

JANUSZ PATKOWSKI, KRZYSZTOF WYTRYCHOWSKI

Pathophysiology of Apoptosis and Its Role in Allergic Inflammation and Allergic Diseases

Patofizjologia apoptozy i jej znaczenie w rozwoju zapalenia alergicznego i chorób alergicznych

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii AM we Wrocławiu

Streszczenie

Apoptoza jest ważnym procesem warunkującym homeostazę ustrojową poprzez zapewnienie wzajemnej równowagi między namnażaniem i śmiercią komórek. U podłoża zapalenia alergicznego leżą uwarunkowane genetycznie procesy immunologiczne związane z napływem wielu komórek wytwarzających prozapalne mediatory i cytokiny. Szybkość ustępowania reakcji alergicznej zależy natomiast od eliminacji tych komórek również na drodze apoptozy. Wśród wielu czynników warunkujących indukcję apoptozy należy zwrócić uwagę na rodzinę receptorów TNF, NGF, kaspaz i endonukleaz. W procesie wieloetapowych przemian biochemicznych indukują one podstawowy układ Fas/FasL zdolny do ostatecznego przekazania sygnału śmierci apoptotycznej komórki związanej z degradacją DNA przez nukleazy. Liczne badania eksperymentalne i obserwacje kliniczne wskazują na udział apoptozy w reakcjach alergicznych przez zahamowanie apoptozy komórek zapalnych – mastocytów, eozynofików, limfocytów T i neutrofilów. Skutkuje to nasileniem dynamiki zapalenia alergicznego przez zmiany w mikrośrodoisku związane z napływem mediatorów i cytokin. Stan ten w konsekwencji wpływa na potencjalizację chorób alergicznych, takich jak: astma oskrzelowa atopowa, sezonowy i całoroczny alergiczny nieżyt nosa i atopowe zapalenie skóry. Przyjmuje się, że jednym z mechanizmów zachwiania równowagi limfocytów Th₂/Th₁ w astmie oskrzelowej może być wzmożona apoptoza limfocytów Th₁ przy zwiększonym jednoczesnym przeżyciu limfocytów Th₂. Przedstawione dane wskazują na złożone mechanizmy procesu śmierci komórek. Wyjaśnienie tych mechanizmów może przyczynić się do skuteczniejszego leczenia chorób alergicznych (*Adv Clin Med* 2006, 15, 2, 321–328).

Słowa kluczowe: apoptoza, mechanizmy apoptozy, zapalenie alergiczne, choroby alergiczne.

Abstract

Apoptosis is an important process that causes tissue homeostasis due to balance between proliferation and death of cells. Increased recruitment of numerous cells producing pro-inflammatory mediators controlled by several genes is typically for allergic inflammation. Apoptosis is one of the mechanisms responsible for limitation of allergic reaction. A number of factors have been described that accelerate apoptosis including TNF family receptors, NGF, caspases and endonucleases. Cascade of biochemical events initiates programmed cell death including activation of Fas/FasL and degradation of DNA by endonucleases. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies showed that in allergic diseases delayed apoptosis leads to pathological accumulation of mastocytes, eosinophils, T lymphocytes and neutrophils. Increase of allergic inflammation is likely to be related to a dysregulation in the tissue microenvironment between pro- and anti-apoptotic mediators. This mechanism is responsible for development of allergic diseases like bronchial asthma, seasonal and perennial allergic rhinitis and atopic dermatitis. It is proposed that increased apoptosis of Th₁ lymphocytes and prolonged survive of Th₂ are responsible for asthma development. Apoptosis is a very complex process and understanding of its mechanisms might be possible to use apoptosis modulation as a novel therapeutic approach to the treatment of allergic diseases (*Adv Clin Med* 2006, 15, 2, 321–328).

Key words: apoptosis, mechanisms of apoptosis, allergic inflammation, allergic diseases.

Homeostaza organizmu wielokomórkowego jest zależna zarówno od regulacji proliferacji i różnicowania komórek, jak również od ich obumierania. Ostatecznie o liczbie komórek spełniających określone funkcje fizjologiczne decyduje wzajemna równowaga między namnażaniem i śmiercią komórek. Zagadnienie to jest obecnie w centrum zainteresowania biologii molekularnej i wielu działów medycyny klinicznej.

U podłoża zapalenia alergicznego leżą zdeterminowane procesy immunologiczne warunkujące jego fazę indukcyjną i efektorową. Obie fazy charakteryzują się napływem i aktywacją komórek – mastocytów, bazoofilów, eozynofili, limfocytów T i neutrofilów – w miejscu procesu zapalnego. Dynamika przebiegu reakcji alergicznej, a także szybkość jej ustępowania jest związana z zachowaniem równowagi między proliferacją a eliminacją komórek w miejscu zapalenia alergicznego. Obecnie dość dobrze poznano mechanizmy napływu i aktywacji tych komórek w chorobach alergicznych. Procesy eliminacji i ich późniejsze następstwa dla rozwoju zapalenia alergicznego są jednak dalekie od dostatecznego poznania.

Współcześnie śmierć komórki jest dokładnie określona i uważa się, że następuje po osiągnięciu tzw. „punktu nieodwracalności”, w którym wstecznie zmiany w komórce są już tak zaawansowane, że nie może ona utrzymać zdefiniowanej integralności strukturalno-funkcjonalnej [1]. Obecnie wiadomo, że każda komórka może być eliminowana na drodze martwicy lub apoptozy, chociaż niektórzy autorzy wyróżniają jeszcze tzw. onkozę jako możliwą formę śmierci komórki [2].

Nekroza jest нефизjologiczną formą śmierci komórkowej określaną również jako incydentalna śmierć komórki (*accidental cell death*). Wywołana jest działaniem różnorodnych czynników mechanicznych, fizycznych, chemicznych lub biologicznych, które prowadzą do nieodwracalnego szybkiego uszkodzenia błony komórkowej, organelli i jądra komórkowego. W kolejnych fazach dochodzi do zniszczenia struktur wewnątrzkomórkowych, obrzęku komórki, autolizy jądra i jej strukturalnego rozpadu z uwalnianiem zawartości do otoczenia, co prowadzi do miejscowego stanu zapalnego [2].

Apoptoza natomiast (*apoptosis* – opadanie płatków kwiatów lub liści) jest aktywnym uwarunkowanym genetycznie, kontrolowanym przez własne mechanizmy wewnątrzkomórkowe, procesem zaprogramowanej śmierci komórki (*PCD* – *programmed cell death*). Termin apoptoza został wprowadzony po raz pierwszy przez Kerr et al. [3] w 1972 roku na podstawie obserwacji morfologicznych zmian komórkowych w stanach fizjologicznych. 8 lat później ci sami badawcy zdefinio-

wali dokładnie formę śmierci komórek zachodzącą podczas apoptozy i nekrozy [4]. Proces apoptozy zaczyna się od wnętrza komórki, które zmniejszają swoją objętość w wyniku obkurczania cytoplazmy komórkowej przy jednoczesnej aktywacji endoproteaz i swoistych receptorów śmierci (*DR* – *death receptor*). Następnie dochodzi do kondensacji chromatyny i rozpadu DNA na drobne fragmenty. Zostają one potem otoczone fragmentami błony komórkowej i jądrowej, tworząc charakterystyczne wypuklenia, tzw. ciała apoptotyczne, zawierające niezmiennione organella komórkowe i chromatynę. Ulegają one niezapalnej eliminacji przez makrofagi i komórki dendrytyczne. Cały ten proces umożliwia stopniową dezintegrację komórki bez uwalniania z jej wnętrza enzymów i substancji cytotoksycznych, co pozwala na uniknięcie zapalenia sąsiadujących tkanek tak charakterystycznych dla nekrozy. Cechą charakterystyczną dla apoptozy jest ponadto tzw. faza utajniona występująca od zadziałania bodźca do kaskady śmierci komórki, co przemawia za wieloetapową złożonością procesu [5].

Biochemiczne i genetyczne uwarunkowania apoptozy

Wymiernym wykładnikiem biochemicznym apoptozy jest obecność pofragmentowanego DNA na odcinki stanowiące wielokrotność nukleosomów zawierających od 180–200 par zasad, co zachodzi pod wpływem aktywacji endonukleaz. Niezależnie od sposobu indukowania mechanizmu wczesnych etapów przemian biochemicznych, odpowiedzialnych za programowaną śmierć komórki (*PCD*), zasadnicze znaczenie przypisuje się aktywacji kaskady kaspaz. W obrębie ludzkich komórek wyizolowano przynajmniej 10 różnych typów kaspaz. Aktywna kaspaza-8 i kaspaza-10 uczynnia na drodze proteolizy kaspazę-3, ta zaś uwalnia endonukleazę CAD (*caspase-activated deoxyribonucleas*), która przedostaje się do jądra komórkowego i dokonuje fragmentacji chromosomalnego DNA, prowadząc w następstwie do śmierci komórki [6]. Mechanizm apoptozy klasycznej (zewnątrzkomórkowej) jest związany z dużym stężeniem kaspazy-8. Małe stężenie kaspazy-8 warunkuje natomiast apoptozę wewnątrzkomórkową. Kaspaza-3 występuje w dużych ilościach m.in. w nabłonku oskrzeli, limfocytach, hepatocytach i chondrocytach. Praktyczny jej brak wykazano zaś w neurocytach mózgowia i rdzenia kręgowego oraz w kłębkach nerkowych [7]. Podczas apoptozy obserwowano również zwiększenie aktywności γ -glutamylu-transpeptydazy, rybonukleazy i aktywatora plazminogenu.

Poza aktywacją kaspaz transdukcja sygnałów proapoptotycznych jest związana z aktywacją kompleksu PTPC (*permeability transition pore complex*) – tzw. „megakanalu” i kompleksu białek regulujących apoptozę Bcl-2 i Bax [8]. Kompleks PTPC związany z proapoptotycznym Bax prowadzi do zaburzenia integralności błony mitochondrialnej i przepływu innych proapoptotycznych molekuł – cytochromu C i AIF (*apoptosis inducing factor*) z przestrzeni międzybłonowej do cytozolu, gdzie ostatecznie dochodzi do wspomnianej aktywacji endonukleaz i kaspaz [9].

Członkowie rodziny Bcl-2 mogą zarówno indukować (Bax, Bad), jak i hamować (Bcl-2, Bcl-x) apoptozę przez regulację funkcji błony mitochondrialnej. Białka te, znajdując się w zewnętrznej strefie błony mitochondrialnej, w wyniku wzajemnej regulacji między działaniem czynników antyapoptotycznych (Bcl-2) i proapoptotycznych (Bax) wpływają na tworzenie kanałów jonowych, co pozwala na utrzymanie homeostazy wewnątrzkomórkowej.

Alternatywną drogą indukowania apoptozy przez białka z rodziny Bcl-2 jest ich interakcja z czynnikiem Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) oraz z cytochromem C i kaspazą-9. Powstały w ten sposób kompleks odgrywa zasadniczą rolę w procesie aktywacji kaspaz [8, 9].

Jak już wspomniano, apoptoza jest procesem czynnym wymagającym dopływu energii do komórki za pośrednictwem cyklinozależnych kinaz, takich jak kinaza cdc-2. Proces eliminacji komórek drogą apoptozy jest ponadto uwarunkowany genetycznie. U ludzi jest on regulowany przez 2 klasy genów: gen *c-myc* będący komórkowym protoonkogenem i gen *p-53* o działaniu supresyjnym w stosunku do komórek nowotworowych. Geny te są zdolne do indukowania apoptozy, ponieważ kodują jądrowe fosfoproteiny, które działają jako regulatory transkrypcyjne kontrolujące namnażanie i różnicowanie komórek oraz ich programowaną śmierć [10, 11]. Wydaje się więc, że niektóre poglądy, traktujące apoptozę jako wariant zaburzonej mitozy, mają w tym kontekście pewne uzasadnienie.

Drugą poznaną klasą genową jest rodzina genów *Bcl-2*. Gen *Bcl-2* jest określany jako tzw. „czynnik przetrwania”, który jest zdolny do zablokowania śmierci komórki zapoczątkowanej przez działanie genu *p-53* lub promieni jonizujących. Białko genu *p-53* może wywoływać apoptozę za pomocą mechanizmu polegającego na indukowaniu transkrypcji czynnika proapoptotycznego Bax i hamowaniu transkrypcji czynnika antyapoptotycznego Bcl-2, co zachodzi podczas apoptozy związanej z zaburzeniami adhezji komórkowej – brak integrin [12, 13].

Hamowanie apoptozy warunkują również

czynniki transkrypcyjne AP-1, a szczególnie czynnik NF- κ B. Zwiększa on ekspresję cząstek antyapoptotycznych, tzw. inhibitorów apoptozy. Supresja apoptozy przez NF- κ B dochodzi do skutku przez aktywację inhibitora apoptozy Bcl-x i aktywację genów proliferacji komórkowej m.in. dla ligandu CD₄₀ i GM-CSF oraz stymulację syntezy IL-2 [14].

W ostatnich latach zidentyfikowano kolejny gen – *Bak*. Białko tego genu Bak w odpowiedzi na czynniki stymulujące nasila apoptozę, hamuje natomiast apoptozę w komórkach transformowanych działaniem wirusa Epstein-Barra [11].

Mechanizmy apoptozy

Programowana śmierć komórki jest procesem aktywnym, który wymaga indukcji genów – trwa ona od kilku godzin do kilku dni. Mechanizmy pobudzania i hamowania apoptozy są niezwykle złożone i nie do końca poznane. Uzyskiwano zahamowanie apoptozy za pomocą działania inhibitorów m-RNA pod wpływem aktynomycyny D, cyklofosfamid, promieniowania γ i deksometazonu. Znanne są jednak przypadki, w których wspomniane inhibitory syntezy białek pobudzały apoptozę. Najdokładniej poznano proces przekazywania sygnału dla apoptozy w komórkach limfoidalnych [5].

Apoptoza aktywowanych limfocytów jest realizowana przede wszystkim za pomocą sygnału za pośrednictwem białka powierzchniowego – Fas/APO-1/CD₉₅ o charakterze receptora komórkowego należącego do nadrodziny receptorów TNF (*tumor necrosis factor*) i czynnika wzrostu nerwów NGF (*nerve growth factor*) – zwanych receptorami śmierci (DR – *death receptors*). Fas/APO-1/CD₉₅ był pierwszym poznanym receptorem, który jak wydawało się początkowo, że indukuje wyłącznie apoptozę, chociaż ostatnio wykazano, że może stymulować proliferację. Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 40–50 KD. U ludzi gen dla receptora Fas jest zakodowany na ramieniu długim chromosomu 10. Ekspresję receptora Fas u ludzi wykazano na aktywowanych limfocytach T, komórkach mieloidalnych, fibroblastach, niektórych komórkach zakażonych wirusem i na nielicznych limfocytach B. Apoptoza wywołana pobudzeniem receptora Fas przebiega szybko i jest wykrywalna już po kilku godzinach. Czynnikiem nasilającym ekspresję receptora Fas na powierzchni limfocytów B są cytokiny, takie jak: TNF- α i INF- γ [15, 16].

Pobudzenie receptora Fas prowadzi do zapoczątkowania procesu apoptozy w komórce. Naturalnym stymulatorem dla Fas jest inny receptor komórkowy sFasL – rozpuszczalny Fas-ligand. Związanie się receptora śmierci (Fas) ze swoistym

ligandem sFasL jest niezbędne w celu umożliwienia przekazania sygnału o indukcji apoptozy. Czynniki Fas i jego ligand FasL należą do dużej rodziny receptora TNF. Ekspresja receptora FasL jest ograniczona do aktywowanych limfocytów cytotoksycznych linii T i komórek NK. Gen kodujący dla Fas ligand znajduje się na chromosomie 1. Należy zaznaczyć, że FasL występuje również na powierzchni komórek „narządów uprzywilejowanych immunologicznie” – macicy, jajnika, jądra, oka i łożyska. Miejsca te są chronione przed odpowiedzią immunologiczną nie tylko na drodze sekwestracji anatomicznej, ale także w wyniku apoptozy komórek immunologicznie kompetentnych, gromadzących się w tych narządach, wywołanej interakcją układu Fas/FasL [17, 18].

Istotną rolę w przekazywaniu sygnału do apoptozy prawdopodobnie odgrywają przeciwciała skierowane przeciwko kompleksowi TCR/CD₃. Wiadomo, że receptor TCR limfocytów T jest receptorem tyrozynowym zbudowanym z łańcuchów białkowych, w tym z łańcucha CD₃. Stymulacja dojrzałych limfocytów T mitogenami prowadzi do zwiększenia stężenia wapnia w cytozolu, syntezy IL-2 i proliferacji komórek. Pobudzenie receptora TCR przez przeciwciało anti-CD₃ lub przez te same mitogeny, ale niedojrzałych limfocytów T (głównie tymocytów), prowadzi natomiast do śmierci komórek na drodze apoptozy. W zależności więc od stopnia dojrzałości komórki można wywołać skrajne procesy biologiczne – śmierć lub podziały komórkowe [19].

Pewne znaczenie w indukcji samobójczej śmierci komórki odgrywają także czynniki cytotoksyczne – perforyny i granzyny A i B. Są to serynowe proteazy syntetyzowane przez cytotoksyczne limfocyty T, aktywują one bezpośrednio proteazy cysteinowe z rodziny kaspaz. Przemawiają za tym wyniki badań [20], w których oceniano stężenie ICE/kaspazy-1 w surowicy chorych na astmę oskrzelową i alergiczny nieżyt nosa. Stwierdzono istotnie większe stężenie ICE/kaspazy-1 u chorych w porównaniu z osobami zdrowymi, co korelowało dodatnio z nasileniem apoptozy.

Apoptoza w stanach fizjologicznych, patologicznych i w regulacji odpowiedzi immunologicznej

Równowaga między procesami proliferacji i eliminacji komórek zapewnia zachowanie prawidłowej homeostazy ustrojowej. W ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań były zaburzenia proliferacji w różnych stanach chorobowych,

np. w rozwoju nowotworów. Badania z ostatnich lat dowiodły jednak, że równie ważne jak patologia namnażania komórek jest badanie upośledzenia procesu ich obumierania [15, 19].

Liczne badania doświadczalne i obserwacje kliniczne pozwoliły na określenie obecnie fundamentalnej roli apoptozy w procesach fizjologicznych; jest ona niezbędna począwszy od embriogenezy (rozwój tkanek i narządów) przez starzenie organizmu i procesy inwolucyjne – usuwanie zbędnych komórek [3, 4].

W stanach patologicznych natomiast dowiedziono jej roli w chorobach alergicznych, autoimmunologicznych, nowotworowych, w zakażeniach wirusowych i w chorobach neurodegeneracyjnych [34, 35].

Na drodze apoptozy są usuwane komórki nowotworowe i zakażone wirusem. Mechanizm apoptozy uczestniczy również w usuwaniu autoreaktywnych limfocytów, co zapobiega zjawisku autoimmunizacji. Zahamowanie apoptozy obserwuje się w licznych chorobach autoimmunologicznych, a zwłaszcza w reumatoidalnym zapaleniu stawów i w toczeniu rumieniowatym układowym [21]. Upośledzenie mechanizmów apoptozy stwierdzano także w chorobach neurodegeneracyjnych (chorobie Parkinsona i Alzheimerera) oraz w chorobach nowotworowych [22, 23]. W tych pierwszych dochodzi do nasilonej apoptozy licznych neuronów o.u.n. w wyniku nadmiernego gromadzenia się β -amyloidu. Komórki nowotworowe wykazują natomiast silną ekspresję dla układu receptorów Fas/Fas L limfocytów T i dlatego nie dochodzi do ich eliminacji przez układ immunologiczny gospodarza.

Jest znamienny również udział apoptozy w regulacji odpowiedzi immunologicznej, a zwłaszcza w immunogenezie. Apoptoza odgrywa istotną rolę w promocji autotolerancji, co jest bardzo ważne w nadzorze immunologicznym, zwłaszcza na etapie immunogenezy. W wyniku delecji klonalnej dochodzi bowiem do eliminacji limfocytów T i B, które są zdolne do rozpoznania własnych antygenów (limfocytów autoreaktywnych) w procesie apoptozy. W przypadku limfocytów T delecja klonalna ma miejsce głównie w grasicy i częściowo na obwodzie. Delecja limfocytów B zachodzi przede wszystkim w szpiku kostnym, a w mniejszym stopniu na obwodzie. Eliminacja autoreaktywnych limfocytów T i B, które rozpoznały własne cząstki MHC przebiega w procesie apoptozy przez aktywację układu Fas/APO-1/FasL. Niewielka liczba dojrzałych limfocytów T (które uniknęły delecji centralnej) zostaje poddana na obwodzie dodatkowej eliminacji. Odbyna się to z udziałem stymulacji receptora TCR i koreceptora CD₂₈. Limfocyty T wytwarzają wtedy niewielką

ilość IL-2, nie są zdolne do podziału, są anergiczne i obumierają również w procesie apoptozy [24].

Apoptoza pełni także ważną rolę w procesie cytotoksyczności komórkowej realizowanej przez limfocyty Th₈ i przez komórki NK. Cytotoksyczność jest uwarunkowana działaniem granzymów i perforyn, mających bezpośredni wpływ niszczący na komórki docelowe. Udowodniono, że oddziaływanie na te komórki polega na przekazaniu sygnału dla apoptozy na drodze interakcji między obecnym na powierzchni limfocytów cytotoksycznych ligandem FasL a receptorem Fas na komórkach docelowych. W fazie eliminacji komórki docelowej, skazanej na zagładę (komórki zarażone wirusem, komórki nowotworowe), limfocyty cytotoksyczne przekazują takiej komórce perforyny i granzym B, co uruchamia mechanizmy apoptozy [25].

Znaczenie apoptozy w rozwoju zapalenia alergicznego i chorób alergicznych

W świetle aktualnego stanu wiedzy przyjmuje się, że u podłoża chorób alergicznych leżą uwarunkowane genetycznie i środowiskowo procesy zapalenia alergicznego związane z zachwianiem równowagi między podtypami limfocytów wspomagających Th. Następstwem takiego przesunięcia jest przewaga liczbowa limfocytów Th₂ w stosunku do subpopulacji Th₁, co powoduje nadmierne wytwarzanie prozapalnych cytokin: IL-3, IL-4, IL-5, IL-15 i GM-CSF, mediatorów i czynników chemotaktycznych. Następuje naruszenie prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego, co w przypadku alergii atopowej objawia się zwiększeniem syntezy przeciwciał klasy IgE pozostającej pod ścisłą kontrolą IL-4 i IL-13 [26, 27]. Zarówno faza indukcyjna, jak i efektorowa reakcji alergicznej jest związana z udziałem licznych komórek – mastocytów, bazofilów, monocytów, neutrofilów, eozynofilów i limfocytów T – wytwarzających ww. mediatory [26]. Dotychczas zdecydowana większość badań zarówno w alergologii doświadczalnej, jak i klinicznej koncentrowała się na procesach dynamiki napływu komórek i wyzwalanych mediatorów. Stosunkowo niewiele natomiast jest obserwacji dotyczących roli apoptozy w eliminacji komórek uznawanych za kluczowe w rozwoju alergii. Liczne jednak badania z ostatnich lat wskazują na zmiany stanowiska.

Mastocyty

Komórki tuczne (mastocyty) odgrywają kluczową rolę we wczesnej fazie reakcji astmatycznej, uczestniczą także w podtrzymywaniu fazy przewlekłej. Ich liczba wzrasta wraz z rozwijaniem się zapalenia alergicznego. Przeżycie mastocytów po dotarciu do narządów efektorowych jest związane ze zmianą mikrośrodowiska uwarunkowaną miejscowym wytwarzaniem wielu cytokin. Wykazano, że usunięcie IL-3 ze środowiska wywołuje nasiloną apoptozę mastocytów, którą udaje się zahamować, podając czynnik SCF (*stem cell factor*). Przypuszcza się, że czynnik SCF jest odpowiedzialny za zwiększone przeżycie komórek tucznych w miejscu zapalenia alergicznego przez pobudzenie swoistego receptora c-Kit. Działanie czynnika SCF można zahamować, podając inną cytokinę TGF-β (*Transforming Growth Factor-β*), która hamuje ekspresję receptora c-Kit na powierzchni komórek tucznych [28].

Udowodniono również, że cytokiny prozapalne limfocytów Th₂ – IL-4, 5, 6, 13, szczególnie aktywne w miejscu zapalenia alergicznego, przedłużają czas przeżycia mastocytów przez zahamowanie apoptozy, wzmagając dynamikę zapalenia alergicznego [29].

Eozynofile

Eozynofile, uwalniając liczne cytokiny, białka polikationowe, a także wolne rodniki, wywierają niezwykle silne działanie prozapalne i odgrywają istotną rolę w kształtowaniu późnej fazy reakcji alergicznej. W astmie oskrzelowej prowadzą do uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych i nasilenia procesu przebudowy drzewa oskrzelowego. Wykazano, że czas przeżycia eozynofilów w środowisku tkankowym u człowieka wynosi około 5 dni. U chorych na astmę oskrzelową dochodzi do zwiększonej przeżywalności eozynofilów w wyniku zahamowania apoptozy, z udziałem zwiększonej ekspresji cytokin limfocytów Th₂ (IL-3, IL-5 i GM-CSF) i aktywacji kinaz tyrozynowych prowadzących do fosforylacji białek, które mogą przekazać sygnał genom antyapoptotycznym zapobiegającym śmierci komórki [30, 31]. U astmatyków ponadto, oprócz zwiększonego wytwarzania cytokin antyapoptotycznych, występuje zwiększona synteza NO w makrofagach i w komórkach nabłonka oskrzelowego, co również może hamować apoptozę eozynofilów i potencjalizować stan przewlekłego zapalenia eozynofilowego [30].

Nie można pominąć znaczenia eotaksyny, najsilniejszego czynnika chemotaktycznego dla eozynofilów, jednej z najważniejszych chemokin pro-

mających zapalenie alergiczne. Odgrywa ona istotną rolę w patomechanizmie astmy oskrzelowej, sezonowego nieżytu nosa i zapalenia zatok. Wykazano także zwiększone stężenie eotaksyny w drogach oddechowych u chorych na astmę oskrzelową. Dodatkowo eotaksyna hamuje apoptozę granulocytów kwasochłonnych w środowisku tkankowym [32].

Działanie antagonistyczne, nasilające apoptozę eozynofików, wywiera natomiast TGF- β – cytokina o silnym działaniu przeciwzapalnym. Zahamowanie apoptozy eozynofików może być więc przyczyną zwiększonej eozynofilii towarzyszącej chorobom alergicznym [31, 34].

Na uwagę zasługują badania Wolleya et al. [33], które rzucają bezpośrednie światło na znaczenie apoptozy eozynofików w astmie oskrzelowej. Autorzy wykazali, że poprawa kliniczna chorych po 14-dniowym leczeniu kortykosteroidami wiązała się ze zmniejszeniem liczby eozynofików w płwocinie i zwiększeniem liczby komórek wykazujących proces apoptozy. Badania te wskazują ponownie na ścisły związek procesów apoptozy z patofizjologią astmy oskrzelowej. W innych badaniach ci sami autorzy na modelu hodowli tkankowej (po polipektomii polipów z nosa) stwierdzili wysoką ekspresję m-RNA dla IL-5, postulując ścisły związek IL-5 z procesem apoptozy [33].

Limfocyty

Limfocyty T pełnią nadrzędną rolę w reakcjach immunologiczno-alergicznym. Z tego też względu dynamika apoptozy limfocytów może mieć zasadnicze znaczenie dla potencjalizacji względnie wygaszania mechanizmów zapalenia alergicznego. Badania Kowalskiego et al. [36] wykazały, że limfocyty wyizolowane z krwi obwodowej u chorych na astmę atopową i pyłkowicę wykazywały nasilony proces apoptozy w porównaniu z osobami zdrowymi.

Zaburzenie stosunku subpopulacji limfocytów Th₂/Th₁ na korzyść Th₂ w astmie oskrzelowej atopowej może być uwarunkowane zwiększoną eliminacją komórek Th₁ na skutek apoptozy. Hamzani et al. [37] wykazali zwiększoną liczbę limfocytów Th₂ przy jednoczesnym znacznym zmniejszeniu liczby limfocytów Th₁ spowodowanym eliminacją tych komórek na drodze apoptozy aktywowanej przez układ Fas/FasL. Powyższe zagadnienia bardziej wyjaśniają doświadczalne badania Zhanga et al. [38], przeprowadzone na modelu zwierzęcym. W badaniach *in vitro* wykazano masywny wzrost odsetka apoptotycznych limfocytów Th₁ do 48 godz. po stymulacji antygenem, podczas gdy po restymulacji antygenowej komór-

ki te obumierały już po 5–12 godz. Preferowane natomiast było przeżycie komórek Th₂, które nawet po 5–7 dniach nie podejmowały procesu apoptozy. Limfocyty Th₁ i Th₂ wykazują na swojej powierzchni zarówno antygen Fas i FasL, ale tylko limfocyty Th₂ mają wysokie poziomy FAP-1 enzymu, który aktywnie hamuje przewodzenie sygnału do apoptozy przez pobudzenie układu Fas/FasL [41].

Niezwykle interesujące są również wyniki badań Guerra et al. [39] nad zachowaniem się subpopulacji limfocytów Th₁ i Th₂ u pacjentów atopowych pod wpływem skutecznej klinicznie swoistej immunoterapii. Autorzy wykazali mianowicie zwiększoną apoptozę komórek Th₂ i spadek poziomu IL-4 z jednoczesnym zwiększeniem liczby limfocytów Th₁ i wzrostem poziomu INF- γ .

Monocyty

Monocyty są aktywne zarówno w fazie indukcyjnej, jak i efektorowej reakcji alergicznej. Badania Brattona et al. [40] dowiodły, że monocyty krwi obwodowej od osób z chorobami atopowymi (astma oskrzelowa, alergiczny nieżyt nosa i atopowe zapalenie skóry) wykazywały zwiększony czas przeżycia z wyraźnie obniżonym procesem apoptozy w porównaniu z monocytami osób zdrowych. Stwierdzono ponadto, że monocyty atopików okazywały się niewrażliwe na działanie IL-4, które u osób zdrowych potęguje proces apoptozy w tych komórkach.

Neutrofile

Neutrofile są komórkami obecnymi w każdym zapaleniu przez uwalnianie do otaczających tkanek enzymów proteolitycznych, niektórych cytokin i generacji toksycznych rodników tlenowych. Są komórkami krótko żyjącymi (od kilkudziesięciu godzin we krwi do 1–2 dni w tkankach), a po spełnieniu swej fizjologicznej funkcji w ognisku zapalenia są szybko fagocytowane przez makrofagi, co jest skutecznym mechanizmem ograniczającym miejscowo zapalenie [31, 34]. Proces apoptozy granulocytów obojętnochłonnych może być hamowany przez następujące mediatory zapalenia – TNF- α , GM-CSF, składnik C5a dopełniacza i peptydy chemotaktyczne. Ostatnio wykazano również hamujący wpływ leukotrienu B₄ na apoptozę neutrofilów. Interesujące były również badania poczynione podczas wygaszania późnej reakcji skórnej indukowanej swoistym alergenem, której towarzyszył nasilony proces apoptozy granulocytów obojętnochłonnych i kwasochłonnych [31, 42, 43]. Apoptoza

neutrofilów odgrywa ogromną rolę w kontroli uszkodzeń tkankowych i nacieków zapalnych, ponieważ neutrofile, które uległy apoptozie tracą właściwości chemotaktyczne, ulegając degranulacji. Aktywacja i przedłużony czas ich życia potencjalizuje procesy zapalne i uszkodzenie tkanek.

Zwracają uwagę pionierskie badania przeprowadzone w Klinice Chorób Wewnętrznych i Alergologii AM dotyczące mechanizmów regulujących apoptozę mięśni gładkich oskrzeli. Stwierdzono, że cytokiny uwalniane przez limfocyty T i eozynofile – TNF- α , IFN- γ i FasL – powodują w miocytach zmiany funkcjonalne, które prowadzą do ich śmierci o znamionach klasycznej apoptozy [44]. Badania te rzucają nowe światło na patomechanizm przebudowy drzewa oskrzelowego w astmie.

Podjęto również badania nad oceną apoptozy komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi ob-

wodowej w przypadkach ciężkiej astmy kortykosteroidoopornej. W literaturze światowej nie ma doniesień na ten temat. Dotychczasowe wstępne obserwacje wskazują na zmniejszenie odsetka apoptotycznych komórek jednojądrzastych u astmatyków steroidoopornych w stosunku do chorych na astmę steroidowrażliwą [45].

Literatura światowa ostatnich lat wzbogaciła się o liczne prace wskazujące na udział apoptozy komórek zaangażowanych w procesie zapalenia alergicznego nie tylko w astmie oskrzelowej i w sezonowym nieżycie nosa, ale również w atopowym zapaleniu skóry, a przede wszystkim w chorobach autoimmunologicznych [21, 34, 36, 38, 40]. Przedstawione powyżej dane wskazują na skomplikowany charakter mechanizmów regulujących apoptozę. Pełne poznanie ich roli w rozwoju zapalenia alergicznego pozwoli na optymalizację leczenia chorób alergicznych.

Piśmiennictwo

- [1] Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 1997, 26, 239–257.
- [2] Majno G, Joris J: Apoptoza, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995, 145, 3–16.
- [3] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26, 239–257.
- [4] Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980, 68, 251–301.
- [5] Schultz DR, Harrington WJJr: Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 2003, 32, 345–369.
- [6] Green D, Kroemer G: The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Cell Biology* 1998, 8, 267–271.
- [7] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998, 391, 43–50.
- [8] Antoson B, Conti F, Ciavatta A: Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997, 27, 370–374.
- [9] Zou H: Apaf-1, a human protein homologous to C elegans CED-4 participates in cytochrome-C dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997, 90, 405–408.
- [10] Wyllie AH: The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Der* 1995, 5, 97–104.
- [11] Hitendent T, Harrington EA, V'Conor R: Induction of apoptosis by the BCL-2 homologue BAK. *Nature* 1995, 374, 733–736.
- [12] Poylak K, Xia Y, Zweiver JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p-53 induced apoptosis. *Nature* 1997, 389, 300–304.
- [13] Meredith JE, Schwartz MA: Integrins, adhesion and apoptosis. *Cell* 1994, 78, 539–542.
- [14] Ghosh S, Karin M: Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002, 109 (Suppl.), S81–S96.
- [15] Abtado JP: Apoptosis: function and regulation of cell death. *Areas Immunol* 1996, 147, 443–456.
- [16] Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC: Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996, 236, 1–26.
- [17] Miyawaki T, Vehara T, Nibu R: Differential expression of apoptosis – related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992, 149, 3753–3758.
- [18] Kumar S: Apoptosis: Biology and Mechanisms, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York, 1999.
- [19] Bright J, Khar A: Apoptosis: programmed cell death in health and disease. *Biosci Rep* 1994, 14, 67–81.
- [20] Grzegorzczak J: Apoptoza – udział w rozwoju zapalenia alergicznego. *Alergia, Astma, Immunologia* 2003, 8, 20–23.
- [21] Szmyrka M: Markery apoptozy w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Praca doktorska AM, Wrocław 2000.
- [22] Troy CM, Shelanski ML: Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC 12 neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91, 6384–6389.
- [23] Mitsiades CS, Poulaki V, Mitsiades N: The role of apoptosis-inducing receptors of the tumor necrosis factor family in thyroid cancer. *J Endocrinol* 2003, 178, 205–216.
- [24] Mountz JD, Zou T, Su X, Wu J, Cheng J: The role of programmed cell death as an emerging concept of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996, 80, 2–14.
- [25] Ogawa N, Dang H, Talal N: Apoptosis and autoimmunity. *J Autoimmun* 1995, 8, 1–19.
- [26] Colavita AM, Reinach AJ, Peters SP: Contributing factors to the pathobiology of asthma. *Clin Chest Med* 2000, 21, 263–277.

- [27] **Hansen G, Berry G, De Kruyff A:** Specific Th₁ cell fail to counterbalance Th₂ cell-induced hyperreactivity but cause severe inflammation. *J Clin Invest* 1999, 103, 175–183.
- [28] **Piliponsky AM, Levi-Schaffer F:** Regulation of apoptosis in mast cells. *Apoptosis* 2000, 5, 435–441.
- [29] **Oskeritzian CA, Wang Z, Kochan JP, Grimes M, Du Z, Chang HW:** Recombinant IL-4 mediated apoptosis and recombinant human stem cell factor-dependent human mast cells derived from cord blood mononuclear cell progenitors. *J Immunol* 1999, 163, 5105–5115.
- [30] **Walsh GM:** Eosinophil apoptosis: mechanism and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *B J Haematol* 2000, 111, 61–67.
- [31] **Sampson AP:** The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000, 30 (Suppl.), 22–27.
- [32] **Fal AM, Rosiek M, Biegus J, Małolepszy J:** Eotaksyna i jej rola w patofizjologii zapalenia eozynofilowego. *Astma, Alergia, Immunologia* 2003, 8, 19–24.
- [33] **Wolley KL, Gibson PG, Carty K:** Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1996, 154, 237–243.
- [34] **Vignola AM, Chiappara G, Gagliardo R:** Apoptosis and airway inflammation in asthma. *Apoptosis* 2000, 5, 473–485.
- [35] **Tchórzewski H:** Nowe możliwości kontrolowania zapalenia alergicznego. *Pol Merk Lek* 2003, 14, 609–612.
- [36] **Grzegorzczak J, Kowalski ML, Piłat A, Iwaszkiewicz J:** Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: relation to serum markers of apoptosis. *Mediators Inflamm* 2002, 11, 225–233.
- [37] **Hamzaoni A, Hamzaoni K, Salah K, Chabbou A:** Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbations of asthma. *Mediators Inflamm* 1999, 8, 237–243.
- [38] **Zhang X, Brunner T, Carter L:** Unequal death in T helper cell (Th)₁ and Th₂ effectors: Th₁ but not Th₂, effectors undergo rapid Fas/FasL mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997, 185, 1837–1849.
- [39] **Guerra F, Carracedo J, Solana-Lara R:** Th₂ lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107, 647–653.
- [40] **Bratton DL, Hamid Q, Boguniewicz M:** Granulocyte Macrophage Colony – Stimulating factor contributes to enhanced monocyte survival in chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1995, 95, 211–218.
- [41] **Holtzman MJ, Green MJ, Jayaraman, Arch RH:** Regulation of T cell apoptosis. *Apoptosis* 2000, 5, 459–471.
- [42] **Simon O:** Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis-similarities and differences. *Immunol Rev* 2001, 179, 156–162.
- [43] **Zhang X, Moilanen E, Adcoc IM, Lindsay MA:** Divergent effect of mometasone on human eosinophil and neutrophil apoptosis. *Life Sciences* 2002, 71, 1523–1534.
- [44] **Solarewicz K:** Mechanizmy regulujące apoptozę komórek mięśni gładkich oskrzeli. Praca doktorska AM, Wrocław 2004
- [45] **Patkowski J, Wytrychowski K** – Informacja ustna.

Adres do korespondencji:

Janusz Patkowski
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych
i Alergologii AM
ul. Traugutta 57/59
50-417 Wrocław
tel.: +48 071 344 21 64

Conflict of interest: None declared

Praca wpłynęła do Redakcji: 12.07.2005 r.

Po recenzji: 30.08.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 8.09.2005 r.

Received: 12.07.2005

Revised: 30.08.2005

Accepted: 8.09.2005