

REVIEWS

Adv Clin Exp Med 2007, 16, 3, 425–433
ISSN 1230-025X

© Copyright by Silesian Piasts
University of Medicine in Wrocław

MONIKA BUCHANIEWICZ¹, ALEKSANDRA OSADA²

Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells – the Medical Importance

Apoptoza komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych – znaczenie medyczne

¹ Department of Medical Biochemistry Silesian Piasts University of Medicine in Wrocław, Poland

² Department of Basic Medical Sciences Silesian Piasts University of Medicine in Wrocław, Poland

Abstract

Apoptosis has become one of the most extensively studied topics in cell biology in the last few years. Obtained data suggest that programmed cell death may play a role in development of vasculature and pathophysiology of its diseases. Apoptosis has pathological implications both when increased or decreased. The aim of this article is to review key points regarding the apoptosis of vascular smooth muscle cells: its regulation and possible role in development and therapy of atherosclerosis, hypertension, restenosis after arterial injury and aortic aneurysm (**Adv Clin Exp Med 2007, 16, 3, 425–433**).

Key words: apoptosis, smooth muscle cells, atherosclerosis, hypertension, restenosis, aortic aneurysm.

Streszczenie

W ciągu ostatnich kilku lat apoptoza stała się jednym z najintensywniej badanych zagadnień biologii komórki. Wyniki badań sugerują, że programowana śmierć komórki może odgrywać rolę w procesach fizjologicznych związanych z rozwojem układu krążenia, a także w patogenezie chorób tego układu. Do rozwoju zmian patologicznych może przyczyniać się zarówno nasilenie, jak i zahamowanie apoptozy. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najważniejszych zagadnień związanych z apoptozą zachodzącą w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych: regulacji apoptozy i jej potencjalnej roli w rozwoju i leczeniu miażdżycy, nadciśnienia, restenozy występującej po uszkodzeniu naczyń i tętniaka aorty (**Adv Clin Exp Med 2007, 16, 3, 425–433**).

Słowa kluczowe: apoptoza, komórki mięśni gładkich, miażdżycy, nadciśnienie tętnicze, restenoza, tętniak aorty.

Apoptoza jest aktywnym procesem, którego celem jest utrzymanie homeostazy organizmu. Odgrywa rolę zarówno w embriogenezie, prawidłowym wzroście i rozwoju narządów, a także w usuwaniu komórek nieprawidłowych lub uszkodzonych. Apoptoza bywa określana jako programowana śmierć komórki (każda komórka ma wewnętrzny program realizacji apoptozy) lub jako śmierć samobójcza (po otrzymaniu sygnału proapoptotycznego komórka „podejmuje decyzję o samobójstwie”). Od odkrycia apoptozy przez J. Kerr’a w 1972 r. zjawisko to jest intensywnie badane. Obecnie zwraca się uwagę nie tylko na mechanizmy komórkowe tego procesu, ale również na jego znaczenie w przebiegu zmian patologicznych zachodzących w całym organizmie człowieka.

W ostatnich kilkunastu latach szczególnie zainteresowanie budzą zmiany w układzie krążenia i związana z nimi apoptoza komórek mięśni gładkich obecnych w ścianach naczyń (VSMC – *vascular smooth muscle cells*). W prawidłowych tętnicach indeks apoptotyczny i mitotyczny dla tych komórek jest mały, ale zmienia się w stanach patologicznych, a zaburzenia równowagi między proliferacją i apoptozą mogą powodować progresję zmian chorobowych. Nasilenie apoptozy towarzyszy tworzeniu np. tętniaków, a jej zahamowanie można obserwować w miażdżycy lub restenozy występującej po zabiegach balonikowania [1].

Apoptoza charakteryzuje się swoistymi zmianami morfologicznymi i biochemicznymi. Komórka ulega odwodnieniu, kurczy się i traci kontakt

z sąsiadującymi komórkami. Błona komórkowa tworzy uwypuklenia (*blebbing*), w których są zamknięte fragmenty jądra, cytoplazmy i nienaruszone organelle. Tak powstają ciała apoptotyczne, które są następnie fagocytowane przez makrofagi i komórki sąsiadujące. Błona komórkowa typowej komórki apoptotycznej nie ulega uszkodzeniu; w wyniku działania transglutaminazy aktywowanej przez kaspazy w błonie powstają wiązania lizyna–glutamina, które stabilizują błonę komórkową. Dzięki tym dodatkowym wiązaniom między białkami powstające ciała apoptotyczne są niewrażliwe na działanie proteaz; ogranicza to uwalnianie substancji wewnątrzkomórkowych do przestrzeni międzykomórkowej i do krwiobiegu. W niektórych doświadczeniach obserwowano jednak komórki z przerwaną błoną komórkową, które zachowywały inne cechy charakterystyczne dla apoptozy (takie jak kurczenie się komórki, kondensacja chromatyny i fragmentacja DNA) [2]. W przebiegu apoptozy można wyróżnić następujące fazy: fazę inicjacji, która prowadzi do aktywacji tzw. kaspaz inicjujących (są to proteazy cysteinowe produkowane jako proenzymy) – sygnał do rozpoczęcia apoptozy może zostać przekazany przez szlak zewnątrzkomórkowy związany z receptorami śmierci z rodziny TNF-R i odpowiednimi białkami adaptorowymi, co skutkuje aktywacją kaspazy 8 lub przez szlak wewnątrzkomórkowy, w którym dochodzi do zaburzeń przepuszczalności błony mitochondrialnej, przemieszczenia cytochromu c do cytoplazmy oraz aktywacji kaspazy 9 w kompleksie z cytochromem c i białkiem Apaf-1; fazę efektorową, podczas której dochodzi do aktywacji kaskady kaspaz, trawienia różnych białek komórkowych, a ostatecznie do degradacji DNA oraz zmian strukturalnych prowadzących do utworzenia ciałek apoptotycznych – faza ta może być kontrolowana przez białka z rodziny Bcl-2 (proapoptotyczne lub antyapoptotyczne); fazę usuwania umierających komórek – znakiem charakterystycznym dla ciałek apoptotycznych, który umożliwia ich identyfikację jest fosfatydyloseryna przemieszczana w czasie apoptozy z wewnętrznej monowarstwy błony komórkowej na jej część zewnętrzną.

Apoptoza w warunkach fizjologicznych

Apoptoza w warunkach fizjologicznych bierze udział w przebudowie układu krążenia noworodka, tzn. umożliwia zamknięcie przewodu tętniczego Botalla oraz tętnicy pępkowej [3, 4]. Czynniki zewnątrzkomórkowe, które mogłyby być odpowiedzialne za powyższe zmiany, nie zostały jeszcze do końca poznane. Przypuszcza się, że mo-

że do nich należy zmiana przepływu krwi przez naczynia [5] oraz oddziaływanie komórek VSM z macierzą zewnątrzkomórkową i substancjami w niej zawartymi [4]. W mechanizmie molekularnym najbardziej prawdopodobny jest udział białka Bax w indukcji apoptozy komórek mięśni gładkich. Wiadomo również, że receptor Fas nie jest zaangażowany w przebudowę układu krążenia po urodzeniu [4]. Angiotensyna II ma działanie proapoptotyczne przez receptor AT₂: receptor ulega silnej ekspresji w tkankach płodowych; u osób dorosłych jest go niewiele, może zatem odgrywać rolę w przebudowie układu krążenia w czasie rozwoju organizmu [6]. Ważnym regulatorem apoptozy w rozwijającym się układzie krążenia jest tlenek azotu (NO). Podczas rozwoju tego układu obserwuje się nasiloną ekspresję syntazy tlenu azotu w śródbłonku naczyń, a większe niż fizjologiczne stężenia NO działają na komórki mięśni gładkich proapoptotycznie [3]. U osób dorosłych apoptoza komórek mięśni gładkich obecnych w ścianach naczyń jest prawie niewykrywalna i indeks apoptotyczny jest mały.

Apoptoza w warunkach patologicznych

Miażdżyca

Miażdżyca jest chorobą układową obejmującą duże i średnie naczynia. Na pierwszym etapie dochodzi do dysfunkcji śródbłonka naczyniowego i zwiększenia adhezji monocytów na jego powierzchni. Wnikają one następnie do błony wewnętrznej naczynia, gdzie przekształcają się w makrofagi. Makrofagi usuwają oxLDL dzięki obecnemu na ich błonie komórkowej receptorowi zmiatającemu (*scavenger receptor*). Proces ten nie podlega żadnej regulacji; gdy dochodzi do przeładunku komórek cholesterolem, przekształcają się one w komórki piankowate i tworzą w błonie nacieki lipidowe (*fatty streaks*). Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych (komórki VSM) migrują z błony środkowej do błony wewnętrznej, intensywnie proliferują i wytwarzają znaczne ilości kolagenu, w rezultacie czego rozwija się blaszka włóknisto-tłuszczowa (*fibrous cap*). Na kolejnym etapie choroby może dojść do zwapnienia lub pęknięcia blaszki miażdżycowej, co jest przyczyną tworzenia skrzepliny mogącej doprowadzić do zamknięcia światła naczynia. Udział apoptozy w przebiegu miażdżycy zależy od stadium choroby [7]. W początkowym okresie miażdżycy, kiedy tworzą się nacieki lipidowe i zaczyna się pogrubianie ściany naczyń, indeks apoptotyczny jest mały. W komórkach VSM pochodzących z nacie-

ków lipidowych obserwuje się zwiększoną ekspresję proapoptotycznego białka Bax [7], podczas gdy w zdrowych naczyniach jest ono niewykrywalne [6]. Wpływ apoptozy na rozwój miażdżycy w tym wczesnym stadium nie jest znany [1]. Wraz z rozwojem choroby tempo apoptozy zwiększa się i osiąga swoje maksimum w stadium zmian zaawansowanych [5]. Podziały komórek nasilają się wraz z rozwojem zmian miażdżycowych, gdyż komórki VSM przemieszczające się z błony środkowej do błony wewnętrznej przez obszar bogaty w makrofagi są wystawione na działanie czynników mitogennych (np. PDGF), przez co stają się bardziej wrażliwe na bodźce apoptotyczne [8].

Najpoważniejszym problemem, z punktu widzenia zdrowia pacjenta, jest pęknięcie blaszki miażdżycowej i jej oderwanie od ściany naczynia. Zjawiska te są związane ze zmniejszeniem grubości blaszki włóknisto-tuszczowej [9]. Liczne badania potwierdzają, że zmniejszenie liczby komórek mięśni gładkich w wyniku ich nasilonej apoptozy osłabia blaszkę miażdżycową i przyczynia się do jej destabilizacji [10]. Apoptoza komórek VSM najczęściej zachodzi w obszarze „ramiennym” blaszki. Obserwuje się w tym miejscu dużą liczbę makrofagów, które mogą przyspieszać apoptozę [1]. W modelu zwierzęcym bezpośrednia indukcja apoptozy komórek mięśniowych w obszarze ramiennym blaszki wywołuje jej pęknięcie i tworzenie skrzepliny [11]. W obrębie niestabilnej blaszki miażdżycowej liczba komórek ulegających apoptozie jest większa w porównaniu z blaszką stabilną [11, 12]. W przypadku blaszki objawowej obserwuje się ponadto zmniejszenie grubości blaszki włóknisto-tuszczowej i większą infiltrację tego obszaru przez makrofagi i monocyty [13]. Ostatnie badania wskazują, że ostre zespoły wieńcowe są spowodowane przez erozję lub pęknięcie często małych, niestenotycznych blaszek. Celem leczenia powinna być raczej stabilizacja blaszki niż zmniejszanie jej rozmiarów [11].

Indukcja apoptozy przez makrofagi zależy przede wszystkim od systemu Fas. Komórki VSM mają na swojej powierzchni receptor Fas, a komórki zapalne wydzielają odpowiedni ligand – FasL. Niektórzy autorzy podkreślają, że komórki VSM mogą być odporne na apoptozę indukowaną przez Fas w rezultacie zmniejszonej ekspresji receptora. W tych komórkach zwykle dochodzi jednak do uwrażliwienia na apoptozę wywołowaną przez Fas/FasL w wyniku synergistycznego działania cytokin prozapalnych [11]. W czasie rozwoju blaszki miażdżycowej w ścianie naczyń gromadzą się komórki wydzielające te cytokiny, dlatego w komórkach VSM pochodzących z blaszki miażdżycowej obserwuje się zwiększoną ekspresję Fas i częściej ulegają one apoptozie w wyniku aktywa-

cji układu Fas/FasL [14]. Ekspresja Fas w komórkach błony wewnętrznej naczyń krwionośnych jest więc większa niż w komórkach błony środkowej [6]. Mechanizm wzmożonej regulacji liczby receptorów przez cytokiny nie został jeszcze w pełni poznany, ale przypuszcza się, że jest związany z indukowanym przez nie wydzielaniem tlenu azotu [10]. Rozpuszczalny FasL jest mniej skuteczny, ponieważ wywołanie trimeryzacji receptora niezbędnej do dalszego przekazania sygnału jest osłabione. Zgodnie z tą interpretacją, komórki VSM są uwrażliwiane na apoptozę związaną z receptorem Fas przez interferon γ , który zwiększa jego ekspresję w błonie komórek mięśni gładkich naczyń [5].

Komórki VSM, pochodzące z blaszki miażdżycowej, są bardziej wrażliwe na bodźce proapoptotyczne niż komórki pochodzące ze zdrowych naczyń. Cechą charakterystyczną komórek VSM jest szybkie starzenie i wolniejszy wzrost oraz większe tempo apoptozy w hodowlach komórkowych [5, 6, 9, 15]. Ich większa wrażliwość na czynniki proapoptotyczne jest przypuszczalnie rezultatem zmian genetycznych związanych z ekspozycją na działanie utlenionych lipidów i wolnych rodników. Konsekwencją tych zmian jest to, że apoptoza komórek VSM zachodzi nawet przy dużym stężeniu określonych czynników osocza warunkujących przeżycie komórki [15]. Źródłem wolnych rodników w układzie krążenia jest głównie oksydaza NADPH, a angiotensyna II zwiększa aktywność tego enzymu i produkcję rodnika O_2^- [16]. Zwiększenie liczby wolnych rodników prowadzi do peroksydacji lipoprotein o małej gęstości (LDL), które stają się silnym czynnikiem pobudzającym apoptozę przez szlak wewnątrzpochodny, jak również przez uwrażliwienie na szlak zewnątrzpochodny. Przypuszcza się, że główny mechanizm, przez który utlenione lipidy wpływają na apoptozę komórek VSM, jest związany ze zmniejszeniem przez nie ekspresji receptora dla IGF-1 (*insulin like growth factor*) [11]. IGF-1 wykazuje bowiem silne działanie antyapoptotyczne wobec komórek VSM, ale w komórkach mięśni gładkich, pochodzących z blaszki miażdżycowej, dochodzi do zmniejszenia ekspresji jego receptora, co predysponuje te komórki do apoptozy [11].

Oprócz angiotensyny II, silnym aktywatorem oksydazy NADPH w komórkach mięśni gładkich jest nasilona siła ścinająca [16]. Jest to siła, jaką wywiera na śródbłonek przepływająca krew. Siła ta jest równoległa do powierzchni śródbłonna; powoduje mechaniczne osłabienie blaszki miażdżycowej, zaburzając przepływ krwi w jej otoczeniu [17].

W przebiegu nasilonej apoptozy komórek VSM zdolność makrofagów i pozostałych komórek do fagocytowania powstających ciałek

apoptotycznych może okazać się niewystarczająca. Prowadzi to do nasilenia reakcji zapalnej w obrębie uszkodzonego naczynia [6]. Apoptotyczne komórki, które nie ulegną w porę fagocytozy, podlegają wtórnej martwicy i mogą wydzielać cytokiny prozapalne. Wydzielenie tych cytokin powoduje gromadzenie się monocytów i makrofagów. W miażdżycy przyczyną niewystarczającej fagocytozy może być obecność zmodyfikowanych LDL [1]. Pomimo że początkowo apoptoza jest „cichą” śmiercią, niedobór profesjonalnych komórek fagocytycznych może przyczynić się do nasilenia rozwoju stanu zapalnego, który wydaje się, że odgrywa kluczową rolę w patogenezie miażdżycy. W obszarze pęknięcia blaszki miażdżycowej często znajdują się limfocyty T i makrofagi, co sugeruje, że miejscowe zmiany zapalne są czynnikiem prowokującym pęknięcie płytki [13]. Dowody te wspierają hipotezę, że układowe zapalenie odgrywa rolę w wywoływaniu i progresji miażdżycy [18]. Dodatkowo – długa ekspozycja fosfatydyloseryny na niesfagocytowanych ciałkach apoptotycznych powoduje aktywację trombinny i kaskady krzepnięcia. W taki sposób w założeniu cicha śmierć, jaką jest apoptoza, może paradoksalnie powodować nasilenie zmian zapalnych i tworzenie skrzepliny.

Dokładne ustalenie liczby komórek ulegających apoptozie w obrębie blaszki miażdżycowej u ludzi jest trudne. W bardzo podobnych modelach doświadczalnych wyniki te wahały się średnio od 2 [7] do 30% [11] (osiągając nawet wartość 60% [7]). Poza tym, apoptozie mogą ulegać zarówno komórki VSM, jak i makrofagi (oba typy komórek dają pozytywne wyniki przy oznaczaniu metodą TUNEL). Śmierć komórek mięśniowych i zmniejszenie ich liczby w obrębie blaszki włóknisto-tłuszczowej wpływa na destabilizację blaszki [7], podczas gdy apoptoza makrofagów może wywierać działanie odwrotne (makrofagi promują apoptozę komórek VSM przez bezpośrednie oddziaływanie (FasL) i wydzielanie cytokin) [1]. W wyniku śmierci makrofagów zmniejsza się ponadto ilość wydzielanych przez nie metaloproteinaz [13], a więc słabnie rozkład włókien kolagenu, które również stabilizują blaszkę miażdżycową [7]. Ma ona tendencję do pęknięcia w miejscu dużej zawartości makrofagów i zmniejszonej liczby komórek mięśni gładkich, co sugeruje, że apoptoza komórek mięśniowych, prawdopodobnie nasilana przez makrofagi, przyspiesza pęknięcie blaszki miażdżycowej [11].

Wśród leków, stosowanych w terapii miażdżycy, do wywołania apoptozy są zdolne statyny, czyli substancje będące inhibitorami reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA). Kliniczne korzyści z ich stosowania mogą być jed-

nak większe niż tylko te wynikające z obniżenia stężenia cholesterolu z powodu mechanizmu nieliipidowego, który zmienia funkcje śródbłonka, komórek VSM i limfocytów [11, 18]. Mewalonian, produkt działania reduktazy HMG-CoA, jest prekursorem wielu metabolitów o znaczeniu regulacyjnym; inhibicja reduktazy HMG-CoA przez statyny wywiera więc działanie plejotropowe. Wiadomo, że odsetek komórek ulegających apoptozie zależy od zastosowanej dawki leku. Proces ten przebiega w sposób zależny od kinazy p38 MAP, ponieważ jej inhibicja hamuje apoptozę w komórkach poddanych działaniu leku [19]. Do tej pory udowodniono właściwości proapoptotyczne fluwastatyny, lowastatyny, prawastatyny i ceriwastatyny [18, 20]. Oprócz zwiększania aktywności kaspazy 3, związki te hamują proliferację komórek i zmniejszają wydzielanie metaloproteinazy-9 przez makrofagi [18]. Przede wszystkim pobudzają apoptozę w komórkach VSM pochodzących z neointymy (nowej błony wewnętrznej powstającej w uszkodzonych naczyniach, składającej się w przeważającej części z komórek mięśni gładkich) [20]. Może to przynosić korzyści kliniczne, gdyż komórki neointymy są bardziej odporne na apoptozę i trudniej przez to usunąć restenozę. Nie wiadomo jednak na pewno, czy indukcja apoptozy przez statyny jest korzystna czy szkodliwa. Z jednej strony dzięki niej następuje zmniejszenie proliferacji neointymy, której rozrost jest trudny do zatrzymania, z drugiej strony jednak usuwanie komórek VSM z blaszki miażdżycowej powoduje jej destabilizację [20]. Wydaje się więc, że korzyści ze stosowania statyn są ograniczone do niektórych chorób, podczas gdy w innych mogą przyczyniać się nawet do rozwoju choroby.

Nienasycone kwasy tłuszczowe ω -3 znajdują zastosowanie w profilaktyce miażdżycy tętnic i w chorobie niedokrwiennej serca. Wywołują one apoptozę w komórkach mięśni gładkich i mogą w ten sposób wpływać na strukturę ściany naczyń. Kwas dokozaheksaenowy (DHA) indukuje apoptozę przez dwa odrębne szlaki – zależny i niezależny od kinazy p38 MAP. Pierwszy z nich wymaga aktywacji PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*), drugi jest związany z utratą potencjału błonowego przez mitochondrium i z wydzieleniem cytochromu c do cytoplazmy. Poznanie tych mechanizmów wymaga jednak dalszych prac i wyjaśnień [21].

Nadciśnienie tętnicze

Nadciśnienie tętnicze jest jednym z głównych czynników powodujących przerost oraz przebudowę mięśnia sercowego i ścian naczyń, upośledzenie funkcji śródbłonka, przyspieszenie rozwoju

miażdżycy, zwiększenie ryzyka zawału serca i udaru mózgu. Przewlekły skurcz mięśni gładkich naczyń prowadzi do przerostu ściany tętnicy i zmniejszenia jej światła, zmiany te mają charakter adaptacyjny i zapewniają utrzymanie napięcia ściany naczyniowej. Coraz częściej mówi się o udziale apoptozy w przebiegu zmian w układzie sercowo-naczyniowym [22]. Obserwuje się wzrost liczby komórek VSM ulegających apoptozie pochodzących od szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem (SHR – *spontaneously hypertensive rat*) w porównaniu z komórkami pobranymi od szczurów z prawidłowym ciśnieniem krwi (odmiana WKY – Wistar Kyoto) [23]. Komórki linii SHR wykazują ponadto nadmierną reaktywność w stosunku do czynników pobudzających wzrost, a ich cykl komórkowy jest krótszy o 4 godziny [23]. Ich rozrost jest więc szybszy i trudniejszy do zahamowania [24] i może być nasilony przez niektóre substancje, których działanie jest uzależnione od warunków środowiska i komórek, na które działają. Przykładem jest TGF- β 1, który w prawidłowych komórkach VSM hamuje, a w komórkach pochodzących od zwierząt z nadciśnieniem pobudza wzrost [23]. Zwiększenie oporu naczyniowego przyczynia się do podwyższenia ciśnienia działającego na ściany naczyń, co powoduje oksydacyjne uszkodzenia DNA w komórkach VSM i wzrost liczby antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-x [25]. Procesy proliferacyjne przeważają zatem nad śmiercią komórek.

Proces apoptozy komórek VSM w przebiegu nadciśnienia zachodzi z udziałem białka Bax – obserwuje się wzrost jego ekspresji. Chociaż zachodzi nasilenie apoptozy, to proliferacja przeważa jednak nad usuwaniem komórek mięśni gładkich w rezultacie programowanej śmierci i równowaga między tymi procesami zostaje zaburzona [24].

Apoptoza komórek VSM w przebiegu nadciśnienia tętniczego jest zjawiskiem korzystnym, gdyż wpływa na przebudowę ścian naczyń i normalizuje ich strukturę. Wśród stosowanych leków wiele z nich może wywoływać program śmierci komórek VSM, w ten sposób nasila się ich działanie hipotensyjne, ponieważ dodatkowo wywołują regresję przerostu ściany naczynia. Do szczególnie intensywnie badanych grup leków z zakresu wpływu na procesy apoptozy komórek VSM w nadciśnieniu należą: antagoniści kanałów wapniowych, inhibitory konwertazy angiotensyny (IKA), antagoniści receptora angiotensynowego.

Zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia są jednym z czynników wyzwalających apoptozę w komórkach mięśni gładkich. W komórkach VSM pochodzących od szczurów SHR dochodzi do wzrostu liczby kanałów wapniowych typu L (zależnych od napięcia), co wskazuje na zmie-

niają gospodarkę wapniową w porównaniu z komórkami zwierząt mających prawidłowe ciśnienie tętnicze. Konsekwencją tej zmiany jest nasilony transport jonów wapnia do cytosolu i wzrost jego stężenia przy zablokowaniu kanałów przez leki. Do najczęściej badanych antagonistów kanałów wapniowych należy nifedypina. Wykazano jej działanie proapoptotyczne w komórkach pochodzących od szczurów SHR [22, 26], chociaż w niektórych badaniach była też zdolna do wywoływania apoptozy w komórkach VSM od szczurów WKY [27]. Podanie innego leku stosowanego w nadciśnieniu, amlodypiny, powodowało również wyraźne nasilenie apoptozy, o czym świadczyła zwiększona ekspresja białka Bax [22]. Diltiazem nie wywoływał programowanej śmierci komórek [28], więc sugeruje się, że działanie proapoptotyczne jest związane z lekami będącymi pochodnymi dihydropirydyny [26]. Dodatkowo nifedypina wykazywała swoje działanie głównie w komórkach neointymy, które są uważane za bardziej odporne na apoptozę [27]. Opinie o działaniu antagonistów wapnia są jednak rozbieżne; chociaż większość badań świadczy o właściwościach proapoptotycznych tych leków, obserwowano pod wpływem ich działania także zahamowanie apoptozy [22]. Ponieważ dwa kluczowe procesy w przebiegu apoptozy są zależne od wapnia: ekspresja γ -GT (gamma-glutamylotranspeptydaza EC2.3.2.13) i fragmentacja DNA przez endonukleazy, niektórzy autorzy sugerują, że antagoniści wapnia mogą hamować apoptozę [23].

Leki wpływające na układ renina–angiotensyna–aldosteron, zarówno inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (enalapryl), jak i antagoniści receptorów AT1 (lozartan) w większych stężeniach powodowały przebudowę ścian naczyń i były zdolne do wywołania apoptozy [29]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach chinalaprylu i kaptoprylu [22]. Podanie chinalaprylu stymulowało ekspresję białka Bax i hamowało ekspresję białka Bcl-2 u szczurów SHR, dzięki czemu stosunek liczby tych białek normalizował się [24].

Tętniak aorty

Tętniak to uwypuklenie ściany aorty, które może rozwinąć się w przebiegu miażdżycy, nadciśnienia tętniczego, urazu, zakażenia bakteryjnego lub w chorobach genetycznych. Pod wpływem stale działającego ciśnienia krwi dochodzi do dalszego rozciągania ściany tętnicy, co prowadzi do ucisku tętniaka na sąsiednie narządy lub do jego pęknięcia. Charakterystyczną cechą tętniaka jest stopniowa utrata komórek mięśni gładkich z błony środkowej, która przyczynia się do postępującego rozszerzania aorty i późniejszego przerwania jej ściany. W tętniaku dochodzi do nasilenia apoptozy

w porównaniu z naczyniami zdrowymi [30] i jest to związane ze zwiększeniem ekspresji wielu proapoptotycznych cząsteczek, takich jak receptory śmierci i białko p53 [31]. W obrębie zmienionego chorobowo naczynia obserwuje się makrofagi i limfocyty T, co sugeruje, że wydzielane przez nie mediatory stanu zapalnego mogą nasilać utratę komórek w tym obszarze [1]. Makrofagi, prezentując na swojej powierzchni białko FasL, mogą się przyczyniać do aktywacji apoptozy przez system receptora Fas [32]. W uruchomienie programu śmierci komórki są zaangażowane też reaktywne formy tlenu, które wywołując w komórkach stres oksydacyjny, inicjują kaskadę kaspaz [33].

Ubytek komórek mięśni gładkich nie jest ograniczony do szczególnych miejsc i występuje w całej błonie środkowej naczyń. Nie wykryto żadnych liniowych korelacji między liczbą komórek apoptotycznych w błonie a rozmiarem tętniaka [34]. Kondo et al. zaobserwowali natomiast, że powstawanie tętniaka workowatego naczynia mózgu jest poprzedzone formowaniem się w obrębie ściany naczynia „przedtętniakowych” skupisk apoptotycznych komórek, w skład których wchodzi głównie komórki mięśni gładkich. Miejsca w szczególności predysponowane do tego, by rozwinął się w nich tętniak to te, które są poddawane działaniu wysokiego ciśnienia ścinającego. Jest to jeden z mechanicznych czynników mogących wywoływać śmierć komórki. Powiększanie się naczynia można w tym przypadku potraktować jako proces adaptacyjny [35].

Apoptoza jest tylko jednym z możliwych mechanizmów, przez które następuje utrata komórek VSM z błony środkowej w tętniakach. Sprzeczne dane dotyczące procentowego udziału programowanej śmierci komórek w rozwoju tej choroby sprawiają, że nie należy przeceniać jej udziału w patogenezie tętniaka. Niewątpliwie próby leczenia ograniczającego apoptozę mogą jednak zahamować jego rozwój.

Mechaniczne uszkodzenie naczyń

Ostre uszkodzenie tętnic, zdarzające się między innymi podczas angioplastyki naczyń, gwałtownie indukuje apoptozę komórek mięśni gładkich w ich ścianach. We wcześniejszych pracach postulowano, że w procesie utraty komórek VSM uczestniczy głównie martwica, jednak badania z ostatnich lat potwierdzają duży udział apoptozy w zmianach następujących po uszkodzeniu naczyń [36]. Mechaniczne naruszenie ciągłości tętnicy wywołuje dwie fale apoptozy. Pierwsza występuje po 0,5–6 godz. od zadziałania czynnika uszkodzającego, osiągając swoje maksimum po około 18 godz.,

a następnie szybko zanika [31]. Jest związana ze zmniejszeniem ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-x [6], doprowadza do znacznego zmniejszenia liczby komórek w błonie środkowej naczynia, powoduje pobudzenie proliferacji komórek mięśni gładkich na skutek wydzielania przez uszkodzone naczynia czynników wzrostu, takich jak: FGF (*fibroblast growth factor*) i PDGF (*platelet-derived growth factor*). Wzmocniona proliferacja jest przyczyną rozwoju neointymy. W zdrowych naczyniach nie dochodzi do takiego pobudzenia proliferacji, ponieważ powyższe czynniki wzrostu nie mogą przeniknąć do warstwy komórek mięśniowych przez nieuszkodzoną śródbłonek [37]. Apoptoza pojawiająca się w początkowym okresie uszkodzenia ma charakter zsynchronizowany i większość komórek apoptotycznych znajduje się w tym samym czasie w analogicznym stadium. Druga fala apoptozy rozpoczyna się kilka dni później, zwykle między 7. a 14. dniem po uszkodzeniu naczynia. Nie występowała ona jednak we wszystkich badanych przypadkach i nie udało się na razie ustalić, dlaczego tak się dzieje. Apoptoza związana z tą falą pojawia się w czasie najsilniejszego rozwoju nowej błony wewnętrznej, przez co może ograniczać jej rozwój i przyczyniać się do zahamowania zmniejszania światła naczynia [5]. U ludzi obserwowano zarówno nasilenie apoptozy, jak i jej spadek po mechanicznym uszkodzeniu naczynia [1]; proces ten nie jest do końca wyjaśniony i wymaga dalszych badań. Zaobserwowano, że hipercholesterolemia zmienia przebieg apoptozy występującej po zabiegu balonikowania. Cholesterol może wpływać na przebieg tylko drugiej fali, która towarzyszy wzmocnionej proliferacji i tworzeniu neointymy. Wskazuje to, że programowana śmierć komórek w pierwszej i drugiej fali przebiega w wyniku odmiennych mechanizmów. Wczesna apoptoza jest powodowana przez mechaniczne uszkodzenie naczynia i przerwanie interakcji między komórkami; apoptoza występująca po kilku dniach, która towarzyszy intensywnej proliferacji, może być wywoływana przez czynniki biochemiczne [38].

Ograniczenie powstawania neointymy wydaje się ważnym zagadnieniem, jeżeli wziąć pod uwagę to, że w późniejszym okresie komórki nowo powstałej błony są odporne na indukcję apoptozy, co utrudnia jej regresję. Wydaje się więc, że teoretyczna możliwość wywoływania śmierci komórek po uszkodzeniu naczynia może przyczynić się do powstania terapii ograniczających rozwój restenozy (zdarza się ona po 70% zabiegów balonikowania) [39]. Oporność komórek VSM pochodzących z neointymy na apoptozę, w porównaniu z komórkami z błony środkowej, może wynikać z odmienności ich fenotypów. Obserwowano w nich zwięks-

szoną ekspresję antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (głównie Bcl-xL) [36, 40]. Apoptoza komórek VSM z błony środkowej i wewnętrznej ogranicza tworzenie neointymy w krótkim czasie po zranieniu. Nie przeprowadzono jednak dłuższych badań, które udowodniłyby, że tworzenie neointymy nie jest wyłącznie przesunięte w czasie.

Apoptoza komórek mięśni gładkich, następująca po zabiegu balonikowania, przebiega przez mechanizm związany z zaburzeniem procesów oksydoredukcyjnych. Obserwacje dowodzą, że w zjawisku uczestniczy SAPK (*stress-activated protein kinase*), której aktywność zwiększa się już po 10 min od powstania uszkodzenia. Aktywacja SAPK występuje w odpowiedzi na wiele sygnałów, między innymi na cytokiny, ligand Fas oraz mechaniczne rozciąganie naczyń [36]. Zablockowanie SAPK zapobiega śmierci komórki, gdyż nie dochodzi do aktywacji kaspaz. Dostarczanie antyoksydantów powoduje inhibicję aktywacji SAPK i ogranicza apoptozę komórek VSM. Szlak uruchamiany przez SAPK nie może być aktywowany w komórkach mięśniowych pochodzących z neointymy z powodu zwiększenia ilości antyapoptotycznego białka Bcl-xL. W zdrowych naczyniach poziom ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 jest mały. Po czterech tygodniach od uszkodzenia białko Bcl-2 osiąga znacznie większy poziom w obrębie komórek neointymy w porównaniu z komórkami VSM z błony środkowej [36]. Komórki neointymy są usytuowane blisko światła naczynia, gdzie są wystawione na działanie większości silnych aktywatorów programowanej śmierci; ich oporność na apoptozę wskazuje na silny ochronny wpływ antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2.

Do zmniejszenia hiperplazji błony wewnętrznej próbuje się zastosować terapię genową, która miałaby doprowadzić do ekspresji FasL w komórkach VSM. Komórki mięśni gładkich, mające na

swojej powierzchni Fas i jego ligand, same nie ulegają apoptozie, ale wywołują śmierć sąsiadujących z nimi komórek (śmierć bratobójcza). Obecnie prowadzi się badania nad oceną skuteczności terapii genowej na różnych modelach zwierzęcych i wyniki tych prób są obiecujące. Terapia genowa napotyka jednak trudności związane z niewystarczającym przenoszeniem genu do komórek w bardziej zaawansowanych zmianach chorobowych oraz z koniecznością stosowania dużej liczby wirusowego wektora potrzebnego do skutecznej ekspresji genu, która może być przyczyną stanów zapalnych, a nawet nasilenia hiperplazji [41].

Podsumowanie

Powyższe rozważania wskazują, że apoptoza komórek mięśni gładkich ścian naczyń może być zarówno zjawiskiem korzystnym, ograniczającym zmiany kliniczne w przebiegu niektórych chorób (restenoza, nadciśnienie), jak i powodującym rozwój innych chorób (miażdżycy, tętniak aorty). Jej znaczenie kliniczne jest zależne przede wszystkim od zmian w obrębie układu krążenia i stanu zdrowia pacjenta (zaburzenia współtowarzyszące, np. hipercholesterolemia, mogą zmieniać apoptozę komórek VSM). Te czynniki określają też korzyści, których można oczekiwać, stosując leki wywołujące apoptozę. Stosowane w celu obniżenia stężenia cholesterolu statyny nasilają apoptozę komórek mięśni gładkich pochodzących z neointymy (co jest zjawiskiem korzystnym), ale u pacjentów z miażdżycą przyspieszają pęknięcie blaszki miażdżycowej (co jest zjawiskiem niekorzystnym). Terapia lekami indukującymi lub hamującymi apoptozę wymaga dalszych badań i pełnego zrozumienia mechanizmów, w wyniku których wpływają one na śmierć komórek.

Autorzy pragną podziękować pani prof. dr hab. Janinie Kwiatkowskiej-Korczak i panu doc. dr. hab. Hubertowi Krotkiewskiemu za życzliwą i krytyczną ocenę artykułu.

Piśmiennictwo

- [1] **McCarthy NJ, Bennett MR:** The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000, 45, 747–755.
- [2] **Hayakawa Y, Takemura G, Misao J, Kanoh M, Ohno M, Ohashi H, Takatsu H, Ito H, Fukuda K, Fujiwara T:** Apoptosis and overexpression of Bax protein and *bax* mRNA in smooth muscle cells within intimal hyperplasia of human radial arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19, 2066–2077.
- [3] **Fisher SA, Langille BL, Srivastava D:** Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res* 2000, 87, 856.
- [4] **Kim HS, Hwang KK, Seo JW, Kim SY, Oh BH, Lee MM, Park JB:** Apoptosis and regulation of Bax and Bcl-x proteins during human neonatal vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20, 957–963.
- [5] **Walsh K, Smith RC, Kim HS:** Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis and plaque rupture. *Circ Res* 2000, 87, 184–188.
- [6] **Mallat Z, Tedgui A:** Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000, 130, 947–962.
- [7] **Kockx MM:** Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18, 1519–1522.

- [8] **Newby AC, Zaltsman AB:** Fibrous cap formation or destruction – the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 1999, 41, 345–360.
- [9] **Bennet MR:** Vascular smooth muscle cell apoptosis – a dangerous phenomenon in vascular disease. *J Clin Basic Cardiol* 2000, 3, 63–65.
- [10] **Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszyński M, Libby P:** Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998, 82, 704–712.
- [11] **Stineman VEA, Bennet MR:** Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci* 2004, 107, 343–354.
- [12] **Bauriedel G, Schluckebier S, Hutter R, Welsch U, Kandolf R, Luderitz B, Prescott MF:** Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis: implication for the pathogenesis of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18(7), 1132–1139.
- [13] **Dhume AS, Soundararajan K, Hunter WJ, Agrawal DK:** Comparison of vascular smooth muscle cell apoptosis and fibrous cap morphology in symptomatic and asymptomatic carotid artery disease. *Ann Vasc Surg* 2003, 17, 1–8.
- [14] **Boyle JJ, Bowyer DE, Weissberg PL, Bennet MR:** Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-Ligand/Fas interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21, 1402–1407.
- [15] **Bennet MR, Evan GI, Schwartz SM:** Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessel and coronary atherosclerotic plaque. *J Clin Invest* 1995, 95(5), 2266–2274.
- [16] **Wójcicka G, Bełtowski J, Jamroz A:** Stres oksydacyjny w nadciśnieniu tętniczym. *Postepy Hig Med Dosw* 2004, 58, 183–193.
- [17] **Slager CJ, Wentzel JJ, Gijzen FJH, van der Wal AC, Schaar JA, Serruys PW:** The role of shear stress in the destabilization of vulnerable plaques and related therapeutic implications. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005, 2(9), 456–464.
- [18] **Kaneider NC, Reinisch CM, Dunzendorfer S, Meierhofer C, Djanani A, Wiedermann CJ:** Induction of apoptosis and inhibition of migration inflammatory and vascular wall cells by cerivastatin. *Atherosclerosis* 2001, 158, 23–33.
- [19] **Chen H, Xing Y, Liu R:** Lovastatin increases nitric oxide synthesis in IL-1 beta stimulated smooth muscle cells. *Chin Med J (Engl)* 2001, 114(11), 1123–1127.
- [20] **Erl W:** Statin-induced vascular smooth muscle cell apoptosis: a possible role in the prevention of restenosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005, 5(2), 135–144.
- [21] **Ekhterae D, Platoshyn O, Krick S, Yu Y, McDaniel SS, Yuan JXJ:** Bcl-2 decrease voltage-gated K⁺ channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 281(1), 157–165.
- [22] **Sitkiewicz D, Januszewicz A:** Apoptoza a nadciśnienie tętnicze – aktualny stan wiedzy i perspektywy. *Nadciśn Tętn* 2000, 4(2), 131–137.
- [23] **Hamet P:** Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995, 4, 1–7.
- [24] **Diez J, Fortuno MA, Ravassa S, Gonzalez A, Zalba G, Fortuno A:** Beneficial aspects of vascular apoptosis in hypertensive heart disease. *J Clin Basic Cardiol* 2000, 3, 61–62.
- [25] **Shaw A, Xu Q:** Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update. *Curr Vasc Pharmacol* 2003, 1(1), 41–58.
- [26] **Stead S, Werstiuk ES, Lee RM:** Nifedipine induces apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2000, 67(8), 895–906.
- [27] **Lemay J, Tea BS, Hamet P, deBlois D:** Regression of neointimal lesion in the carotid artery of nifedipine-treated SHR and WKY rats: possible role of apoptosis. *J Vasc Res* 2001, 38(5), 462–470.
- [28] **Wada Y, Kato S, Okamoto K, Izumaru S, Aoyagi S, Morimatsu M:** Diltiazem, a calcium antagonist, inhibits matrix metalloproteinase-1 (tissue collagenase) production and collagenolytic activity in human vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med* 2001, 8, 561–566.
- [29] **Rizzoni D, Porteri E, Piccoli A, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Pasini G, Guelfi D, Mulvany MJ, Rosei EA:** Effects of losartan and enalapril on small artery structure in hypertensive rats. *Hypertension* 1998, 32, 305–310.
- [30] **Jacob T, Hingorani A, Ascher E:** Role of apoptosis and proteolysis in pathogenesis of iliac artery. *Vascular* 2005, 13 (1), 34–42.
- [31] **McCarthy NJ, Bennet MR:** The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000, 45, 747–755.
- [32] **Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whitemore AD, Knox J, Libby P:** Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1999, 99, 96–104.
- [33] **Miller FJ Jr, Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL:** Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms. A potential mediator of aneurysms remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22, 560–565.
- [34] **Rowe VL, Stevens SL, Reddick TT, Freeman MB, Donnell R, Carroll RC, Goldman MH:** Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive and normal human aortas. *J Vasc Surg* 2000, 3, 567–575

- [35] **Kondo S, Hashimoto N, Kikuchi H, Hazama F, Nagata I, Kataoka H:** Apoptosis of medial smooth muscle cells in the development of saccular cerebral aneurysms in rats. *Stroke* 1998, 29, 181–189.
- [36] **Pollmaan MJ, Hall JL, Gibbson GH:** Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. *Circ Res* 1999, 84, 113–121.
- [37] **Chen L, Daum G, Forough R, Clowes M, Walter U, Clowes AW:** Overexpression of human endothelial nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells and balloon-injured carotid artery. *Circ Res* 1998, 82, 862–870.
- [38] **Song JM, Kim HS, Rhee MY, Chae IH, Sohn DW, Oh BH, Lee MM, Park JB, Choi JS, Lee YW:** Effect of hypercholesterolemia on the sequential changes of apoptosis and proliferation after balloon injury to rabbit iliac artery. *Atherosclerosis* 2000, 150, 309–320.
- [39] **Huang J, Yin H, Leng J, Yao R, Peng T, Li J:** Evidence of apoptotic smooth muscle cells in proliferative intima of injured arteries. *Chin Med J (Engl)* 2000, 113 (1), 10–13.
- [40] **Sata M, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Hirata Y, Nagai R:** Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21 (11), 1733–1737.
- [41] **Jiang C, Yang YF, Cheng SH:** Fas ligand gene therapy for vascular intimal hyperplasia. *Curr Gene Ther* 2004, 4, 33–39.

Address for correspondence:

Monika Buchaniewicz
Department of Medical Biochemistry
Silesian Piasts University of Medicine
Chałubińskiego 10
50-368 Wrocław
E-mail: buchanie@bioch.am.wroc.pl

Conflict of interest: None declared

Received: 20.04.2006

Revised: 14.02.2007

Accepted: 10.05.2007