

Robert Marek Mróz¹, Jacek Noparli², Elżbieta Chyczewska¹, Jan Józef Braszko², Adam Hołownia²¹Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Chyczewska

²Zakład Farmakologii Klinicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. med. Jan Józef Braszko

Sygnalizacja zależna od histonów w farmakoterapii przewlekłej obturacyjnej choroby płuc

Histone dependent signalization during pharmacotherapy of chronic obstructive pulmonary disease

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a 4th major cause of morbidity and mortality worldwide. Cigarette smoking and oxidative/nitrosative stress leading to chronic inflammation is considered as a major cause of COPD but up to now, details of molecular pathways responsible for development of disease are unknown. Recent reports indicate the role of disruption in histone function in promoting synthesis of inflammatory cytokines through increased gene transcription which underlies disease development. Core histone acetylation/deacetylation regulate their transcription activity and drug induced changes of its intensity may be an interesting field of further research. In this article the opinions about the role of steroids as inhibitors of the inflammatory process as well as resistance to steroids have been presented. Findings from studies which aimed to explore the anti-inflammatory activity of drugs such as theophylline and N-acetylcysteine and their ability to suppress oxidative stress may suggest the usefulness of these drugs in causative treatment of COPD. However, further studies are necessary to confirm these findings.

Key words: COPD, histones, HDAC, theophylline, corticosteroids, N-acetylcysteine

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 375–382

Streszczenie

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) jest czwartą co do częstości przyczyną zgonów na świecie. Molekularne mechanizmy odpowiadające za rozwój choroby nie zostały dotychczas poznane, ale wiadomo, że u podłoża POChP leży przewlekły proces zapalny i stres oksydacyjny/nitrozacyjny spowodowany paleniem tytoniu. Wyniki ostatnich badań wskazują, że zaburzenia funkcji histonów, które prowadzą, poprzez wzrost transkrypcji genów, do syntezy cytokin prozapalnych, mogą odgrywać zasadniczą rolę w patomechanizmie choroby. Reakcje acetylacji i deacetylacji histonów wpływają na ich aktywność transkrypcyjną, a zmiany intensywności tych reakcji, wywołane przez leki, mogą stanowić interesujące pole do dalszych badań. W artykule autorzy prezentują aktualne opinie na temat roli steroidów jako inhibitorów stanu zapalnego, jak również zjawiska steroidooporności. Wyniki badań, w których oceniano aktywność przeciwzapalną i zdolność do hamowania stresu oksydacyjnego takich leków, jak teofilina i N-acetylocysteina, mogą prowadzić do zastosowania tych leków w leczeniu przyczynowym POChP, jednakże obserwacje te wymagają potwierdzenia w przebiegu dalszych badań.

Słowa kluczowe: POChP, histony, HDAC, teofilina, glikokortykosteroidy, N-acetylocysteina

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 375–382

Adres do korespondencji: Robert M. Mróz, Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy Akademii Medycznej w Białymstoku, ul. Żurawia 14, 15–540 Białystok, tel.: (085) 740 95 30, faks: (085) 732 41 49, e-mail: robmroz@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 23.04.2007 r.

Copyright © 2007 Via Medica

ISSN 0867–7077

Wstęp

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) według definicji *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) to choroba charakteryzująca się ograniczeniem przepływu powietrza przez drogi oddechowe. Ograniczenie to jest zwykle nieodwracalne, postępujące i wiąże się z nieprawidłową odpowiedzią zapalną płuc na szkodliwe pyły i gazy” [1]. W Stanach Zjednoczonych POChP występuje u 5% mężczyzn oraz 3% kobiet i zajmuje podobnie jak w Polsce 4. miejsce wśród przyczyn zgonów [1]. W Polsce na POChP choruje co 10. dorosły powyżej 30 roku życia, a choroba ta jest rozpoznawana u 5,5% dorosłych mężczyzn i 4,8% dorosłych kobiet [2]. Na POChP składają się 2 jednostki chorobowe: przewlekłe zapalenie oskrzeli (PZO) i rozedma płuc. Prawie 90% chorych na POChP to czynni palacze papierosów, ale palacze bierni i byli palacze należą do grupy zwiększonego ryzyka [3].

Przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, podobnie jak takie choroby, jak: astma oskrzelowa, reumatoidalne zapalenie stawów czy schorzenia zapalne jelita grubego, charakteryzuje przewlekły stan zapalny, w którego przebiegu dochodzi do nagromadzenia w miejscu zapalenia komórek uwalniających mediatory zapalenia odpowiedzialne za zmiany strukturalne. W zapaleniu o podłożu alergicznym bierze udział około 100 mediatorów, w tym mediatory lipidowe, białka zapalne, cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu [4, 5].

W ostatnim czasie pogłębiono wiedzę o molekularnych mechanizmach aktywacji genów odpowiedzialnych za ekspresję czynników zapalnych. Wzrost ekspresji białek prozapalnych jest regulowany na poziomie transkrypcji genów poprzez aktywację prozapalnych czynników transkrypcyjnych, takich jak jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B (NF- κ B, *nuclear factor kappa B*) czy białko aktywujące-1 (AP-1, *activating protein-1*). Uważa się, że aktywacja NF- κ B i AP-1 może następować we wszystkich chorobach o podłożu zapalnym, a tym samym czynniki te mają być odpowiedzialne zarówno za zwiększenie, jak i podtrzymanie zapalenia. Udowodniono, że NF- κ B jest aktywowany nie tylko w astmie, ale również w POChP [6, 7] i reumatoidalnym zapaleniu stawów [8].

Wpływ remodelingu chromatyny na ekspresję genów prozapalnych

Kluczową rolę w ekspresji genów odgrywiają białka histonowe, wokół których nawinięta jest nić DNA. Im bardziej „rozluźniona” chromatyna, tym

więcej odsłoniętych miejsc przyłączania czynników transkrypcyjnych, a w konsekwencji — większa zdolność ich wiązania i aktywacji transkrypcji genowej. Odwrotnie, skondensowana chromatyna to brak możliwości wiązania czynników transkrypcyjnych, „wyciszenie genowe”. Acetylacja i deacetylacja histonów zależna od acetylotransferazy histonowej (HAT, *histone acetyl-transferaze*) i deacetyazy histonowej (HDAC, *histone deacetylase*) jest procesem regulującym stopień upakowania histonów i stanowi główny czynnik modyfikujący strukturę chromatyny [9]. Chromatyna składa się z nukleosomów, stanowiących jej białkowy rdzeń, z nawiniętym na niego 2-krotnie łańcuchem złożonym ze 146 par zasad DNA. Oktamer histonowy, tworzący białkowy rdzeń, składa się z 4 białek histonowych H2A, H2B, H3 i H4, po 2 każdego typu. W komórkach nieaktywnych DNA ściśle przylega do histonów, uniemożliwiając tym samym przyłączenie się polimerazy RNA II — enzymu odpowiedzialnego za aktywację mRNA — i w tym stanie („wyciszenie genowe”) nie zachodzi transkrypcja genów. Rozluźnienie nukleosomów prowadzi do aktywacji, umożliwia polimerazie RNA II i czynnikom transkrypcyjnym dostęp do DNA i w konsekwencji rozpoczęcie transkrypcji.

Białka histonowe zawierają dużo reszt lizynowych, które są obdarzone ładunkiem dodatnim, silnie wiążąc dodatnio naładowaną cząsteczkę DNA. Przyłączenie grup acetylowych do końca lizynowego histonu przy udziale HAT powoduje ich neutralizację i prowadzi do stanu rozluźnienia chromatyny, a w konsekwencji umożliwia czynnikom transkrypcyjnym dostęp do DNA [10, 11]. Warto dodać, że histony, oprócz procesu acetylacji, mogą być modyfikowane potranslacyjnie poprzez metylację, fosforylację czy ubikwitynację, która zachodzi na bocznych N-końcowych łańcuchach histonów [12]. W momencie aktywacji prozapalnych czynników transkrypcyjnych, takich jak na przykład NF- κ B, przyłączają się one do konkretnego regionu DNA, a do tego kompleksu dołączają koaktywatory, takie jak CBP (CREB, *CRE-binding protein*), p300 oraz czynniki związane z p300/CBP (PCAF, *p300/CBP-associated factor*), mające aktywność HAT i wpływające na transkrypcję genów [13]. W ludzkich komórkach nabłonka na skutek procesu zapalnego dochodzi do aktywacji czynnika NF- κ B poprzez działanie takich cytokin, jak IL-1 β (interleukina 1 β), czynnik martwicy nowotworów (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*) lub endotoksyn, a następnie do acetylacji reszt lizynowych histonów H4 i w konsekwencji do aktywacji procesu transkrypcyjnego genów odpowiedzialnych za kodowanie białek zapalnych, na przykład czynni-

ka stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) [14]. W przebiegu POChP, w komórkach miększu płuc, drzewa oskrzelowego, a także w makrofagach pęcherzykowych stwierdzono nasilenie acetylacji histonów w regionach promotorów genów odpowiedzialnych za kodowanie czynników zapalnych, takich jak IL-8, które są z kolei regulowane poprzez NF- κ B. Stopień acetylacji histonów korelował z ciężkością choroby [15]. Za reakcje deacetylacji histonów jest odpowiedzialna deacetylaza histonowa (HDAC, *histone deacetylase*), która ma 11 izoenzymów, zlokalizowanych w obrębie jądra komórkowego, a poszczególne rodzaje HDAC mogą być aktywowane w różny sposób [16]. Deacetylazę histonową podzielono na 2 główne klasy. Klasa I, występująca powszechnie w większości komórek, charakteryzuje się dużym podobieństwem do białka drożdży RPD3 i obejmuje takie izoenzymy, jak: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, HDAC11, zlokalizowane głównie w obrębie jądra komórkowego. Klasa II nie występuje tak powszechnie jak klasa I i wydaje się być zaangażowana w różnicowanie się komórek. Obejmuje ona izoenzymy: HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 i HDAC10, które wykazują podobieństwo do drożdżowych enzymów przypominających HDA-1, przemieszczających się pomiędzy cytoplazmą i jądrem komórkowym. Inną klasą tej rodziny enzymów, różniącą się od wcześniej wymienionych deacetylaz, jest klasa przypominająca gen SIR (*silencing information regulator* — regulator wyciszania informacji) drożdży, odpowiedzialna w większości za deacetylację białek niehistonowych. Klasa III wydaje się mieć znaczący wpływ na przeżycie komórek i ich apoptozę [16–19]. Deacetylazy współdziałają z korepresorami, takimi jak korepresor receptora jądrowego (NCoR, *nuclear receptor corepressor*) czy mediator wyciszający receptorów retinoidowych i tarczycowych (SMRT, *silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*), tworząc z nimi kompleksy odpowiedzialne za hamowanie ekspresji genowej [20].

Oprócz białek histonowych procesom acetylacji i deacetylacji mogą podlegać same czynniki transkrypcyjne, takie jak GATA3 lub p65, będące komponentami NF- κ B. Deacetylaza histonowa wpływa na inaktywację komponentu p65 i w konsekwencji modyfikuje transkrypcję genów bez oddziaływania na strukturę chromatyny. Białko CBP poprzez acetylację reszt lizynowych p65 zwiększa jego powinowactwo do DNA i aktywuje proces transkrypcyjny genów. Izoenzymy HDAC1 oraz HDAC2 są odpowiedzialne za deacetylację NF- κ B i wpływają na jego łączenie się z białkiem inhibi-

torowym I κ B- α (inhibitory κ B), co prowadzi do inaktywacji NF- κ B, a następnie do zmniejszenia ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję cytokin, na przykład IL-8 [21–23].

Deacetylaza histonowa w przebiegu POChP

Uważa się, że w komórkach miększu pacjentów cierpiących na POChP może dochodzić do zahamowania aktywności HDAC. Największe zahamowanie, powyżej 95% aktywności, ma dotyczyć izoenzymu HDAC2, charakteryzując pacjentów w ciężkim stadium choroby (IV stopień wg GOLD). Zahamowanie ekspresji w mniejszym stopniu dotyczy HDAC5 i HDAC8, natomiast nie stwierdzono zmian ekspresji pozostałych typów HDAC. Stopień zahamowania HDAC można określić za pomocą oceny ekspresji mRNA IL-8 i stopnia acetylacji histonu H4 w miejscu przyłączenia się czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w miejscu promotora dla IL-8. Warto zaznaczyć, że w przypadku POChP aktywność HAT nie jest podwyższona tak jak w astmie, tak więc nasilenie acetylacji histonów i transkrypcji genów odpowiedzialnych za reakcje zapalne może być tłumaczone jedynie przez hamowanie aktywności HDAC [24]. Makrofagi pęcherzykowe u osób palących również wykazują obniżoną aktywność HDAC i mniejszą ekspresję HDAC2, co koreluje ze wzrostem wytwarzania TNF- α i IL-8 w odpowiedzi na czynniki drażniące [25].

Hamowanie HDAC i zmniejszenie ekspresji HDAC2 w makrofagach pęcherzykowych koreluje z ciężkością choroby [24].

Do przyczyn powodujących zahamowanie funkcji HDAC, a w szczególności HDAC2, należą stres oksydacyjny i nitrozacyjny, prowadzące do szybkiego tworzenia się między innymi jonów nadtlenoazotanowych, które reagują z tyrozynowymi rejonami białek, takich jak białka HDAC2, doprowadzając do ich ubikwitynacji i degradacji spowodowanej przez proteosomy. Powoduje to istotne obniżenie aktywności izoenzymów HDAC2 u pacjentów z ciężką postacią POChP [26, 27]. Istnieją doniesienia, że acetylacja histonu H4, spowodowana zahamowaniem aktywności HDAC2 w wyniku działania anionorodnika ponadtlenu powstającego na skutek stresu oksydacyjnego wywołanego paleniem tytoniu, może być odwrócona przez działanie antyoksydantów, takich jak N-acetylocysteina (NAC) [28]. Może to sugerować, że dym tytoniowy bierze udział w mechanizmie hamowania HDAC u pacjentów z POChP. Istnieją dowody na intensyfikację stresu oksydacyjnego w drogach oddechowych pacjentów chorujących na POChP. Intensyfikacja przejawia się w postaci obecności mar-

kerów tego stresu w wydychanym powietrzu, takich jak 8-izoprostany, metan czy obecność 4-hydroksynonenalu w obwodowych częściach płuc [29–32]. Do czynników wpływających na zwiększenie ekspresji genów kodujących białka prozapalne w badanych *in vitro* komórkach nabłonka należy infekcja adenowirusowa, a dokładnie białko E1A adenowirusa, które wchodzi w reakcję z takimi koaktywatorami, jak na przykład białko CBP mające aktywność HAT [33]. Istnieją doniesienia, że zakażenie adenowirusami w stanie latencji powoduje w płucach pacjentów chorych na POChP wzrost ekspresji białka E1A, co prawdopodobnie wiąże się z mechanizmem nasilenia się procesu zapalnego u tych pacjentów [34, 35].

Podłoże molekularne terapii glikokortykosteroidowej

W przebiegu POChP jedynym postępowaniem terapeutycznym o udowodnionej skuteczności, zapobiegającym postępowi choroby, jest zaprzestanie palenia. Bez względu na zaawansowanie choroby od chwili rzucenia palenia roczny spadek czynności płuc wyrażonej jako natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa (FEV_{1} , *forced expiratory volume in 1 second*) odpowiada fizjologicznemu spadkowi związanemu z wiekiem [36]. Z drugiej strony tak zwana optymalna terapia POChP, oparta na długodziałających bronchodylatorach, takich jak tiotropium należące do grupy agonistów receptora muskarynowego oraz formoterol i salmeterol, będących agonistami receptora β_2 -adrenergicznego, nie wykazała znaczącego działania przeciwzapalnego ani wpływu terapii na postęp omawianej choroby [37]. W odróżnieniu od astmy oskrzelowej, gdzie nawet małe dawki glikokortykosteroidów (GKS) odznaczają się bardzo wysoką skutecznością w hamowaniu zapalenia w drogach oddechowych, skuteczność GKS w hamowaniu zapalenia w drogach oddechowych pozostaje wysoce nieefektywna, przedstawia tym samym mniejszą wartość kliniczną, nie zatrzymując postępu choroby [38]. Przemawia za tym brak wpływu leczenia doustnymi GKS na liczbę komórek zapalnych, stężenie cytokin i proteaz w indukowanej płwocinie chorych na POChP [39]. Również na podstawie metod histologicznych wykazano, że w drogach oddechowych pacjentów cierpiących na ciężką postać POChP leczenie dużymi dawkami wziewnych GKS nie ma wpływu na toczący się intensywny proces zapalny [40].

Jak wcześniej wspomniano, GKS są znacznie bardziej skuteczne w astmie niż w POChP. Leki te na poziomie komórkowym działają poprzez zaha-

mowanie i redukcję w drogach oddechowych takich komórek zapalnych, jak eozynofile, limfocyty T czy komórki dendrytyczne. Działanie to wyraża się przez zahamowanie napływu komórek biorących udział w zapaleniu, zahamowanie produkcji czynników chemotaktycznych, a także wpływając na czas przeżycia tych komórek [41]. Ostatnio coraz częściej podaje się, że przeciwzapalne działanie kortykosteroidów wiąże się z ich hamującym działaniem na takie prozapalne czynniki, jak NF- κ B i AP-1 [42, 43]. Glikokortykosteroidy z łatwością przechodzą przez błonę komórkową do cytoplazmy, gdzie łączą się z receptorem glukokortykosteroidowym (GR, *glucocorticosteroid receptor*), wiążącym w normalnych warunkach takie białka, jak hsp-90 (*heat shock protein-90*) czy białka typu *FK binding protein*. Białka te (chaperony) mają za zadanie chronić receptor i uniemożliwiać transport tego receptora do jądra komórki [44]. Zmiana konformacyjna GR, wynikająca z przyłączenia ligandu (w tym przypadku GKS), powoduje uaktywnienie receptora poprzez odłączenie od niego chaperonów, to z kolei umożliwia jego translokację do jądra komórkowego, gdzie może on bezpośrednio pobudzać czynniki transkrypcyjne przeciwzapalne (transaktywacja), bądź w sposób pośredni hamować aktywację czynników transkrypcyjnych dla cytokin zapalnych (transrepresja) [45]. Istnieją 2 izoformy GR: GR α łącząca się z GKS oraz GR β , która ma zdolność przyłączania się do DNA, jednakże nie jest pobudzana przez GKS. W porównaniu z GR α izoformę GR β charakteryzuje znacznie niższy poziom ekspresji genowej [46], a izoforma GR β odgrywa rolę w astmie odpornej na leczenie steroidami [47]. Receptor glukokortykosteroidowy może również ulegać modyfikacji, między innymi na skutek procesów fosforylacji, co z kolei zmienia odpowiedź spowodowaną połączeniem się GR z GKS poprzez wpływ na połączenie z ligandem, oddziaływanie białko–białko czy wpływ na rekrutację kofaktorów [48]. W momencie pobudzenia receptora GR przez GKS dochodzi do zmian w strukturze receptora doprowadzających do odsłonięcia miejsc sygnałowych, co umożliwia szybki transport pobudzonego receptora do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym pobudzony receptor łączy się z DNA w regionie promotorowym odpowiedzialnym za ekspresję właściwych dla GKS genów, nazywanym regionem odpowiedzi na glikokortykosteroidy (GRE, *glucocorticoid response elements*). Dwa receptory GR łączą się ze sobą, tworząc homodimer, który, przyłączając się do regionu GRE, uruchamia reakcje transkrypcji genów, które w przypadku klasycznego połączenia się z tym regionem aktywują transkrypcję genów (tzw.

transaktywację), natomiast w przypadku połączenia się z tak zwanym negatywnym regionem GRE dochodzi do zahamowania ekspresji genów (tzw. transrepresja) [49]. Jednak połączenie się pobudzonych dimerów receptorów GR z regionem GRE najczęściej prowadzi do aktywacji procesu transkrypcji genowej. Receptory GR mogą mieć wpływ na wzrost transkrypcji poprzez współdziałanie z białkami CBP. Białka te, mające aktywność HAT poprzez acetylację histonów, doprowadzają do zwiększenia transkrypcji genów. Na przykład, relatywnie wysokie stężenia GKS powodują wzrost sekrecji enzymu SLPI (*secretory leukoprotease inhibitor*) — antyproteazy występującej w komórkach nabłonkowych. Z aktywacją genów związanych z działaniem GKS jest powiązana reakcja acetylacji reszt lizynowych w pozycjach 5 oraz 16 histonu H4, co doprowadza do wzrostu ekspresji genowej [14]. Dodatkowo pobudzone receptory GR współdziałają z koaktywatorami wykazującymi aktywność HAT, takimi jak CBP, jak również SRC-1 (*steroid receptor coactivator*) czy białka GRIP-1 (*glucocorticoid receptor interacting protein 1*) [50]. Niektóre z genów aktywowanych przez GKS są odpowiedzialne za transkrypcję czynników przeciwzapalnych, takich jak inhibitor NF- κ B-I κ B- α , IL-10, SLPI, czy lipokortynę-1. Jednakże u pacjentów leczonych wziewnymi GKS w dawkach terapeutycznych nie zanotowano podwyższonego stężenia lipokortyny-1 w komórkach otrzymanych z płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego [51] ani nie zaobserwowano podwyższonego stężenia I κ B- α w większości komórek [52]. Glikokortykosteroidy są odpowiedzialne również za aktywację syntezy 2 protein odpowiedzialnych za kierowanie procesem zapalenia: białka GILZ (*glucocorticoid-induced leucine zipper protein*) hamującego zarówno NF- κ B, jak i AP-1 [53] oraz kinazy MKP-1 (*MAP kinase phosphatase 1*), hamującej kinazę p38MAP [54].

Szerokie działanie GKS trudno wytłumaczyć transkrypcją tak niewielu czynników przeciwzapalnych, tym bardziej że do efektywnego działania GKS są potrzebne wysokie stężenia leku. Jednocześnie w praktyce klinicznej GKS już w niewielkich stężeniach daje możliwość dobrej kontroli procesu zapalnego [55]. Jest też prawdopodobne, że większość działań niepożądanych związanych z leczeniem GKS powstaje poprzez aktywację genów, ponieważ w badaniu na myszach, u których stwierdzono mutację receptora GR uniemożliwiająca tworzenie dimerów i w konsekwencji przyłączenie się do DNA, wykazano brak efektów metabolicznych GKS przy zachowanym działaniu przeciwzapalnym. Sugeruje to interakcję monomerów receptora GR z czynnikiem NF- κ B i koaktywatorami [56].

Teoria „teofilinowa” grupy Barnes

Potencjalnie duże znaczenie terapeutyczne mają również leki zmieniające aktywność deacetylazy HDAC. Takim lekiem jest teofilina, która jest powszechnie stosowana w leczeniu chorób obturacyjnych jako lek bronchodylatacyjny, działający na mięśnie gładkie oskrzeli poprzez hamowanie fosfodiesterazy (PDE, *phosphodiesterase*). Jest coraz więcej dowodów na to, że teofilina wykazuje działanie przeciwzapalne występujące przy małych dawkach, jest to jednak najprawdopodobniej działanie niezwiązane z hamowaniem przez lek PDE [57]. Działanie przeciwzapalne teofiliny może natomiast zależeć od aktywacji HDAC, niezależnie od hamowania PDE [58]. Małe dawki teofiliny powodują wzrost aktywności HDAC i zmniejszenie liczby eozynofili w drogach oddechowych [58]. Wydaje się zatem, że teofilina bardziej aktywuje I klasę deacetylaz histonowych [59]. Aktywacja HDAC przez teofilinę wydaje się nasiloną w warunkach stresu oksydacyjnego [59]. Taki mechanizm sugeruje, że teofilina może wzmacniać przeciwzapalne działanie GKS, co obserwowano w badaniach *in vitro* [59]. *In vivo* małe dawki teofiliny zmniejszyły liczbę komórek zapalnych w indukowanej płwocinie chorych na POChP [60]. Warto dodać, że efektu takiego nie powodowały GKS. Przypuszczalnie teofilina może współdziałać z endogennymi GKS w warunkach *in vivo* [61].

Małe dawki teofiliny przywracają aktywność HDAC w makrofagach pęcherzyków płucnych chorych na POChP, co skutkuje zmniejszeniem steroido-oporności tych komórek [59]. Sugeruje to, że teofilina może mieć potencjalne możliwości przywracania „steroidowrażliwości” pacjentów chorych na POChP. Dodatkowo teofilina może mieć zastosowanie w chorobach, w których dochodzi do steroido-oporności, na przykład w ciężkiej astmie bądź u pacjentów z astmą, którzy palą tytoń, a opisany wcześniej mechanizm działania tego leku może tłumaczyć stosowanie teofiliny jako terapii uzupełniającej leczenie steroidami wziewnymi w ciężkiej astmie [62].

Antyoksydanty w leczeniu POChP

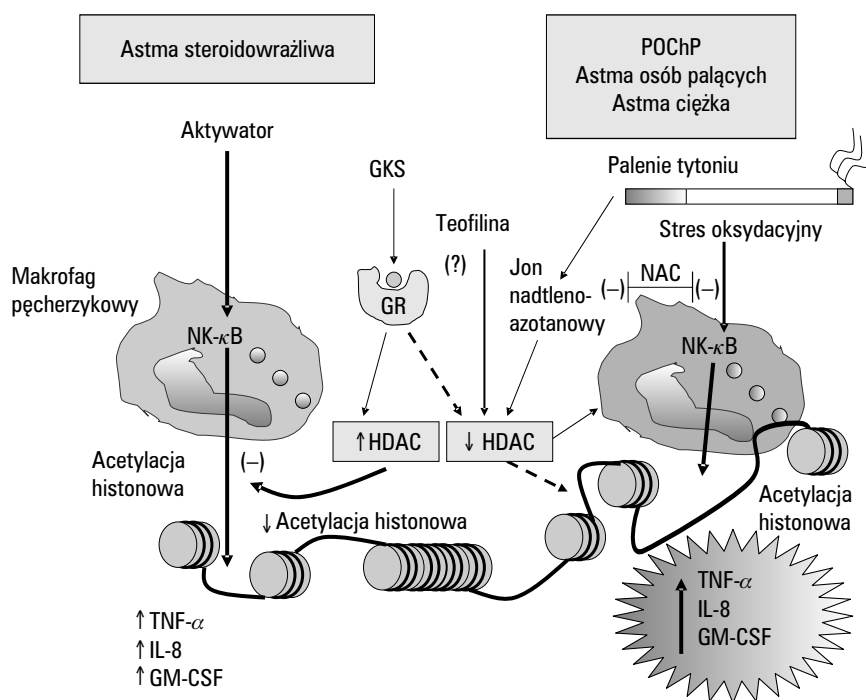
Podłożem POChP i ciężkiej astmy jest stres oksydacyjny, w którego przebiegu dochodzi do zahamowania HDAC, dlatego właściwie zastosowane antyoksydanty mogą mieć znaczenie w terapii obu jednostek chorobowych [63, 64]. N-acetylocysteina (NAC) jest pochodną N-acylową naturalnego kwasu L-cysteiny o bardzo silnych właściwościach mukolitycznych. Ulega szybkiemu wchłanianiu i charakteryzuje się krótkim okresem poło-

wicznej eliminacji [65, 66]. N-acetylocysteina jest szybko metabolizowana do cysteiny, która jest bezpośrednim prekursorem syntezy wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH, *glutathione*). Poprzez ten szlak NAC, działając jako antyoksydant, normalizuje stężenie GSH, które w wyniku toczącego się procesu zapalnego i towarzyszącego mu stresu oksydacyjnego jest obniżone [67–69]. N-acetylocysteina działa ponadto jako zmiatacz nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenu [70, 71] i przywraca równowagę proantyoksydacyjną, a także zachowuje aktywność wrażliwych na oksydację czynników, takich jak NF- κ B [72], p38, kinazy aktywowanej przez czynniki pozakomórkowe (ERK1, *extracellular regulated kinase 1*) oraz kinazy N-terminalu c-Jun (JNK, *c-Jun N-terminated kinase*) i innych [73, 74]. W badaniu na zdrowych ochotnikach otrzymujących 600 mg NAC na dobę wykazano czasowy wzrost stężenia GSH, natomiast u pacjentów z POChP stwierdzono, że tylko duże dawki NAC (3×600 mg/d.) powodują utrzymujące się podwyższone stężenie GSH [75]. Powyższe wyniki mogą sugerować, że stres oksydacyjny występujący w POChP zwiększa zapotrzebowanie na anty-

oksydanty, dlatego potrzebne są większe dawki NAC u tych pacjentów. Dostępne są publikacje, w których analizuje się badania z zastosowaniem NAC w dawkach terapeutycznych (400–1200 mg) u pacjentów z POChP i potwierdza zmniejszenie ryzyka zaostrzeń o 23% u chorych leczonych NAC ponad 3 miesiące w porównaniu z placebo [76]. Może to wskazywać na potrzebę rewizji dawki NAC w POChP.

Podsumowanie

W niniejszej pracy omówiono mechanizmy zachodzące na poziomie komórkowym i subkomórkowym u chorych na POChP (ryc. 1). Nowe, coraz szerzej stosowane metody biologii molekularnej umożliwiają odkrywanie niedostępnych do niedawna obszarów, szlaków sygnalizacji komórkowej na poziomie submolekularnym. Takimi są zmiany strukturalne chromatyny i sygnalizacja ekspresji genów prozapalnych w przebiegu choroby i leczenia zaobserwowane u chorych na POChP. Doniesienia przedstawione w pracy rzucają nowe światło na patogenezę i leczenie choroby,



Rycina 1. Proponowany mechanizm oporności steroidowej w przebiegu POChP. Pobudzenie makrofagów płucnych aktywuje NF- κ B i inne czynniki transkrypcyjne do uruchomienia acetylotransferazy histonowej, co prowadzi do acetylacji histonów, a następnie transkrypcji genów kodujących białka zapalne, to jest TNF- α i IL-8. Glikokortykosteroidy odwracają to poprzez wiązanie z GR i rekrutację HDAC2, co powoduje deacetylację histonów, wyłączając zaktywowane geny zapalne. U chorych na POChP dym tytoniowy aktywuje makrofagi, ale stres oksydacyjny (poprzez jon nadtlenu-azotanowy) upośledza aktywność HDAC2, co wzmacnia odpowiedź zapalną na aktywację NF- κ B. To z kolei osłabia przeciwzapalne działanie GKS, ponieważ HDAC2 nie jest zdolna do deacetylacji histonowej. Uwidoczniono ponadto potencjalne miejsca działania teofiliny i NAC [na podstawie 4–6, 14, 25, 27, 29, 31, 37, 39, 41–43, 45, 55, 57, 59–63]. Wyjaśnienie skrótów w tekście

Figure 1. Proposed mechanism of steroid resistance in COPD

uzasadniają zastosowanie takich leków, jak wziewne kortykosteroidy, antyoksydanty, a także wskazują nowe, nieznane do tej pory mechanizmy synergizmu pomiędzy lekami, stanowiąc wartościowy krok w kierunku przyczynowego leczenia POChP.

Piśmiennictwo

- Kozielski J., Chazan R., Gorecka D. i wsp. Diagnosis and therapy of chronic obstructive pulmonary disease—recommendations of the Polish Phthisiopneumology Society. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2002; 70 (supl. 2): 2–42.
- Gorecka D., Zielinski J. Early diagnosis and prevention of COPD in Poland; current status and perspectives. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2005; 73: 112–115.
- Vollmer W.M. Epidemiology of COPD: Overview and the US perspective. *Eur. Respir. J.* 2003; 22 (supl. 43): 1–44.
- Barnes P.J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharm. Rev.* 2004; 56: 515–548.
- Barnes P.J., Chung K.F., Page C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharm. Rev.* 1998; 50: 515–596.
- Hart L.A., Krishnan V.L., Adcock I.M., Barnes P.J., Chung K.F. Activation and localization of transcription factor κ B in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158: 1585–1592.
- Di Stefano A., Caramori G., Oates T. i wsp. Increased expression of NK- κ B in bronchial biopsies from smokers and patient with COPD. *Eur. Respir. J.* 2002; 20: 556–563.
- Muller-Ladner U., Gay R.E., Gay S. Role of nuclear factor κ B in synovial inflammation. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2002; 4: 201–207.
- Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349–352.
- Littau V.C., Burdick C.J., Allfrey V.G., Mirsky S.A. The role of histones in the maintenance of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1965; 54: 1204–1212.
- Ogryzko V.V., Schiltz R.L., Russanova V., Howard B.H., Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 1996; 87: 953–959.
- Urnov F.D., Wolffe A.P. Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). *Oncogene* 2001; 20: 2991–3006.
- Roth S.Y., Denu J.M., Allis C.D. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 2001; 70: 81–120.
- Ito K., Barnes P.J., Adcock I.M. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits IL-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20: 6891–6903.
- Ito K., Ito M., Elliott W.M. i wsp. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 1967–1976.
- Thiagalingam S., Cheng K.H., Lee H.J. i wsp. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 983: 84–100.
- Cohen H.Y., Miller C., Bitterman K.J. i wsp. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 305: 390–392.
- Buck S.W., Gallo C.M., Smith J.S. Diversity in the Sir2 family of protein deacetylases. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 939–950.
- Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S. i wsp. Modulation of NF- κ B dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004; 23: 2369–2380.
- Privalsky M.L. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Ann. Rev. Physiol.* 2004; 66: 315–360.
- Ashburner B.P., Westerheide S.D., Baldwin A.S., JR. The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell Biol.* 2001; 21: 7065–7077.
- Chen L., Fischle W., Verdin E., Greene W.C. Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science* 2001; 293: 1653–1657.
- Zhong H., May M.J., Jimi E., Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell.* 2002; 9: 625–636.
- Ito K., Ito M., Elliott W.M. i wsp. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 1967–1976.
- Ito K., Lim S., Caramori G., Chung K.F., Barnes P.J., Adcock I.M. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J.* 2001; 15: 1100–1102.
- Montuschi P., Collins J.V., Ciabattoni G. i wsp. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162: 1175–1177.
- Bowler R.P., Barnes P.J., Crapo J.D. The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *J. COPD.* 2004; 2: 255–277.
- Moodie F.M., Marwick J.A., Anderson C.S. i wsp. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF- κ B activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J.* 2004; 18: 1897–1899.
- Paredi P., Kharitonov S.A., Leak D., Ward S., Cramer D., Barnes P.J. Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162: 369–373.
- Montuschi P., Collins J.V., Ciabattoni G. i wsp. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162: 1175–1177.
- Biernacki W.A., Kharitonov S.A., Barnes P.J. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003; 58: 294–298.
- Rahman I., van Schadewijk A.A., Crowther A.J. i wsp. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166: 490–495.
- Higashimoto Y., Elliott W.M., Behzad A.R. i wsp. Inflammatory mediator mRNA expression by adenovirus E1A transfected bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166: 200–207.
- Retamales I., Elliott W.M., Meshi B. i wsp. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 469–473.
- Hogg J.C. Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: S71–S75.
- Fletcher C.M., Peto R., Tinker C.M., Spizer F.E. The Natural History of Chronic Bronchitis and Emphysema. Oxford University Press, 1976.
- Barnes P.J., Stockley R.A. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur. Respir. J.* 2005; 25: 1084–1106.
- Alsaeedi A., Sinn D.D., McAlister F.A. The effects of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: a systemic review of randomized placebo controlled trials. *Am. J. Med.* 2002; 113: 59–65.
- Keatings V.M., Jatakanon A., Worsdell Y.M., Barnes P.J. Effects of inhaled and oral glucocorticosteroids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 542–548.
- Hogg J.C. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl. J. Med.* 2004; 350: 2645–2653.
- Barnes P.J. Corticosteroids: The drugs to beat European Journal of Pharmacology 2006; 533: 2–14.
- Barnes P.J., Adcock I.M. Transcription factors and asthma. *Eur. Respir. J.* 1998; 12: 221–234.
- Barnes P.J., Karin M. Nuclear factor κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 1066–1071.
- Wu B., Li P., Liu Y. i wsp. 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101: 8348–8353.
- Hart L., Lim S., Adcock I., Barnes P.J., Chung K.F. Effects of inhaled corticosteroid therapy on expression and DNA-binding activity of nuclear factor- κ B in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 224–231.
- Pujols L., Mullol J., Roca-Ferrer J. i wsp. Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002; 283: C1324–C1331.
- Leung D.Y.M., Hamid Q., Votter A. i wsp. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor b. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1567–1574.

48. Bodwell J.E., Webster J.C., Jewell C.M., Cidkowski J.A., Hu J.M., Munck A. Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 1998; 65: 91–99.
49. Dostert A., Heinzel T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.* 2004; 10: 2807–2816.
50. Kurihara I., Shibata H., Suzuki T. i wsp. Expression and regulation of nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002; 189: 181–189.
51. Hall S.E., Lim S., Witherden I.R. i wsp. Lung type II cell and macrophage annexin I release: differential effects of two glucocorticoids. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: L114–L121.
52. Heck S., Bender K., Kullmann M., Gottlicher M., Herrlich P., Cato A.C. I κ B alpha-independent downregulation of NF- κ B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO. J.* 1997; 16: 4698–4707.
53. Mittelstadt P.R., Ashwell J.D. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 29603–29610.
54. Lasa M., Abraham S.M., Boucheron C., Saklatvala J., Clark A.R. Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22: 7802–7811.
55. Barnes P.J., Adcock I.M., Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur. Respir. J.* 2005; 25: 552–563.
56. Reichardt H.M., Tuckermann J.P., Gottlicher M. i wsp. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 2001; 20: 7168–7173.
57. Barnes P.J. Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 813–818.
58. Ito K., Lim S., Caramori G. i wsp. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 8921–8926.
59. Cosio B.G., Tsaprouni L., Ito K., Jazrawi E., Adcock I.M., Barnes P.J. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 689–695.
60. Culpitt S., Maziak W., Loukides S., Keller A., Barnes P.J. Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices in COPD patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 157: A797.
61. Barnes P.J. Targeting histone deacetylase 2 in chronic obstructive pulmonary disease treatment. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2005; 9: 1111–1121.
62. Barnes P.J. The role of theophylline in severe asthma. *Eur. Respir. Rev.* 1996; 6: 154S–159S.
63. Bowler R.P., Barnes P.J., Crapo J.D. The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *J. COPD* 2004; 2: 255–277.
64. Rahman I., Marwick J., Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and proinflammatory gene expression. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 1255–1267.
65. Allegra L., Dal Sasso M., Bovio C., Massoni C., Fonti E., Braga P.C. Human neutrophil oxidative bursts and their in vitro modulation by different N-acetylcysteine concentrations. *Arzneimittelforschung* 2002; 52: 669–676.
66. De Caro L., Ghizzi A., Costa R., Longo A., Ventresca G.P., Lodola E. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 1989; 39: 382–386.
67. Santangelo F. Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 2599–610.
68. Rahman I., MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 1405–1420.
69. Grinberg L., Fibach E., Amer J., Atlas D. N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38: 136–145.
70. Benrahmoune M., Therond P., Abedinzadeh Z. The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29: 775–782.
71. Aruoma O.I., Halliwell B. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 6: 593–597.
72. Desaki M., Takizawa H., Kasama T., Kobayashi K., Morita Y., Yamamoto K. Nuclear factor- κ B activation in silica-induced interleukin 8 production by human bronchial epithelial cells. *Cytokine* 2000; 12: 1257–1260.
73. Wuyts W.A., Vanaudenaerde B.M., Dupont L.J., Demedts M.G., Verleden G.M. Involvement of p38 MAPK, JNK, p42/p44 ERK and NF- κ B in IL-1beta-induced chemokine release in human airway smooth muscle cells. *Respir. Med.* 2003; 97: 811–817.
74. Zafarullah M., Li W.Q., Sylvester J., Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60: 6–20.
75. Bridgeman M.M., Marsden M., Selby C., Morrison D., MacNee W. Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue. *Thorax* 1994; 49: 670–675.
76. Grandjean E.M., Berthet P., Ruffmann R., Leuenberger P. Efficacy of oral long-term N-acetylcysteine in chronic bronchopulmonary disease: a meta-analysis of published double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Clin. Ther.* 2000; 22: 209–221.