

# Znaczenie apoptozy w patogenezie miażdżycy

Role of apoptosis in the pathogenesis of atherosclerosis

Danuta Zapolska-Downar<sup>1,2</sup>, Grażyna Sygitowicz<sup>2</sup>, Mirosław Jarosz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

## Streszczenie

Apoptoza jest formą genetycznie zaprogramowanej śmierci, która odgrywa główną rolę w regulacji ilości komórek w wielu tkankach, włączając w to tkankę naczyniowo-sercową. Badania ostatnich lat wskazują na znaczenie zaprogramowanej śmierci komórek w miażdżycy. Wykryto wiele regulatorów, które przyczyniają się do apoptozy komórek obecnych w płytce miażdżycowej i wyjaśniono mechanizmy ich działania. Wydaje się, że rola apoptozy w powstawaniu miażdżycy jest dwójaka i zależy od etapu zmiany miażdżycowej. We wczesnych etapach śmierć apoptotyczna komórek mięśni gładkich i komórek zapalnych może osłabiać proces apoptozy. Kiedy natomiast zmiana jest uformowana, apoptoza komórek śródbłonna i mięśni gładkich oraz makrofagów może promować wzrost płytki miażdżycowej i stan nadkrzepliwości oraz indukować jej pęknięcie. Wyjaśnienie molekularnych mechanizmów, które regulują apoptozę, może pomóc w opracowaniu nowych strategii leczenia miażdżycy i jej głównych komplikacji, ostrych epizodów naczyniowych. W pracy szczegółowo omówiono molekularne mechanizmy prowadzące do indukcji apoptozy. Na podstawie badań eksperymentalnych opisano warunki i różnego rodzaju czynniki biofizjologiczne i biochemiczne, które mogą wpływać na apoptozę komórek obecnych w płytce miażdżycowej. Ponadto przedyskutowano znaczenie apoptozy dla progresji miażdżycy i wystąpienia jej klinicznych powikłań.

**Słowa kluczowe:** apoptoza, miażdżycy, szlaki sygnalizacyjne, komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich, makrofagi

## Abstract

Apoptosis is a form of genetically programmed cell death, which play a key role in regulation of cellularity in a variety tissues, including the cardiovascular tissue. Studies over the past year have demonstrated the significance of programmed cell death in atherosclerosis. Some of the key regulators that contribute to the apoptosis of cells within the atherosclerosis lesion have been identified and their mechanism of action elucidated. It seems that the role of apoptosis in atherogenesis is dual, depending on the stage of the plaque. In early stages apoptotic death of smooth muscle cells and inflammatory cells may delay atherosclerotic process. However, once the plaque is formed, apoptosis of smooth muscle cells, endothelial cells and macrophages may promote plaque growth and pro-coagulation and may induce rupture. Clarification of the molecular mechanisms that regulates apoptosis may help design a new strategy for treatment of atherosclerosis and its major complication, the acute vascular syndromes. The article discusses in detail mechanisms leading to induction of apoptosis. On the basis of the results of experimental studies, the condition and various biophysiological and biochemical factors, which may influence apoptosis of vascular cells have been described. Moreover, the article discusses the relevance of apoptosis to plaque progression and clinical consequence of vascular cell apoptosis.

**Key words:** apoptosis, atherosclerosis, signaling pathway, endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages

Kardiologia Polska 2008; 66: 10 (supl. 3): 347–357

Apoptoza jest drugim obok nekrozy sposobem eliminacji komórek z organizmu, który zapewnia utrzymanie homeostazy dzięki zachowaniu równowagi między proliferacją a eliminacją niepotrzebnych czy nieprawidłowych komórek. Słowo „apoptoza” pochodzi z języka greckiego i oznacza opadanie płatków kwiatowych lub liści, co odnosi się do końca

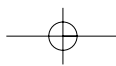
wegetacji roślin. Zostało zaproponowane przez Kerrego i wsp. [1], którzy w ten sposób określili zaprogramowany zespół zmian biochemicznych i morfologicznych charakteryzujący inny od nekrozy proces obumierania komórek.

Apoptoza inicjowana jest głównie przez czynniki wewnętrzne i dotyczy zazwyczaj pojedynczych komórek [2]. Jest

## Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Danuta Zapolska-Downar, Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, tel.: +48 22 572 07 35, e-mail: zapolska@vp.pl

Kardiologia Polska 2008; 66: 10 (supl. 3)



procesem skoordynowanym, genetycznie kontrolowanym i czynnym energetycznie. Najpierw następuje obkurczanie i zmniejszenie objętości komórki wskutek utraty wody i elektrolitów. Jednocześnie dochodzi do zagęszczania i marginalizacji chromatyny oraz degradacji jądrowego DNA. Następnie błona komórkowa fałduje (ang. *blebbing*). Na jej powierzchni pojawiają się tzw. ciała apoptotyczne, zawierające fragmenty cytoplazmy, organella komórkowe oraz fragmenty chromatyny. Ciała te są szybko fagocytowane przez makrofagi i sąsiadujące komórki, dzięki czemu nie dochodzi do uruchomienia mechanizmów odpowiedzi zapalnej.

W przeciwieństwie do apoptozy, nekroza jest bardziej chaotycznym modelem śmierci [2]. Powodowana jest głównie przez czynniki zewnętrzne, takie jak: ciśnienie osmotyczne, temperatura, związki toksyczne, stres hipoksyjny czy uszkodzenia mechaniczne. Zazwyczaj dotyczy zespołu komórek i nie wymaga nakładu energii. W nekrozie dochodzi do postępującej utraty integralności błony cytoplazmatycznej, napływu jonów sodu i wapnia oraz wody, co powoduje pęcznienie komórki. Kolejne stadium to obrzęk mitochondriów, fragmentacja błony cytoplazmatycznej i uwolnienie zawartości komórki do otaczającego środowiska, co powoduje reakcję obronną organizmu z wyzwoleniem odpowiedzi zapalnej. Różnice między apoptozą a nekrozą przedstawia Tabela I.

### Molekularne mechanizmy apoptozy

Wiele czynników wpływa na proces apoptozy i jego regulację. Sygnałem do rozpoczęcia tego procesu może być niedobór lub brak czynników wzrostowych, hormonów czy substancji odżywczych [3]. Mogą też to być uszkodzenia DNA, aktywacja onkogenów, stymulacja specyficznych receptorów błonowych i wewnątrzkomórkowych, obecność reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu lub promieniowanie jonizujące. Zaprogramowana śmierć komórki przebiega w trzech etapach [4, 5]. W pierwszym, zwanym fazą induk-

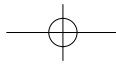
cji lub inicjacji oraz przekazywania sygnału, podejmowana jest decyzja o śmierci komórki pod wpływem wymienionych czynników wewnątrz- i zewnątrzpochodnych. Sygnał śmierci jest odczytywany i przekazywany wzdłuż określonych ścieżek, zależnych od sygnału i rodzaju komórki. Najlepiej poznаныmi ścieżkami są: wiązanie receptor-ligand – tzw. szlak zewnątrzpochodny, który w efekcie końcowym prowadzi do aktywacji jednej z kaspaz efektorowych – kaspazy 8, oraz szlak mitochondrialny – wewnątrzpochodny, podczas którego dochodzi do aktywacji innej kaspazy inicjującej – kaspazy 9. W kolejnym etapie, zwanym fazą wykonawczą, który jest wspólny dla różnych dróg sygnałowych inicjujących apoptozę, dochodzi do aktywacji kaspaz efektorowych przez powstałe w fazie pierwszej kaspazy inicjujące. Pod wpływem kaspaz efektorowych (głównie kaspazy 3) dochodzi do proteolizy wielu białek istotnych dla życia komórki i ostatecznie do jej śmierci. W ostatnim etapie, czyli fazie degradacji, następuje fagocytoza powstających ciałek apoptotycznych przez makrofagi i otaczające komórki.

### Faza inicjacji i przekazywania sygnału drogą zewnątrzpochodną (receptorową)

Transmisja sygnału śmierci poprzez ścieżkę zewnątrzpochodną rozpoczyna się związaniem ligandu ze specyficznym receptorem błonowym, zwanym receptorem śmierci [5]. Receptory te należą do nadrodziny czynnika martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor*, TNF) i są transbłonowymi cząsteczkami, których domeny zewnątrzkomórkowe odpowiadają za wiązanie z ligandem, zaś fragment cytoplazmatyczny, zawierający domenę śmierci (ang. *death domain*, DD) odpowiada za przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Dotychczas najlepiej poznane są mechanizmy zależne od receptora Fas (CD95, Apo1), dla którego ligandem jest rozpuszczalna forma Fas-L i receptora TNF-R1, dla którego ligandem jest TNF- $\alpha$ . Interakcje Fas/Fas-L powodują zmiany konformacyjne domeny DD. Dzięki temu re-

Tabela I. Różnice między apoptozą a nekrozą

	Apoptoza	Nekroza
Sposób eliminacji komórek	programowana, genetycznie kontrolowana śmierć komórki	chaotyczny model śmierci komórki
Czas	śmierć komórki jest procesem wieloetapowym, ale szybko zachodzącym	śmierć komórki w bardzo krótkim czasie (kilka minut)
Nakłady energii	proces czynny, endoenergetyczny	nie wymaga nakładu energii
Przebieg procesu	obkurczanie jądra i całej komórki, zagęszczanie i fragmentacja DNA; zmniejszenie objętości cytoplazmy i kondensacja materiału genetycznego; degradacja DNA i pofałdowanie błony komórkowej; powstanie i uwolnienie ciałek apoptotycznych (zachowanie ciągłości błony komórkowej)	utrata integralności błony cytoplazmatycznej; pęcznienie komórki i powstanie jądra pyknotycznego; dezintegracja błony komórkowej; obrzęk mitochondriów, fragmentacja błony cytoplazmatycznej, uwolnienie zawartości komórek do otaczającego środowiska pozakomórkowego
Wpływ na otaczające komórki	ciałka apoptotyczne są szybko fagocytowane przez makrofagi i sąsiadujące komórki	obecność produktów rozpadu komórki może uszkadzać sąsiadujące komórki
Odpowiedź organizmu	nie dochodzi do uruchomienia mechanizmów odpowiedzi zapalnej	wywołanie reakcji obronnej organizmu z wyzwoleniem reakcji zapalnej

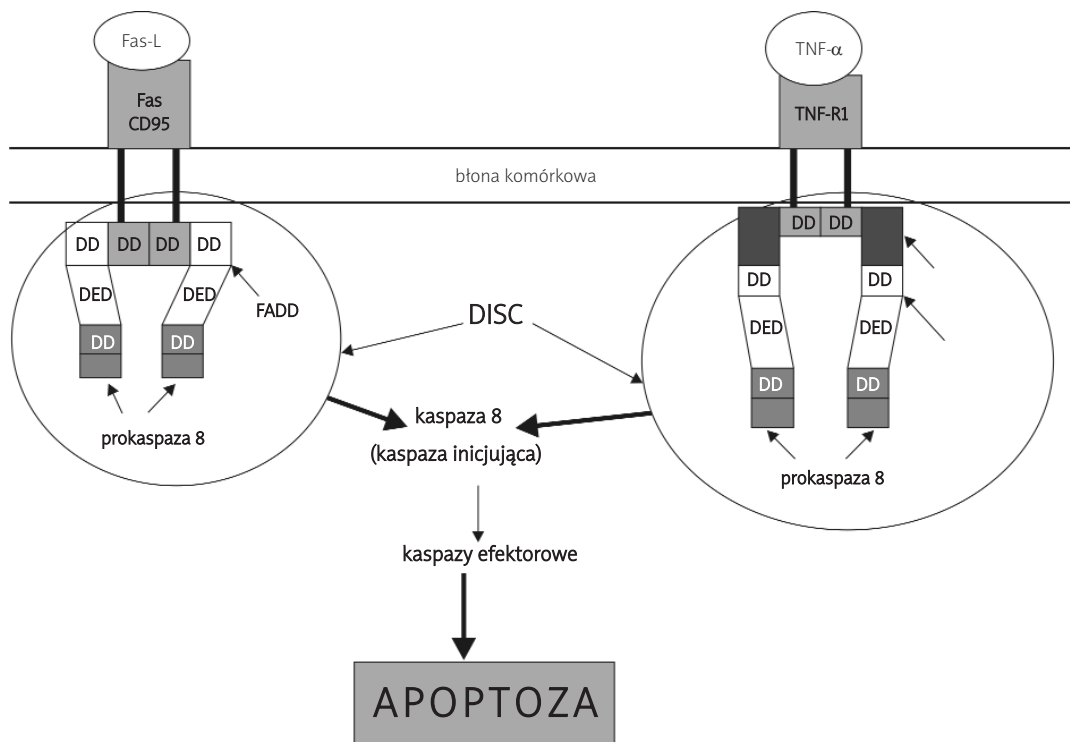


ceptor Fas łączy się z białkiem adaptorowym (ang. *fas-associated protein with death domain*, FADD) zawierającym również sekwencję DD, za pomocą której wiąże się z receptorem Fas. Białko FADD zawiera domenę DED (ang. *death effector domain*), do której przyłącza się za pomocą swojej domeny śmierci prokaspaza 8. Powstaje kompleks sygnalizujący apoptozę – DISC (ang. *death inducing signalling complex*), w obrębie którego dochodzi do przekształcenia prokaspazy 8 w aktywny enzym. TNF-R1 po połączeniu z TNF- $\alpha$  łączy się z TRADD (ang. *TNF-R1 associated death domain*). TRADD przekazuje sygnał do apoptozy pośrednio, przez wiązanie FADD, do którego, podobnie jak poprzednio, przyłącza się prokaspaza 8. Tworzy się DISC, w obrębie którego powstaje aktywna kaspaza 8, aktywująca następnie kaspazy efektorowe. Przebieg inicjacji apoptozy drogą zewnątrzpochodną przedstawia Rycina 1.

#### Faza inicjacji i przekazywania sygnału drogą wewnątrzpochodną (mitochondrialną)

Na szlaku wewnątrzpochodnym apoptozy za decyzje o śmierci komórki odpowiedzialne są mitochondria [5]. Wśród czynników indukujących mitochondrialny szlak apoptozy wy-

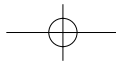
mienia się: wzrost reaktywnych form tlenu (RFT), wzrost stężenia jonów wapnia, czynniki zaburzające transport elektronów, uszkodzenia DNA, szok termiczny czy brak czynników wzrostu. Powyższe czynniki indukują szereg zmian, wśród których za wczesne uznaje się otwieranie porów mitochondrialnych, tzw. megakanatów. Są to leżące w miejscach styku zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej kompleksy białkowe składające się z translokatora nukleotydu adeninowego (ANT), napięciозależnego kanału anionowego (VDAC) i cyklofiliny D [6]. Otwarcie megakanatów prowadzi do obniżenia potencjału transbłonowego, co jest pierwszym sygnałem inicjacji apoptozy drogą wewnątrzpochodną [5]. Konsekwencją jest pęcznienie mitochondrium i pęknięcie błony wewnętrznej. Z przestrzeni międzybłonowej do cytozolu uwalniane są białka promujące śmierć komórki, m.in. cytochrom c, AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) czy prokaspazy 2, 3, 9. Uwolniony do cytoplazmy cytochrom c jest głównym czynnikiem promującym mitochondrialną kaskadę aktywacji. W obecności dATP łączy się z obecnym w cytoplazmie czynnikiem Apaf-1, co prowadzi do zmiany jego konformacji i w efekcie odsłonięcia domeny werbunku kaspazy (ang. *caspase and RIP adapter with death domain*, CARD).



**Rycina 1.** Faza inicjacji i przekazywania sygnału drogą zewnątrzpochodną

DD – domena śmierci (ang. *death domain*), DED – ang. *death effector domain*, DISC – kompleks sygnalizujący apoptozę (ang. *death inducing signaling complex*), FADD – ang. *fas associated protein with death domain* (białko adaptorowe), TRADD – *TNF-R1 associated death domain* (białko adaptorowe)





Z domeną CARD łączy się prokaspaza 9, w wyniku czego powstaje kompleks zwany apoptosomem. W obrębie apoptosomu dochodzi do aktywacji prokaspazy 9, która z kolei na drodze proteolizy uaktywnia prokaspazy efektorowe. Przebieg inicjacji apoptozy drogą wewnątrzpochodną przedstawia Rycina 2.

W regulacji mitochondrialnej drogi aktywacji apoptozy biorą udział białka błonowe należące do rodziny Bcl-2, które znajdują się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Członkowie tej rodziny mogą zarówno indukować (Bax, Bak, Bid, Bad, Bag i in.), jak i hamować (Bcl-2, Bcl-xL, Bod, Bim) apoptozę poprzez regulację przepuszczalności błony mitochondrialnej [7]. Białka antyapoptotyczne są zdolne tworzyć, natomiast białka proapoptotyczne uniemożliwiają tworzenie kanałów jonowych, zapewniających utrzymanie elektrochemicznej homeostazy [8]. Mogą stabilizować zewnętrzną błonę mitochondrialną poprzez modulację przepływu jonów przez kanały jonowe, a tym samym hamować tworzenie megakanałów i uwalnianie cytochromu c. Natomiast białka proapoptotyczne ulegają translokacji do wewnętrznej warstwy błony mitochondrialnej, gdzie w połączeniu z VDAC tworzą megakanały, przez które dochodzi do ucieczki cytochromu c.

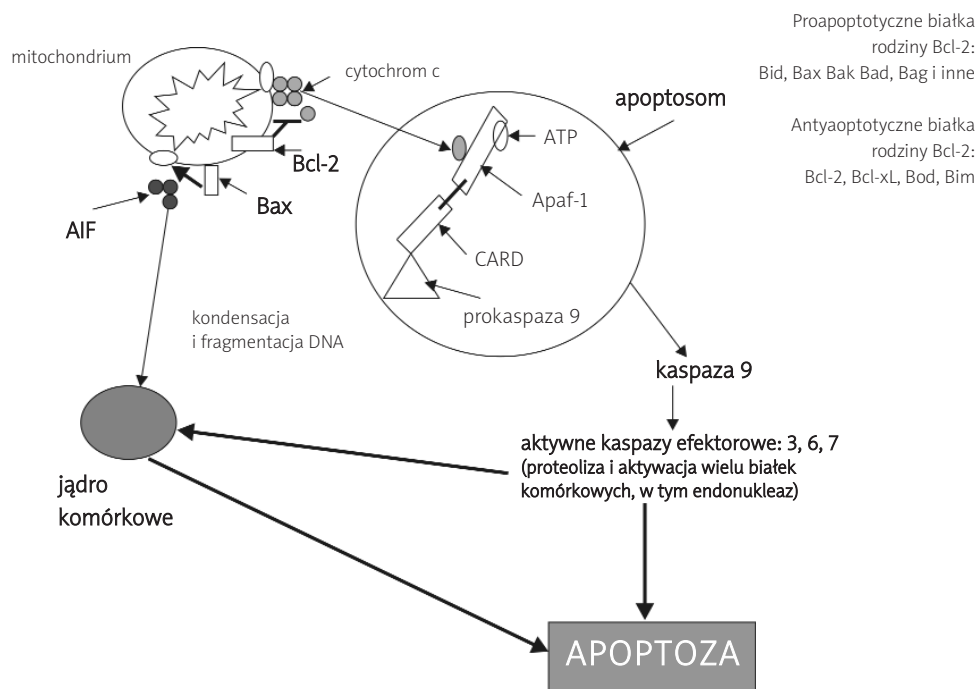
Jak wspomniano wcześniej, zmiany w przepuszczalności błony mitochondrialnej są związane również z uwalnianiem czynnika AIF. Jest to flawoproteina o właściwo-

ściach oksydoreduktazy, która w zdrowych komórkach jest zlokalizowana w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Uwolniony z mitochondriów AIF wędruje do jądra, gdzie wiążąc się z DNA, wywołuje niezależną od kaspaz kondensację i fragmentację DNA [9].

Ostatnie badania sugerują, że szlaki zewnętrz- i wewnątrzpochodny nie są całkowicie niezależne od siebie [5]. Powstająca w szlaku zewnątrzpochodnym kaspaza 8 może aktywować zlokalizowane w błonie zewnętrznej mitochondriów białko Bid. Bid ulega proteolizie pod wpływem kaspazy 8, co prowadzi do jego aktywacji. Aktywne białko Bid działa hamująco na Bcl-2, przez co promuje uwalnianie cytochromu c i uruchomienie szlaku wewnątrzpochodnego.

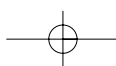
### Faza wykonawcza

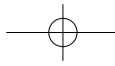
Drugim etapem zaprogramowanej śmierci komórki jest faza wykonawcza. Podczas jej przebiegu zostaje nieodwracalnie i ostatecznie uruchomiony program śmierci komórki. Białkami fazy wykonawczej są proteazy serynowe zwane kaspazami. Są syntetyzowane jako nieaktywne proteazy i aktywowane na drodze proteolitycznej poprzez odcięcie od zymogenu takiego fragmentu, który blokuje aktywność enzymu [5, 10]. Jako aktywne enzymy mają zdolność do rozrywania wiązania peptydowego leżącego bezpośred-



**Rycina 2.** Faza inicjacji i przekazywania sygnału drogą wewnątrzpochodną

AIF – ang. apoptosis inducing factor, CARD – domena werbunku kaspaz (ang. caspase and RIP adapter with death domain)





nio za kwasem asparaginowym. Są uważane za główne enzymy „maszyny proteolitycznej” apoptozy. Powstałe w pierwszym etapie kaspazy inicjujące aktywują kaspazy efektorowe (kaspazy: 3, 6 i 7). Wydaje się, że główną kaspazą efektorową jest kaspaza 3.

Aktywacja kaspaz efektorowych prowadzi do selektywnej i uporządkowanej degradacji białek strukturalnych i enzymatycznych, dając w końcowym efekcie inaktywację białek, które są istotne dla życiowych funkcji komórek [10, 11]. Enzymy te rozrywają połączenia między komórkami, dezorganizując cały cytoszkielet poprzez zniszczenie aktyny oraz filamentów pośrednich, co jest powodem charakterystycznych zmian morfologii komórek apoptotycznych. Natomiast zniszczenie lamininy uszkadza błonę jądrową. Degradacja białkowej kinazy DNA (uczestniczy w wykrywaniu uszkodzeń jądrowego DNA) i polimerazy (poli ADP) rybozy – PARP (bierze udział w rozpoznawaniu i naprawie uszkodzeń DNA) uniemożliwia proces naprawy uszkodzonego DNA. Swoistym substratem dla kaspaz jest czynnik fragmentacji DNA – DFF (ang. *DNA fragmentation fragment*), który aktywuje endonukleazy, enzymy degradujące DNA na fragmenty polinukleosomalne, a dalej na małe fragmenty oligonukleosomalne [11]. Główną endonukleazą jest CAD (ang. *caspase-activated DNAase*). Występuje ona w postaci nieaktywnej, związanej z podjednostką inhibitorową. Swą nukleolityczną aktywność ujawnia dopiero po zadziałaniu kaspazy 3 lub 7, które usuwają sekwencję inhibitorową. Dzięki działaniu endonukleaz obserwujemy jedną z najbardziej znanych i charakterystycznych cech komórek apoptotycznych, którą jest obecność w nich po-fragmentowanego na odcinki DNA, wykrywanego podczas elektroforezy na żelu jako „drabinki”.

Inną znaną cechą charakterystyczną apoptozy jest utrata asymetrii błony komórkowej w wyniku przemieszczenia się jednego z fosfolipidów – fosfatydyloseryny – z warstwy wewnętrznej na powierzchnię błony plazmatycznej, co można ocenić za pomocą barwienia aneksyną V [12]. Dzieje się tak dlatego, że już we wczesnych etapach fazy efektorowej dochodzi do hamowania enzymu utrzymującego asymetrię błony komórkowej.

#### Faza degradacji i usuwania ciałek apoptotycznych

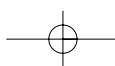
Ostatnią fazą w kaskadzie reakcji procesu apoptozy jest faza degradacji. W jej wyniku fragmenty materiału jądrowego, cytoplazmy i zachowanych organelii są upakowywane i otaczane fragmentami błony komórkowej – powstają ciała apoptotyczne [13]. Aktywność tkankowej transglutaminazy zapewnia stabilizację błony umierającej komórki i ciałek apoptotycznych. Powstające ciała apoptotyczne usuwane są poprzez ich specyficzne rozpoznawanie i fagocytozę przez makrofagi lub inne otaczające je komórki. Ligandem dla swoistego rozpoznawania ciałek apoptotycznych może być fosfatydyloseryna, znajdująca się na ich powierzchni w wyniku utraty asymetrii błony komórkowej [14]. Chroni to organizm przed uruchomieniem

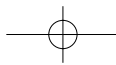
mechanizmów odpowiedzi zapalnej. Dodatkowo, komórki w trakcie apoptozy uwalniają reaktywne formy tlenu, które mogą indukować peroksydację fosfolipidów błony komórkowej. Wykazano, że komórki podlegające apoptozie zawierają w swojej błonie komórkowej epitopy, podobne do zmodyfikowanych oksydacyjnie LDL [13]. Te epitopy stają się ligandami do ich rozpoznawania i fagocytozy przez makrofagi za pomocą receptorów wymiatających (ang. *scavenger receptors*).

#### Rola białka p53 w regulacji apoptozy

Nadrzędną rolę w regulacji procesu apoptozy odgrywa gen *p53*. Jest to gen supresorowy, który kontroluje normalny wzrost i stabilność genomu [15, 16]. Świadczy o tym fakt, że mutacje tego genu są związane z większością chorób nowotworowych. Produktem genu *p53* jest białko p53, które jest głównym regulatorem cyklu komórkowego. W prawidłowej komórce poziom p53 jest niski, a jego dramatyczny wzrost obserwuje się po uszkodzeniu DNA czy też wywołaniu innych form stresu. W sytuacji uszkodzenia DNA indukcji genu *p53* towarzyszy zwiększona synteza i fosforylacja białka p53. Białko to decyduje o losie komórki; ma zdolność zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 lub skierowania go na drogę apoptozy, zależnie od stopnia uszkodzenia materiału genetycznego. Białko p53 wiąże się bezpośrednio z uszkodzonym DNA i działa jako czynnik transkrypcyjny, indukujący transkrypcję wielu genów. Ich produkty hamują podziały komórkowe, uczestniczą w naprawie DNA lub stymulują produkcję białek niezbędnych w apoptozie. W razie uszkodzenia DNA białko p53 zatrzymuje komórkę w fazie G1 poprzez wpływ na gen *p21* i pozwala na naprawę uszkodzeń DNA. Jeżeli naprawa uszkodzonego DNA jest niemożliwa, to białko p53 indukuje proces apoptozy, dzięki któremu komórka umiera i nie popętnia błędów. Białko p53 aktywuje proces apoptozy poprzez nasilenie ekspresji proapoptotycznego białka Bax. Jednocześnie blokuje gen *Bcl-2*, a tym samym zmniejsza ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2. Ponadto, stymuluje ekspresję receptora Fas na błonie komórkowej.

Rola genu *p53* jest dobrze poznana w aspekcie wielu chorób nowotworowych. Ostatnie badania wskazują na udział p53 w regulacji komórek obecnych w zaawansowanej zmianie miażdżycowej [17]. Zwiększoną ekspresję i fosforylację tego białka w połączeniu z oksydacyjnym uszkodzeniem DNA i jednoczesną aktywacją dróg naprawy tych uszkodzeń stwierdzono w zaawansowanej zmianie miażdżycowej [18]. Powyższe obserwacje sugerują, że to uszkodzenia DNA są odpowiedzialne za zwiększenie ekspresji p53. Rzeczywiście markery uszkodzenia DNA obecne są zarówno w komórkach krążących we krwi osób z miażdżycą, jak i komórkach obecnych w zmianie miażdżycowej [19]. Ponadto stopień uszkodzenia DNA koreluje z nasileniem miażdżycy u zwierząt doświadczalnych. Z wielu badań cytowanych w pracy wynika, że stwierdzone w płytce miażdżycowej p53 hamuje proliferację komó-





rek mięśni gładkich i jednocześnie promuje ich apoptozę. Niemniej wyniki pochodzące z badań przeprowadzonych na zwierzęcym modelu doświadczalnym miażdżycy u myszy pozbawionych jednocześnie genu *p53* są niejednoznaczne i kontrowersyjne. Sytuacja została częściowo wyjaśniona dzięki opublikowanym ostatnio wynikom badań [18], z których wynika, że u myszy *p53<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>* w porównaniu z myszami *ApoE<sup>-/-</sup>* zwierającymi gen *p53* zmiany miażdżycowe powstawały szybciej. Stwierdzono jednocześnie nasilenie szybkości proliferacji i zmniejszenie tempa apoptozy. Głównymi komórkami proliferującymi były monocyty/makrofagi, natomiast apoptoza dotyczyła w równym stopniu komórek mięśni gładkich i makrofagów. Przeszczep komórek szpiku zawierających *p53* prowadził do osłabienia formowania zmiany miażdżycowej, ale także znacznej redukcji apoptozy. Na podstawie tych wyników i analizy danych z literatury autorzy sformułowali następujące wnioski dotyczące roli *p53* w patogenezie miażdżycy: endogenne *p53* chroni komórki mięśni gładkich przed apoptozą, po części poprzez promowanie naprawy DNA, natomiast wzrost ekspresji *p53* powyżej poziomów podstawowych indukuje ich apoptozę. Wpływ na makrofagi jest nieco inny. Zarówno endogenne, jak i podwyższone poziomy *p53* promują apoptozę makrofagów, natomiast brak *p53* może prowadzić do ich nekrozy.

### Apoptoza komórek śródbłonka

Śródbłonek pokrywający naczynia w miejscach predysponowanych do rozwoju miażdżycy charakteryzuje się zwiększonym *turnover*, co sugeruje istnienie bezpośredniej zależności pomiędzy zwiększoną umieralnością i powstawaniem nowych komórek a podatnością na rozwój zmiany miażdżycowej. Uważa się, że zwiększony *turnover* komórek śródbłonka jest wynikiem nasilenia procesu apoptozy [20]. Zmiany miażdżycowe zlokalizowane są najczęściej w miejscach rozgałęzień i rozwidleń naczyń, czyli w miejscach z turbulentnym lub zwolnionym przepływem krwi. Obserwuje się tam osłabienie lub brak sił hemodynamicznych, takich jak: siły rozciągania (ang. *stretch stress*) i siły ścinania (ang. *shear stress*). W wielu badaniach wykazano, że takie warunki stymulują apoptozę komórek śródbłonka [21]. Natomiast szybki laminarny przepływ krwi hamuje apoptozę stymulowaną innymi czynnikami proaterogennymi. Siły ścinania, podobnie jak przepływ laminarny, mogą wywierać swoje działanie antyapoptotyczne poprzez stymulację uwalniania NO, zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego oraz wpływ na transkrypcję i ekspresję genów czynników wzrostowych [22]. Wpływ NO na apoptozę śródbłonka zależy od jego stężenia w komórce [22, 23]. W stężeniach fizjologicznych tlenek azotu zapobiega apoptozie. W zdrowych naczyniach fizjologiczne stężenia pojawiają się w wyniku działania endotelialnej syntazy NO (eNOS), której głównym aktywatorem są siły ścinania. Antyapoptotyczne działanie NO może się odbywać poprzez aktywację kinaz zależnych od cGMP, co pro-

wadzi do zahamowania apoptozy. Ponadto, tlenek azotu powoduje nitrozylację kaspaz, co prowadzi do ich inaktywacji. W miażdżycy obserwujemy inną sytuację. Dochodzi wówczas do zwiększonej produkcji NO poprzez indukowaną syntazę NO (iNOS), znajdującą się w makrofagach fagocytykujących zmodyfikowane formy LDL. Produkowane przez makrofagi wolne rodniki tlenowe tworzą z NO nad-tlenoazotyn, który jest źródłem rodników hydroksylowych. Zarówno NO, jak i rodniki hydroksylowe niszczą strukturę DNA i prowadzą do modyfikacji wielu białek, w tym enzymów łańcucha oddechowego. Może to być przyczyną indukcji apoptozy w tych komórkach.

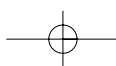
Pierwsze doniesienia o możliwości indukcji apoptozy w komórkach śródbłonka pojawiły się na początku lat 90. Robaye i wsp. [24] wykazali, że TNF może indukować apoptozę tych komórek. Jak wiemy, TNF- $\alpha$  jest cytokiną prozapalną, której głównym źródłem są makrofagi. TNF- $\alpha$  indukuje apoptozę głównie poprzez aktywację receptorów śmierci i tym samym uruchomienie szlaku zewnątrzpochodnego

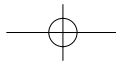
Z przeprowadzonych dotychczas badań *in vitro* wynika, że większość uznanych czynników ryzyka miażdżycy może indukować apoptozę komórek śródbłonka.

Oksy-LDL, które odgrywają główną rolę w patogenezie miażdżycy, mogą promować apoptozę poprzez wpływ na wiele mechanizmów regulujących tę zaprogramowaną śmierć komórki [13, 22, 23]. Stymulują apoptozę zarówno poprzez wpływ na szlak zewnątrz-, jak i wewnątrzpochodny. Działanie oksy-LDL na drodze receptorowej polega na zwiększeniu wrażliwości receptorów Fas na sygnały indukujące apoptozę. Wpływ oksy-LDL na szlak mitochondrialny zaznacza się w obrębie megakanatów w błonie mitochondrialnej. Zmienia się także stężenie wapnia w komórce. Dochodzi do uwalniania cytochromu c, powstania apoptosomu i aktywacji kaspazy 3. Proapoptotyczne działanie oksy-LDL może być również wynikiem ich wpływu na Bcl-2. Pod wpływem oksy-LDL zmniejsza się ekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2, bez wyraźnych zmian stężenia proapoptotycznego Bax. Ponadto oksy-LDL aktywują białko *p53* [25]. W płytce miażdżycowej oksy-LDL mogą zwiększać wrażliwość komórek śródbłonka na apoptozę poprzez hamowanie eNOS i tym samym zmniejszenie syntezy i uwalniania tlenu azotu.

Jednym z czynników patogenetycznych miażdżycy jest nasilenie stresu oksydacyjnego, a powstające w nadmiarze RFT są silnymi induktorami apoptozy. Indukcja apoptozy przez RFT została potwierdzona w badaniach, w których wykazano zahamowanie wywołanej oksysterolami apoptozy za pomocą przeciwutleniaczy, takich jak N-acetylocysteina czy witaminy E i C. W mediowanej RFT indukcji apoptozy dochodzi także do aktywacji białka *p53* [25].

Cukrzyca jest uznany za czynnik ryzyka miażdżycy. W badaniach *in vitro* wykazano, że wysokie stężenia glukozy indukują apoptozę komórek śródbłonka poprzez wpływ na aktywację kaskady kaspaz [27]. Z opublikowanych ostat-





nio danych wynika, że również homocysteina indukuje apoptozę w komórkach śródbłonna poprzez wpływ na aktywność kaspazy-3 [28]. Kolejnym czynnikiem indukującym apoptozę komórek śródbłonna jest angiotensyna II, substancja o silnych właściwościach proapoptotycznych [29].

Jak wynika z przedstawionych faktów, wiele czynników patogenetycznych miażdżycy oraz sytuacje promujące rozwój i progresję miażdżycy mogą indukować apoptozę komórek śródbłonna. Czy tak jest rzeczywiście *in vivo*? Należy przypuszczać, że jest to uzależnione od nasilenia działania czynników zarówno proapoptotycznych, jak i antyapoptotycznych. Może to zależeć od stężenia HDL, którym przypisuje się korzystne działanie w miażdżycy. Badania Suca i wsp. [30] wykazały, że HDL, a w szczególności apolipoproteina A, hamują stymulowaną oksy-LDL apoptozę komórek śródbłonna poprzez wpływ na uwalnianie jonów wapnia do cytozolu. Rozmiary apoptozy w płytce miażdżycowej mogą zależeć także od rodzaju lokalnie wydzielanych cytokin. IL-10 jest cytokiną, która hamuje zapalenie i odgrywa istotną, protekcyjną rolę w rozwoju miażdżycy. Ostatnio wykazano, że obecność tej cytokiny w płytce miażdżycowej była związana z redukcją apoptozy [31]. Warunki antyapoptotyczne w płytce miażdżycowej mogą być także wynikiem prawidłowych interakcji komórka-komórka czy też komórka-macierz pozakomórkowa [13]. Ponadto, może to również zależeć od ilości obecnych w płytce miażdżycowej czynników wzrostowych, które działają antyapoptotycznie, oraz od warunków hemodynamicznych w krążeniu.

### Apoptoza komórek mięśni gładkich

Apoptoza komórek mięśni gładkich może być indukowana przez wiele czynników i warunków obecnych w płytce miażdżycowej. Z badań *in vitro* wynika, że komórki mięśni gładkich pochodzących z ludzkiej zmiany miażdżycowej w porównaniu z komórkami zdrowych naczyń wolniej proliferują, szybciej się starzeją i wykazują wyższą podatność na apoptozę, co sugeruje, że istniejące w płytce warunki zmieniają ich fenotyp i podatność na działanie różnych mediatorów [32].

W zaawansowanej zmianie miażdżycowej, w pobliżu mięśni gładkich, stwierdza się duże ilości oksy-LDL [33]. Regiony te charakteryzują się wysoką ekspresją proapoptotycznego białka Bax i intensywną apoptozą komórek mięśni gładkich. Z badań *in vitro* wynika, że oksy-LDL mogą indukować apoptozę komórek mięśni gładkich poprzez wpływ na szlak receptorowy [34]. Aktywacji Fas/FasL towarzyszyła aktywacja kaskady kaspaz. Mogą także aktywować szlak mitochondrialny poprzez wpływ na białka z rodziny Bcl-2 [34]. Wykazano, że inkubacja komórek mięśni gładkich z oksy-LDL związana była ze zwiększeniem ekspresji proapoptotycznego białka Bax z jednoczesnym zmniejszeniem ekspresji antyapoptotycznego Bcl-2.

Apoptoza komórek mięśni gładkich w miażdżycy może być wynikiem interakcji z komórkami zapalnymi, które

na swej powierzchni mają ligandy dla receptorów śmierci oraz są źródłem proapoptotycznie działających cytokin. Obecne w zmianie miażdżycowej komórki mięśni gładkich mają na swej powierzchni Fas, natomiast makrofagi, limfocyty T oraz komórki śródbłonna mają FasL [33]. Badania przeprowadzone na wycinkach zmiażdżycowanych naczyń wykazały, że obecne w błonie wewnętrznej komórki mięśni gładkich zawierające na swojej powierzchni receptor Fas współistniały z apoptotycznymi komórkami mięśni gładkich w miejscach zawierających duże ilości makrofagów i limfocytów T. Tak więc apoptoza komórek mięśni gładkich z udziałem receptorów śmierci może zachodzić w miejscach, w których jest duża liczba komórek zapalnych. Inkubacja komórek mięśni gładkich z cytokinami, takimi jak INF- $\gamma$  czy IL-1, związana była z indukcją ekspresji Fas i podwyższeniem wrażliwości na apoptozę [35]. Cytokiny wydzielane przez makrofagi i limfocyty T mogą działać poprzez zwiększenie wydzielania NO, który może zabijać komórki mięśni gładkich poprzez wpływ na szlak mitochondrialny [33].

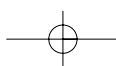
Niedostatek lub upośledzenie dostępu czynników wzrostu może być również silnym induktorem apoptozy komórek mięśni gładkich. Takim przykładem może być IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor-1*), który jest czynnikiem antyapoptotycznym dla tych komórek [36]. Aktywacja receptora dla tego czynnika hamuje indukowaną oksy-LDL apoptozę poprzez wpływ na uwalnianie cytochromu c. Działanie IGF-1 w komórkach mięśni gładkich pochodzących ze zmiany miażdżycowej może być osłabione, gdyż w komórkach tych stwierdza się obniżoną ekspresję receptora dla tego czynnika [37]. Warto podkreślić, że metaloproteinazy produkowane przez makrofagi mogą się przyczyniać do apoptozy komórek mięśni gładkich poprzez degradację składowych tkanki łącznej, od których te komórki otrzymują istotne sygnały do przeżycia [38].

Jak wspomniano wcześniej, białko p53 może być również zaangażowane w apoptozę komórek mięśni gładkich w miażdżycy. Pochodzące ze zmiany miażdżycowej komórki mięśni gładkich są bardziej podatne na apoptozę mediowaną p53 [39]. Z badań przeprowadzonych na zwierzętach wynika, że wywołany dietą hipercholesterolową stres oksydacyjny doprowadzający do uszkodzenia DNA był związany ze wzrostem ekspresji p53 [40].

### Apoptoza makrofagów

Apoptoza makrofagów widoczna jest we wszystkich stadiach miażdżycy i prawdopodobnie jest wynikiem oddziaływania wielu czynników, które są różne w zależności od stadium choroby. Na podstawie badań przeprowadzonych na kulturach komórkowych wytoniono kilka możliwych czynników działających proapoptotycznie na makrofagi [41]. Mogą to być oksy-LDL, cytokiny zapalne, wysokie stężenia NO, niedostatek czynników wzrostowych czy wewnątrzkomórkowe nagromadzenie wolnego cholesterolu.

Uważa się, że za proapoptotyczne działanie oksy-LDL na makrofagi odpowiedzialne są zawarte w nich oksyste-



role [42]. Indukują apoptozę makrofagów poprzez wpływ na drogę mitochondrialną, którą uruchamiają poprzez zwiększenie napływu wapnia do cytozolu lub poprzez zwiększenie tworzenia RFT. Ponadto aktywują białka proapoptotyczne Bad i Bim poprzez ich defosforylację z następczą translokacją do błony mitochondrialnej. Jednocześnie hamują ekspresję białek antyapoptotycznych.

Z ostatnich badań wynika, że niektóre cytokiny produkowane przez obecne w zmianie miażdżycowej komórki zapalne mogą indukować apoptozę makrofagów. Taką cytokiną, produkowaną przez limfocyty T i obecną w płytce miażdżycowej, jest interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), który hamuje syntezę DNA i indukuje apoptozę makrofagów [33]. Proapoptotyczne działanie przypisuje się również IL-18 – cytokinie, której dużą ekspresję, zlokalizowaną w pobliżu makrofagów, stwierdza się w zaawansowanej zmianie miażdżycowej [33].

Silnym induktorem apoptozy makrofagów, szczególnie istotnym dla apoptozy tych komórek w zmianie zaawansowanej, jest akumulacja dużych ilości wolnego cholesterolu [42, 43]. We wczesnych etapach miażdżycy nie dochodzi do nadmiernej akumulacji cholesterolu, ponieważ z jednej strony w wyniku działania acetylotransferazy cholesterolu (ACAT) podlega on estryfikacji, z drugiej zaś strony przy sprawnie działającym mechanizmie *efflux* usuwany jest z komórki. W zmianie zaawansowanej dochodzi do stopniowego obniżania zawartości ACAT i upośledzenia usuwania cholesterolu z komórki z jednoczesnym jego nagromadzeniem zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowo. Z dotychczas przeprowadzonych badań [42, 43] wynika, że nadmierna akumulacja wolnego cholesterolu w makrofagach prowadzi do indukcji apoptozy zarówno drogą zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkową. Aktywacja drogi receptorowej związana była z aktywacją kaspazy 8, którą udało się zahamować poprzez zastosowanie przeciwciał anty-FasL. Już we wczesnych etapach akumulacji cholesterolu w makrofagach dochodziło do obniżenia potencjału transbłonowego mitochondriów, uwalniania cytochromu c i aktywacji kaspazy 9. Zaobserwowano także wzrost poziomu Bax zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach. Potwierdzeniem istotnej roli nagromadzenia wolnego cholesterolu w apoptozie makrofagów są badania przeprowadzone na myszach transgenicznych pozbawionych jednocześnie genu dla receptora LDL i genu dla ACAT [44]. U myszy tych dochodzi do nasilenia tworzenia zmian miażdżycowych, zwiększenia ilości wolnego cholesterolu, redukcji liczby makrofagów oraz nasilenia ich apoptozy.

### Potencjalne znaczenie apoptozy w miażdżycy i pękaniu płytki miażdżycowej

Wyniki ostatnich badań sugerują, że apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, odgrywa istotną rolę w progresji miażdżycy. Wykorzystując techniki barwienia wyinków naczyń w celu wykazania obecności cech apoptotycznych, stwierdzono, że w zmiażdżycowanej ścianie naczynia dochodzi do apoptozy obecnych tam komórek [13, 45, 46].

Proces ten nie występuje w zdrowych naczyniach. Komórki apoptotyczne stwierdza się już na poziomie pasm tłuszczowych, jednak największą intensywność apoptozy obserwuje się w zmianie zaawansowanej. Dystrybucja apoptozy w obrębie blaszki miażdżycowej nie jest jednolita. Najczęściej występuje w regionach z dużą ilością makrofagów, co sugeruje, że komórki te biorą udział w jej indukcji.

O ile śmierć komórek obecnych w zmianie miażdżycowej jest już sprawą oczywistą, to udział apoptozy tych komórek w progresji miażdżycy nie został do końca wyjaśniony. Podobnie jest w przypadku spekulacji na temat potencjalnej, szkodliwej lub korzystnej, roli apoptozy komórek blaszki w patogenezie i progresji miażdżycy. Zestawienie korzystnych i niekorzystnych następstw apoptozy komórek ściany naczynia przedstawia Tabela II.

Apoptozę komórek mięśni gładkich rozpatruje się jako zjawisko niekorzystne, gdyż może ona prowadzić do osłabienia czapeczki łącznotkankowej, a tym samym do powstania niestabilnej zmiany predysponowanej do pęknięcia [22, 33, 34]. Blaszka miażdżycowa predysponowana do pęknięcia charakteryzuje się obecnością zwiększonej liczby makrofagów oraz zmniejszoną liczbą komórek mięśni gładkich, co sugeruje, że apoptoza komórek mięśni gładkich może być stymulowana przez makrofagi. W blaszkach miażdżycowych osób z niestabilną postacią choroby niedokrwiennej w porównaniu z jej postacią stabilną stwierdza się zwiększony poziom apoptozy komórek mięśni gładkich [47]. Pomimo że powyższe badania sugerują istnienie związku przyczynowego pomiędzy apoptozą komórek mięśni gładkich a pękaniem blaszki miażdżycowej, nadal nie ma wielu bezpośrednich dowodów na istnienie takiej zależności. Ostatnio opublikowane zostały badania przeprowadzone na zwierzęcym modelu doświadczalnym miażdżycy skonstruowanym tak, że możliwa była selektywna indukcja apoptozy komórek mięśni gładkich [48]. Z badań tych wynika, że apoptoza tych komórek związana jest z pojawieniem się wielu cech charakterystycznych dla płytki podatnej na pęknięcie. Stwierdzono osłabienie czapeczki łącznotkankowej, powiększenie rdzenia nekrotycznego, utratę białek strukturalnych oraz intensywne miejscowe zapalenie. Ponadto w zmianie miażdżycowej stwierdzono duże ilości fragmentów ciałek apoptotycznych otoczonych makrofagami, co może świadczyć o upośledzeniu ich usuwania. Autorzy sugerują, że defekt ten prowadzi do wtórnej nekrozy, której następstwem może być zaobserwowana również zwiększona ekspresja MCP-1 (czynnik chemotaktyczny dla monocytów) oraz wzrost IL-6.

Wydaje się, że apoptoza makrofagów i limfocytów T powinna być zjawiskiem korzystnym, ze względu na usuwanie komórek odgrywających istotną rolę w progresji miażdżycy. Mogłoby to osłabić odpowiedź zapalną oraz obniżyć ilość metaloproteinaz, enzymów trawiących składowe tkanki łącznej czapeczki pokrywającej zmianę miażdżycową, a tym samym sprzyjałoby stabilizacji blaszki miażdżycowej.

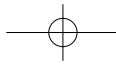


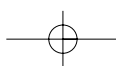
Tabela II. Skutki apoptozy w miażdżycy

Korzystne skutki apoptozy	Szkodliwe skutki apoptozy
<ul style="list-style-type: none"> <li>• jako proces fizjologiczny równoważy mitozę</li> <li>• ogranicza akumulację komórek</li> <li>• hamuje nadmierny rozwój warstwy wewnętrznej</li> <li>• ogranicza odpowiedź zapalną poprzez eliminację limfocytów T i makrofagów</li> <li>• jest procesem adaptacyjnym – poprzez eliminację szkodliwych/zbędnych komórek, bez naruszenia integralności ściany naczynia</li> <li>• stanowi czynnik stabilizujący blaszkę – zmniejsza pulę makrofagów i aktywność metaloproteinaz trawiących macierz pozakomórkową</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• doprowadza do zaniku czapeczki łącznotkankowej</li> <li>• poprzez usuwanie komórek mięśni gładkich prowadzi do obniżenia syntezy tkanki łącznej i destabilizuje blaszkę</li> <li>• apoptoza endotelium inicjuje erozję blaszki, promuje miejscową agregację trombocytów oraz wyzwolenie kaskady krzepnięcia</li> <li>• apoptoza makrofagów i komórek piankowatych z ich następującą nekrozą przyczynia się do wzrostu rdzenia lipidowego oraz formacji kaszki</li> <li>• jest źródłem chemotaktycznych, prokoagulacyjnych i stymulujących wzrost zmiany miażdżycowej ciałek apoptotycznych</li> <li>• zwiększa ryzyko autoimmunizacji</li> <li>• zwiększa właściwości prokoagulacyjne blaszki; fosfatydyloseryna ekspozycja podczas apoptozy znacznie wzmacnia aktywność czynnika tkankowego</li> <li>• ciała apoptotyczne, jeśli nie są skutecznie usuwane, mogą się gromadzić w obszarze rdzenia lipidowego, a związany z tym nadmiar jonów <math>Ca^{2+}</math> sprzyja kalcyfikacji blaszki, typowej dla stadium zaawansowanego</li> </ul>

Znaczenie apoptozy makrofagów nie jest do końca jednoznaczne. Wydaje się, że jest w dużej mierze uzależnione od stadium zaawansowania zmiany miażdżycowej. Sugeruje się, że we wczesnych etapach miażdżycy apoptoza makrofagów jest zjawiskiem sprzyjającym stabilności płytki miażdżycowej [41]. Inaczej jest jednak w zaawansowanej zmianie. Apoptoza makrofagów w tym przypadku wydaje się zjawiskiem niekorzystnym i może się przyczyniać do progresji miażdżycy, między innymi dlatego że prowadzi do powstania pozakomórkowego rdzenia lipidowo-nekrotycznego. Jak wspomniano wcześniej, zmiana zaawansowana zawiera dużo więcej makrofagów podlegających apoptozie niż zmiana wczesna, co sugeruje, że we wczesnych etapach miażdżycy fagocytowanie komórek apoptotycznych jest wystarczające, a w zaawansowanych zmianach upośledzone. Jedną z przyczyn upośledzonego usuwania komórek apoptotycznych mogą być obecne w płytce miażdżycowej oksy-LDL, które przez kompetycyjne blokowanie receptorów dla komórek apoptotycznych hamują ich wyłapywanie przez fagocyty. Defektywna fagocytoza ciałek apoptotycznych prowadzi do ich nagromadzenia w blaszce miażdżycowej oraz nagromadzenia materiału o silnych właściwościach pobudzania reakcji immunologicznej [49]. Nieusunięte komórki apoptotyczne mogą ponadto podlegać wtórnej nekrozie i prowadzić do pozakomórkowej akumulacji lipidów i nasilenia odpowiedzi zapalnej.

Niewątpliwie apoptoza komórek śródbłonna jest zjawiskiem niekorzystnym i może być odpowiedzialna za transformację zmiany stabilnej w zmianę predysponowaną do pęknięcia [13, 23]. Apoptoza śródbłonna może

inicjować erozję blaszki miażdżycowej, co prowadzi do odstonięcia włókien kolagenu, a tym samym adhezji i agregacji płytek krwi. Do wnętrza blaszki miażdżycowej poprzez uszkodzone powłoki wdiera się krew i dochodzi, między innymi, do kontaktu z czynnikiem tkankowym (TF). Głównym źródłem obecnego w blaszce miażdżycowej TF są zaktywowane makrofagi. TF jest glikoproteiną, która aktywuje zewnątrzpochodny tor krzepnięcia i przyczynia się do tworzenia trombin. Zarówno komórkowy, jak i pozakomórkowy TF jest głównym determinanem trombo-genności rdzenia lipidowego. Tak więc erozja blaszki miażdżycowej będąca wynikiem apoptozy komórek śródbłonna może prowadzić do tworzenia zakrzepu zamykającego światło naczynia, przyczyniając się tym samym do wystąpienia ostrych epizodów wieńcowych. Apoptoza komórek śródbłonna prowadzi do zmian ich fenotypu, czyli osłabienia naturalnych funkcji przeciwzakrzepowych, a tym samym do powstania środowiska sprzyjającego stanowi nadkrzepliwości [50]. Apoptoza komórek śródbłonna może promować zarówno lokalną, jak i systemową nadkrzepliwość. Komórki czy też ciała apoptotyczne, zawierające na swej powierzchni fosfatydyloserynę, uwalniają mikrofragmenty błon z dużą zawartością tego fosfolipidu o silnych właściwościach prozakrzepowych [13]. Mikrofragmenty te mogą następnie pojawiać się w krążeniu. Zwiększone poziomy krążących we krwi mikrofragmentów stwierdzone zostały w przypadku większości chorób naczyniowo-sercowych [51]. Podobnych obserwacji dokonano u osób z nadciśnieniem, otyłością i hipercholesterolemią.

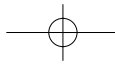


Wydaje się, że najważniejsze znaczenie apoptozy w patogenezie miażdżycy, a szczególnie w wystąpieniu ostrych powikłań klinicznych, jest związane z nasileniem stanu nadkrzepliwości. Dotyczy to nie tylko komórek śródbłonna, ale także apoptozy innych komórek znajdujących się w blaszce miażdżycowej. Jest bowiem bardzo prawdopodobne, że niepodlegające natychmiastowemu usuwaniu ciątka apoptotyczne czy znajdujące się w płytce miażdżycowej mikrofragmenty błon, zawierające fosfatydyloserynę, mogą aktywować znajdujący się tam czynnik tkankowy. To z kolei mogłoby stwarzać idealne warunki do inicjacji kaskady krzepnięcia w momencie pęknięcia płytki miażdżycowej i ekspozycji rdzenia lipidowego na elementy wdzierającej się tam krwi. Potwierdzają to badania [52], w których wykazano, że apoptoza makrofagów jest istotnie wyższa w miejscach pęknięcia płytki miażdżycowej i tworzenia zakrzepu u osób, u których doszło do nagłej śmierci sercowej.

Z przedstawionych danych wynika, że apoptoza obecnych w płytce miażdżycowej komórek może być jednym z czynników patogenetycznych miażdżycy, przy czym wydaje się, że odgrywa ona przede wszystkim istotną rolę w pękaniu płytki miażdżycowej i powstawaniu zakrzepu, a tym samym wystąpieniu ostrych powikłań klinicznych. Podlegające apoptozie komórki śródbłonna mają silne właściwości prokoagulacyjne, co może sprzyjać powstawaniu zakrzepu, podczas gdy apoptoza komórek mięśni gładkich i makrofagów może nasilać odpowiedź zapalną oraz być przyczyną destabilizacji czapeczki pokrywającej zmianę miażdżycową. Niemniej należałoby stwierdzić, że nieznamy jest dokładny i rzeczywisty rozmiar wpływu apoptozy na te procesy. Miażdżycą jest chorobą o wieloczynnikowej patogenezie, dlatego niezbędne są badania prowadzone na zwierzęcym modelu pęknięcia blaszki miażdżycowej. Badania takie pozwoliłyby lepiej zrozumieć molekularne i komórkowe mechanizmy istotne dla wystąpienia ostrych powikłań miażdżycy i jednocześnie w przyszłości skuteczniej zapobiegać wystąpieniu ostrych epizodów naczyniowo-sercowych u ludzi.

#### Piśmiennictwo

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br Cancer* 1972; 26: 239-57.
- Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 189-96.
- Nalepa G, Łukowska-Szczechowska E. Kaspazy i apoptoza: umrzyj i pozwól żyć. *Wiad Lek* 2002; 55: 100-6.
- Twomey C, McCarthy JV. Pathway of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 345-59.
- Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-23.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998; 187: 1261-71.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997; 277: 370-2.
- Cande C, Cecconi F, Dessen P, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 2002; 115: 4727-34.
- Shi Y. Caspase activation, inhibition and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 2004; 13: 1979-87.
- Lavrick IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115: 2665-72.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51.
- Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 947-62.
- Drewna T, Olszewska D, Woźniak A. Znaczenie zaprogramowanej śmierci komórki w patogenezie chorób człowieka. *Pol Merk Lek* 2002; 70: 336-41.
- Mróz P, Młynarczyk I. Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Post Biol Kom* 2003; 27: 527-68.
- Crow MT. Revisiting p53 and its effectors in ischemic heart injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 401-3.
- Mercer J, Bennett M. The role of p 53 in atherosclerosis. *Cell Cycle* 2006; 5: 1907-9.
- Martinet W, Knaapen M, De Mayer GR, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 106: 927-31.
- Mecer J, Mahmoudi M, Bennet M. DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. *Mutat Res* 2007; 621: 75-86.
- Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9: 697-8.
- Kaiser D, Freyberg MA, Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 586-90.
- Knock MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovas Res* 2000; 45: 736-46.
- Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: Biochemical characteristics and potential implication for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1673-90.
- Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, et al. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1991; 138: 447-53.
- Cheng J, Cui R, Chen CH, et al. Oxidized low-density lipoprotein stimulates p 53-dependent activation of apoptotic Bax leading to apoptosis of different endothelial progenitor cells. *Endocrinology* 2007; 148: 2085-94.
- Granville DJ, Shaw JR, Leong S, et al. Release of cytochrome c, Bax migration, Bid cleavage and activation of caspases 2, 3, 6, 7, 8, and 9 during endothelial cell apoptosis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1021-5.
- Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, et al. High-glucose triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1995; 44: 1323-7.
- Zhang C, Cai Y, Adachi MT, et al. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells



- through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001; 276: 35867-74.
29. Halkin A, Keren G. Potential indications for angiotensin-converting enzyme inhibitors in atherosclerotic vascular disease. *Am J Med* 2002; 112: 126-34.
30. Suc I, Escargueil-Blanc I, Trolly M, et al. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2158-66.
31. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 85: 17-24.
32. Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, et al. 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: 704-12.
33. Kavoura MM, Bhindi R, Lowe HC, et al. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 465-72.
34. Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 469-75.
35. Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, et al. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2200-8.
36. Li Y, Higashi Y, Itabe H, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor activation inhibits oxidized LDL-induced cytochrome C release and apoptosis via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2178-84.
37. Patel VA, Zhang QJ, Siddle K, et al. Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signaling. *Circ Res* 2001; 88: 895-902.
38. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-6.
39. Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, et al. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ Res* 1997; 81: 591-9.
40. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, et al. Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. *Circ Res* 2001; 88: 733-9.
41. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2255-64.
42. Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* 2004; Suppl 1: S12-S16.
43. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002; 110: 905-11.
44. Fazio S, Major AS, Swift LL, et al. Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT 1 in macrophages. *J Clin Invest* 2001; 107: 163-71.
45. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97: 2307-15.
46. Lutgens E, de Muinck ED, Kitslaar PJ, et al. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 473-9.
47. Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, et al. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 480-8.
48. Clarke M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol* 2006; 26: 531-5.
49. Levine JS, Koh JS. The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen and accelerant. *Semin Nephrol* 1999; 19: 34-47.
50. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, et al. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89: 2429-42.
51. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticle: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48: 180-6.
52. Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, et al. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol* 2000; 157: 1259-68.

