (*insulin-like growth factor*) oraz płytkowy czynnik wzrostu (*platelet derived growth factor*) [14, 15]. Jedną z postulowanych dróg zmian apoptotycznych w SMC izolowanych ze zmian miażdżycowych jest zwiększona odpowiedź tych komórek na ekspresję białka p53 [12, 14–16]. Obok zwiększonej wrażliwości na p53 w hodowlach tych dochodzi także do istotnego spadku współczynnika Bcl-2/Bax [16].

W badaniach klinicznych coraz więcej uwagi poświęca się także problemowi niestabilności blaszki miażdżycowej i jej powikłaniom [16–18]. Niestabilność może się wiązać zarówno z występowaniem mikroembolizacji obwodowej, jak i z rozpadem powierzchniowej struktury blaszki miażdżycowej i odsłonięciem trombogennych struktur w jej wnętrzu [17]. Analizując grupę preparatów uzyskanych w trakcie endarterektomii tętnicy szyjnej w obrębie symptomatycznych blaszek miażdżycowych, stwierdzo-

ture or superficial ulceration was observed (48% vs. 31% — asymptomatic control group) [17]. The presence of peri-parietal thrombosis (40% vs. 35%) or bleeding to the ruptured plaque (48% vs. 50%) were of slight clinical significance. In the pathological assessment of symptomatic plaque, the superficial structures turned out to be significantly thinner and in the further analysis a greater number of inflammatory infiltrating cells was present (including macrophages and T lymphocytes) [11, 17]. A factor responsible for the plaque instability can be also metalloproteinase activity that can lead to the destruction of collagen that is important for superficial “fibrous cap” stability [11, 17]. The enhancement of metalloproteinase activity can be related to the inflammatory cell infiltrations [17]. The plaque infiltrating lymphocytes stimulate secretion of this enzyme by macrophages. They can also produce interleukines that induce PCD in SMCs [10, 17]. Another pathway is the expression of Fas receptor ligand on the surface of inflammatory cells (including peripheral blood macrophages). Fas-ligand activates Fas receptor (death receptor from TNF family receptor group) of SMCs and this can lead to activation of death receptor pathway [18, 19]. This facts are confirmed by the reduction of the total SMC number within the plaque and the presence of Fas expression in the superficial regions (fibrous cap) [19]. On the other hand, the inflammatory cells, beside Fas-L expression can be also responsible for p53 induction or direct apoptosis activation due to production of TNF- α (macrophages) or granzyme B (lymphocytes T). The thrombotic complications connected with the presence of atherosclerotic plaque can occur even at the very early stages of the apoptotic process that is related to membrane configuration changes and superficial expression of thrombogenic phosphatidylinositol on the cell surface [12].

There are also more and more data available concerning acute myocardial ischemia where both necrotic and apoptotic cell deaths are present. In the autopsy, in patients with heart infarction the apoptotic cardiomyocytes were found mostly in the hypoperfusion zone around ischemic necrosis [2]. In the animal model (rat myocardial infarction) the expression of Bax and Bcl-2 in peri-infarction hypoperfusion tissue was confirmed. Additionally, also in the animal model, an administration of apoptosis executive enzyme (caspases) inhibitor resulted in a significant reduction of the infarction size [2]. Unfortunately, the duration of this effect is unknown. In humans, the role of PCD in acute heart ischemia was confirmed in one unique investigation, where the early stages of apoptosis in patients with myocardial infarction were detected by SPECT assessment. All the patients received Tc-99m labeled annexin V confirming presence of early membrane PCD changes — the apoptosis occurrence was documented in 6 of 7 patients [20]. According to other investigations concerning vascular remodeling, PCD can play an important role in post-infarction changes like ischemic cardiomyopathy or post-infarction cicatrix formation [2, 18]. Another interesting point is an increase of PCD in myocardial cells during reperfusion [2].

no znacznie częstsze występowanie pęknięcia blaszki lub owrzodzeń na jej powierzchni (48% vs. 31% — grupa zmian asymptomatycznych) [17]. Obecność przyściennych zmian zakrzepowych (40% vs. 35%) czy też krwawienie do światła blaszki (48% vs. 50%) nie wykazywały aż tak istotnego znaczenia klinicznego. W ocenie histologicznej w blaszkach symptomatycznych stwierdzono ścieńczenie powierzchniowych struktur blaszki oraz znacznie większą liczbę nacieków komórek reakcji zapalnej, w tym — makrofagów i limfocytów T mogących decydować o niestabilnym charakterze zmian [11, 17]. Czynniki odpowiedzialnymi za niestabilność mogą okazać się także metaloproteinazy powodujące uszkodzenie kolagenu — jednego z podstawowych elementów powierzchniowych struktur blaszki [11, 17]. Ich wysokie stężenie wiąże się z infiltracją komórkami reakcji zapalnej [17]. Choć w niestabilnych blaszkach stwierdzono także apoptozę komórek mięśni gładkich, to jednak właśnie makrofagi i limfocyty T wydają się pełnić zasadniczą rolę [10–12]. Jak udowodniono, obecne w blaszce komórki limfocytarne stymulują sekrecję metaloproteinaz przez komórki makrofagów, a produkowane przez nie interleukiny mogą indukować PCD komórek mięśni gładkich [10, 17]. Innym mechanizmem może być ekspresja liganda receptora śmierci komórkowej Fas-L (*Fas-Ligand*) na powierzchni komórek zapalnych (także makrofagów krwi obwodowej), oddziałującego z receptorem Fas na powierzchni mięśni gładkich, co jest jedną z rozpatrywanych dróg prowadzących do indukcji apoptozy [18, 19]. Rolę tych czynników potwierdza opisywana w obrębie niestabilnych blaszek miażdżycowych mniejsza całkowita liczba komórek mięśni gładkich, a także ekspresja Fas w okolicach powierzchniowych blaszki (*fibrous cap*) [19]. Jak wykazano, komórki reakcji zapalnej obok ekspresji Fas-L mogą być także odpowiedzialne za indukcję p53 oraz bezpośrednią indukcję apoptozy poprzez produkcję TNF- α (makrofagi) oraz granzymu B (limfocyty T). Za powikłania zakrzepowe w przypadku zmian apoptotycznych w obrębie blaszki miażdżycowej mogą być odpowiedzialne już początkowe etapy tego procesu, polegające na zmianie konfiguracji błony komórkowej i ekspozycji na powierzchni komórki silnie trombogenicnej fosfatydyloseryny [12].

Istnieje coraz więcej danych na temat ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego, w trakcie którego może dochodzić zarówno do nekrotycznej, jak i apoptotycznej śmierci komórki. W badaniach sekcyjnych u osób z zawałem serca apoptotyczne kardiomiocyty stwierdzono głównie w obrębie granicznej strefy hipoperfuzji wokół ogniska martwicy [2]. W modelu zwierzęcym (zawał serca u szczura) potwierdzono zmiany ekspresji Bax i Bcl-2 w obrębie strefy okołozawałowej hipoperfuzji. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu inhibitora enzymów wykonawczych PCD — kaspaz — udało się uzyskać istotne zmniejszenie strefy zawałowej — nieznanym jest jednak czas utrzymywania się tego efektu [2]. Znaczenie PCD w przypadku powikłań choroby wieńcowej udało się potwierdzić także w unikalnym badaniu przeżyciowym, w czasie którego wykrywano wczesne etapy śmierci apoptotycznej, wykonując badanie SPECT u chorych z ostrym niedo-

Aortic aneurysm

The decrease of SMC number within aortic wall is one of the characteristic findings within aortic aneurysm wall. The aortic smooth muscle cells are responsible for vessel wall homeostasis (including intercellular matrix, elastine and collagen production) [21]. Concomitant infiltration of the aortic wall by inflammatory cells is usually present. One of the postulated mechanism leading to the SMC number decrease is apoptosis. According to the data published by Lopez-Canalez in the media of aortic aneurysm wall 74% reduction of the mean SMC density in comparison with unchanged aorta was noticed and up till 30% of ISEL positive (*in situ-end labeling*) cells could be found [22]. Simultaneously, in 20–30% of medial SMCs an accumulation of p53 was documented. In the results presented by Henderson elevated apoptotic index in aortic aneurysm wall (including also inflammatory cells) was lower but still present (6.78 vs. 0.57 in the control group) [23]. The mechanisms leading to PCD in the aortic wall are still under investigation. Among various theories, the ischaemia of the aortic wall due to intraluminal thrombus formation or an influence of mechanical forces and blood pressure on the aneurysm wall are proposed. Further discussed factors are oxidized-lipoprotein influence or matrix destructive changes leading to aortic wall homeostasis disturbances. The role of the inflammatory reaction is also emphasized. In the macrophages and lymphocytes T infiltrating aortic wall, a significant expression of Fas-L (Fas-ligand) can be found [23]. Lymphocytes produce also perforins that influence the cell membrane permeability. The role of TNF, Nitric Oxide and interleukine-2 is also proposed. In some cases of aortic aneurysm or dissection, cystic medial degeneration (CMD) is recognized. Beside characteristic elastine fibers fragmentation and storage of acid mucopolisacharydes and collagen in the aortic wall, a significant decrease of the SMC population is observed [24]. By immunohistochemic assay an expression of pro-apoptotic Bax protein in 5.4 % of medial layer cells was found (comparing with 0.5% in the control group) [24]. Additionally, the higher number of apoptotic cells was documented (IxAP 1.5% vs. 0.5%) with expression of p53 in 11.5% of SMC (control group 1.3%).

The PCD up-regulation within aortic wall was also documented by Bondreman in the cases of congenital aortic valve malformations with concomitant aortic dilatation [25]. However, it is still unknown if PCD is the cause or effect of pathological changes in the vessel wall, especially if such advanced changes in matrix are observed.

Vessel wall remodeling — angioplasty, restenosis, vein by-pass, congenital malformations, regulatory factors

The role of apoptosis is emphasized in vessel wall remodeling occurring due to endogenous or exogenous stimuli factor influence — *e.g.*: arterial hypertension or mechanical vessel injury during balloon angioplasty [12,

krwieniem mięśnia sercowego, którym podano znakowaną technetem aneksynę V, dokumentując występowanie charakterystycznych dla apoptozy zmian w obrębie błon komórkowych u 6 z 7 badanych pacjentów [20]. W świetle innych badań dotyczących procesu remodelingu w układzie naczyniowym apoptoza wydaje się spełniać rolę także w zmianach pozawałowych, takich jak gojenie blizny pozawałowej czy kardiomiopatia niedokrwienna [2, 18]. Udowodniono także wzrost częstości występowania komórek apoptotycznych w obrębie kardiomiocytów mięśnia sercowego w przebiegu zespołu reperfuzji [2].

Tętniak aorty brzusznej

Jedną z charakterystycznych cech towarzyszących powstawaniu tętniaka aorty brzusznej jest stopniowy spadek liczby SMC, których zdolność do produkowania substancji międzykomórkowej oraz kolagenu i elastyny jest odpowiedzialna za zachowanie homeostazy ściany aorty [21]. Towarzyszącą temu obecne w preparatach histopatologicznych nacieki komórek reakcji zapalnej. Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za zmniejszenie liczby komórek mięśni gładkich może być PCD. Na podstawie badań Lopez-Candalez stwierdzono, że w obrębie błony środkowej tętniaka aorty dochodzi do aż 74,5-procentowej redukcji średniej gęstości SMC w porównaniu z prawidłową aortą, z dużym odsetkiem komórek ISEL-pozytywnych („*in situ*” *end-labeling*) — do 30% w obrębie błony środkowej [22]. W badaniu tym wykazano także akumulację p53 w 20–30% SMC błony środkowej, co potwierdzono także 2–3-krotnie większą ekspresją p53. W badaniu, które przeprowadzili Henderson i wsp., indeks komórek apoptotycznych w obrębie komórek ściany tętniaka aorty (w tym komórek reakcji zapalnej), choć znacznie niższy niż w poprzednim badaniu, wyniósł 6,78 (vs. 0,57 w grupie kontrolnej) [23]. Nadal trwają badania nad mechanizmem, który może indukować PCD w ścianie tętniaka. Z jednej strony może to być niedokrwienie ściany aorty poprzez formowanie się przyściennej skrzepliny, z drugiej — wpływ czynników mechanicznych w postaci wzrostu ciśnienia tętniczego oddziałującego na ścianę aorty. Powszechnie znany jest także wpływ oksydowanych form lipoprotein krwi czy też zmiany destrukcyjne w obrębie substancji międzykomórkowej, zaburzające jej hemostazę. Istotne znaczenie może również mieć reakcja zapalna w ścianie naczynia, ze szczególnym uwzględnieniem roli komórek limfocytarnych oraz makrofagów. Jak wykazano, w limfocytach T naciekających ścianę aorty dochodzi do istotnej ekspresji Fas-L [23]. Limfocyty uwalniają także perforyny wpływające na zmianę przepuszczalności błony komórkowej. Rozpatruje się również rolę TNF, tlenu azotu czy interleukiny drugiej. O roli PCD donosi się też, prowadząc badania nad zwyrodnieniem torbielowatym ściany aorty pełniącym rolę w powstaniu niektórych przypadków rozwarstwienia lub tętniaka aorty [24]. Obok charakterystycznej dla tego zjawiska fragmentacji włókien elastyny oraz odkładania glikoaminoglikanów

18, 26]. In the animal model, 30 minutes after angioplasty up till 70% of muscle cells of the medial layer are TUNEL positive with characteristic PCD alterations documented in electron microscopy (*e.g.* chromatin condensation) [3, 8, 12, 27]. Simultaneously, a diminution of regulatory Bcl-X protein was noticed. Beside apoptotic death, an injury of the vessel wall stimulates also an enhanced proliferation response with peak of the DNA synthesis within first 48 hrs and maximal SMC number increase after 48 hrs [26, 27]. An increased proliferation is observed also in the later period after injury-up to 3 months after angioplasty or stent placement. The enhance of proliferation results also in an increase of apoptotic cell number among growing neointimal cells with second apoptotic peak from 7 to 30 days after procedure [2, 8, 28]. In restenotic lesions, connected usually with an advanced proliferation at the place of vessel wall injury, the apoptotic cells are present more frequently in a more localized, multifocal form when compared with primary atherosclerotic plaque [3, 8, 9]. In these changes, PCD is one of the principal mechanisms controlling enhanced proliferation that has become an important point in the research concerning medicines or other external factors able to influence (and increase) this process [12]. One of the important factors regulating SMC proliferation through cell cycle arrest or pro-apoptotic activity in cases of DNA injury is p53 protein [29]. Expression of p53 correlates with low proliferation activity. On the other hand, decreased p53 expression was documented in restenotic lesions after endovascular procedures. In the SMCs derived from restenotic regions, the apoptotic response due to p53 expression was significantly higher when external stimuli were used. Using x-ray stimulation, previously very low p53 expression increased in both normal and restenotic cell cultures. Despite p53 expression in both groups, PCD concerns especially SMCs isolated from restenosis [29]. This is an important implication for the implementation of brachytherapy after endovascular procedures [29].

The presence of factors inducing cell proliferation can also lead to an inhibition of PCD. Fibroblast growth factor (FGF) seems to be one of the most important stimuli and an increase of its expression was noticed in restenoses occurring due to an enhanced proliferation response [3, 8, 12]. On the other hand, as it was documented by Hishikawa in aortic SMC culture, the expression of another important growth factor — connective tissue growth factor (CTGF) induces apoptotic death via caspase 3 activation [30].

The progressive degenerative arteriopathy (transplant arteriopathy) concerning the cases of allogenic transplantation was documented many years ago [8, 31]. Contemporarily, the data confirming the role of PCD in this process are discovered. Expression of the death receptor (Fas) pathway was found in the majority of endothelial and in almost one third of the allograft infiltrating inflammatory cells (lymphocytes, macrophages) [3, 8]. An activation of apoptosis was confirmed by an increase of the presence of TUNEL positive cells in the specimens [3]. The PCD related to degenerative changes and cell prolifera-

i kolagenu dochodzi do istotnego spadku liczby komórek mięśni gładkich. Ekspresję proapoptotycznej proteiny Bax wykazano immunohistochemicznie w 5,4% komórek błony środkowej w porównaniu z zaledwie 0,5% komórek w grupie kontrolnej [24]. Towarzyszyła temu także zwiększona ekspresja p53 w 11,5% SMC w porównaniu z 1,3% w grupie kontrolnej.

Zwiększenie liczby komórek apoptotycznych w ścianie aorty wstępującej udowodniła także Bonderman, stwierdzając większą częstość PCD (w SMCs) w przypadku chorych z wrodzonymi wadami zastawki aortalnej i współistniejącym poszerzeniem aorty wstępującej [25]. Nadal jednak nie można odpowiedzieć na pytanie, czy u chorych ze zwyrodnieniem torbielowatym błony środkowej aorty PCD jest przyczyną, czy też objawem patologicznych zmian w ścianie naczynia, dotyczących w tak dużym stopniu substancji międzykomórkowej.

Remodeling ściany naczyniowej – angioplastyka, restenoza, przeszczep żylny, wady wrodzone, czynniki regulacyjne

Apoptoza jest też nierozdzielnie związana z procesami przebudowy ściany naczyniowej, do jakiej dochodzi w wyniku działania czynników zewnętrznych i wewnętrznych, na przykład nadciśnienia tętniczego lub urazu mechanicznego w wyniku angioplastyki śródnaczyniowej [12, 18, 26]. W modelu zwierzęcym po 30 minutach od wykonanej angioplastyki balonowej do 70% komórek mięśni gładkich błony środkowej tętnic wykazuje cechy śmierci apoptotycznej (TUNEL) oraz charakterystyczne cechy morfologiczne programowanej śmierci komórki, między innymi w postaci kondensacji chromatywności w badaniu mikroskopii elektronowej [3, 8, 12, 27]. Stwierdzono, że towarzyszy temu także osłabienie ekspresji białka regulatorowego Bcl-X. Następnym etapem uszkodzenia ściany naczynia jest także zmniejszenie odpowiedzi proliferacyjnej ze stwierdzonym szczytem syntezy DNA w ciągu pierwszych 48 godzin i maksymalnym wzrostem liczby SMC po 48 godzinach [26, 27]. Wzmoczoną proliferację obserwuje się jednak także w okresie późniejszym — do 3 miesięcy po zabiegu, czemu towarzyszy ponowny wzrost częstości PCD w obrębie tworzącej się neointymy, z maksymalnym nasileniem tego zjawiska w okresie 7–30 dni po uszkodzeniu balonem lub wszczępieniu stentu [2, 8, 28]. W przypadku restenozy, nierozdzielnie związanej ze wzrostem proliferacji komórkowej w miejscu uszkodzenia ściany naczynia, obserwuje się zwykle zwiększoną częstość zlokalizowanych ognisk komórek apoptotycznych występujących w znacznie większej liczbie i w sposób bardziej zogniskowany niż w pierwotnej blaszce miażdżycowej [3, 8, 9]. Programowana śmierć komórki jest tutaj jednym z mechanizmów kontrolujących nasilone procesy proliferacyjne, co obecnie ma coraz większe implikacje kliniczne — poszukuje się leków lub czynników zewnętrznych mogących nasilić to działanie [12]. Istotnym regulatorem proliferacji komórek mięśni gładkich, działającym poprzez hamowanie wzrostu komórki oraz wpływ proapoptotyczny w przy-

tion was also found in the segments of autogenic vein by-passes in the investigated autologous tissues, beside the presence of hypocellular regions within the vein wall, PCD was also recognized [3, 8]. According to Wang, in the non-atherosclerotic coronary artery saphenous vein by-pass stenoses, the necrotic and apoptotic cell deaths were discovered (with the presence of characteristic "apoptotic bodies" in hyperplastic intima and its surrounding media) [32]. The fact of PCD activation was also confirmed in medial SMCs by Rodriguez immediately after vein by-pass implantation [33].

Apoptosis is one of the important regulatory mechanisms concerning multicell organism development [13]. Apoptotic cardiomyocytes were found in the rat and human embryonic development during progressive heart chamber growth and dilatation [34, 35]. Similar changes were recognized in the heart conduction system and within other heart structures such as: septum, pericardium, or in the places of coronary artery ostium formation [34]. According to this information the role of PCD in physiological processes or congenital malformation development was postulated [8]. Nowadays, the role of apoptosis was definitely confirmed in patients with conduction heart system disturbances and bradyarrhythmias [2, 8, 34]. On the other hand apoptosis inhibition can lead to the persistence of accessory conduction pathways (*e.g.* — Wolf-Parkinson-White syndrome) [2]. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy — ARVC is one of the model diseases confirming the role of PCD in the congenital heart malformations [2, 8, 34]. In patients with ARVC beside right ventricle changes, conduction system disturbances are present and in the myocardium and endocardium biopsies a high number of apoptotic cells is recognized [2]. Physiologically, apoptosis is important for ductus arteriosus occlusion after birth and it also plays an important role in the umbilical cord vessel changes where both an increase of the apoptotic cell number and proteins Bax and Bcl-2 over-expression are noticed [12, 35].

Another important factor stimulating apoptotic pathways are hemodynamic disturbances. In the investigation concerning distal abdominal aortic segment after birth, an enhanced aortic wall cell proliferation was found [29, 36]. However, no accumulation of the proliferating cells was noticed in this region, that was controlled by an increase of PCD due to hemodynamical post-partum changes and umbilical cord vessel disruption [18].

Apoptosis plays also an important role in the cases of progressive heart failure, where a continuous decrease of cardiomyocytes number is observed [2]. There are also some data available confirming the presence of PCD in dilated or ischemic cardiomyopathy or in degenerative post-transplantation changes [2, 8]. The role of local hemodynamic disturbances and also other factors stimulating the programmed cell death (*e.g.* ANF — atrial natriuretic factor) is discussed [2].

The vessel wall remodeling concerns also the patients with arterial hypertension where eutrophic or hypertrophic vessel wall changes with simultaneous apop-

padku uszkodzenia genomowego DNA, jest białko p53 [29]. Ekspresja p53 koreluje zwykle z niskim poziomem proliferacji komórkowej, z drugiej strony donosi się o spadku ekspresji tego białka w przypadkach, w których dochodzi do powstania restenozy po zabiegach śródnaczyniowych. W hodowlach komórek mięśni gładkich uzyskanych z okolic poddanych angioplastyce, w obrębie których doszło do powstania restenozy, wykazano istotnie większą odpowiedź apoptotyczną na bodźce zewnętrzne poprzez ekspresję p53. Stosując promieniowanie jonizujące jako czynnik indukujący, wykazano wzrost (początkowo niskiego) poziomu ekspresji p53 w hodowlach zarówno prawidłowych SMC, jak i z miocytów izolowanych z restenozy — po naświetlaniu początkowo niski poziom ekspresji p53 wzrastał w populacjach obu grup komórek, przy czym śmierci apoptotycznej ulegały głównie SMC izolowane ze zwężenia nawrotowego [29]. Uzasadnia to między innymi stosowanie brachyterapii po zabiegach śródnaczyniowych [29].

Obok czynników indukujących śmierć apoptotyczną znane są także te, które powodują wzrost proliferacji, a tym samym — hamowanie programowanej śmierci komórki. Jednym z najbardziej istotnych wydaje się czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, *fibroblast growth factor*), którego ekspresję obserwowano w przypadkach restenozy spowodowanej nasileniem odpowiedzi proliferacyjnej [3, 8, 12]. Z drugiej strony, inny czynnik — czynnik wzrostu tkanki łącznej — CTGF (*connective tissue growth factor*) indukuje apoptozę poprzez aktywację kaspazy 3 w hodowlach mięśni gładkich aorty [30].

Od dawna znane jest zjawisko postępującej arteriopatii, prowadzącej do stopniowo narastających zmian degeneracyjnych w przypadku przeszczepów allogenicznym (*transplant arteriopathy*) [8, 31]. Ekspresję białek związanych z szlakiem śmierci apoptotycznej powodowanym przez aktywację receptora śmierci komórkowej Fas wykazuje większa część komórek endotelialnych oraz jedna trzecia komórek reakcji zapalnej (limfocytów T, makrofagów) [3, 8]. Potwierdza to także znacznie większy odsetek komórek „TUNEL” pozytywnych w obrębie tych komórek [3]. Apoptozę związaną z procesami nasilonej proliferacji stwierdzono także w niektórych segmentach autogennych przeszczepów żylnych, gdzie w obrębie hipocelularnych odcinków naczynia obserwuje się nasilenie tego zjawiska [3, 8]. Jak podają Wang i wsp., w miejscach niemiażdżycowych zwężeń żył odpiszczelowych implantowanych w postaci przeszczepów aortalno-wieńcowych stwierdzono współwystępowanie zmian nekrotycznych oraz apoptotycznych (z obecnością charakterystycznych ciałek apoptotycznych w błonie wewnętrznej ulegającej hiperplazji oraz w otaczającej ją błonie środkowej) [32]. Równocześnie w świetle doniesień Rodrigueza i wsp. już w okresie bezpośrednio po wszczępieniu przeszczepu żylnego dochodzi do istotnego wzrostu częstości występowania komórek apoptotycznych wśród miocytów błony środkowej, co wynika z przebudowy ściany naczynia [33].

Programowana śmierć komórki jest jednym z istotnych zjawisk zachodzących także w trakcie rozwoju organizmów

totot presence were found [3, 8, 18]. In the later stages of the disease, the pathology considers whole target organs of hypertension that can lead to their important dysfunction [37]. In the animal model apoptotic cells were documented in rat cardiomyocytes and in brain, kidney and myocardial cells in mice [38]. Additionally, the cell cultures derived from these organs present an enhanced apoptotic response to PCD stimuli factors.

Vessel wall SMC apoptosis can be also induced by other factors such as: TNF- α , interleukin 1- β or interferon γ [12]. Among the discussed mechanisms of this activity an influence on nitric oxide concentration, Bax/Bcl-2 index changes, p53 expression or death receptor activation are mentioned as well as interactions between cells and intercellular matrix, oxidized cholesterol form influence (ox-LDL) or metalloproteinase activity (produced by macrophages and SMCs). The presence of ox-LDL leads to the Bax/Bcl-2 index change due to lecithine-like ox-LDL receptor activation [39]. The role of free radicals, lack of growth factors or an activity of commonly present nitric oxide is also emphasized [40, 41]. Concerning nitric oxide (NO), various effects of its activity were found. Due to DNA injury and positive influence on p53 expression, nitric oxide is an important PCD (also SMC PCD) stimulating factor. On the other hand, because of apoptosis executory enzyme inhibition (especially caspase 3 inhibition) NO inhibits apoptosis in endothelial cells. Contrary to NO, the presence of TGF- β (transforming growth factor β) stimulates endothelial PCD simultaneously increasing vessel wall SMC viability [13, 18, 34].

Beside the above mentioned relations between apoptosis and vascular system disorders many other possibilities explaining vascular disease pathology by PCD activation are currently under investigation. As was already described in the paper, apoptosis is related to many physiological and pathological vessel wall disorders. Understanding of the PCD role in the pathophysiology at the molecular level can give important clinical advice for a successful treatment of many vascular pathologies — from venous insufficiency to arterial hypertension, heart infarction or stroke.

Piśmiennictwo (References)

1. Kam P.C.A., Ferich N.I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anesthesia* 2000; 55: 1081–1093.
2. Haunstetter A., Izumo S. Apoptosis; basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Histol. Histopathol.* 1998; 82: 1111–1129.
3. Best P., Hasdai D., Sangiorgi G. i wsp. Apoptosis: Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Ann Vasc Surg* 1999; 19: 14–22.
4. Rowan S., Fisher D.E. i wsp. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997; 11: 457–465.
5. Bujan J., Jumenez-Cossio J.A., Jurado F. i wsp. Evaluation of the smooth muscle cell component and apoptosis in the varicose vein wall. *Histology and Histopathology* 2000; 15: 745–752.
6. Ascher E., Jacob T., Hingorani A. i wsp. Programmed cell death (apoptosis) and its role in the pathogenesis of lower extremity varicose veins. *Ann Vasc Surg* 2000; 14: 24–30.

wielokomórkowych [13]. W związku ze stopniowym poszerzaniem się jam serca w trakcie rozwoju embrionalnego apoptotyczne kardiomiocyty wykazano u embrionów zarówno szczurzych, jak i ludzkich [34, 35]. Podobne zmiany stwierdzono także w komórkach biorących udział w tworzeniu układu przewodzącego serca, a także w komórkach innych struktur serca, takich jak: przegrody, nasierdzie czy też miejsca powstawania ujęć naczyń wieńcowych [34]. Apoptoza może więc spełniać rolę w powstawaniu zarówno fizjologicznych przekształceń rozwojowych, jak i niektórych wad wrodzonych [8]. W chwili obecnej udowodniono związek śmierci apoptotycznej z zaburzeniami przewodzenia w obrębie układu bodźcotwórczego serca [2, 8, 34]. Z drugiej strony zahamowanie apoptozy może być odpowiedzialne za przetrwanie dodatkowych dróg przewodzenia, jak na przykład w zespole Wolfa-Parinsona-White'a [2]. Schorzeniem szczególnie interesującym jest arytmogenna prawokomorowa kardiomiopatia (ARVC, *arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*), w której zmianom prawokomorowym towarzyszy blok w obrębie układu przewodzącego [2, 8, 34]. U chorych z ARVC wykazano znaczny odsetek komórek apoptotycznych w preparatach biopsyjnych zarówno endo-, jak i miokardium [2]. Fizjologicznie programowana śmierć SMC towarzyszy zmianom związanym z przebudową, a następnie zamknięciem przewodu tętniczego po urodzeniu, a także zmianom w obrębie naczyń sznura pępowinowego, w których obok zwiększonej liczby komórek apoptotycznych stwierdza się także wzrost ekspresji Bax i Bcl-X [12, 35].

Czynnikiem, który niewątpliwie pełni istotną rolę w uaktywnieniu mechanizmów prowadzących do śmierci apoptotycznej, są zmiany hemodynamiczne. Badania przeprowadzone bezpośrednio po urodzeniu dowodzą wzmożonej proliferacji komórek ściany dystalnego odcinka aorty [29, 36]. Dzięki śmierci programowanej nie dochodzi jednak w tym odcinku do nadmiernej akumulacji komórek. Nasilenie regulacyjnej odpowiedzi apoptotycznej jako reakcji na wzrost proliferacji wynika ze zmian warunków hemodynamicznych po urodzeniu i z przerwania krążenia w obrębie naczyń sznura pępowinowego [18].

W postępującej niewydolności serca, której towarzyszy zwykle stopniowa utrata liczby kardiomiocytów, jako jedną z przyczyn spadku liczby komórek rozpatruje się obecnie PCD [2]. O roli apoptozy wspomina się też w przypadku kardiomiopatii rozstrzeniowej, pozawałowej i w obrębie zmian rozwijających się po przeszczepie serca [2, 8]. Znaczenie mogą mieć tutaj zarówno miejscowe zaburzenia hemodynamiczne, jak i inne czynniki — na przykład przedślonkowy czynnik natriuretyczny stymulujący PCD [2].

Przebudowa ściany naczynia jest także procesem nierozzerwalnie związanym z występowaniem nadciśnienia tętniczego [3, 8, 18]. Zmiany w postaci zarówno eutroficznego, jak i hipertroficznego przerostu, którym towarzyszy PCD, dotyczą początkowo ściany naczyń [37]. W późniejszym okresie narastające zmiany są jednak stwierdzane w obrębie całych narządów, których powolne uszkodzenie prowadzi do stopniowej dysfunkcji. W zwierzęcym modelu nadciśnienia tętniczego udo-

7. Ascher E., Jacob T., Hingorani A. i wsp. Expression of molecular mediators of apoptosis and their role in the pathogenesis of lower extremity varicose veins. *J Vasc Surg* 2001; 33: 1080–1086.
8. Best P., Hasdai D., Sangiorgi G. i wsp. Apoptosis: Basic concepts and implications in coronary artery disease. *J. Hematother Stem Cell Res.* 1999; 19: 14–22.
9. Isner J., Kearney M., Bortman S. i wsp. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; 91: 2703–2711.
10. Kockx M., Guido R.Y., De Meyer i wsp. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97: 2307–2315.
11. Hegyi L., Hardwick S.J., Siow R.C.M. i wsp. Macrophage death and role of apoptosis in human atherosclerosis. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2001; 10: 27–42.
12. Bennett M.R. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodeling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc. Res.* 1999; 41: 361–368.
13. Dimmeler S., Zeiher A. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ. Res.* 2000; 87: 434–439.
14. Bennet M., Evan G., Schwartz S. i wsp. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from vessels and coronary atherosclerotic plaques. *The Journal of Clinical Investigation* 1995; 95: 2266–2274.
15. Bennett M.R., Macdonald K., Chan S.W. i wsp. Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ. Res.* 1998; 82: 704–712.
16. Bennett M.R., Littlewood T.D., Schwartz S.M. i wsp. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53 mediated apoptosis. *Circ. Res.* 1997; 81: 591–599.
17. Golledge J., Greenhalgh R., Davies A. i wsp. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000; 31: 774–781.
18. Walsh K., Smith R.C., Kim H.S. i wsp. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis and plaque rupture. *Circ. Res.* 2000; 87: 184–188.
19. Geng Y.J., Hendsen L.E., Lavesque E.B. i wsp. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine — primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2200–2208.
20. Hofstra L., Liem I.H., Dumont E.A. i wsp. Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. *Lancet* 2000; 356: 209–212.
21. Powell J., Greenhalgh R.M. Cellular, enzymatic and genetic factors in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1989; 9: 297–304.
22. Lopez-Candel A., Holmes D.R., Liao S. i wsp. Decreased Vascular Smooth Muscle Cell Density in Medial Degeneration of Human Abdominal Aortic Aneurysm. *Am J Pathol* 1997; 150 (3): 993–1007.
23. Henderson E.L., Geng Y., Sukhova G.K. i wsp. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysm. *Circulation* 1999; 99: 96–104.
24. Ihling C., Szombathy T., Nampoothiri K. i wsp. Cystic medial degeneration of aorta is associated with p53 accumulation, Bax upregulation, apoptotic cell death, and cell proliferation. *Heart* 1999; 82: 286–293.
25. Bondreman D., Gharehbaghi-Schnell E., Wollenek G. i wsp. Mechanism underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation* 1999; 99: 2138–2143.
26. Malik N., Francis S.E., Holt C.M. i wsp. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation* 1998; 98: 1657–1665.
27. Perlman H., Maillard L., Krasinski K. i wsp. Evidence of rapid

wodniono występowanie zmian apoptotycznych w kardiomiocytach szczerca oraz w mózgu, nerkach i miocytach mięśnia sercowego u myszy [38]. Dodatkowo komórki hodowane z tych narządów wykazują większą reaktywność w stosunku do czynników indukujących PCD.

Obok przedstawionych wcześniej czynników zmiany apoptotyczne w komórkach mięśni gładkich ściany naczyniowej mogą indukować TNF- α , interleukina 1- β , interferon γ [12]. Prawdopodobny mechanizm tego oddziaływania wiąże się z wpływem tlenu azotu, zamianą indeksu Bax/Bcl-2 oraz aktywacją receptora śmierci komórkowej Fas i wzmożeniem ekspresji białka P53. Duże znaczenie mają także interakcje z substancją międzykomórkową, na co wpływają metaloproteiny produkowane przez SMC i makrofagi, a także wspomniane oksydowane formy cholesterolu (ox-LDL). Te ostatnie, jak wykazano, zmieniają stosunek Bax do Bcl-2 poprzez oddziaływanie z lecytynopodobnym receptorem oksydowanych form LDL [39]. Czynniki indukującymi mogą być także wolne rodniki tlenowe, niedobór czynników wzrostu czy też wpływ powszechnie obecnego w organizmie tlenu azotu [40, 41], który wykazuje działanie dwukierunkowe, indukując PCD (a także SMC) poprzez uszkodzenie genomowego DNA i wzrost ekspresji p53. Równocześnie jednak hamuje zmiany apoptotyczne w komórkach śródbłonna poprzez zahamowanie enzymów egzekutorowych, szczególnie kaspazy 3. Czynnikiem o odmiennym działaniu jest przekształcający czynnik wzrostu (TGF- β , *transforming growth factor β*), który indukuje apoptozę endotelium, stymulując jednocześnie przeżycie SMC ściany naczynia [13, 18, 34].

Liczne mechanizmy opisane w artykule nie wyczerpują wszystkich możliwości wpływu programowanej śmierci komórki na przebieg zmian w układzie naczyniowym. Jak wynika jednak z powyższego omówienia, apoptoza nierozzerwalnie wiąże się zarówno z procesami fizjologicznej przebudowy ściany naczyń, jak i liczną grupą schorzeń. Następnym dokładnym poznaniem patogeny powyższych zjawisk na poziomie molekularnym mogą być istotne rozstrzygnięcia kliniczne, począwszy od przypadków przewlekłej niewydolności żylniej, a skończywszy na leczeniu nadciśnienia tętniczego, zawału serca czy też udaru mózgu.

- onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* 1997; 95: 981–987.
28. Kamenz J., Seibold W., Wohlfrom M. i wsp. Incidence of intimal proliferation and apoptosis following balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45: 766–776.
 29. Scott S., O'Sullivan M., Hafizi S. i wsp. Human vascular smooth muscle cells from restenosis or in — stent stenosis sites demonstrate enhanced response to p53: implications for brachytherapy and drug treatment for restenosis. *Circ. Res.* 2002; 90: 398–404.
 30. Hishikawa K., Nakaki T., Fojii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis via caspase 3 in cultured aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 392: 19–22.
 31. Wies M., von Scheidt W. i wsp. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* 1997; 96: 2069–2077.
 32. Wang A.Y., Bobryshev Y.V., Liang H. i wsp. Electron-microscopic detection of apoptotic and necrotic cell death in non-atherosclerotic areas of stenotic aortocoronary saphenous vein bypass grafts. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2000; 32: 209–219.
 33. Rodriguez E., Labert E.H., Magno M.G. i wsp. Contractile smooth muscle cell apoptosis early after saphenous grafting. *Ann Thorac Surg.* 2000; 70: 1145–1153.
 34. Fisher S.A., Langille B.L., Sirvastava D. i wsp. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ. Res.* 2000; 10: 856–864.
 35. Hyo-Soo K., Kyung-Kuk H., Eso J.W. i wsp. Apoptosis and regulation of Bax and Bcl-X proteins during human neonatal vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 957–963.
 36. Cho A., Courtman D., Langille B.L. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of neonatal lamb. *Circ. Res.* 1995; 76: 168–175.
 37. Intengan H., Schiffrin E. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation and fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 581–587.
 38. Hamet P., Lucie R., Than Vinh D. i wsp. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 1995; 26: 642–648.
 39. Kataoka H., Kume N., Miyamoto S. i wsp. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lecithin like Ox-LDL receptor 1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 955–960.
 40. Tanner F.C., Meier P., Greuter H. i wsp. Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins. *Circulation* 2000; 101: 1982–1989.
 41. Nishio E., Watanabe Y. i wsp. Nitric oxide donor induced apoptosis in smooth muscle cells is modulated by protein kinase C and protein kinase A. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 339: 245–251.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Dr med. Tomasz Urbanek
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń Śląskiej Akademii Medycznej
ul. Ziołowa 45/47
40–635 Katowice

Praca wpłynęła do Redakcji: 03.01.2002 r.