

## Ρύθμιση της απόπτωσης των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος

**Ν. Κατοίκη**  
**Α. Χατζητόλιος**  
**Δ. Καραμήτσος**

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απόπτωση, μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, καθορίζει τον τύπο και τον αριθμό των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες, όπως κατά την οργανογένεση, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην αθηροσκλήρωση. Βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού κατέχουν ειδικές ενδοκυττάρειες πρωτεάσες, οι κασπάσες και η οικογένεια των ενδοκυττάρειων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών Bcl-2. Διάφοροι προ και αντιαποπτωτικοί παράγοντες επιδρούν στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, ενεργοποιώντας ή αναστέλλοντας την απόπτωσή τους. Η σε βάθος κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να συμβάλει στο σχεδιασμό μιας νέας και αποτελεσματικότερης θεραπευτικής στρατηγικής για την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απόπτωση αποτελεί μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην αναδιαμόρφωση (remodeling) των αγγείων που λαμβάνει χώρα είτε σε φυσιολογικές (οργανογένεση και ανάπτυξη του οργανισμού) είτε σε παθολογικές καταστάσεις (τραυματισμός και αθηροσκλήρωση)<sup>1</sup>. Συγκεκριμένα, ο τύπος και ο αριθμός των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος καθορίζεται από τη σύγχρονη επίδραση προ και αντιαποπτωτικών παραγόντων, από τη συνισταμένη δράση των οποίων ενεργοποιείται ή αναστέλλεται κατά περίπτωση ο αποπτωτικός μηχανισμός.

### ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΦΑΣΕΙΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Υπάρχουν διάφορες μορφές κυτταρικού θανάτου, με κύριες τη νέκρωση και την απόπτωση<sup>2</sup>. Στη νέκρωση, που προκαλείται με την επίδραση διαφόρων βλαπτικών παραγόντων, παρατηρείται διόγκωση του κυττάρου, ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, καταστροφή των μιτοχονδρίων και του πυρήνα και ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απάντησης. Αντίθετα, η απόπτωση αποτελεί μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και εξελίσσεται με έναν απολύτως ελεγχόμενο και ομαλό τρόπο, αφήνοντας ανεπηρέαστα τα γειτονικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, στην απόπτωση δια-

Α' Προπαιδευτική Παθολογική  
Κλινική Α.Π.Θ.,  
Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ,  
Θεσσαλονίκη

**Πίνακας 1.** Διαφορές μεταξύ κυτταρικής απόπτωσης και νέκρωσης. (Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma. A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1370-1380)

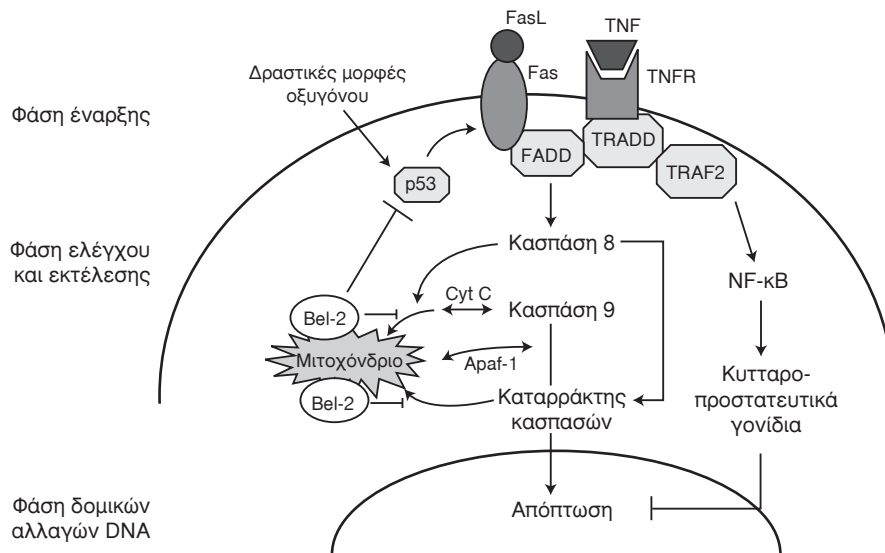
	Απόπτωση	Νέκρωση
Σήμα θανάτου	Εξωκυττάριο/ενδοκυττάριο	Εξωκυττάριο
Κύτταρα που προσβάλλονται	Μεμονωμένα	Ομάδες κυττάρων
Κυτταρικός θάνατος	Προγραμματισμένος	Τυχαίος
Κυτταρόσωμα	Συρρίκνωση	Διόγκωση
Κυτταρική μεμβράνη	Αθικτη	Διασπασμένη
Λυσόσωμα	Αθικτο	Με ρήξη
Κυτταρικός σκελετός	Κατάρρευση πριν τον κυτταρικό θάνατο	Κατάρρευση μετά τον κυτταρικό θάνατο
Μιτοχόνδρια	Αθικτα με απελευθέρωση κυτοχρώματος C και σύνθεση ATP	Κατεστραμμένα χωρίς σύνθεση ATP
Πυρήνας	Συρρίκνωση και κατάτμηση	Διόγκωση και θραύση
DNA	Κατάτμηση εντός των νουκλεοσωματίων	Κατάτμηση σε τυχαίες θέσεις
Κασπάσες	Πρώιμη ενεργοποίηση	Άγνωστος ρόλος
Φλεγμονή	Σπάνια	Συνήθης

φορετικά ερεθίσματα, με τη συμμετοχή ειδικών υποδοχέων και ενδοκυττάρων οδών μεταφοράς σήματος, ενεργοποιούν έναν καταρράκτη ειδικών πρωτεασών, των κασπασών, οι οποίες προκαλούν συρρίκνωση του κυττάρου, ανακατανομή των φωσfolιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, διατηρώντας την όμως αέραη, συμπίκνωση της χρωματίνης, συρρίκνωση και κατάτμηση του πυρήνα. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με το σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων (apoptotic bodies), τα οποία

περιέχουν τα υπολείμματα αυτοκαταστροφής του κυττάρου και τα οποία φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά μακροφάγα, χωρίς όμως να διεγείρουν την έκλυση φλεγμονώδους απάντησης<sup>3</sup>. Στον πίνακα 1 συνοψίζονται οι διαφορές μεταξύ κυτταρικής απόπτωσης και νέκρωσης<sup>4</sup>.

Συνολικά, η αποπτωτική διαδικασία περιλαμβάνει τέσσερις κύριες φάσεις<sup>5,6</sup>, οι οποίες παρουσιάζονται στο σχήμα 1:

1) φάση έναρξης ή φάση σηματοδότησης



**Σχ. 1.** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ενεργοποίησης του αποπτωτικού καταρράκτη των κασπασών. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 947-962). Fas/FasL: ειδικός υποδοχέας απόπτωσης και ο συνδέτης του, TNF/TNFR: παράγοντας νέκρωσης των όγκων και ο υποδοχέας του, FADD, TRADD, TRAF2: ειδικές ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες «θανάτου», p53: γονίδιο p53, Cyt C: κυτόχρωμα C, Apaf-1: αποπτωτικός παράγοντας ενεργοποίησης των πρωτεασών-1, Caspases 8 and 9: κασπάσες 8 και 9, Caspase cascade: καταρράκτης κασπασών, Bcl-2: μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, NF-κB: πυρηνικός παράγοντας κB.

(initiation or signaling phase), κατά την οποία το κύτταρο λαμβάνει το σήμα «θανάτου», εξωκυττάριο ή ενδοκυττάριο. Παράδειγμα εξωκυττάριας οδού σηματοδότησης αποτελεί η σύνδεση ειδικών μορίων «θανάτου», όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ή ο Fas συνδέτης (Fas-Ligand) στους αντίστοιχους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (TNFR1 και Fas) με τη μεσολάβηση ειδικών πρωτεϊνών που περιέχουν «περιοχές θανάτου» (death domains), όπως FADD, TRADD και RIP, απαραίτητων για την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και την επακόλουθη έναρξη του πρωτεολυτικού καταρράκτη των κασπασών<sup>7</sup>,

2) φάση ελέγχου και εκτέλεσης (control and effector phase), κατά την οποία ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών και διαταράσσεται η λειτουργία της μιτοχondριακής μεμβράνης<sup>8</sup>,

3) φάση δομικών αλλαγών και αποδόμησης του DNA, κατά την οποία παρατηρείται διάσπαση της λαμινίνης της πυρηνικής μεμβράνης, της πολυADPριβοζοπολυμεράσης (PARP) και του αναστολέα της ενεργοποιούμενης από τις κασπάσες δεοξυριβονουκλεάσης (ICAD/DFP45), με τελικό αποτέλεσμα τη θραύση και αποδόμηση του γενομικού DNA<sup>9</sup> και

4) φάση αναγνώρισης των αποπτωτικών κυττάρων και φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών σωματιδίων από γειτονικά μακροφάγα, με τη μεσολάβηση ποικιλίας παραγόντων, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη (PS), η περιοχική σύνδεσης θρομβοσπονδίνη/CD36 και ο υποδοχέας της βιτρονεκτίνης (vitronectin) ή CD14<sup>10,11</sup>. Ειδικά, η απώλεια της φωσφολιπιδικής συμμετρίας της κυτταρικής μεμβράνης και η επακόλουθη έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωκυττάρια επιφάνεια της μεμβράνης, θεωρούνται πρώιμα στοιχεία που χαρακτηρίζουν τα υπό απόπτωση ευρισκόμενα κύτταρα και οδηγούν στο σχηματισμό, μέσω απόσπασης από τη μεμβράνη, αποπτωτικών μικροσωματιδίων (apoptotic microparticles)<sup>12,13</sup>.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, λόγω της προσηπτικής δράσης της εξωκυττάριας φωσφατιδυλοσερίνης, τα αποπτωτικά κύτταρα και μικροσωματίδια αποκτούν θρομβογεννητικές ιδιότητες με αποτέλεσμα, μόλις έρθουν σε επαφή με την κυκλοφορία, να ενεργοποιούν το σύμπλεγμα ιστικός παράγοντας/παράγοντας VIIa και να συμβάλλουν στη δημιουργία θρόμβου στην περιοχή της αθηρωματικής πλάκας<sup>14,15</sup>.

## Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑΣΠΑΣΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ BCL-2 ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Οι κασπάσες (Πίν. 2) αποτελούν μια οικογένεια 14 πρωτεασών της κυστεΐνης, οι οποίες ενέχονται στην έναρξη και εκτέλεση της αποπτωτικής διαδικασίας που κινητοποιείται από μέλη της TNFR υπερκοινογένειας, όπως οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας TNFR1 και Fas, οι οποίοι διαθέτουν μια ενδοκυττάρια περιοχή «θανάτου» 70 υπολειμμάτων αμινοξέων<sup>16</sup>. Στο κυτταρόπλασμα υπάρχουν ως ανενεργά προένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση του υπολείμματος ασπαρτικού οξέος. Ανάλογα με τη δράση τους, οι κασπάσες διακρίνονται σε τρεις ομάδες: 1) προφλεγμονώδεις κασπάσες, οι οποίες συμμετέχουν κυρίως σε φλεγμονώδεις διαδικασίες με περιορισμένη δράση στην απόπτωση (κασπάσες 1, 4, 5, 11, 12, 13 και 14), 2) εναρκτήριες κασπάσες (initiators), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την κινητοποίηση του αποπτωτικού πρωτεολυτικού καταρράκτη (κασπάσες 2, 8, 9 και 10) και 3) κασπάσες-εκτελεστές (effectors), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας (κασπάσες 3, 6 και 7).

Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί ενεργοποίησης του αποπτωτικού καταρράκτη των κασπασών. Στον πρώτο, ειδικά μόρια (TNF- $\alpha$  ή Fas-L) συνδέονται στους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς (TNFR και Fas) και με τη μεσολάβηση ειδικών πρωτεϊνών, ενεργοποιούν τις κασπάσες 2 και 8 μέσω αυτοπρωτεόλυσης. Οι τελευταίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν με πρωτεόλυση τις κασπάσες 3, 6 και 7, οι οποίες καταλύουν τη διάσπαση διάφορων ενδοκυττάριας μορίων<sup>7</sup>.

Στο δεύτερο μηχανισμό, διάφοροι κυτταροτοξικοί παράγοντες «επιτίθενται» στα μιτοχόνδρια, διεγείρουν τα προαποπτωτικά μέλη των Bcl-2 ενδοκυττάριας πρωτεϊνών και προκαλούν αλλαγή του δυναμικού της μιτοχondριακής μεμβράνης και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c<sup>5</sup>. Το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα σχηματίζει σύμπλεγμα με τον αποπτωτικό παράγοντα ενεργοποίησης των πρωτεασών-1 (Apaf-1, apoptotic protease activation factor-1) και την κασπάση 9. Αυτό το σύμπλεγμα ενεργοποιεί τις κασπάσες-εκτελεστές και έτσι πυροδοτεί τον πρωτεολυτικό καταρράκτη των κασπασών<sup>4</sup>. Αναφέρεται ότι η κασπάση 8 μπορεί να δραστηριοποιήσει και το δεύτερο μηχανισμό από-

πτωσης, με διάσπαση του προαποπτωτικού παράγοντα Bid.

Η οικογένεια των ενδοκυττάρων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών Bcl-2 (Πίν. 2) περιλαμβάνει 15 μέλη και είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της αποπτωτικής διαδικασίας<sup>17</sup>. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 αφορούν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και διακρίνονται σε δυο υποομάδες, μια που περιλαμβάνει τις αντι-αποπτωτικές (Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, Bcl-w και A1) και μια που περιλαμβάνει τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες (Bax, Bak, Bad, Bik, Hrk, Bid και Bcl-xs). Πολλά μέλη της Bcl-2 οικογένειας εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου σχηματίζουν έναν ειδικό πόρο. Η διέγερσή τους από διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα προκαλεί αιφνίδια πτώση του διαμεμβρανικού δυναμικού και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων προαποπτωτικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα<sup>18</sup>, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και την απόπτωση του κυττάρου.

Το εναρκτήριο σήμα που κινητοποιεί τον αποπτωτικό μηχανισμό του κυττάρου μπορεί να είναι

είτε ενδοκυττάριο (intrinsic signal) είτε εξωκυττάριο (extrinsic signal). Στην πρώτη περίπτωση, το κύτταρο ενεργοποιεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο είτε στα πλαίσια της προκαθορισμένης χρονικής διάρκειας ζωής του είτε ως απάντηση σε έλλειψη παραγόντων επιβίωσης, αλλαγή αιμοδυναμικών συνθηκών ή απώλεια επαφής με άλλα κύτταρα. Αυτή η μορφή απόπτωσης, η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια και προοδευτική απώλεια κυττάρων, αφορά τα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης.

Στη δεύτερη περίπτωση, διάφοροι παράγοντες, όπως κυτοκίνες, ορμόνες, χημειοθεραπευτικοί και οξειδωτικοί παράγοντες, ιονίζουσα ακτινοβολία και ιοί, προκαλούν οξεία και μαζική απόπτωση των κυττάρων, καθιστώντας κατά συνέπεια ανεπαρκή και την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων. Τα εναπομένοντα αποπτωτικά κύτταρα νεκρώνονται, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση μιας χρόνιας φλεγμονώδους ή/και αυτοάνοσης αντίδρασης, όπως παρατηρείται στην αθηροσκλήρωση<sup>19</sup>.

**Πίνακας 2.** Ενδοκυττάριας πρωτεΐνες που συμβάλλουν στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος κατά την αθηρογένεση. (Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma. A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1370-1380)

Υποδοχείς θανάτου	Άλλη ονομασία	Συνδέτης
DR3	Apo3, Ws11, TRAMP, LARD	TWEAK
DR4	Apo2, Trail-R1	Trail
DR5	Trail-R2, TRICK2	Trail
Fas	CD95, Apo1	FasL (CD95L)
TNFR1		TNF
Κασπάσες	Άλλη ονομασία	Δράση
Κασπάση-1	ICE	Προφλεγμονώδης
Κασπάση-2	ICH-1	Προ-αποπτωτική
Κασπάση-3	CPP32, YAMA, Apopain	Προ-αποπτωτική
Κασπάση-4	ICErel II, TX, ICH-2	Προφλεγμονώδης
Κασπάση-5	ICErel III, TY	Προφλεγμονώδης
Κασπάση-6	Mch2	Προ-αποπτωτική
Κασπάση-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Προ-αποπτωτική
Κασπάση-8	FLICE, MACH, Mch5	Προ-αποπτωτική
Κασπάση-9	ICE-Lap6, Mch6, APAF-3	Προ-αποπτωτική
Κασπάση-10	Mch4	Προ-αποπτωτική
Κασπάση-11		Προφλεγμονώδης
Κασπάση-12		Προφλεγμονώδης
Κασπάση-13		Προφλεγμονώδης
Κασπάση-14	MICE	Προφλεγμονώδης/Προ-αποπτωτική

Οικογένεια μιτοχονδριακών πρωτεϊνών Bcl 2. Προ-αποπτωτικές: Bad, Bak, Bax, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Bod, Bod, Bok, DP5, Hrk, Mtd, Nip3

Αντι-αποπτωτικές: Bcl-2, Bcl-w, Bfl-1, BHRF-1, Boo, Mcl-1

## ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΛΕΙΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

Όλα τα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος υφίστανται απόπτωση<sup>20</sup>. Στη ρύθμιση της απόπτωσης συμμετέχουν διάφοροι επιφανειακοί υποδοχείς, ενδοκυττάρια πρωτεΐνες και ενζυμικά συστήματα. Στον πίνακα 2 αναφέρονται οι κυτταρικές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στον έλεγχο της απόπτωσης των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος κατά την αθηρογένεση<sup>4</sup>.

Ειδικότερα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα επιδρά πληθώρα προ- και αντι-αποπτωτικών παραγόντων (Πίν. 3), από τη συνδυασμένη δράση των οποίων θα καθορισθεί η επιβίωση ή ο θάνατός τους<sup>21</sup>. Ιδιαίτερης σημασίας για την τύχη των ενδοθηλιακών κυττάρων θεωρούνται και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών κυττάρων και μεταξύ κυττάρου

και εξωκυττάριας ουσίας<sup>22</sup>. Απώλεια της επαφής του κυττάρου με τα γειτονικά κύτταρα οδηγεί στο προγραμματισμένο θάνατό του. Η εξωκυττάρια ουσία παράγει σήματα επιβίωσης που στοχεύουν είτε στην καταστολή του ρυθμιζόμενου από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 κυτταρικού θανάτου είτε στην υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας<sup>2</sup>. Συγκεκριμένα, η ινωδονεκτίνη (fibronectin), μέσω φωσφορύλιωσης της κινάσης FAK (focal adhesion kinase), απενεργοποιεί το γονίδιο p53<sup>23</sup>, ενώ όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας με τη δράση της ιντεγκρίνης  $\alpha_v\beta_3$  αναστέλλει τη δραστηριότητα του γονιδίου p53, μειώνει την έκφραση των γονιδίων p21 και Bax και ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα NF- $\kappa$ B<sup>24</sup>.

Η αγγειακή ενδοθηλιακή καντχερίνη (VE-cadherin) συμβάλλει στην προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους, αλλά συμμετέχει και στο σχηματισμό του συμπλέγματος του υποδο-

**Πίνακας 3.** Προ- και αντι-αποπτωτικοί παράγοντες που δρουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα. (Stefanec T. Endothelial apoptosis. Could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? Chest 2000; 117: 841-854)

Προαποπτωτικοί	Αντιαποπτωτικοί
Αδενοσίνη και ATP	Αλβουμίνη
Ηλικία	Αγγειοποιητίνη-1
Αγγειοστατίνη	Αντιοξειδωτικά
Αγγειοτενσίνη II	Apo-A
Αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου	Κυκλοσπορίνη A
Ενδοστατίνη	Ενδοθελίνη-1
Ομοκυστεΐνη	Ερυθροποιητίνη
Υπεργλυκαιμία	Οιστραδιόλη
Υπερ και υποτονικό στρες	Πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας
Υποξία	FGF
Υποθερμία	Αποκλειστές των διαύλων ασβεστίου
IL-1 $\beta$	IL-10
INF- $\alpha$ και - $\gamma$	IGF-1
Ενδοκυττάρια οξειδωση	HDL
Ισχαμία/επανααιμάτωση	VEGF
LPS	Προστακυκλίνη
Νατριουρητικό πεπτίδιο	Shear stress
NO σε υψηλές συγκεντρώσεις	NO σε χαμηλές συγκεντρώσεις
Οξειδωμένες LDL	Βιταμίνη C
Περοξυνιτρίτης	Βιταμίνη E
Προϊνσουλίνη	Μονοκύτταρα σε άμεση επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα
Ακτινοβολία	Ιντεγκρίνες
TNF	Γλουταμίνη
TGF- $\beta$ 1	HGF

ATP: αδενοσινوترιφωσφορικό οξύ, IL-1 $\beta$ : ιντερλευκίνη-1 $\beta$ , INF- $\alpha$  και - $\gamma$ : ιντερφερόνη  $\alpha$  και  $\gamma$ , LPS: λιποπολυσακχαρίτες, NO: μονοξείδιο του αζώτου, LDL: λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, TNF: παράγοντας νέκρωσης των όγκων, TGF- $\beta$ 1: μετατροπικός αυξητικός παράγοντας - $\beta$ 1, Apo-A: απολιποπρωτεΐνη A, FGF: αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, IL-10: ιντερλευκίνη-10, IGF-1: ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας, HDL: λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, Shear stress: διατμητική τάση, HGF: αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων.

χέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF receptor-2) με τη β-κατενίνη (β-catenin) και την κινάση της φωσφοϊνοσιτόλης 3 (PI3-kinase), με τελικό αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της κινάσης Akt και τη ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης<sup>25</sup>.

Η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να είναι το αποτέλεσμα απώλειας των παραγόντων επιβίωσης, αναστολής των ενδοκυττάρων οδών επιβίωσης ή ενεργοποίησης προ-αποπτωτικών οδών. Βασικό ρόλο διαδραματίζουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο παράγοντας TNF-α και η ιντερφερόνη γ, οι οποίες καταστέλλουν την εξαρτώμενη από την ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$  σύνδεση και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>26</sup>, ενώ ο παράγοντας TNF-α επιπρόσθετα ενεργοποιεί και την κασπάση-3<sup>27</sup>, την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη A1<sup>28</sup> και την οδό του πυρηνικού παράγοντα NF- $\kappa$ B<sup>29</sup> και επομένως δρα και ως προ- και ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας.

Ανάλογα και στα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος, η ισορροπία μεταξύ επιβίωσης και απόπτωσης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Όπως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, έτσι και στα λεία μυϊκά, η ινωδονεκτίνη<sup>30</sup>, η ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$ <sup>31</sup>, αλλά και η τενασκίνη-C (tenascin-C)<sup>32</sup> φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των λείων μυϊκών κυττάρων. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο ινσουλινομορφος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF-BB), ο αυξητικός παράγοντας-2 των ινοβλαστών (FGF-2) και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β1 (TGF-β1), δρουν ως παράγοντες επιβίωσης, διεγείροντας τις αντι-αποπτωτικές ή καταστέλλοντας τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας<sup>33,34</sup>. Αντίθετα, προφλεγμονώδεις παράγοντες,

όπως TNF-α, ιντερφερόνη-γ (INF-γ) και ιντερλευκίνη-1 (IL-1), διεγείρουν την έκφραση του υποδοχέα Fas<sup>35</sup> και επομένως τα κύτταρα φλεγμονής και κυρίως τα μακροφάγα, που εκκρίνουν τέτοιες κυτοκίνες, μπορούν να προκαλέσουν την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων, αλλά και των ενδοθηλιακών, μέσω ενεργοποίησης της αποπτωτικής οδού TNF-α/TNFR και Fas/FasL<sup>36</sup>.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η υπερπαραγωγή νιτρικού οξέος (NO) διεγείρει την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ ο ίδιος παράγοντας (NO) σε φυσιολογικά επίπεδα δρα αντι-αποπτωτικά μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των κασπασών<sup>37</sup>. Στον πίνακα 4 αναφέρονται οι κυριότεροι προ- και αντιαποπτωτικοί παράγοντες που δρουν στα λεία μυϊκά κύτταρα.

Η αγγειοτενσίνη II (Angiotensin II) διεγείρει την απόπτωση τόσο των ενδοθηλιακών, όσο και των λείων μυϊκών κυττάρων<sup>38</sup> μέσω υπερέκφρασης προαποπτωτικών γονιδίων, όπως c-fos, c-jun, jun B, Egr-1 και c-myc<sup>39</sup>. Σύμφωνα με μελέτες σε πειραματόζωα και κυτταρικές καλλιέργειες, η αγγειοτενσίνη II ασκεί την αποπτωτική της δράση μέσω διέγερσης των AT1 και AT2 υποδοχέων της<sup>40</sup>. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος αυτών των υποδοχέων στην αποπτωτική διαδικασία παραμένει αμφιλεγόμενος και φαίνεται να επηρεάζεται από τον τύπο του κυττάρου ή του ιστού που κάθε φορά αποπίπτει. Συγκεκριμένα, παρά τα πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι και οι δύο υποδοχείς (AT1 και AT2) όταν διεγείρονται προκαλούν κυτταρική απόπτωση<sup>41</sup>, υπάρχουν πειραματικές μελέτες στις οποίες η διέγερση των AT1 υποδοχέων αναστέλλει την απόπτωση, ενώ η διέγερση των AT2 την πυροδοτεί<sup>42</sup>. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρατήρηση ότι τόσο οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου (ACE inhibitors), όσο και οι

**Πίνακας 4.** Προ- και αντι-αποπτωτικοί παράγοντες που δρουν στα λεία μυϊκά κύτταρα. (Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma. A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1370-1380)

Προαποπτωτικοί	Αντιαποπτωτικοί
Οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL)	Διαμητική τάση (shear stress)
Οξυστερόλες	Μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε χαμηλές συγκεντρώσεις
Δραστικές μορφές οξυγόνου	Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF)
Δραστικές μορφές μονοξειδίου του αζώτου	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)
Ακτινοβολία	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF-2)
Κυτοκίνες	Ινσουλινομορφος αυξητικός παράγοντας (IGF-1)
Γικά παράγωγα	Βιταμίνες C και E
Βακτηριακά παράγωγα (καταλάση, δισμουτάσες ανιόντος του υπεροξειδίου-SOD κ.ά.)	Αντιοξειδωτικά ένζυμα

ανταγωνιστές των AT1 υποδοχέων (AT1 receptor antagonists) εμποδίζουν την αποπτωτική δράση της αγγειοτενσίνης II<sup>39,41</sup>. Φαίνεται ότι τα κύτταρα στα οποία κυριαρχούν οι AT2 υποδοχείς αποπνικτούν μέσω της διέγερσης αυτών των υποδοχέων, ενώ όταν αφθονούν οι AT1 υποδοχείς κυρίως αυτοί αναλαμβάνουν την ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας<sup>39</sup>.

Εξάλλου, στη ρύθμιση της απόπτωσης των λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος συμβάλλουν και πυρηνικές πρωτεΐνες και κυρίως εκείνες που σχετίζονται με ογκογονίδια και αντιογκογονίδια, όπως το πρωτοογκογονίδιο c-myc και τα ογκοκατασταλικά γονίδια p53 και Rb<sup>43</sup>. Το γονίδιο p53 προάγει την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων, μέσω στέρσης των αυξητικών παραγόντων και υπερέκφρασης του γονιδίου c-myc<sup>44</sup>. Τα λεία μυϊκά κύτταρα παρουσιάζουν μια υπερευαίσθησία στην p53 ρυθμιζόμενη αποπτωτική οδό. Αυτή οφείλεται στην προκαλούμενη από την ενεργοποίηση του p53 αυξημένη έκφραση του υποδοχέα Fas στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω μετακίνησης του από το σύμπλεγμα Golgi και στη συνακόλουθη σύνδεση του υποδοχέα με την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη «θανάτου» FADD, που καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στην αποπτωτική οδό Fas/FasL<sup>45</sup>.

Το γονίδιο c-myc αποτελεί ενδοκυττάριο μεσολαβητή είτε του κυτταρικού θανάτου (όταν υπερεκφράζεται) είτε του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του βρίσκεται εντός φυσιολογικών ορίων)<sup>4</sup>. Στα λεία μυϊκά κύτταρα των αθηρωματικών πλακών, σε συνθήκες έλλειψης αυξητικών παραγόντων ή/και επίδρασης κυτοκινών, όπως η ιντερφερόνη γ, παρατηρείται υπερέκφραση του ανωτέρω γονιδίου, που προάγει την απόπτωσή τους<sup>2</sup>.

Το προϊόν του γονιδίου Rb είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, η οποία αναστέλλει τη λειτουργία του απαραίτητου για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μεταγραφικού παράγοντα E2F και η οποία όταν φωσφορυλιώνεται απενεργοποιείται. Στα λεία μυϊκά κύτταρα των αθηρωματικών πλακών κυριαρχεί η υποφωσφορυλιωμένη (ενεργός) μορφή της πρωτεΐνης Rb και κατά συνέπεια τα επίπεδα του παράγοντα E2F είναι χαμηλά. Επομένως, η απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων υπεριοιχτεί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού τους<sup>46</sup>.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η απόπτωση συμβάλλει καθοριστικά στην αθηρογένεση και την αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας. Καθώς η αθηροσκληρωτική νόσος χαρακτηρίζεται από μεγάλη επίπτωση, νοσηρότητα και θνητότητα, το ενδιαφέρον της διεθνούς ερευνητικής κοινότητας στρέφεται προς την ενδεδειγμένη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αποπτωτικής διαδικασίας στα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος, με απώτερο σκοπό την ανεύρεση αποτελεσματικότερων θεραπευτικών μέσων για την επιτυχή αντιμετώπιση της νόσου και των επιπλοκών της.

## SUMMARY

**Katsiki N, Hatzitolios A, Karamitsos D. Regulatory mechanisms of apoptosis of endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterial Hypertension 2007; 16: 36-44.***

Apoptosis, a form of programmed cell death, determines the type and number of vascular cells both under normal circumstances like in organogenesis and in pathological conditions, such as atherosclerosis. Specific intracellular proteases, caspases, and the Bcl-2 family of mitochondrial proteins play a fundamental role in the activation of the apoptotic mechanism. Several pro and antiapoptotic factors may influence (trigger or inhibit) the apoptosis of vascular endothelial and smooth muscle cells. Understanding in depth the regulatory mechanisms of programmed cell death may help design a new, more effective, therapeutic strategy for the treatment of atherosclerosis.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis and plaque rupture. *Circ Res* 2000; 87: 184-188.
2. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 947-962.
3. Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 2000; 45: 736-746.
4. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma. A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1370-1380.
5. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-11.
6. Golstein P. Controlling cell death. *Science* 1997; 275: 1081-1082.

7. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.
8. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998; 8: 267-271.
9. Sakahira H, Evari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-99.
10. Devitt A, Moffatt OD, Raykundama C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 1998; 392: 505-509.
11. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (avb3). *J Immunol* 1998; 161: 6250-6257.
12. Aupeix K, Hugel B, Martin T, et al. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1997; 99: 1546-1554.
13. Zhang J, Driscoll TA, Hannun YA, Obeid LM. Regulation of membrane release in apoptosis. *Biochem J* 1998; 334: 479-485.
14. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 1999; 99: 1780-1787.
15. Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Leseche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 611-616.
16. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
17. Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival *Science* 1998; 281: 1322-1326.
18. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.
19. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82: 1111-1129.
20. Martinet W, Knaapen MWM, De Meyer GRY, Herman AG, Kockx MM. Overexpression of the anti-apoptotic caspase-2 short isoform in macrophage-derived foam cells of human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2003; 162: 731-736.
21. Stefanec T. Endothelial apoptosis. Could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000; 117: 841-854.
22. Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 1998; 187: 579-586.
23. Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky CH. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol* 1998; 143: 547-560.
24. Scatena M, Almeida M, Chaisson M, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998; 141: 1083-1093.
25. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999; 98: 147-157.
26. Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune FJ. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin  $\alpha\beta 3$  in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- $\gamma$ . *Nat Med* 1998; 4: 408-413.
27. Dimmeler S, Haendeler J, Rippman V, Nehls M, Zeiher AM. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 1996; 399: 71-74.
28. Karsan A, Yee E, Kaushansky K, Harlan JM. Cloning of a human Bcl-2 homologue: Inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood* 1996; 87: 3089-3096.
29. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* 1996; 274: 787-789.
30. Zheng B, Clemmons DR. Blocking ligand occupancy of the  $\alpha\beta 3$  integrin inhibits insulin-like growth factor I signaling in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95: 11217-11222.
31. Dufourcq P, Louis H, Moreau C, et al. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 168-176.
32. Jones PL, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the avb3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol* 1997; 139: 279-293.
33. Bai H, Pollman MJ, Inishi Y, Gibbons GH. Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *Circ Res* 1999; 85: 229-237.
34. Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular cell apoptosis: cell type-specific modulation by transforming growth factor-b1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 99: 2019-2026.
35. Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszynski M, Libby P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2200-2208.
36. Boyle JJ, Bowyer DE, Proudfoot D, Weissberg PL, Bennett MR. Human monocyte/macrophages induce human vascular smooth muscle cell apoptosis in culture. *Circulation* 1998; 98: I-598.
37. Kim YM, Bombeck CD, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999; 84: 253-256.



38. *Werner N, Nickenig G.* AT1 receptors in atherosclerosis: biological effects including growth, angiogenesis and apoptosis. *Eur Heart J Suppl* 2003; 5 (Suppl A): A9-A13.
39. *Li D, Yang B, Philips MI, Mehta JL.* Proapoptotic effects of ANG II in human coronary artery endothelial cells: role of AT1-receptor and PKC activation. *Am J Physiol* 1999; 276: 786-792.
40. *Bonnet F, Cao Z, Cooper ME.* Apoptosis and angiotensin II: yet another renal regulatory system? *Exp Nephrol* 2001; 9: 295-300.
41. *Diep QN, Li JS, Schiffrin EL.* In vivo study of AT1 and AT2 angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension* 1999; 34: 617-624.
42. *Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M.* Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 1998; 63: L289-L295.
43. *Evan G, Littlewood T.* A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1322.
44. *Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, Weissberg PL.* Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ Res* 1997; 81: 591-599.
45. *Bennett MR, McDonald K, Chan SW, Boyle JJ, Weissberg PL.* Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998; 282: 290-293.
46. *Bennett MR, McDonald K, Chan SW, Luzio JP, Weissberg PL.* Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res* 1998; 82: 704-712.