

Znaczenie apoptozy (programowanej śmierci komórki) w chorobach układu naczyniowego — tętniak aorty

The role of the programmed cell death (apoptosis) in the vascular diseases — aortic aneurysm

Tomasz Urbanek¹, Elektra Sliupkas-Dyrda², Ilona Bednarek², Barbara Skop², Urszula Mazurek²,
Tadeusz Wilczok², Daniel Sypniewski², Krzysztof Ziąja¹

¹Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń Śląskiej Akademii Medycznej (Department of General and Vascular Surgery Silesian Medical Academy)

²Katedra Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji Śląskiej Akademii Medycznej ²(Division of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy Silesian Medical Academy)

Streszczenie

W pracy przedstawiono znaczenia programowanej śmierci komórki (apoptozy) w patogenezie schorzeń układu naczyniowego na przykładzie tętniaka aorty. Omówiono charakterystyczne cechy zjawiska apoptotycznej śmierci komórki, uwzględniając najczęstsze bodźce stymulujące oraz czynniki regulacyjne — szczególnie białka rodziny Bcl-2 oraz receptory śmierci komórki.

Na podstawie współczesnej, wieloczynnikowej teorii powstawania tętniaka przedstawiono znaczenie apoptotycznej śmierci komórki w zmniejszeniu liczby komórek błony środkowej aorty, charakterystycznym dla tętniaka aorty oraz torbielowatego zwyrodnienia błony środkowej. Zwrócono uwagę na znaczenie komórek zapalnych (limfocyty, makrofagi) oraz możliwe czynniki wywołujące apoptotyczną śmierć komórki u chorych ze zmianami w obrębie błony środkowej aorty.

Słowa kluczowe: apoptoza, choroby naczyń, tętniak aorty

Abstract

In the paper a role of programmed cell death (apoptosis) in the vascular disease development was presented. The influence of apoptosis on the aortic aneurysm development was discussed. Characteristic cell changes concerning apoptotic cell death were described, including inducers and regulatory factors — especially Bcl-2 protein family and death receptors. According to the current multivariant theory concerning aneurysm etiology, apoptosis can play the role in the decrease of the smooth muscle cell number in the medial aortic layer in the cases of aortic aneurysm and cystic medial degeneration. The role of inflammatory cells such as lymphocytes and macrophages and the factors inducing apoptotic cell death in the degenerative changes of the aortic wall is emphasized.

Key words: apoptosis, vascular diseases, aortic aneurysm

Wstęp

Coraz większa liczba przypadków zdiagnozowanego tętniaka aorty skłania do ciągłego poszukiwania przyczyn choroby [1–3]. Schorzenie jest najczęściej umiejscowione w podnerkowym odcinku aorty brzusznej. Obok zwykle uwzględnianych czynników patogenetycznych, które już od lat wiąże się z chorobami naczyń, takich jak przynależność do określonej płci (częstsze występowanie choroby u męż-

Introduction

The number of diagnosed cases of aortic aneurysm is still increasing and this fact indicates investigations concerning the etiology of aneurysm occurrence [1–3]. The most common placement of the disease is the infrarenal aortic region. Apart from well-known vascular pathogenetic factors, such as sex (more frequent disease occurrence in men), genetic implications, smoking, coexistence of

czynn), czynniki dziedziczne, palenie tytoniu, współistnienie zmian miażdżycowych, nadal bada się nowe mechanizmy, które mogą prowadzić do zaburzenia struktury ściany i poszerzenia naczyń [1, 2]. Czynnikiem mającym decydujący wpływ na powstanie tętniaka są zmiany degeneracyjne w obrębie elastyny i kolagenu (typ I i III), stanowiących podstawę budulca błony środkowej naczyń. Degradacja włókien elastyny wywołwana przez zaktywowane proteazy, obejmujące grupę enzymów, takich jak metaloproteinazy, plazmina, katepsyny S i K, elastaza, prowadzi do zniszczenia struktur odpowiedzialnych za właściwości elastyczne oraz wytrzymałość naczyń [1, 2, 4, 5].

Coraz większą uwagę w powstawaniu schorzeń naczyniowych zwraca uwagę zjawisko programowanej śmierci komórki — apoptozy. Potwierdzono, że ma ono znaczenie nie tylko w procesach patologicznych przekształceń naczyń w przebiegu miażdżycy i nadciśnienia tętniczego, ale także w fizjologicznych zmianach związanych z remodelingiem ściany naczyń wskutek zmian warunków hemodynamicznych w krążeniu (np. po urodzeniu) [6–8].

Apoptoza — programowana śmierć komórki

Termin „apoptoza” określający programowaną śmierć komórki pojawił się w literaturze w 1972 roku (Kerr i wsp.). Opisuje on szczególny rodzaj śmierci komórki, do której może dochodzić w obrębie żywej, prawidłowo funkcjonującej tkanki [9]. W przeciwieństwie do opisanej wcześniej nekrotycznej śmierci komórek, stanowiącej proces patologiczny, bierny energetycznie i występujący w przypadku ekspozycji komórki na czynniki fizyczne lub chemiczne, apoptoza wymaga wydatku energetycznego i niejednokrotnie jest procesem fizjologicznym dotyczącym narządów rozwijających się lub też prawidłowo zachodzących procesów biologicznych w organizmie [7, 10–12]. Komórki podlegające apoptozie wykazują charakterystyczne zmiany morfologiczne, które polegają na agregacji i kondensacji chromatyny, kondensacji i odwodnieniu cytoplazmy oraz powstawaniu charakterystycznych, otoczonych błoną komórkową ciałek apoptycznych — pęcherzyków zawierających fragmenty cytoplazmy i jądra komórkowego [7, 11]. W badaniach *in vivo* tego typu pęcherzyki oddzielane od komórki oraz pozostałe jej fragmenty podlegają zazwyczaj fagocytozie w przeciwieństwie do ulegających lizie komórek nekrotycznych [11, 13]. Należy także podkreślić, że właśnie dzięki fagocytozie w przypadku programowanej śmierci komórki w miejscu zachodzącego procesu zwykle nie występuje reakcja zapalna.

Inaczej niż w przypadku apoptozy, w zmianach nekrotycznych proces niespecyficznie postępującej destrukcji dotyczy zwykle większej grupy komórek w polu działania czynnika uszkadzającego — w trakcie postępujących zmian dochodzi do zahamowania transportu błonowego i zaburzeń integralności błony komórkowej oraz organelli komórkowych, do obrzęku mitochondriów, pęcznienia i zmian destrukcyjnych w obrębie organelli, uwolnienia enzymów lizosomalnych, w końcu do obrzęku komórki i jej następowej lizy [11].

W pierwszym etapie procesu apoptozy dochodzi do indukcji procesu samounicestwienia w wyniku zewnątrz-

atherosclerosis, many new mechanisms of the vessel wall destruction and dilatation have been under investigation recently [1, 2]. Both elastin and collagen (type I and III) degenerative changes are decisive factors in mechanical resistance failure and disease development. Structural deterioration of the elastin fibres, due to activated proteases, *e.g.*: metaloproteinases, plasmin, cathepsyn S, K and elastase, is responsible for the decrease in the elastic and mechanical properties of the vessel wall [1, 2, 4, 5].

Recently, in papers concerning vascular disease development, the importance of apoptosis (programmed cell death) has been emphasised. The process of programmed cell death plays a critical role in the pathological vessel wall changes in a variety of cardiovascular diseases (including arteriosclerosis and arterial hypertension) but also in physiological vessel wall remodelling due to haemodynamic circulatory changes (*e.g.* after birth) [6–8].

Apoptosis

The term “apoptosis”, describing “programmed cell death”, was introduced in 1972 by Kerr *et al.* for a morphological distinction of a special kind of cell death that can take place also within living and properly functioning tissues [9]. The previously described and well characterised “necrotic” cell death was considered to be a pathological and energetically passive process concerning cells and tissues exposed to physical and chemical destructive factors. In contrast to the above-mentioned, apoptosis is an energy-consuming event and plays an important role in some physiological processes in the body (also during organ development and further remodelling) [7, 10–12]. There are some features specific for programmed cell death. The apoptotic cells undergo characteristic alterations, such as condensation and margination of chromatin, condensation and dehydration of cytoplasm and formation of characteristic apoptotic bodies — consisting of fragmented cytoplasm and nucleus surrounded by cell membrane [7, 11]. In comparison to cell lysis occurring in the case of the necrotic death, the apoptotic bodies or the remainder of apoptotic cells undergo phagocytosis by macrophages without the presence of inflammatory reaction (data confirmed by *in vivo* investigations) [11, 13].

The previously described “necrotic” death concerns a group of cells in the area of an injury in the field of activity of a destructive factor. The necrotic process consists of an increase or arrest of membrane transport, destruction of the cell membrane and cytoplasmic organelles integrity and mitochondria swelling. It leads to the release of lysosomal enzymes, destruction of organelles and finally, cell oedema and lysis [11].

The activation of apoptosis depends on the presence of some inducers of this process — pathological or physiological, extra- or intra-cellular factors, such as nitric oxide, hormones and cytokines (*e.g.* — transforming growth factor Beta), neurotransmitters, death receptors, bacterial toxins, gamma-radiation, UV, ischaemia and reperfusion, chemotherapeutics and many other stimulus factors [7, 11, 12, 14–21].

lub wewnątrzkomórkowych sygnałów. Do znanych obecnie czynników powodujących wejście komórki w szlak apoptozy należą między innymi: tlenek azotu, hormony i cytokiny (na przykład czynnik transformujący wzrostu — Beta), neuroprzekazniki, „receptory śmierci”, toksyny bakteryjne, promieniowanie gamma, promieniowanie ultrafioletowe, niedokrwienie i reperfuzja, chemioterapeutyki i inne [7, 11, 12, 14–21].

W etapie wstępnym programowanej śmierci komórki może dochodzić do zmian w obrębie struktur błonowych związanych z przesunięciem fosfatydyloseryny na zewnętrzną powierzchnię błony komórkowej. Aktywacja dalszych procesów zachodzących w komórce apoptycznej jest możliwa dzięki grupie komórkowych proteaz cysteinowych, tak zwanych kaspaz (*Cysteiny Aspartate-Specific Proteases*) — enzymów wykonawczych (egzekutorów) apoptozy [3, 11, 12]. Obok zmian w błonie komórkowej miejscem najbardziej widocznych przemian w trakcie wejścia komórki w szlak śmierci apoptycznej są zmiany w obrębie mitochondrium komórkowego w postaci depolaryzacji i zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej oraz uwolnienia czynników aktywujących wspomniane wyżej proteazy — między innymi: cytochromu C oraz AIF (*apoptosis inducing factor*) [7, 10, 12].

Specyficzne zmiany zachodzą w trakcie apoptozy również w obrębie jądra komórkowego. Obok widocznych makroskopowo zmian w postaci kondensacji chromatyny i jej przemieszczenia w okolice pod błoną jądrową, w komórce dochodzi do fragmentacji DNA poprzez aktywowane endonukleazy tnące nić DNA pomiędzy szczególnie nukleosomami — powoduje to powstanie zdefiniowanej długości mono- i oligonukleosomalnych fragmentów DNA [7, 10–12].

Na występowanie zjawiska apoptozy wpływa między innymi kilka grup genów o właściwościach pro- i anty-apoptycznych [14–16, 22]. Do najbardziej znanych czynników regulacyjnych w okresie wchodzenia komórki w szlak śmierci apoptycznej należy grupa białek Bcl-2. Wyróżniono co najmniej 3 podrodziny białek Bcl-2: podrodzinę Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl xs, Bcl-w), podrodzinę Bax (Bax, Bak, Bok) oraz podrodzinę BH3 (Bad, Bik, Bid). Z wyjątkiem Bcl-xs białka podrodziny Bcl-2 są inhibitorami apoptozy [14, 22].

Bax (*Bcl-2 associated X protein*) jest promotorem apoptozy zależnym od czynnika transkrypcyjnego p53. Czynnikiem transkrypcyjnym p53 określa się jako gen supresorowy transformacji nowotworowej. Zmutowane formy p53 odpowiadają za transformację nowotworową komórek. Fizjologicznie p53 ma zdolność naprawy uszkodzenia DNA oraz kontroli cyklu komórkowego; w przypadku komórki o cechach apoptycznych może wykazywać jednak wielokierunkowe, zwykle proapoptyczne działanie, regulując między innymi powstawanie produktów genów, takich jak na przykład zależny od cyklin inhibitor kinaz p21 [7, 12, 14, 16, 22].

„Receptory śmierci komórkowej” to grupa receptorów należących do grupy receptorów TNF (np. Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5) [7]. O ile z ekspresją najbardziej chyba znanego receptora błonowego Fas spotykamy się tylko

Preliminary changes in the cell metabolism and structure of the apoptotic cell include redistribution and exposition of the phosphatidylserine on the outer layer of the cell membrane. Apart from characteristic cell membrane changes, the most important, and also easiest to detect, changes in the initial phase of the programmed cell death could be observed in mitochondria. Changes in mitochondrion membrane permeability lead to membrane depolarisation and to the release of protease activating factors *e.g.* cytochrome C and AIF (Apoptosis Inducing Factor) [7, 10, 12]. The further steps of the cell destruction depend on the activation of the group of executive apoptosis enzymes — caspases (Cysteiny — Aspartate — Specific Proteases) [3, 11, 12]. There is also a number of changes concerning the nucleus of the apoptotic cell. Apart from visible chromatin condensation and margination near to the nucleus membrane, fragmentation of the genetic material caused by internucleosomal cutting of the DNA by activated endonucleases (into mono- or oligo-nucleosomal fragments) is observed [7, 10–12].

The process of the apoptotic programmed cell death can be modified and controlled by groups of pro- and anti-apoptotic genes and their expression products [14–16, 22]. One of the best known regulatory factors is the group of the Bcl-2 protein family. There are at least 3 subfamilies of Bcl-2 proteins described: subfamily Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl xs, Bcl-w), subfamily Bax (Bax, Bak, Bok) and subfamily BH3 (Bad, Bik, Bid). Except for Bcl-xs, the proteins from Bcl-2 subfamily have an anti-apoptotic activity [14, 22].

Bax (Bcl-2 associated protein X) is a promoter of apoptotic cell death, with activity depending on p53 transcriptional factor (also known as a suppressor gene of neoplastic transformation). Mutations of p53 are responsible for neoplastic cell transformation; p53 is physiologically able to repair damaged DNA and to control the cell cycle. In the cases of apoptotic cell death, this factor (p53) can have a multipotential activity — especially a proapoptotic one, *e.g.* in regulating the generation of gene products like the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 [7, 12, 14, 16, 22].

Death receptors (*e.g.* Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5) are the group of cell membrane receptors which belongs to a large group of TNF family receptors. One of the best known receptors is Fas, mediating programmed cell death after stimulation by the Fas ligand (Fas-L). The activated receptor involves the recruitment of an adapter protein into the region of the cell membrane followed by caspase activation. The expression of the Fas receptor is ubiquitously observed whereas Fas-L is typically expressed on the cell surface of inflammatory cells including T cells and macrophages [3, 7, 13, 23]. Fas expression is also reported on vascular SMCs [3, 15].

Caspases (Cysteiny — Aspartate — Specific Proteases) play an important role in the initiation and execution of apoptosis by various stimuli. Nowadays the number of intracellular cysteine proteases is recognised. Caspases are synthesised as inactive “proenzymes” that are subsequently processed by proteolytic cleavage to form an active enzyme.

w części komórek, ligand tego receptora (Fas L — *Fas ligand*) jest zwykle spotykany na powierzchni komórek zapalnych, takich jak limfocyty T i makrofagi [3, 7, 13, 23]. Do ekspresji Fas dochodzi jednak także na powierzchni komórek mięśni gładkich (SMC, *smooth muscle cells*) [3, 15]. Dzięki występowaniu w komórce specyficznych białek adaptorowych aktywacja receptora Fas umożliwia zapoczątkowanie aktywacji kaspaz.

Kaspazy (*Cysteiny/Aspartate-Specific Proteases*) mają istotne znaczenie w procesie aktywacji i egzekucji zjawiska programowanej śmierci komórki zachodzącej pod wpływem różnych czynników stymulujących. W chwili obecnej znanych jest kilkanaście enzymów należących do grupy kaspaz; są one syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy i wymagają przekształcenia w formę aktywną.

Oczywiście istnieje jeszcze wiele innych możliwych czynników regulujących i aktywujących proces apoptotycznej śmierci komórki, których omówienie przekracza ramy powyższego opracowania [7, 9, 10, 12, 24, 25, 34].

Techniki diagnostyczne

Wśród licznych technik umożliwiających identyfikację komórek apoptycznych wymienić należy te, które opierają się na potwierdzeniu fragmentacji DNA za pomocą miedzynukleosomalnego cięcia jego nici poprzez endonukleazy. Efekt cięcia endonukleolitycznego można identyfikować różnymi technikami. Jedną z nich jest technika rozdziału elektroforetycznego ekstraktu genomowego DNA na żelu agarozowym. W przypadku zmian typowych dla zjawiska apoptozy obserwuje się charakterystyczny obraz tak zwanej „drabinki” apoptycznej, gdzie poszczególne prążki na żelu odpowiadają ciętym przez endonukleazy fragmentom nukleosomalnym. Pęknięcia DNA w komórkach apoptycznych można zidentyfikować również przy użyciu techniki znakowania DNA *in situ* TUNEL (TdT — *mediated dUTP nick end-labeling*). W metodzie tej enzym terminalna transferaza dezoksynukleotydowa dobudowuje do końców 3' znakowane nukleotydy. W zależności od typu zastosowanego znacznika, pęknięcia DNA w reakcji TUNEL można wykrywać na podstawie analizy mikroskopowej fluorescencyjnej lub mikroskopii w zakresie światła widzialnego. Alternatywną techniką wykorzystującą polimerazę DNA dla wbudowywania znakowanych nukleotydów w miejsca cięć łańcuch DNA jest ISEL (*in situ end-labeling*).

W ostatnim okresie podkreśla się dużą czułość testów z aneksyną V, która umożliwia stwierdzenie już bardzo wczesnych etapów zaburzeń związanych z wchodzeniem komórki w cykl śmierci apoptycznej (metoda wykorzystuje łączenie się aneksyny V z fosfatydyloseryną ekspozowaną na zewnętrznej powierzchni błon komórkowych komórek wkraczających w szlak śmierci apoptycznej).

Innym sposobem monitorowania zjawiska apoptozy jest także ocena specyficznych mediatorów lub wskaźników programowanej śmierci komórki oraz ocena stopnia aktywacji kaspaz w komórce. Ocenę ekspresji wybranych pro- i antyapoptycznych genów związanych ze szlakiem apoptozy można prowadzić metodami immu-

There is, of course, a great number of other regulatory and activating mechanisms of apoptotic death that cannot be discussed here due to the limited size of this publication. Recent studies have discovered a new link and correlations between factors implied in programmed cell death and each year brings new data concerning apoptosis [7, 9, 10, 12, 23, 25, 34].

Diagnostic techniques in the detection of programmed cell death

Evaluation of typical apoptotic cell morphology serves as one of the simplest methods used in programmed cell death detection. Cell labelling with specific dyes, followed by analysis with light, fluorescence or electron microscopy, provides us with some information about cell structure alterations.

Among various ways of programmed cell death detection, the techniques based on the internucleosomal genomic DNA fragmentation by activated endonucleases should be mentioned. Separation of cellular DNA on agarose gel shows a characteristic ladder-like pattern of DNA fragments. Another technique, enabling visualisation of characteristic DNA fragmentation of the cells *in situ* within a tissue, is the TUNEL method (Tdt — mediated dUTP nick end — labelling). In this method dUMP is attached to the 3' end of genomic DNA by terminal desoxynucleotidyl-transferase. Positive cells are visualised using dyes conjugated to desoxyuridine and the result can be evaluated by fluorescence or light microscopy. An alternative technique is *in situ* end-labelling (ISEL), which utilises DNA polymerase to incorporate biotinylated nucleotides at the DNA strand breaks.

Recently, tests of a very high sensitivity for preliminary apoptotic changes have been introduced (*e.g.* labelling cells with annexin V — the method is based on the binding of annexin V to phosphatidylserine exposed on the outer leaflet of the cell membrane of the apoptotic cell).

Another possibility is an evaluation of the expression or level of specific mediators, apoptotic markers or evaluation of the activity of caspases. Using immunohistochemical methods, the presence of chosen pro- or anti-apoptotic proteins is also examined. Modern molecular techniques — gene amplification techniques, like PCR, RT-PCR and QPCR (Quantitative-PCR) allow for an evaluation of apoptosis on the level of gene expression. Precise descriptions of all those methods can be found in the publications concerning molecular biology [11].

Apoptosis and abdominal aortic aneurysm

According to previously conducted investigations, in the medial layer of the abdominal aortic aneurysm a decrease of the SMC density is observed [3, 23]. Apoptosis is considered to be one of the mechanisms responsible for SMC number decrease. According to Liao, cultured SMCs of the aortic wall present a significantly decreased proliferation capacity and a limited time of survival in comparison with SMCs originated from the inferior mesenteric artery of the same patient [27]. SMCs represent the major-

nohistochemicznymi lub też nowoczesnymi metodami amplifikacji opartymi na detekcji frakcji mRNA(s) w reakcjach PCR (*polymerase chain reaction*, polimerazowa reakcja łańcuchowa), RT-PCR czy też ilościowo jako Q-PCR (*Quantitative-PCR*, ilościowa PCR). Znane są także metody selektywnego barwienia oraz oceny morfologicznej, umożliwiające określenie charakterystyki komórki apoptycznej; w badaniach istnieje także możliwość wykorzystania mikroskopii świetlnej, fluorescencji oraz mikroskopii elektronowej. Szczegółowe omówienie tych i innych metod zawierają podręczniki i publikacje dotyczące biologii molekularnej [11].

Apoptoza a tętniak aorty brzusznej

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań w obrębie błony środkowej wykazano znaczny spadek gęstości komórek mięśni gładkich (SMCs, *smooth muscle cells*) w ścianie tętniaka aorty brzusznej [3, 23]. Jednym z mechanizmów zmniejszenia się populacji SMCs może być ich wejście na drogę programowanej śmierci komórki. Jak podaje Liao, SMCs tętniaka aorty cechują się zmniejszonymi zdolnościami proliferacyjnymi oraz ograniczonym czasem przeżycia w hodowli w porównaniu na przykład z miocytami uzyskanymi ze ściany tętnicy kregkowej dolnej tego samego chorego [27]. Stanowiące zdecydowaną większość w obrębie błony środkowej aorty SMCs są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy ściany naczynia [1–3, 7, 23, 30]. W przypadku błony środkowej, poddawanej wpływowi wysokich wartości ciśnienia tętniczego w trakcie całego życia, odpowiadają one za utrzymanie jej prawidłowego składu i proporcji pomiędzy komponentami elastyny i kolagenu oraz odnowę zniszczonej substancji międzykomórkowej [1–3, 28, 29]. Najczęściej obserwowanymi zmianami histologicznymi w obrębie ściany tętniaka, obok spadku liczby komórek mięśni gładkich, są zmiany degeneracyjne w błonie środkowej, które polegają na przerwaniu i degradacji włókien jej poszczególnych warstw (szczególnie włókien elastyny błony środkowej) [1, 4]. Równocześnie dochodzi do powstawania nowych naczyń w obrębie błony środkowej (neowaskularyzacja) oraz zmian aktywności enzymów mogących przyspieszać degradację ściany naczynia [1, 4]. Od dawna podkreśla się i dyskutuje znaczenie metaloproteinaz oraz aktywatora plazminogenu [1, 2, 4]. Odkładanie się immunoglobulin G w ścianie aorty, zwapnienia i blaszki miażdżycowe w błonie wewnętrznej to dodatkowe czynniki uszkadzające [2, 5].

Obok spadku liczby SMCs w przypadku poszerzania się aorty niejednokrotnie dochodzi do nacieku ściany aorty komórkami zapalnymi (makrofagi, limfocyty T). W badaniach Henderson wykazano w obrębie ściany tętniaka aorty brzusznej zmniejszenie liczby SMC oraz ekspresję mediatorów procesu śmierci apoptycznej w limfocytach T naciekających ścianę naczynia (*Fas-ligand*) [3]. Infiltracja ściany tętniaka poprzez limfocyty T oraz makrofagi jest powszechnie podkreślanym w literaturze zjawiskiem [1, 2, 4].

We wspomnianych badaniach [3] wykazano 25–66-procentowy spadek liczby SMCs w błonie środkowej aor-

ity of the aortic medial layer cells and are one of the factors responsible for vessel wall homeostasis [1–3, 7, 23, 30]. In the medial layer of the aortic wall (remaining under high pressure the whole life) SMCs control the elastin and collagen content and the changes occurring in the intracellular matrix. According to some data, they are able to produce other components of the intracellular matrix [1–3, 28, 29]. Apart from SMCs loss, the most common pathology observed within the aneurysmal wall are changes concerning the degeneration and disruption of the fibres of the elastic medial layer [1, 4]. Another pathology observed is the neovascularisation of the aortic media.

The described vessel wall remodelling is connected with important changes of the activity of the enzymes responsible for the degenerative process inside the wall — metalloproteinases and plasminogen activator are well-known factors influencing aortic wall destruction [1, 2, 4]. Other factors responsible for aortic injury are deposition of immunoglobulin G inside the wall, calcifications and atherosclerotic plaques within the intimal layer [2, 5].

In the cases of aortic dilatation, an infiltration of the wall by inflammatory cells such as macrophages and lymphocyte T has been noticed [1, 2, 4]. According to the data reported by Henderson, the decrease of the SMC population is connected with the expression of the apoptosis stimulus factors on the lymphocyte T infiltrating the vessel wall (*Fas-ligand*) [3]. In the same investigation, compared with a normal aorta, a 25–66% decrease of the SMC density in the aortic media in patients with aortic aneurysm was found. Calculation of the number of SMC nuclei per cross-sectional area reveals a 36% reduction in the nuclei per unit in the investigated specimens. The presence of apoptotic cells was confirmed by the TUNEL method — the apoptotic index of both SMCs and wall infiltrating macrophages was 6.78 vs. 0.57 (compared with control aortic specimens). The evaluation of SMCs only, confirmed the presence of apoptosis-positive SMC nuclei in the medial aortic layer — the apoptotic index value was 13.5 [3].

There is still discussion concerning the influence of the T lymphocytes on SMCs. One of the mechanisms can be a release of the perforin, that can change the cell membrane permeability, leading to the cell's death [3, 13]. Inflammatory cells are also able to express the ligand of the death receptor *Fas*, which can activate apoptotic cell death through caspase activation [3, 7]. Immunohistochemically, with the application of the monoclonal antibodies, the expression of the *Fas* receptor on SMCs of the medial aortic layer was also confirmed [3].

According to the Lopez-Candalez investigation, decrease of the SMC density in the medial aortic wall (74.5% reduction of the mean density of SMCs in comparison with control normal aorta) and the high percentage of the ISEL positive cells were confirmed (up to 30% of the medial layer cells). Additionally, in 20–30% of α -actine positive cells, an accumulation of p53 was documented — this fact was confirmed by RT-PCR, which revealed mRNA p53 expression 2–3 times higher than in the non-dilated aorta [23].

ty u chorych z tętniakiem aorty brzusznej w porównaniu z niezmienną aortą (po przeliczeniu liczby jąder SMCs na jednostkę powierzchni wykazano 36-procentową redukcję liczby SMCs w badanych preparatach). Obecność komórek apoptycznych potwierdzono reakcją TUNEL (indeks apoptyczny — zarówno w komórkach SMC, jak i w obrębie naciekających ścianę makrofagów 6,78 vs. 0,57 w grupie kontrolnej) [3]. Analizując częstość występowania jąder komórek apoptycznych w populacji komórek ograniczonej do SMCs błony środkowej aorty, stwierdzono wartość indeksu apoptycznego równą 13,5.

Limfocyty T w ścianie tętniaka aorty mogą przyczyniać się do śmierci komórek mięśni gładkich, uwalniając perforyny, które, oddziałując na błonę komórkową, zmieniają jej przepuszczalność [3, 13]. Równocześnie wykazują one jednak zdolność do ekspresji liganda receptora śmierci komórkowej Fas (FasL), co może aktywować zależny od niego apoptyczny schemat śmierci komórki poprzez aktywację kaspaz [3, 7]. Immunohistochemicznie (z wykorzystaniem znakowanych specyficznych przeciwciał) potwierdzono także ekspresję receptora Fas w obrębie SMCs błony środkowej tętniakowato zmienionej aorty [3].

W badaniu przeprowadzonym przez zespół Lopez-Candalez wykazano zarówno zmniejszenie gęstości komórek mięśni gładkich w obrębie błony środkowej tętniaka aorty (74,5-procentowa redukcja średniej gęstości SMCs w porównaniu z normalną aortą), jak i duży odsetek ISEL (*in situ end-labeling*) pozytywnych komórek sięgający 30% komórek błony środkowej (dodatkowo w 20–30% komórek pozytywnych w stosunku do α -aktywny udowodniono akumulację p53, co potwierdzono badaniem RT-PCR (*reverse transcription — polymerase chain reaction*), w którym wykazano ekspresję mRNA p53 2–3 razy wyższą niż w nieposzerzonej aorcie [23].

W rozpoczętych obecnie w Katedrze Biologii Molekularnej Śląskiej Akademii Medycznej badaniach przy wykorzystaniu RT-QPCR (TaqMan PCR) dla ilościowego oznaczenia poziomu ekspresji genów kodujących Bax i Bcl-2 stwierdzono wahania ekspresji zarówno Bax, jak i Bcl-2 w obrębie materiału uzyskanego ze ściany tętniaka aorty brzusznej u części badanych chorych — wymaga to jednak potwierdzenia poprzez objęcie badaniem większej grupy pacjentów oraz zastosowania metod immunohistochemicznych w celu potwierdzenia obecności tych białek w tkance.

Nadal dyskusyjny jest sposób wywoływania apoptozy w obrębie SMCs błony środkowej aorty [1–4, 23]. Czynniki stymulującymi mogą być zarówno oksydowane lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL, *low-density lipoprotein*), występujące w trakcie formowania się zmian miażdżycowych, jak i wolne rodniki oraz tlenek azotu, co wykazano w badaniach *in vitro*. Innym diskutowanym czynnikiem stymulującym mogą być zmiany niedokrwienne SMCs w obrębie błony środkowej wraz z postępującym formowaniem się skrzepliny przyściennej oraz zmian miażdżycowych. Odżywianie komórek środkowej błony aorty w jej podnerkowym odcinku pochodzi w znacznym stopniu z przezściennej dyfuzji substancji ze światła aorty [2–4]. Innym rozważanym czynnikiem może być degeneracja

Another investigation with the RT-QPCR for the quantitative estimation of the expression of genes encoding Bax and Bcl-2 in the abdominal aortic wall, conducted at the Department of Molecular Biology of the Silesian Medical Academy, showed the changes of the expression of Bax or Bcl-2 in the examined tissue — however, this has to be confirmed on a larger group of patients and it requires the confirmation of the presence of protein products using other methods *e.g.* the immunohistochemical one.

The way of apoptosis induction within the aortic media is still disputable [1–4, 23]. The role of oxidatively modified low density protein (LDL) present at the time of the atherosclerotic plaque occurrence, the role of free radicals and nitride oxide was confirmed in *in vitro* studies [2–4].

The nutrition of the medial layer in the infrarenal aortic segment comes partially from the diffusion of transmural nutrient substances from the aortic lumen. Another factor influencing apoptosis occurrence can be ischaemia of the medial SMCs, due to thrombus formation on the internal aortic layer and also the presence of atherosclerotic plaques.

Another factor influencing the apoptotic cell death is the changes of the intracellular matrix surrounding and contacting SMCs. This can decrease the resistance of the SMCs to apoptotic stimuli [1, 2, 23, 24]. According to *in vitro* examinations, SMC apoptosis can be induced by TNF, IL-1 β , γ -interferon, nitric oxide — substances penetrating into the vessel wall [7, 20, 21]. The data reported by Hishikawa confirmed that an enhanced expression of the connective tissue growth factor increases apoptosis frequency in the cultured SMC [24].

In the discussion about aortic aneurysm occurrence, a group of patients with aortic cystic medial degeneration (CMD) should also be mentioned [28, 29]. The disease, especially occurring in cases of aortic dilatation or dissection, concerns mainly the thoracic segment of the vessel. In the pathological examination, the loss of SMCs, elastin fibres fragmentation and accumulation of acid mucopolisaccharides inside the aortic wall was observed [28]. According to the data reported by Ihling, in patients with CMD, confirmed by immunohistochemical staining, the evidence of p53 expression was noticed in 11.5% of SMC medial cells (vs. 1.3% in the control group). Pro-apoptotic Bax positive cells were observed in 5.4% of the aortic media cells (control group — 0.5%). TUNEL positive cells were found in 17 out of 20 specimens (mean — 1.5% of VSMC cells vs. control group — 0, $p < 0.001$) — the results were confirmed by electron microscopy and gel electrophoresis [28].

The documented presence of the apoptotic cells in the aneurysmatic aorta confirms the role of programmed cell death in the decrease of the SMC density in the medial aortic layer during aneurysm formation. There was also a correlation found between the presence of apoptotic cells and the expression of stimuli and/or regulatory factors, as previously described [30]. Currently, the role of apoptosis in the vascular wall changes at the various stages of its growth and development and also its further remodelling is confirmed. This concerns not only physiological but also pathological conditions (beginning

substancji międzykomórkowej stanowiącej naturalne środowisko komórki, co może zmniejszyć odporność SMCs na bodźce apoptyczne [1, 2, 23, 24]. W badaniach *in vitro* apoptozę SMCs wywołują TNF, IL-1 β , interferon- γ , tlenek azotu — czynniki, które w organizmie mogą penetrować do ściany naczynia [7, 20, 21]. Jak wykazał Hishikawa, zwiększona ekspresja czynnika wzrostu tkanki łącznej (*connective tissue GF*) zwiększa częstość apoptozy w komórkach hodowli mięśni gładkich aorty [24].

Analizując przypadki tętniaka aorty brzusznej, należy także wspomnieć o grupie chorych, u których rozwarstwienie lub też tętniakowate poszerzenie — obejmujące zwykle szczególnie piersiowy odcinek aorty — rozwija się na tle zwyrodnienia torbielowatego błony środkowej aorty (CMD, *cystic medial degeneration*) [28, 29]. W obrazie histologicznym tego schorzenia, obok spadku liczby SMC widoczna jest fragmentacja włókien elastyny i akumulacja kwaśnych mukopolisacharydów w ścianie naczynia [28]. Ihling i wsp., analizując przypadki torbielowatego zwyrodnienia błony środkowej aorty, wykazali w badaniach immunohistochemicznych ekspresję p53 obecną w 11,5% komórek SMCs (vs. 1,3% w grupie kontrolnej). Stwierdzana reaktywność proapoptycznej proteiny Bax dotyczyła 5,4 % komórek błony środkowej (grupa kontrolna — 0,5%). Obecność komórek wykazujących pozytywną reakcję TUNEL stwierdzano w 17 na 20 badanych preparatów (średnio 1,5 % badanych komórek) — w grupie kontrolnej 0 (uzyskane wyniki potwierdzano w badaniu metodami mikroskopii elektronowej oraz elektroforezy na żelu agarozowym) [28].

Udowodniona obecność komórek apoptycznych w ścianie tętniakowato zmienionej aorty dowodzi znaczenia, jakie może mieć programowana śmierć komórki w zaniku SMCs błony środkowej aorty, tym bardziej, że w świetle przedstawionych badań rozwój schorzenia koreluje jednocześnie z wzmożoną ekspresją czynników stymulujących i regulujących w obrębie badanych komórek i tkanek [30]. W chwili obecnej potwierdzono znaczenie programowanej śmierci komórki w zmianach ściany naczyniowej w różnych okresach życia i w różnych jednostkach chorobowych — począwszy od zmian zachodzących w naczyniach (naczyniach pępowinowych, przewodzie tętniczym) po urodzeniu, poprzez zmiany obejmujące naczynia w anomaliach rozwojowych i nadciśnieniu tętniczym, a skończywszy na niezwykle groźnych schorzeniach, takich jak zawał serca, udar mózgu czy też niewydolność krążenia lub niestabilna blaszka miażdżycowa [6–8, 13, 18, 21, 25, 26]. Apoptoza komórek ściany naczynia może być także wynikiem działania niektórych leków stosowanych w chorobach układu krążenia czy też zabiegów angioplastyki naczyniowej [7, 21, 31].

Podsumowanie

Ogromna liczba doniesień z ostatnich lat na temat znaczenia programowanej śmierci komórki (apoptozy), coraz większa ilość danych na temat czynników stymulujących wspomniane zjawisko przybliża nas być może do momentu, w którym możliwe będzie nie tylko osta-

with neonatal vessel remodelling in the umbilical cord or in the ductus arteriosus wall after birth, through the changes observed in congenital malformations or arterial hypertension and finally finishing with the pathology typical of more dangerous conditions, like heart infarction, stroke, circulatory insufficiency or non-stable atherosclerotic plaque) [6–8, 13, 18, 21, 25, 26]. Apoptotic changes are also observed as a result of a pharmacological therapy or angioplasty procedure [7, 21, 31].

Summary

The number of papers concerning “programmed cell death” within the last years and the increasing knowledge concerning regulatory mechanisms and stimulus factors are bringing us close to the moment when the final understanding of the apoptotic process will be possible.

Hopefully, at this time, due to continuous molecular biology technique development, the successful treatment of apoptosis-dependent diseases will be possible. Nowadays, the first projects concerning the use of caspase inhibitors or apoptosis-inhibiting factors are under investigation. Attempts at introducing pro- or anti-apoptotic genes into the cell genetic material are also being undertaken [7, 16]. According to the current multifactor theory of aneurysm occurrence, apoptosis can be qualified as one of the very complex changes within the aortic wall during the development of this disease. Certainly, also other rings of this chain have to be found and recognised.

Piśmiennictwo (References)

1. Powell J., Roger M., Greenhalgh M. *Cellular, enzymatic, and genetic factors in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm*. J. Vasc. Surg. 1989; 9: 297–304.
2. Patel M.I., Hardman D.T.A., Fisher C.M. i wsp. *Current views on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm*. Journal of the American College of Surgeons 1995; 181, 10: 371–382.
3. 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.
4. Schneiderman J., Bordin G.M., Engelberg I. i wsp. *Expressions of fibrinolytic genes in atherosclerotic abdominal aortic aneurysm wall. A possible mechanism for aneurysm expansion*. J. Clin. Invest. 1995; 96, 6: 639–645.
5. Gregory A.K., Yin N.X., Capella J. i wsp. *Features of autoimmunity in the abdominal aortic aneurysm*. Arch. Surg. 1996; 131: 85–88.
6. Walsh K., Smith R.C., Kim H. *Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture*. Circulation Research 2000; 87: 184–188.
7. Haunstetter A., Izumo S. *Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular diseases*. Circulation Research 1998; 82: 1111–1129.
8. Kim H., Hwang K., Seo J. i wsp. *Apoptosis and regulation of Bax and Bcl-X proteins during human neonatal vascular remodeling*. Arterioscle. Thromb. Vasc. Biol. 2000; 20, 4: 957–963.

teczne zrozumienie zjawiska apoptozy, ale też, dzięki znajomości mechanizmów regulujących oraz postępowi technik molekularnych, skuteczne leczenie schorzeń, w których apoptoza odgrywa dominującą rolę. Już dzisiaj prowadzi się badania uwzględniające zastosowanie inhibitorów kaspaz czy też bezpośrednich inhibitorów apoptozy lub też możliwości wprowadzenia do komórki pro- lub też antyapoptycznych genów [7, 16]. Wobec aktualnej wieloczynnikowej teorii powstawania tętniaka aorty brzusznej apoptoza jest być może jeszcze jednym składnikiem złożonych przemian, jakim podlega ściana aorty. Wzrost liczby chorych z diagnozowanym tętniakiem aorty skłania do poszukiwania wszystkich pozostałych ogniw tego łańcucha.

9. Kerr J.F.R., Wyllie A.M., Currie A.R. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics*. British Journal of Cancer 1972; 26: 239–251.
10. Grądzka I. *Apoptosis: decision rests with the mitochondrion*. Postępy Biochemii 2000; 46, 1: 2–15.
11. Sulejczak D. *Apoptosis and methods of identification of this phenomenon*. Postępy Biologii Komórki 2000; 27, 4: 527–568.
12. Rowan S., Fisher D.E. *Mechanism of apoptotic cell death*. Leukemia 1997; 11: 457–465.
13. Hegyi L., Hardwick S.J., Siow R.C.M. i wsp. *Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis*. Journal of Hemathotherapy & Stem Cell Research 2001; 10: 27–42.
14. Motyl T., Gajkowska B., Płoszaj T. i wsp. *Role of Bax and Bcl-2 in regulation of mammary epithelial cells apoptosis*. Postępy Biologii Komórki 2000; 27, 1: 31–51.
15. Chan S., Hegyi L., Scott S. i wsp. *Sensitivity to Fas-mediated apoptosis is determined below receptor level in human vascular smooth muscle cells*. Circ. Res. 2000; 86: 1038–1046.
16. Gibbons G.H., Pollman M.J. *Death receptors, intimal disease, and gene therapy: are therapies that modify cell fate moving to fas?* Circ. Res. 2000; 86: 1009–1012.
17. Pollman M.J., Naumovski L., Gibbons G.H. *Vascular cell apoptosis. Cell type-specific modulation by TGFβ1 in endothelial cells vs. smooth muscle cells*. Circulation 1999; 99: 2019–2026.
18. deBlois D., Tea B., Dam T., i wsp. *Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension 1997; 29 (cz. 2): 340–349.
19. 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*. Circulation Research 1997; 81: 591–599.
20. Wang B., Ho H.V., Lin P.S. i wsp. *Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis*. Circulation 1999; 99: 1236–1241.
21. Ono Y., Ono H., Matsuoka H. i wsp. *Apoptosis, coronary arterial remodeling, and myocardial infarction after nitric oxide inhibition in SHR*. Hypertension 1999; 34: 609–616.
22. Rupniewska Z.M., Różyńska D., Kurowska M. *Bcl-2 gene family*. Postępy Biologii Komórki 1997; 24, 1: 3–47.
23. Lopez-Candel A., Holmes D.R., Liao S. i wsp. *Decreased Vascular Smooth Muscle Cell Density in Medial Degeneration of Human Abdominal Aortic Aneurysm*. American Journal of Pathology 1997; 150, 3: 993–1007.
24. Hishikawa K., Oemar B.S., Tanner F.C. i wsp. *Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells*. Circulation 1999; 100: 2108–2112.
25. Bennett M.R., Efan G.I., Schwartz S.M. *Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques*. The Journal of Clinical investigation 1995; 95: 2266–2274.
26. Dimmler S., Zeiher A.M. *Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression*. Circ. Res. 2000; 87: 434–439.
27. Liao S., Curci J.A., Kelly B.J., Sicard G.A. i wsp. *Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery*. J. Surg. Res. 2000; 92 (1): 85–95.
28. 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.
29. Bonderman D., Gharehbaghi-Schnell E., Wollenek G. i wsp. *Mechanism underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation*. Circulation 1999; 99: 2138–2143.
30. Thompson R.W., Shixiong L., Curci J.A. *Vascular smooth muscle cell apoptosis in abdominal aortic aneurysms*. Coronary Artery Disease 1997; 8: 623–631.
31. Perlman H., Maillard L., Krasinski K. i wsp. *Evidence for rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury*. Circulation 1997; 95: 981–987.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

dr med. Tomasz Urbanek
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyni Ślaskiej AM w Katowicach
ul. Ziołowa 45/47
40–635 Katowice
urbanek.tom@interia.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.12.2001 r.