

Joanna Kołodziejczyk¹, Milena Wojciechowska^{1,2}, Zbigniew Bartuzi¹, Andrzej Dziejczko³

¹Katedra i Klinika Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych, *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Z. Bartuzi

²Zakład Polityki Zdrowotnej i Zabezpieczenia Społecznego, *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

P.o. kierownika: dr n. med. J. Szrajda

³Emerytowany Profesor *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Równowaga proteazowo-antyproteazowa a palenie tytoniu

Balance of proteinases and antiproteinases and smoking tobacco

Abstract

Smoking tobacco can induce formation of inflammable state in respiratory tract and cause lungs damage. Experimental investigations affirm, that the exposure to tobacco smoke causes growth of penetrability of blood-vessels, which favors the enlarged migration of inflammable cells. The growth of exposure to reactive forms of oxygen and concentration changes of cellular antioxidants enzymes, leads to disorders in balance of proteinases and antiproteinases and oxidative stress. As the years go, the disorders mentioned above can lead to deterioration of ventilating efficiency of lungs, and consequently to pronouncement chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which becomes serious problem on a world scale.

Key words: smoking tobacco, elastase, alpha-1-antitrypsin, balance of proteinases and antiproteinases

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 3: 207–214

Streszczenie

Palenie tytoniu może indukować powstawanie stanu zapalnego w drogach oddechowych oraz powodować uszkodzenie płuc. W badaniach eksperymentalnych stwierdzono, że ekspozycja na dym tytoniowy powoduje wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, co sprzyja zwiększonej migracji komórek zapalnych. W wyniku wzrostu ekspozycji na reaktywne formy tlenu dochodzi do zaburzeń równowagi proteazowo-antyproteazowej i stresu oksydacyjnego oraz zmian stężenia komórkowych enzymów antyoksydacyjnych. Z upływem lat wymienione zaburzenia mogą prowadzić do pogorszenia sprawności wentylacyjnej płuc, a w konsekwencji również do wystąpienia przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POCHP), która staje się poważnym problemem zdrowotnym w skali światowej.

Słowa kluczowe: palenie tytoniu, elastaza, alfa-1-antytrypsyna, równowaga proteazowo-antyproteazowa

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 3: 207–214

Wstęp

Palenie tytoniu może indukować powstawanie stanu zapalnego w drogach oddechowych oraz wpływa na uszkodzenie płuc. Badania *in vivo* wykazały, że istnieje bezpośredni związek przyczyn

nowo-czasowy między ekspozycją na dym tytoniowy a pojawieniem się w drogach oddechowych komórek odczynu zapalnego [1]. W prowadzonych badaniach eksperymentalnych stwierdzono również, że ekspozycja na dym tytoniowy powoduje wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych,

Adres do korespondencji: dr n. med. Joanna Kołodziejczyk, Katedra i Klinika Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu; Szpital Uniwersytecki nr 2 im. J. Bizuela, ul. Ujejskiego 75, 85–168 Bydgoszcz; tel./faks: 52 365 54 16; e-mail: joannak555@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 18.01.2010 r.
Copyright © 2011 Via Medica
ISSN 0867–7077

co sprzyja zwiększonej migracji komórek zapalnych [2]. Dochodzi do wzmożonego napływu makrofagów, limfocytów T (przede wszystkim CD8+) oraz neutrofilów i eozynofiliów [1, 3]. Liczne badania wykazują zwiększony odsetek neutrofilów w popłuczynach z drzewa oskrzelowego u palaczy tytoniu [3, 4]. Stwierdzono także, że liczba neutrofilów jest wprost proporcjonalna do liczby wypalanych papierosów. Cechy obrzęku w obrębie nabłonka oddechowego są zauważalne już 30 minut po zadziałaniu dymu tytoniowego, a liczba komórek, zwłaszcza granulocytów obojętnochłonnych, wzrasta nawet 5-krotnie w ciągu następnych 6 godzin [1]. Zmiany te są bardziej nasilone u palaczy tytoniu ze zmianami obturacyjnymi oskrzeli w porównaniu z palaczami, u których te zmiany nie występują [3–5]. Zmiany zapalne są obecne w płucach palaczy niechorujących na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP). Są one podobne do obserwowanych w POChP, ale mają mniejsze natężenie. W badaniu płwociny indukowanej wykazano, że palacze niechorujący na POChP mają większy odsetek neutrofilów w płucach niż dobrane pod względem wieku osoby niepalące; odsetek ten jest jednak mniejszy niż u chorych na POChP. Dlatego uważa się, że reakcja typowa dla POChP stanowi nadmierne nasilenie prawidłowej odpowiedzi obronnej na substancje wziewne [5, 6].

Pobudzone komórki zapalne u palaczy tytoniu uwalniają różne mediatory zapalne, w tym liczne proteiny, utleniacze i toksyczne peptydy [3]. Uważa się, że wiele z nich ma znaczenie dla rozwoju POChP, zwłaszcza leukotrien B₄ (LTB₄), interleukina-8 (IL-8) i czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*), które mają i (lub) zdolność uszkodzenia struktur płuca, i (lub) podtrzymywania zapalenia neutrofilowego [5]. Dym tytoniowy pobudza makrofagi i komórki nabłonkowe do wytwarzania TNF- α i może również powodować uwalnianie przez makrofagi innych mediatorów reakcji zapalnej, w tym IL-8 i LTB₄ [3, 5]. Uważa się, że w patogenezie POChP oprócz reakcji zapalnej istotną rolę odgrywają dwa inne procesy: zachwianie równowagi między aktywnością proteinaz i antyproteinaz w mięszu płucnym oraz stres oksydacyjny. Procesy te mogą być następstwem reakcji zapalnej lub wynikiem działania czynników środowiskowych (np. związki utleniające zawarte w dymie tytoniowym) lub genetycznych (np. niedobór alfa-1-antytrypsyny) [7]. W ostatnich latach podkreśla się również rolę innego mechanizmu — zwiększonej apoptozy komórek nabłonkowych pęcherzyków płucnych oraz komórek śródbłonka — w patogenezie POChP [8].

Proteiny

Elastaza neutrofilowa (NE, *neutrophile elastase*), nazywana również granulocytarną lub leukocytarną, jest jednym z najważniejszych enzymów hydrolitycznych granulocytów wielojądrazastych. Syntezowana jest w szpiku kostnym i magazynowana w ziarnistościach azurochłonnych komórek obojętnochłonnych [9, 10]. Stężenie elastazy zależy od wieku neutrofila; najwięcej enzymu zawierają komórki kilkudniowe, najmniej młode, świeżo uwolnione do krwiobiegu [11]. Indukcja transkrypcji genu NE powstaje na wczesnym etapie szpikowego różnicowania się komórek linii leukocytarnej. Promotor genu NE zawiera czynnościowo ważne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, które nazwano: c-Myb, C/EBP (itp.). Nikotyna zawarta w dymie tytoniowym łatwo wchłania się z tkanki płucnej, przenika również do szpiku kostnego, indukując ekspresję genu NE i prowadząc w ten sposób do wzrostu aktywności elastazy w komórkach [9, 10].

Elastaza jest glikoproteiną należącą do klasy N-wiązanych glikoprotein. Jej działanie polega na degradacji składników błony i białek komórek oraz składników substancji międzykomórkowej — elastyny, kolagenu I, III i IV, fibronektyny, proteoglikanów oraz rozpuszczalnych białek osoczowych, w tym składników układu hemostazy i układu odpornościowego, a także białek transportowych [11]. Wykazano również, że elastaza może wywierać cytotoksyczny wpływ na komórki śródbłonka. Powoduje ona odwarstwienie komórek śródbłonka przez trawienie białek powierzchniowych komórek [10]. Stwierdzono także, że elastaza może być odpowiedzialna za uszkodzenie komórek nabłonka, zmniejszenie ilości rżesek, przerost gruczołów śluzowych oraz zwiększoną produkcję i wydzielanie śluzu w drogach oddechowych. Powoduje również uszkodzenie tkanki śródmiąższowej płuc. Zmiany te prowadzą do destrukcji pęcherzyków płucnych [5].

Rola fizjologiczna elastazy związana jest ściśle z funkcją granulocytów obojętnochłonnych, a jej aktywność enzymatyczna umożliwia prawidłowy przebieg wielu funkcji fizjologicznych neutrofilów. Kontrolowana ekspresja oraz sekrecja NE umożliwia granulocytom obojętnochłonnym diapedezę, przenikanie przez bariery tkankowe oraz ich napływ do ogniska zapalnego. Enzym ten jest również czynnikiem wspomagającym fagocytozę poprzez aktywny udział w degradacji materiału fagocytowanego przez neutrofile [11].

Elastaza, poza granulocytami obojętnochłonnymi, jest syntezowana w makrofagach, monocy-

tach, trombocytach, fibroblastach, w komórkach śródbłonna i mięśni gładkich, a także w trzustce. Wszystkie rodzaje elastazy wykazują znaczne podobieństwo składu i sekwencji aminokwasowej. Elastaza makrofagów wykazuje o wiele mniejszą aktywność proteolityczną w porównaniu z elastazą granulocytów. W komórkach tych elastaza występuje w formie latentnej, która jest aktywowana przez plazminę. Makrofagi wykazują obecność na powierzchni błony komórkowej obecność swoistych receptorów dla elastazy granulocytów obojętnochłonnych. Makrofagi, wiążąc elastazę neutrofilów, spełniają ważną funkcję ochronną tkanki płucnej. Rozpad tych komórek powoduje natomiast nasilony proces tkankowej degradacji enzymatycznej wskutek addycyjnego działania enzymów makrofagów i NE „przenoszonej” przez makrofagi [9].

Uwalnianie elastazy wzrasta w momencie wystąpienia procesu zapalnego. Wzrost jej stężenia we krwi jest jednym z najwcześniejszych wskaźników zaistniałego stanu zapalnego. Podwyższenie jej stężenia następuje po 4–6 godzinach i osiąga maksimum po 8–12 godzinach od momentu zadziałania bodźca wywołującego [11]. Pobudzenie neutrofilów do wydzielania elastazy następuje za pośrednictwem różnych cytokin — TNF- α , IL-8, składnika dopełniacza C5a, lipopolisacharydów (LPS), leukotrienów, fosfolipazy C [10].

Metaloproteiny (MMPs, *matrix metalloproteinases*) stanowią rodzinę metalozależnych endopeptydaz biorących udział w degradacji macierzy pozakomórkowej. Uczestniczą one w szeregu fizjologicznych i patologicznych procesów. W warunkach fizjologicznych są odpowiedzialne za skład tkanki łącznej. Metaloproteiny macierzy posiadają zdolność trawienia kolagenu, fibronektyny, elastyny, lamininy i innych proteoglikanów, glikoprotein. Ekspresja genów metaloproteinaz występuje prawie we wszystkich komórkach — fibroblastach, keratynocytach, makrofagach, komórkach endotelialnych, komórkach dendrytycznych oraz komórkach nacieków zapalnych — monocytach, limfocytach T oraz leukocytach. Metaloproteiny uczestniczą w budowie macierzy pozakomórkowej, migracji i infiltracji komórkowej. Głównym źródłem MMPs są komórki nacieków zapalnych. Metaloproteiny różnią się między sobą substratami, w stosunku do których wykazują właściwości trawiące. Wyróżniono charakterystyczne domeny wspólne dla całej rodziny peptydaz oraz inne, które decydują o specyficznych właściwościach poszczególnych enzymów. Metaloproteiny posiadają zdolność trawienia elastyny, fibronektyny, lamininy i niektórych typów kolagenu, co skutkuje uszko-

dzeniem błony podstawnej naczyń krwionośnych, a w efekcie ułatwia migrację komórek śródbłonna [12–15]. Substratem dla MMPs mogą być również chemokiny, czynniki wzrostu czy receptory. Mogą one także aktywować inne komórki zapalne doprowadzając do rozszerzania procesu zapalnego [16]. Enzymy te produkowane są i wydzielane w formie nieaktywnej, a następnie są aktywowane w środowisku zewnątrzkomórkowym. Niezbędnym warunkiem do pobudzenia komórek do produkcji MMPs jest obecność kolagenu. Zdolność działania MMPs zależy także od pH tkanki; większość MMPs działa w pH neutralnym lub lekko zasadowym [12]. W tabeli 1 przedstawiono poszczególne typy MMPs [13–15, 17].

Antyproteiny

Naturalną obroną tkanek organizmu przed działaniem NE jest inhibicja funkcji enzymu. Przez zahamowanie aktywności enzymatycznej zostaje ograniczony destrukcyjny wpływ na tkankę płucną, a także zmniejszone wytwarzanie czynników odpowiedzialnych za migrację granulocytów obojętnochłonnych. Do endogennych inhibitorów elastazy należą: alfa-1-antyproteinaza, antyleukoproteaza (SLPI, *secretory leukocyte protease inhibitor*), elafina (ESI, *elastase-specific inhibitor*), bompaina (*protease inhibitor 10*), alfa-2-makroglobulina oraz polianiony (mucyna i glikozaminoglikany) [9, 10].

Alfa-1-antyproteinaza (α 1-AT) jest jednym z głównych inhibitorów NE. Dawniej była nazywana α ₁-antytropsyną, jednak udowodniono, że trypsyna nie jest enzymem, którego hamowanie decyduje o biologicznej roli α 1-AT. Inhibitor ten ma również zdolność blokowania funkcji innych proteaz serynowych: chymotrypsyny, trombiny i katepsyny G. Alfa-1-antyproteinaza jest wytwarzana w dojrzałych granulocytach obojętnochłonnych i monocytach. Indukcja transkrypcji genu α 1-AT następuje pod wpływem czynników aktywujących neutrofile i wtórnie przez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-kappa B. Alfa-1-antyproteinaza syntezowana jest *de novo* i w dużych ilościach wydzielana do otoczenia. Zawiera 394 reszty aminokwasowe, wśród których czynną pozycję 358 zajmuje metionina, szczególnie podatna na utlenianie. Alfa-1-antyproteinaza unieczynnia elastazę przez nieodwracalne wiązanie z metioniną. W warunkach fizjologicznych większość cząsteczek tego inhibitora występuje w postaci połączeń ze związkami tiolowymi (α 1-AT-SSG, α 1-AT-SScys), co warunkuje jego rolę ochronną [9]. Alfa-1-antyproteinaza jest bardzo wrażliwa na atak utleniaczy

Tabela 1. Główne typy metaloproteinaz

Table 1. Major type of metalloproteinases

Enzym	Substrat	Lokalizacja	Inhibitor
MMP-1 (kolagenaza 1)	Kolagen typu I, II	Nabłonek, makrofagi, fibroblasty, śródbłonek, keratynocyty, osteoblasty, hepatocyty	TIMP-1
MMP-2 (żelatynaza A)	Kolagen typu IV, V, laminina, elastyna, pro-MMP-9, CCL-7, CXCL-12	Nabłonek, makrofagi, śródbłonek, fibroblasty, mięśnie gładkie, neutrofile, limfocyty T	TIMP-1 TIMP-2
MMP-3 (stromielizyna)	Kolagen typu I, IV, żelatyna, laminina, pro-MMP-9, E-kadheryna, nieczynny TGF- β	Nabłonek, makrofagi, eozynofile, neutrofile, mastocyty, keratynocyty, chondrocyty, mięśnie gładkie naczyń	TIMP-1
MMP-7 (matrilizyna)	Kolagen typu IV, elastyna, pro-alfa defensyna, FAS-ligand, E-kadheryna, syndekan-1, nieczynny TNF- α	Nabłonek, makrofagi, mezangium	TIMP-1
MMP-8 (kolagenaza śródmiąższowa)	Kolagen typu I, II, III, pro-MMP-9	Nabłonek, makrofagi, neutrofile	TIMP-1 TIMP-2
MMP-9 (żelatynaza B)	Kolagen typu IV, elastyna, żelatyna, proteoglikany	Nabłonek, makrofagi, eozynofile, neutrofile, mastocyty, komórki dendrytyczne, komórki T, fibroblasty, śródbłonek, keratynocyty, osteoblasty, trofoblast	TIMP-1
MMP-10 (stromielizyna 2)	Nieznany	Komórki T, fibroblasty, nabłonek, keratynocyty	
MMP-11 (stromielizyna 3)	Nieznany	Fibroblasty, nabłonek, mezenchyma	
MMP-12	Kolagen typu IV, elastyna	Makrofagi	TIMP-1
MMP-13	Kolagen typu I, II	Fibroblasty kości	
MMP-14 (MT1-MMP)	Kolagen typu I, II, III, laminina, fibronektyna, pro-MMP-2, pro-MMP-13	Nabłonek, makrofagi, neutrofile, mięśnie gładkie, śródbłonek	TIMP-1

i enzymów proteolitycznych uwalnianych w miejscu zapalenia [18]. Odgrywa największą rolę w dolnych drogach oddechowych, a jej niedobór wiąże się z chorobami pęcherzyków płucnych [5]. Niedobór α 1-AT może wiązać się z rozwojem rozedmy płuc. Najbardziej atrakcyjną hipotezą tłumaczącą patomechanizm rozedmy jest tak zwana hipoteza elastolityczna, przedstawiona w 1963 roku przez Laurella i Erickssona [19].

Antyleukoproteaza jest niskocząsteczkowym białkiem zbudowanym ze 107 aminokwasów, w obrębie którego wyróżniamy dwie domeny. Pierwsza jest odpowiedzialna za aktywność przeciwbakteryjną, a druga za aktywność antyproteolityczną. Pneumocyty nie mają zdolności magazynowania SLPI. Jest ona w stałych ilościach wydzielana do śluzu. Stężenie aktywnej SLPI nie wzrasta w odpowiedzi na ostry uraz zapalny spowodowany wzrostem elastazy, mimo jednoczesnego wzrostu mRNA dla SLPI. Udowodniono, że elastaza neutrofilowa może nawet zmniejszać wytwarzanie SLPI *in vivo*. Mimo że SLPI ma mniejsze powinowactwo do elastazy niż α 1-AT, inhibitor ten stanowi bardzo ważny element układu antyproteolitycznego (20% całkowitej aktywności proteolitycznej). Antyleukoproteaza, w odróżnieniu od α 1-AT,

wykazuje zdolność do przenikania w głąb błony pęcherzykowo-włośniczkowej i wiązania się z włóknami elastynowymi, co umożliwia jej inaktywację elastazy powiązanej z tymi włóknami. Ponadto, jako jedyna antyproteinaza, ma zdolność blokowania proteolizy przez przylegające do komórek nabłonka granulocyty obojętnochłonne. Jej aktywność może być analizowana w płynie uzyskanym metodą płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Jednak badania dotyczące udziału tego inhibitora w patogenezie chorób są w fazie początkowej [20]. Antyleukoproteaza jest znana jako główny inhibitor proteaz w drogach oddechowych i pełni funkcję ochronną przed rozwojem chorób oskrzeli [5].

Elafina, podobnie jak SLPI, należy do niskocząsteczkowych antyproteinaz wydzielanych przez pneumocyty typu 2. Jako cząsteczka jest stabilizowana przez wewnętrzny mostek dwusiarczkowy [9].

Bompaina jest białkiem o masie cząsteczkowej 45 kDa zbudowanym z 397 aminokwasów. Ekspresja tego inhibitora ograniczona jest do komórek szpiku kostnego. Sugeruje się, że może odgrywać rolę w regulacji aktywności proteaz w czasie hemopoezy [9].

Tkankowe inhibitory proteinaz (TIMPs, *tissue metalloproteinase inhibitors*) są ważną grupą inhi-

bitorów proteinaz hamującą aktywność metaloproteinaz. Produkowane są przez te same komórki co MMPs. Są one rodziną czterech strukturalnie spokrewnionych ze sobą białek. Sprawują podwójną rolę nad MMPs poprzez hamowanie przejścia pro-MMPs w MMPs, jak również w ich aktywne formy. Obecne są w przestrzeniach międzykomórkowych, w osoczu krwi i innych płynach ustrojowych. W formie rozpuszczalnej produkowane są TIMP-1 i TIMP-2, obecne w surowicy krwi, podczas gdy TIMP-3 jest w formie nierozpuszczalnej i jest związany z macierzą międzykomórkową. Tkanekowy inhibitor proteinaz 1 jest glikoproteiną o masie 30 kD, głównym inhibitorem MMPs produkowanym przez większość komórek. Jego ekspresja jest regulowana przez cytokiny — IL-1 i TNF- α , które indukują syntezę MMPs, a hamują syntezę TIMP-1. Z kolei TIMP-2 jest nieglikozylowaną proteiną produkowaną przez fibroblasty i komórki endotelialne, mającą zdolność kontrowania aktywacji MMP-2. Nie wykazano jej podatności na działanie cytokin. Tkanekowe inhibitory proteinaz tworzą niekowalენტne wiązania, łącząc się w dwucząsteczkowe kompleksy z aktywną formą MMPs, czasem z ich prekursorami. Regulują one degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, zarówno przez eliminację proteinaz, jak i hamowanie aktywacji MMPs [12, 15]. Oprócz hamowania MMPs, TIMPs mogą brać udział w promocji wzrostu komórki, wykazywać aktywność przeciwapoptotyczną, działanie steroidogenne i antyangiogenne [16].

Równowaga proteazowo-antyproteazowa

Wolna elastaza stanowi potencjalne niebezpieczeństwo dla otaczających tkanek. Specjalnego znaczenia nabiera fakt, że jej pozakomórkowa aktywność pozostaje pod kontrolą antyproteazową. Znajdująca się poza komórką elastaza jest w przeciągu milisekund (okres półtrwania elastazy — 0,6 ms) wychwytywana i inaktywowana przez obecne we krwi i tkankach inhibitory proteaz. Główny fizjologiczny inhibitor α 1-AT łączy się z cząsteczką elastazy w stosunku 1:1, tworząc nieaktywny, trwały kompleks dyfundujący do krwi. Okres półtrwania kompleksu EN- α 1-AT w krwioobiegu wynosi około godzinę. Oznaczanie elastazy związanej w postaci tego kompleksu ma znaczenie diagnostyczne [11].

Alfa-1-antyproteinaza jest bardzo wrażliwa na atak utleniaczy i enzymów proteolitycznych uwalnianych w miejscu zapalenia. Cząsteczka α 1-AT ma odsłonięte, łatwo dostępne centrum aktywne, a w nim wrażliwy na utlenianie aminokwas — metioninę. Utlenianie metioniny przez wolne rod-

niki i HClO pozbawia enzym aktywności. Metaloproteinazy (kolagenaza i żelatynaza) uaktywniane pod wpływem HClO, a także katepsyna G, elastaza makrofagowa oraz elastazy bakteryjne powodują proteolityczną degradację α 1-AT. Bogactwo czynników powodujących inaktywację inhibitorów elastazy wydaje się wskazywać, że jest to uwarunkowanie celowe, zapewniające ochronę elastazy w sytuacji, kiedy niezbędna jest jej wysoka aktywność. System inaktywatorów α 1-AT powoduje miejscowy niedobór natywnego inhibitora, umożliwiając efektywne działanie elastazy, na przykład w procesach przebudowy i odnowy tkanek lub przy niszczeniu dużych kompleksów bakteryjnych. W warunkach prawidłowych i przy niezaburzonej pracy systemów regulujących aktywność inhibitorów α 1-AT (enzymów antyoksydacyjnych i antymetaloproteinaz) działanie to jest krótkotrwałe, przestrzennie ograniczone, a chwilowy niedobór α 1-AT uzupełniany jest napływem natywnej antyproteazy. Jednak przy dużym stężeniu czynników inaktywujących wokół neutrofila tworzy się „otoczka” związków inaktywujących antyproteinazy, złożona przede wszystkim z jonów podchloraowych, stanowiąca barierę dla aktywnych inhibitorów (α 1-AT, ale również α 2-MG, SLPI). Działanie inaktywujące antyproteinazy jest na tyle silne, że okres pozakomórkowej aktywności elastazy może wydłużyć się z 0,6 ms nawet do 1,2 s (2000 razy), co umożliwia jej zaatakowanie otaczających tkanek. Wielu autorów uważa, że właśnie ten moment, określane jako zaburzenie równowagi proteazowo-antyproteazowej, jest kluczowy dla rozpoczęcia procesów, w których elastaza, jeden z najważniejszych enzymów obronnych, staje się czynnikiem destrukcyjnym. W momencie połączenia z substratem elastaza staje się odporna na działanie nawet natywnych inhibitorów, co umożliwia dalsze jej niekontrolowane działanie. Uszkodzone tkanki stają się nowym ogniskiem zapalnym i źródłem czynników chemotaktycznych; w wyniku napływu i aktywacji kolejnych leukocytów następuje amplifikacja odczynu zapalnego już niezależnie od pierwotnego czynnika wywołującego [10, 11]. Obecnie uważa się, że przyczyną rozwoju zmian obturacyjnych w drogach oddechowych jest zakłócenie w ich dolnych odcinkach równowagi między utleniaczami i przeciwutleniaczami. Aktywność inhibitorów proteaz zmniejsza się znacznie pod wpływem substancji utleniających (oksydantów). Do najbardziej rozpowszechnionych utleniaczy należą składniki dymu tytoniowego [21].

Palenie tytoniu stymuluje komórki nabłonka dróg oddechowych do produkcji cytokin, co aktywuje neutrofile i makrofagi, wpływa też bezpośred-

nio stymulująco na neutrofile i makrofagi. Dym tytoniowy zawiera też oksydanty, które inaktywują antyproteinazy. Inaktywacja ta jest pogłębiana przez oksydanty uwalniane z aktywowanych komórek — neutrofilów i makrofagów. Stymulowane neutrofile i makrofagi uwalniają enzymy proteolityczne. Elastaza neutrofilowa ma zdolność aktywacji MMPs, podczas gdy MMPs mogą unieczynniać alfa-1-antyproteinazę. Metaloproteinaza MMP-12 wpływa na wydzielanie TNF- α , co powoduje nasilenie procesu zapalnego. Procesy te prowadzą do zaburzenia równowagi proteazowo-antyproteazowej, co powoduje zwiększoną degradację kolagenu i tkanki łącznej w drogach oddechowych [22].

Zaburzenia równowagi proteazowo-antyproteazowej u palaczy tytoniu

WzmóŜona aktywność neutrofilów wiąŜe się z uwalnianiem zwiększonych ilości elastazy neutrofilowej [10, 23], a wzrost stęŜenia elastazy jest jednym z najwcześniejszych wskaźników obecności procesu zapalnego. Elastaza, pozostająca poza zasięgiem jej inhibitorów, jest odpowiedzialna za nadreaktywność neutrofilów i w konsekwencji za uszkodzenie tkanek i narządów. Antyproteinaza wiąŜe i unieczynnia elastazę, tworząc z nią pozabawione aktywności kompleksy, transportowane do układu siateczkowo-śródbłonkowego.

Wiele przeprowadzonych badań potwierdza wpływ palenia tytoniu na zaburzenia równowagi proteazowo-antyproteazowej, jakkolwiek ich wyniki są czasami rozbieŜne.

Hoshino i wsp. w swoich badaniach przeprowadzonych u palaczy tytoniu wykazali istotną statystycznie zależność między upośledzoną sprawnością wentylacyjną płuc (zwłaszcza wskaźnika FEV₁), kojarzącą się z liczbą paczkołat, a zwiększonym stęŜeniem tych kompleksów [24].

Znamiennie wyższe stęŜenia elastazy u palaczy tytoniu w porównaniu z byłymi palaczami i osobami niepalącymi stwierdzili również Hind i wsp. Natomiast u palaczy tytoniu nie zaobserwowali oni istotnej korelacji zarówno między stęŜeniem elastazy a wskaźnikiem FEV₁, jak i między stęŜeniem elastazy a intensywnością palenia tytoniu [25]. Porównując palaczy tytoniu z rozwiniętą już rozedmą płuc z osobami zdrowymi, Renkema i wsp. również nie wykazali istotnych statystycznie różnic między stęŜeniami elastazy w badanych grupach [26]. Podobne wyniki uzyskali Abboud i wsp., którzy nie stwierdzili istotnych różnic między stęŜeniami elastazy w grupie zdrowych palaczy tytoniu i w grupie osób niepalących. Zaobser-

wowali natomiast, Ŝe u palaczy po 8-godzinnej abstynencji występował istotny wzrost stęŜenia elastazy w pierwszej godzinie po wypaleniu 8 paczkołat w ciągu 2 godzin, a był nieznamienny po drugiej godzinie [27].

Znamiennie wyższe stęŜenia markerów degradacji elastyny w moczu obserwowali Stone i wsp. u palaczy tytoniu z objawami i bez objawów POChP w porównaniu z osobami niepalącymi, co wskazuje na większą aktywność elastazy w grupach palaczy tytoniu [28]. Podobnie Betsuyaku i wsp., porównując palaczy tytoniu z osobami niepalącymi, wykazali podwyższone stęŜenia peptydów pochodzących z degradacji elastyny (EDP, *elastine-derived peptides*), znajdujących się w popłuczynach z drzewa oskrzelowego. Badacze ci stwierdzili również istotną korelację między stęŜeniem EDP a stęŜeniem kompleksu złożonego z elastazy neutrofilowej i jej inhibitora — α 1-AT. StęŜenie EDP nie korelowało jednak z liczbą paczkołat u palaczy tytoniu. W tym badaniu potwierdzono fakt, Ŝe degradacja elastyny jest związana ze wzrostem elastazy neutrofilowej w płucach palaczy tytoniu [29]. Yoshioka i wsp. również wykazali wzrost stęŜenia kompleksu „elastaza neutrofilowa/ /inhibitor α 1-AT” u palaczy tytoniu, ale z subklinicznymi cechami rozedmy płuc, w porównaniu z palaczami tytoniu i z osobami niepalącymi bez cech rozedmy. Autorzy sugerowali, Ŝe zwiększona zawartość tego kompleksu w popłuczynach z drzewa oskrzelowego u palaczy tytoniu moŜe być czynnikiem ryzyka rozwoju rozedmy płuc [30]. Odmienne wyniki od wyŜej cytowanych uzyskali Abboud i wsp., którzy nie wykazali zwiększonej aktywności elastazy pochodzącej z makrofagów pęcherzyków płucnych w grupie palaczy tytoniu ze średnio zaawansowaną rozedmą płuc potwierdzoną w tomografii komputerowej, w porównaniu z palaczami tytoniu bez cech rozedmy. Nie wykazali również związku między aktywnością elastazy a wartościami wskaźników FEV₁% i FEV₁/FVC [31].

Większość cytowanych badań potwierdza zwiększoną aktywność elastazy u palaczy tytoniu, co wskazuje na jej strategiczną rolę w patogenezie zmian destrukcyjnych w drogach oddechowych, jakkolwiek nie zawsze udaje się potwierdzić jej związek z zaawansowaniem zmian w płucach czy z parametrami spirometrycznymi. W przypadku α 1-AT w prowadzonych badaniach również obserwowano rozbieŜne wyniki.

Chen i wsp. stwierdzili istotnie mniejsze stęŜenie α 1-AT u palaczy tytoniu z POChP w porównaniu z palaczami tytoniu bez zmian obturacyjnych oskrzeli. Potwierdzili tym samym, Ŝe niedobór α 1-AT jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju POChP związanym z paleniem tytoniu [32].

Olsen i wsp. wykazali, że w surowicy krwi stężenie α 1-AT nie różniło się istotnie statystycznie u palaczy tytoniu i u osób niepalących, podczas gdy zawartość α 1-AT w popłuczynach z drzewa oskrzelowego była większa u palaczy tytoniu. Wyższe stężenia α 1-AT zawierały również makrofagi pęcherzyków płucnych pochodzące od palaczy tytoniu, co może sugerować, że wzrost stężenia α 1-AT u palaczy tytoniu jest wyrazem przewlekłego funkcjonowania mechanizmów obronnych przeciwko proteolizie. Nie wykazano jednak korelacji między zawartością α 1-AT w komórkach a stężeniem α 1-AT w surowicy krwi oraz związku tego inhibitora elastazy z intensywnością palenia tytoniu [33]. Z kolei Zhao i wsp. obserwowali istotnie obniżone stężenia α 1-AT oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, *superoxide dismutase*) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px, *glutathione peroxidase*) u palaczy tytoniu [34], a Petridou i wsp. wykazali istotną statystycznie dodatnią korelację między stężeniem α 1-AT w osoczu a intensywnością palenia tytoniu [35]. Istotnych różnic w stężeniu α 1-AT oraz objętości hamowania elastazy neutrofilowej u palaczy tytoniu w porównaniu z osobami niepalącymi nie wykazali Wewers i wsp. Mierząc kinetykę hamowania elastazy neutrofilowej, badacze ci stwierdzili, że była ona 1,5 raza dłuższa u palaczy tytoniu niż u osób niepalących, co może być wyrazem uszkodzenia przez palenie tytoniu systemu antyproteazowego jako mechanizmu obronnego układu oddechowego u palaczy tytoniu [36].

Różne wyniki badań przedstawione w powyższych pracach, wskazujące na zmienne stężenie α 1-AT w surowicy i w materiale pobranym z drzewa oskrzelowego, mogą być związane z zaawansowaniem procesu zapalnego, obecnością różnych kompartmentów układu oddechowego, a także wpływem innych czynników patogenetycznych, jak stres oksydacyjny czy apoptoza, na równowagę proteazowo-antyproteazową.

Również wiele prowadzonych badań dotyczy oceny ekspresji i stężenia metaloproteinaz oraz ich inhibitorów w komórkach, płwocinie indukowanej u palaczy tytoniu oraz u pacjentów z POChP. Istotną rolę w remodelingu drzewa oskrzelowego u pacjentów z POChP odgrywają MMPs i TIMPs, a do ich aktywacji może dochodzić pod wpływem oksydantów, produktów bakteryjnych, na przykład LPS oraz cytokin — IL-1 β , PDGF i TNF- α . W aktualnych badaniach nad palaczami tytoniu oraz w POChP największe znaczenie w toczących się zaburzeniach równowagi proteazowo-antyproteazowej mają MMP-8, MMP-9 i MMP-12 [37].

Aviles i wsp. oceniali ekspresję MMPs w płwocinie indukowanej u palaczy tytoniu oraz pacjentów z POChP w porównaniu ze zdrowymi osobami niepalącymi. U palaczy tytoniu stwierdzono wyższe stężenie MMP-9 w porównaniu z niepalącymi, a pacjenci z POChP mieli wyższe stężenia i aktywność MMP-9 w porównaniu ze zdrowymi palaczami i osobami niepalącymi. W badaniu tym stwierdzono również u zdrowych palaczy tytoniu wyższy wskaźnik MMP-9/TIMP-1 w porównaniu z grupą niepalącą. Chorzy z POChP wykazywali niższe stężenie TIMP-1. Wskaźnik MMP-9/TIMP-1 wykazywał odwrotną korelację z FEV₁ [38]. Podobnie Ilumets i wsp. stwierdzili zwiększone stężenie MMP-9 u palaczy tytoniu i chorych w stadium 0 POChP w porównaniu z niepalącymi. W przypadku MMP-12 stwierdzono jej wyższe stężenie w stadium 0 POChP w porównaniu z niepalącymi. Stężenie MMP-8 znacząco się różnicowało u chorych w stadium 0 POChP i zdrowych palaczy, co sugeruje, że ta metaloproteinaza może być wczesnym biomarkerem rozwoju POChP. Wykazano również korelację między stężeniem MMP-8 a parametrami spirometrycznymi związanymi z drobnymi drogami oddechowymi (MEF50, MEF25) [39]. Demedts i wsp. wykazali zwiększone stężenie MMP-12 w płwocinie indukowanej u pacjentów z POChP w porównaniu z niepalącymi, zdrowymi palaczami i byłymi palaczami. Również i w tym badaniu potwierdzono odwrotną korelację między MMP-12 a parametrami spirometrycznymi [40]. Vernooy i wsp. wykazali niewielkie stężenia MMP-1 u palaczy tytoniu i chorych z POChP, podczas gdy MMP-8 była dominującą kolagenazą w obu tych grupach, a MMP-2 i MMP-13 były poniżej progu wykrywalności [41]. Culpitt i wsp. stwierdzili, że stężenie MMP-9 i TIMP-1 było znamienne wyższe w grupie palaczy tytoniu w porównaniu z grupą osób niepalących. Wykazali oni również znamienne wyższe stężenie MMP-1, MMP-8, ponadto MMP-9 i TIMP-1 w płwocinie indukowanej pacjentów z POChP w porównaniu z palaczami tytoniu i grupą kontrolną [42]. Z kolei Boschetto i wsp. nie stwierdzili istotnych różnic pod względem stężenia TIMP-1 u pacjentów z POChP z rozedmą i bez rozedmy płuc [43].

Istotne jest poszukiwanie czynników predykcyjnych rozwoju POChP, ale również nowych strategii terapeutycznych, polegających na poszukiwaniu inhibitorów hamujących czynniki zapalne odpowiedzialne za rozwój zmian destrukcyjnych. W ostatnim czasie takim celem terapeutycznym stały się MMPs i aktualnie prowadzone są badania eksperymentalne nad skutecznością selektywnych inhibitorów MMPs [44, 45].

Podsumowanie

Palenie tytoniu jest ważną przyczyną zwiększonej chorobowości i śmiertelności i może prowadzić do rozwoju różnych chorób. W drogach oddechowych powoduje rozwój przewlekłego stanu zapalnego i może wpływać na zaburzenie równowagi proteazowo-antyproteazowej, co jest przyczyną rozwoju POChP. Zwiększeniu ulega aktywność proteinaz, a zmniejszeniu aktywność antyproteinaz, co staje się przyczyną rozwoju zmian destrukcyjnych w drogach oddechowych. Istotne jest poszukiwanie mechanizmów patogenetycznych zmian, które pozwalają na ustalenie czynników predykcyjnych rozwoju choroby, jak również mogą stać się celem terapeutycznym w leczeniu POChP.

Piśmiennictwo

- Chorostowska-Wynimko J. Rola procesu zapalnego w patogeniezie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. *Pol. Merk. Lek.* 2004; 17: 203–206.
- Wright J., Churg A. A model of tobacco smoke-induced airflow obstruction in the guinea pig. *Chest* 2002; 121: 188–191.
- Sato E., Koyama S., Takamizawa A. i wsp. Smoke extract stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activities. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Physiol.* 1999; 277: 1149–1157.
- Byrne D. (European Commissioner for Health and Consumer Protection). *European Commission: tobacco or health in the European Union: past, present and future.* Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities 2004.
- Hill A., Gompertz S., Stockley R. Factors influencing airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2000; 55: 970–977.
- Peleman R., Ryttila P., Kips J. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1999; 13: 839–843.
- Pauwels R., Buist A., Calverley P. *Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2004.
- Demedts I., Demoor T., Bracke K., Joos G., Brusselle G.G. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir. Research* 2006; 7: 53.
- Grzanka A., Rogala B. Znaczenie elastazy granulocytów obojętnochłonnych w patofizjologii obturacyjnych chorób płuc. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2000; 54: 213–223.
- Lee W., Downey G. Leukocyte elastase. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2001; 164: 896–904
- Czerwińska B., Laskowska-Klita T. Elastaza neutrofilowa. Część II. Elastaza neutrofilowa a stany zapalne. *Med. Wiek. Rozw.* 1998; 2: 414–419.
- Dziankowska-Bartkowiak B., Waszykowska E., Żebrowska A. Udział metaloproteinaz i ich inhibitorów w patomechanizmie wybranych chorób skóry. *Alergia Astma Immunol.* 2004; 9: 71–79.
- Bühling F., Groneberg D., Weltel T. Proteases and their role in chronic inflammatory lung diseases. *Curr. Drug Targets* 2006; 7: 751–759.
- Chung K. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug Targets* 2005; 4: 619–625.
- Daheshia M., Tesfaigzi Y. The role of matrix metalloproteinases in chronic pulmonary diseases: relevance of the airway epithelium. *Curr. Resp. Med. Rev.* 2005; 1: 165–170.
- Lagente V., Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the inflammatory process of respiratory disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010; 48: 440–444.
- Chakrabarti S., Patel K. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp. Lung Res.* 2005; 31: 599–621.
- Stockley R. Alpha-1-antitrypsin deficiency: what next? *Thorax* 2000; 55: 614–618.
- Mason R., Crystal R. Pulmonary cell biology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157: 72–81.
- Kinnula V. Focus on antioxidants enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax* 2005; 60: 693–700.
- Rahman I., MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 21: 669–681.
- Abboud R., Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2008; 12: 361–367.
- Nadel J. Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies. *Chest* 2000; 117: 386–389.
- Hoshino Y., Nagai S., Koyama H. Airflow limitation in Japanese smokers: significance of serum neutrophil elastase/alpha(1)-proteinase inhibitor ratio and FEV(1) (%pred) adjusted by pack-years. *Respiration* 2000; 67: 372–377.
- Hind C., Joyce H., Tennent G. Plasma leukocyte elastase concentrations in smokers. *J. Clin. Pathol.* 1991; 44: 232–235.
- Renkema T., Postma D., Noordhoek J. In vitro release of neutrophil elastase, myeloperoxidase and beta-glucuronidase in patients with emphysema and healthy subjects. *Eur. Respir. J.* 1991; 4: 1237–1244.
- Abboud R., Fera T., Johal S. Effect of smoking on plasma neutrophil elastase levels. *J. Lab. Clin. Med.* 1986; 108: 294–300.
- Stone P., Gottlieb D., O'Connor G. Elastin and collagen degradation products in urine of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151: 952–959.
- Betsuyaku T., Nishimura M., Yoshioka A., Takeyabu K., Miyamoto K., Kawakami Y. Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154: 720–724.
- Yoskioka A., Betsuyaku T., Nishimura M., Miyamoto K., Kondo T., Kawakami Y. Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152: 2127–2132.
- Abboud R., Ofulue A., Sansores R., Muller N. Relationship of alveolar macrophage plasminogen activator and elastase activities to lung function and CT evidence of emphysema. *Chest* 1998; 113: 1257–1263.
- Chen X., Cheng X., Li J. Changes of serum elastase, alpha-1-antitrypsin, procollagen III peptide and malonaldehyde in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1999; 38: 178–180.
- Olsen G., Harris J., Castle J., Waldman R., Karmgard H. Alpha-1-antitrypsin content in the serum, alveolar macrophages, and alveolar lavage fluid of smoking and nonsmoking normal subjects. *J. Clin. Inv.* 1975; 55: 427–430.
- Zhao X., Yu R. Effects of smoking on the lipid peroxides antioxidant and alpha 1-antitrypsin. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1998; 21: 218–220.
- Petridou E., Chapuis-Cellier C., Ruokas K., Lan S., Tzonou A., Trichopoulos D. Tobacco smoking and other factors in relation to serum alpha-1-antitrypsin. *Hum. Biol.* 1993; 65: 425–432.
- Wewers M., Herzyk D., Gadek J. Comparison of smoker and non-smoker lavage fluid for the rate of association with neutrophil elastase. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1989; 1: 423–429.
- Comandini A., Rogliani P., Nunziata A., Cazzola M., Curradi G., Saltini C. Biomarkers of lung damage associated with tobacco smoke in induced sputum. *Resp. Med.* 2009; 103: 1592–1613.
- Aviles B., Belda J., Margarit G., Bellido-Casado J., Martinez-Bru C., Casan P. Markers of airway remodeling in induced sputum from healthy smokers. *Arch. Bronconeumol.* 2006; 42: 235–240.
- Ilumets H., Myllarniemi M., Kinnula V. i wsp. Matrix metalloproteinases-8, -9, -12 in smokers and patients with Stage 0 COPD. *Int. J. COPD* 2007; 2: 369–379.
- Demedts I., Morel-Montero A., Lebecque S. Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax* 2006; 61: 196–201.
- Vernooy J., Lindeman J., Jacobs J., Hanemaaijer R., Wouters E. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest* 2004; 126: 1802–1810.
- Culpitt S., Rogers D., Traves S., Barnes P., Donnelly L. Sputum matrix metalloproteinases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir. Med.* 2005; 99: 703–710.
- Boschetto P., Quintavalle S., Zeni E. Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006; 61: 1037–1042.
- Srivastava P., Dastidar S., Ray A. Chronic obstructive pulmonary disease: role of matrix metalloproteinases and future challenges of drug therapy. *Expert Opin. Invest. Drugs* 2007; 16: 1069–1078.
- Hongwei Y., De Boer W., Rahman I. Targeting lung inflammation: novel therapies for treatment of COPD. *Current Resp. Med. Rev.* 2008; 4: 57–68.