

Piotr Kopiński¹, Joanna Chorostowska-Wynimko², Andrzej Dyczek³, Agata Giżycka¹

¹Katedra Genoterapii Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz
p.o. kierownika: dr n. med. P. Kopiński

²Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Chorostowska-Wynimko

³Ośrodek Chorób Immunologicznych i Środowiskowych, II Katedra Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Musiał

Apoptoza limfocytów pęcherzykowych. Część 1 — szlaki apoptozy limfocytów

Apoptosis of alveolar lymphocytes. Part 1: pathways of lymphocyte apoptosis

Praca nie była finansowana

Abstract

Apoptosis is a form of programmed cell death essential for maintaining homeostasis, including onset, progress and resolution of immune reactions. Two major apoptosis pathways: extrinsic (mediated by death receptors) and intrinsic (mitochondrial), were distinguished. Lymphocytes with cytotoxic activity may also initiate apoptosis of target cells by granzyme/perforin (pseudoreceptor) pathway. The specific apoptotic processes, i.e. activation induced cell death (AICD) and neglect induced death (NID), are types of extrinsic and intrinsic pathways, respectively. They both seem to be crucial in apoptosis of antigen-primed T cells during the contraction phase of inflammation. Alveolar lymphocytes (AL) are almost exclusively T effector cells, engaged in interstitial lung disease (ILD) pathophysiology. The AL numbers in lower airways depends on recruitment to the lung, proliferation and local apoptosis. According to the references, it should be noted that AL usually do not proliferate in alveoli; their apoptosis rate accounts, on average, for 1% of cells in healthy subjects, and this is significantly decreased in disorders with lymphocytic alveolitis such as sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis (EAA). The mechanisms of AL apoptosis have not been completely explained. However, it is the NID process that is probably critical for the culling of T-cell response, as in EAA or sarcoidosis remission, with AICD as an auxiliary and/or modulating mechanism only. It should be emphasised that many ILDs are chronic disorders with no remission or improvement, and it is difficult to describe the AL response in terms of immune expansion/contraction.

Key words: apoptosis, BCL2 family, death receptors, extrinsic pathway, interstitial lung diseases, intrinsic pathway, lymphocytes
Pneumonol. Alergol. Pol. 2014; 82: 170–182

Streszczenie

Apoptoza jest postacią zaprogramowanej śmierci, zasadniczą w utrzymaniu homeostazy ustrojowej, w tym zapoczątkowania, rozwoju i zejścia reakcji odpornościowych. Wyróżniono dwa główne szlaki apoptozy, zewnątrzpochodny (z pośrednictwem receptorów śmierci) i wewnątrzpochodny (mitochondrialny). Dodatkowo limfocyty o czynności cytotoksycznej inicjują apoptozę komórek docelowych na szlaku granzymów/perforiny (pseudoreceptorowym). Swoiste procesy apoptotyczne, tj. śmierć komórkowa wzbudzona aktywacją (AICD) i śmierć z zaniechania (NID) są odmianami odpowiednio: szlaku zewnątrz- i wewnątrzpochodnego. Obydwa wydają się pełnić kluczową rolę w apoptozie uczulonych antygenowo komórek T w fazie kontrakcji odczynu zapalnego. Limfocyty pęcherzykowe (AL) są prawie wyłącznie efektorowymi komórkami T, uczestniczącymi w patofizjologii śródmiąższowych chorób płuc (ILD). Liczba AL w dolnych drogach oddechowych zależy od rekrutacji do płuc, proliferacji i miejscowej apoptozy. Zgodnie z piśmiennictwem należy zaznaczyć, że AL zwykle nie proliferują w pęcherzykach płucnych, częstość ich apoptozy wynosi około 1% komórek u osób zdrowych i jest ono znacznie obniżone w chorobach z limfocytowym zapaleniem pęcherzyków, jak sarkoidoza i zewnątrzpochodne alergiczne zapalenie pęcherzyków (EAA). Mechanizmy apoptozy AL nie zostały

Adres do korespondencji: dr n. med. Piotr Kopiński, Katedra Genoterapii CM UMK, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85–094 Bydgoszcz, tel.: 52 585 35 70; faks: 52 585 34 88,
e-mail: mpkopins@hotmail.com
DOI: 10.5603/PiAP.2014.0023
Praca wpłynęła do Redakcji: 8.05.2013 r.
Copyright © 2014 PTChP
ISSN 0867–7077

całkowicie wyjaśnione. Prawdopodobnie zasadnicze znaczenie w wygaszaniu odpowiedzi ze strony komórek T, jak w remisji w EAA lub sarkoidozie, pełni jednak proces NID, podczas gdy mechanizm AICD ma znaczenie pomocnicze i/lub modulujące. Wypada podkreślić, że wiele chorób grupy ILD ma charakter przewlekły bez remisji lub poprawy klinicznej i opisanie ich w kategoriach ekspansji/kontrakcji odpowiedzi immunologicznej napotyka na trudności.

Słowa kluczowe: apoptoza, limfocyty, receptory śmierci, rodzina BCL2, szlak wewnątrzpochodny szlak zewnątrzpochodny, śródmiąższowe choroby płuc

Pneumonol. Alergol. Pol. 2014; 82: 170–182

Wstęp

Swoiste uczulenie antygenowe limfocytów T prowadzi, wraz z wachlarzem czynników kostymulujących, do ich aktywacji i proliferacji. Powstają klony komórek efektorowych T, a ze względu na gwałtowny wzrost ich całkowitej liczby, opisywana tu faza odpowiedzi immunologicznej, w odniesieniu do ostrych infekcji, nosi nazwę ekspansji. W miarę jak zagrożenie zostaje opanowane, pojawia się konieczność eliminowania niepotrzebnych już limfocytów. Rozwija się tak zwana kontrakcja, która — pomijając zjawisko powstania populacji komórek pamięci — ma na celu powrót układu immunologicznego do stanu wyjściowej homeostazy [1].

Przeważająca większość efektorowych komórek T ginie w fizjologicznym procesie zwanym apoptozą. Do dzisiaj jednak nie ustalono, który z dwóch zasadniczych, opisanych niżej szlaków apoptozy — receptorowy czy mitochondrialny — reguluje liczbę limfocytów w fazie kontrakcji. Egzemplifikacją pierwszego z nich — w odniesieniu do komórek T — jest zjawisko AICD (*activation induced cell death*), drugiego zaś — proces NID (*neglect induced death*) [2]. Pojęcia te rozwinięto niżej. Tym bardziej nie jest jasne, jakie są rozmiary i mechanizmy zjawiska apoptozy AL, uczestniczących w patofizjologii ILD [3].

Podstawowe pojęcia, fazy i cechy apoptozy

Pojęcie apoptozy wprowadzili do biologii medycznej jako pierwsi Kerr, Wyllie i Currie w roku 1972 [4]. Nazwę zapożyczono z literatury antycznej, słowo *ἀπόπτωση* określało w starożytnej grece opadanie suchych liści i płatków kwiatowych, co według autorów historycznej publikacji najwierniej opisuje tę drogę obumierania komórek.

Apoptozę definiuje się jako powszechnie obecną, odrębną formę śmierci komórki, obligatoryjnie stanowiącą ekspresję zapisów kodu genetycznego. Zapisy działają także, gdy śmierć jest wywołana przez komórki sąsiednie, jak limfocyty cytotoksyczne (Tc). Równolegle stosuje się pojęcie: „zaprogramowana śmierć komórki” (PCD,

programmed cell death). Należy jednak pamiętać, że w myśl nowszych klasyfikacji postuluje się kilka typowych odmian śmierci komórkowej (apoptoza, autofagia, kornifikacja i martwica) oraz wiele nietypowych. Udział kontrolnych mechanizmów genetycznych, udowodniono w autofagii i nekroptozie, a zatem spełniają one kryterium PCD. Często nie udaje się jednoznacznie odróżnić apoptozy od zbliżonych form PCD. Dlatego klasyczną, pierwotnie opisaną, zaprogramowaną śmierć komórki definiuje się niekiedy jako tak zwaną apoptozę kanoniczną (*canonical apoptosis*) [5, 6].

W niczym nie umniejsza to rangi odkrycia Kerra i wsp., którzy jak w przypadku wielu odkryć i nowych idei medycyny, zebrali przesłanki i fragmentaryczne dane oraz zaproponowali nowe syntetyczne pojęcie porządkujące ówczesny stan wiedzy.

Apoptoza jest dziś uznanym zjawiskiem biologicznym [7]. Poglądowo dzieli się jej przyczyny na czynniki endo- i egzogenne. Do pierwszych należy niedobór czynników wzrostu, pobudzenie komórkowych receptorów błonowych (tzw. receptorów śmierci, *death receptors* [DRs]) przez ich swoiste ligandy, działanie cytokin (jak TNF- α [*tumor necrosis factor alfa*], IFN- γ [*interferone gamma*], IL-1 [*interleukin*] i IL-6) oraz hormonów (znaczenie ma ich stężenie i aktualna wrażliwość tkanek docelowych), a także toksyczne działanie reaktywnych form tlenu i azotu [8]. Przykłady bodźców egzogennych obejmują zakażenia bakteryjne, wirusy, hipertermię, promieniowanie jonizujące i onkologiczną terapię cytostatykami [9].

Wachlarz bodźców i warunków uruchamiających apoptozę jest szeroki, a rozmaite komórki są w różnym stopniu wrażliwe na ten proces. W zależności od typu i stanu wyjściowego te same bodźce determinują w komórce odmienny efekt biologiczny. Na przykład znaczenie kliniczne radio- i chemioterapii onkologicznej polega na masywnym uszkodzeniu DNA i w konsekwencji na śmierci tylko części eksponowanych komórek (tj. nowotworowych — niedojrzałych czynnościowo, z wysokim indeksem mitotycznym) [10]. Kortyzol powoduje apoptozę tymocytów i eozynofików, a także limfocytów dróg odde-

chowych, ale w przebiegu erytropoezy stanowi ważny czynnik przeżycia. Część komórek ginie wskutek przyłączenia ligandów śmierci do ich powierzchniowych receptorów, DRs. Inne dysponują „domyślnym” spontanicznym szlakiem samobójczej śmierci: przyłączenie odpowiednich ligandów (hormonów, cytokin, czynników wzrostu) hamuje apoptozę i umożliwia komórce dalsze życie. Gdy czynników przeżycia brak lub spada ich biologiczna dostępność, ten mechanizm śmierci zachodzi samorzutnie. Jest to właśnie istota zjawiska NID (śmierci z zaniechania) [8].

Ze względu na ograniczone rozmiary niniejszej pracy opis zjawisk morfologicznych i biochemicznych procesu podano w skrócie. Cechami kanonicznej apoptozy są: 1) „celowa” aktywacja kaspaz, niżej opisanych enzymów z grupy proteaz cysteinowych oraz 2) charakterystyczna kondensacja materiału jądrowego [4]. Apoptoza przebiega w serii mechanizmów zależnych od racjonalnego zużycia energii przez komórkę, jak w przypadku każdego innego procesu biochemicznego sterowanego przez genom. Tym samym, w przeciwieństwie do typowej martwicy, apoptoza jest serią reakcji chemicznych zależną od dostawy ATP.

W jej przebiegu wyróżnia się trzy charakterystyczne fazy:

- indukcja — czas między ekspozycją na czynnik wyzwalający, a pierwszą uchwytną morfologicznie zmianą w komórce;
- egzekucja (faza wykonawcza) — aktywacja programu śmierci;
- degradacja — fagocytoza komórki lub ciałek apoptotycznych [8].

Proces jest odwracalny do końca fazy indukcji. Potem (samo)zagłada komórki jest bezpowrotna. Przyjmuje się, że mechanizm spustowy uruchamia się wraz z aktywacją kaspazy-3 [10].

W mikroskopie świetlnym, we wczesnej fazie procesu, komórki obkurczają się (*shrinkage*), a chromatyna podlega kondensacji, czyli kariopyknozie [11]. Wraz z obkurczaniem, komórki zmniejszają się, cytoplazma zagęszcza, a organelle grupują się na niewielkiej przestrzeni i podlegają ścisłemu upakowaniu. Komórki apoptotyczne w barwieniu hematoksyliną/eozyną wyglądają jak okrągłe lub owalne masy z ciemną kwasochłoną cytoplazmą i zagęszczoną chromatyną jądrową, niekiedy już z cechami fragmentacji. Tej fazie apoptozy odpowiada w mikroskopii elektronowej gęsta, kondensująca chromatyna, agregująca na obwodzie tuż pod błoną jądrową. Zdarzają się też jądra jednolicie gęste [12].

W miarę kondensacji cytoplazmy, pojawiają się uwypuklenia błony komórkowej (*blebbing*).

Równolegle zachodzą dalsze zmiany jądra komórkowego — karioreksja (fragmentacja materiału jądrowego w cytoplazmie po fazie pyknozy). Wreszcie, oddzielają się całe fragmenty komórek. W procesie tym, zwanym pączkowaniem (*budding*), dochodzi do oddzielania się ciałek apoptotycznych od umierającej komórki. Ciałka zawierają fragmenty cytoplazmy otoczone błoną komórkową z ciasno upakowanymi w środku organellami. Część ciałek zawiera fragmenty materiału jądrowego. W stadium tym wciąż zachowana jest integralność organelli, pokrytych nietkniętą błoną komórkową [8].

Podręcznikową cechą apoptozy jest niewystępowanie odczynu zapalnego w sąsiedztwie umierających komórek, gdyż: 1) apoptotyczne komórki nie uwalniają swej zawartości do otoczenia; 2) fagocyty (makrofagi, histiocyty, komórki śródmiąższu) działają szybko, zapobiegając wtórnej martwicy; 3) komórki fagocytytujące materiał apoptotyczny z reguły nie wydzielają cytokin prozapalnych [13, 14].

Chociaż od części umierających komórek oddzielają się ciałka apoptotyczne, jej główna część fagocytowana jest zwykle osobno. Niekiedy komórka rozpada się na wiele porównywalnej wielkości ciałek apoptotycznych, które również ulegają fagocytozie. Makrofagi trawiące komórki apoptotyczne (np. w odczynowych centrach rozrodczych grudek chłonnych) znane są w terminologii angielskojęzycznej jako *tingible body macrophages* (w wolnym tłumaczeniu „makrofagi z ciałkami podatnymi na barwienie”). Zawierają one szczątki materiału jądrowego sfagocytowanych komórek [15]. Natomiast w płynie z płukania oskrzelowego-pęcherzykowego (BAL, *bronchoalveolar lavage*) komórek takich nie spostrzega się. O ile bowiem nie udaje się odszukać całych sfagocytowanych komórek i dużych ciałek apoptotycznych w cytoplazmie makrofagów pęcherzykowych, to resztki materiału komórkowego gubią się wśród bogactwa innych elementów morfotycznych (ziaren pyłu organicznego i nieorganicznego, drobnoustrojów, białek surfaktantu, zanieczyszczeń wdychanego powietrza itp.) obecnych w cytoplazmie fagocytów [16].

Zespół reakcji biochemicznych i zdarzeń molekularnych, odpowiedzialnych za opisane tu zmiany morfologiczne obejmują degradację białek, powstanie przerw nici DNA i rozpoznanie komórki przez fagocyty [10]. Kluczowymi mediatorami są enzymy proteolityczne grupy kaspaz. W komórce są one zwykle obecne w nieaktywnej postaci proenzymu (zymogenu). Po aktywacji, ich naturalnym celem metabolicznym stają się inne

prokaspazy. Niektóre z nich agregują, podlegają wówczas autoaktywacji. Jak w wielu układach biologicznych zachodzi typowa amplifikacja sygnału — kaspaza wyższego rzędu aktywuje liczne cząsteczki rzędu niższego. Rozwija się kaskada enzymatyczna prowadząca do śmierci komórki [10].

Kaspazy przecinają białka substratowe w miejscu reszty kwasu asparaginowego. Poszczególne enzymy rodziny posiadają odmienne substraty (rozpoznają różne reszty aminokwasów, sąsiadujące z kwasem asparaginowym). Zidentyfikowane dotąd kaspazy przypisano do następujących podgrup:

- 1) inicjatorowych (kaspaza-2, -8, -9, -10);
- 2) wykonawczych (efektorowych, czyli egzekutorowych: kaspaza-3, -6, -7);
- 3) zapalnych (kaspaza-1, -4, -5), a więc formalnie nie uczestniczących w samej apoptozie [17–20].

Zasadnicze szlaki apoptozy

W złożonej sieci poznanych dotąd zdarzeń molekularnych wyodrębniono dwie podstawowe drogi, którymi rozpoczyna się i rozwija proces apoptozy: 1) zewnątrzpochodną, zależną od receptorów śmierci i 2) wewnątrzpochodną, czyli mitochondrialną. Oba szlaki są wzajemnie połączone, a cząsteczki należące do jednego z nich wpływają na przebieg drugiego [21]. Istnieje też dodatkowa droga (szlak perforyny/granzymów), w której limfocyty cytotoksyczne T (Tc) zabijają komórki docelowe, posługując się perforyną i zestawem proteaz serynowych, znanych jako granzymy. Jest to *de facto* odmiana szlaku receptorowego (tzw. szlak pseudoreceptorowy); zaprogramowaną śmierć komórki indukuje ostatecznie granzym B (GZMB) i granzym A (GZMA) [22].

Szlaki: zewnątrz-, wewnątrzpochodny i zależny od GZMB, zbiegają się we wspólnej fazie wykonawczej apoptozy, w miejscu aktywacji kaspazy-3. GZMA inicjuje apoptozę z ominięciem kaspazy-3 [23].

Szlak zewnątrzpochodny (receptorowy)

Droga zewnątrzpochodna rozpoczyna się przyłączeniem swoistych ligandów do przembronowych „receptorów śmierci”, obecnych na powierzchni komórki docelowej. Ligandy te z reguły należą do nadrodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF). Najbardziej znane to Ligand FAS (FASL, CD178, CD95L, Apo-1L), TRAIL (APO-, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), APO-3L, CD40L, naczyniowo-śródbłonkowy

inhibitor wzrostu (VEGI, *vascular endothelial growth inhibitor*) i sam TNF- α [24]. Ligandy obecne są albo na komórce efektorowej (związane z błoną, *membrane-bound*), albo występują w otoczeniu w postaci rozpuszczalnej (sFasL, *soluble FAS Ligand*). Przyjmuje się, że ligandy receptorów śmierci aktywnie działają w postaci błonowej, np. na powierzchni komórek NK, Tc lub makrofagów, a słabo jako mediatory rozpuszczalne [25, 26].

Receptory śmierci należą z kolei do nadrodziny receptora TNF. W części cytoplazmatycznej posiadają charakterystyczne domeny śmierci (DD, *death domains*) [27]. Ścisłej, w bezpośredniej regulacji apoptozy w cząsteczkach tych białek uczestniczy nadrodzina DD, obejmująca: 1) domeny efektorów śmierci (DED, *death effector domains*), 2) domeny rekrutacji kaspaz (CARD, *caspase recruitment domains*) i 3) właściwe domeny śmierci. Te ostatnie pełnią rolę zasadniczą w przewodzeniu sygnału apoptozy z powierzchniowych receptorów do wnętrza komórki [28].

Poznano dotąd ponad 30 receptorów nadrodziny TNFR, między innymi: TNFR1, CD40, FAS (Apo-1) oraz receptory 1 i 2 dla TRAIL: TRAIL-R1 (DR5) i TRAIL-R2 (DR4). Ponadto na błonie komórkowej obecne mogą być receptory „pułapkowe” (*decoy receptors*), DcR1 (TRAIL-R3) i DcR2 (TRAIL-R4). Nie indukują one apoptozy, lecz chronią przed nią komórki, rywalizując o ligand z właściwymi receptorami śmierci [8].

Dokładniej scharakteryzowano parę „ligand/receptor śmierci” w odniesieniu do układów: FASL/FAS, TNF- α /TNFR1, VEGI/DR3, TRAIL/DR4 i TRAIL/DR5 [27]. Za najważniejszą uważa się pierwszą z wymienionych par. Na przykład w pęcherzykach płucnych praktycznie wszystkie limfocyty i makrofagi wykazują powierzchniową ekspresję cząsteczek FAS [29].

Efekt biologiczny wywołany przyłączeniem ligandu do receptora śmierci jest szczególnie silny, gdy ligand przyjmuje postać homologicznego trimery, co prowadzi z kolei do łączenia się receptorów w trzycząsteczkowe zespoły. Zachodzi rekrutacja cytoplazmatycznych białek adaptorowych, dysponujących własnymi domenami śmierci. Przyłączają się one do homologicznych motywów domen DD receptorów. Wiązanie trimery ligandu FAS do receptora śmierci FAS (a także TRAIL do jego receptorów), powoduje przyłączenie białka adaptorowego FADD (*Fas-associated death domain protein*). Połączenie TNF- α /TNFR1 skutkuje rekrutacją cząsteczki adaptorowej TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*); następnie przyłącza się między

innymi białko FADD [29, 30]. Następuje dimeryzacja domeny DED cząsteczki FADD i interakcja tej ostatniej z prokaspazą-8 (i -10) — powstaje zespół białek znany jako DISC (*death-inducing signaling complex*). Jego główna rola polega na autokatalizie i aktywacji kaspazy-8 [28].

Aktywna kaspaza-8 uruchamia program wykonawczy apoptozy, gdyż uczynnia kaspazę-3. Przeciwnie działającym, nieaktywnym homologiem kaspazy-8 jest białko cFLIP. Konkuruje ono o wiązanie FADD z kaspazą-8, hamując szlak zewnętrzny [31].

W odniesieniu do limfocytów T zaobserwowano przed laty, że ich uczulenie antygenowe i związana z tym aktywacja komórek, wybitnie uwrażliwia je na proces apoptozy [32]. Kluczowe jest tu przyłączenie do antygeny (w restrikcji cząsteczki MHC) swoistego receptora TCR. Z jednej strony jest to dla uczulonego limfocyta silny bodziec przeżycia, z drugiej, paradoksalnie — narzędzie uwrażliwienia na apoptozę. Według klasycznych badań doświadczalnych, śmierć aktywowanego limfocyta jest skutkiem komplementacji pary ligand FAS: receptor FAS (FASL/FAS) [33]. Stąd pochodzi nazwa procesu — „śmierć komórkowa wzbudzona aktywacją” (AICD).

Szlak wewnętrzny (mitochondrialny)

Różnorodne czynniki niereceptorowe poprzez mitochondria inicjują wewnętrzny szlak apoptozy, jako tak zwane bodźce negatywne lub pozytywne. Do pierwszych należy deprivacja czynników wzrostu/cytokin (mechanizm NID), do drugich — między innymi promieniowanie, toksyny, hipoksja, hipertermia, wolne rodniki i infekcje wirusowe [34]. Kluczowym zdarzeniem inicjującym jest tu dezintegracja mitochondriów. W ich zewnętrznych i wewnętrznych błonach znajdują się zamknięte kanały mitochondrialne MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*). Ich otwarcie prowadzi do obniżenia potencjału przezbłonowego $\Delta\Psi_M$ mitochondriów (depolaryzacji błon), wypływu GSH i jonów Ca^{2+} z mitochondriów do cytoplazmy oraz spadku wewnątrzkomórkowego pH. Do cytozolu przedostają się silne czynniki proapoptotyczne sekwestrowane wcześniej w mitochondriach [35]. Stan czynnościowy (poziom zamknięcia lub otwarcia) kanałów MPTP jest kontrolowany przez białka rodziny BCL-2. Te z nich, które odpowiadają za zamknięcie kanałów (uszczelnienie błon mitochondriów) pełnią w komórce funkcje antyapoptotyczne. Natomiast proapoptotycznie działają białka rozszczelniające błonę organelli, które otwierają te kanały [10].

Stymulatory szlaku wewnątrzpochoźnego działają bezpośrednio, powodując zmiany wewnętrznej błony mitochondriów lub pośrednio, uszkadzając DNA. Klasycznym przykładem pośredniego działania na mitochondria jest wczesna reakcja obronna, wywołana mutacjami genomu wskutek działania promieniowania jonizującego. Rozpoczyna się ona aktywacją kinazy ATM i innych białek sygnalizujących uszkodzenie DNA. Kinazy fosforylują i aktywują znany czynnik transkrypcyjny P53, kluczowy supresor onkogenezy i białko kontrolujące punkty restrykcyjne cyklu komórkowego (G1/S i G2/M). Naprawie podlegają niewielkie uszkodzenia. Poważniejsze z nich, w mechanizmie przewlekłego wzbudzenia układu ATM/P53, prowadzą do apoptozy. Białko P53 reguluje między innymi ekspresję czynników rodziny BCL-2, w pierwszym rzędzie inicjując czynność proapoptotycznych genów BAX i PUMA [36].

Po otwarciu kanałów MPTP, mitochondria uwalniają dwie główne grupy białek proapoptotycznych. Pierwsza obejmuje cytochrom C (APAF-2) pochodzący z błony wewnętrznej mitochondriów, czynnik SMAC/DIABLO i proteazę serynową HTRA2/OMI [37]. Białka te aktywują szlak apoptozy zależny od kaspaz. Cytochrom C wiąże i aktywuje monomeryczną formę cytoplazmatycznego białka adaptorowego APAF-1, które przy udziale ATP zmienia konformację, oligomeryzuje i wiąże prokaspazę-9. Powstaje wielocząsteczkowy kompleks znany jako apoptosom, w obrębie którego zachodzi dimeryzacja prokaspazy-9 i powstanie aktywnej formy kaspazy-9 [38].

Białka SMAC/DIABLO i HTRA2/OMI torują drogę zaprogramowanej śmierci, hamując czynność białek IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*), silnie działających, konstytutywnych inhibitorów apoptozy [39]. Białko SMAC dodatkowo stabilizuje aktywne postaci kaspaz [10].

Druga grupa uwalnianych z mitochondriów stymulatorów zaprogramowanej śmierci, to białka AIF, endonukleaza G i CAD (*caspase-activated DNA-se*). Ich działanie pojawia się później, zwykle po przejściu komórki przez punkt krytyczny, poza którym nieodwracalnie skazana jest na śmierć. AIF przemieszcza się do jądra i wywołuje fragmentację DNA do odcinków zawierających 50–300 par zasad. Odpowiada za obwodową kondensację chromatyny jądrowej, której morfologicznie odpowiada wczesna faza kondensacji jądrowego DNA [40]. Wspomaga ją endonukleaza G. Oba czynniki działają niezależnie od kaspaz [41].

Czynniki rodziny BCL-2 w przebiegu szlaku wewnątrzpochodnego

Zdarzenia molekularne szlaku mitochondrialnego apoptozy, znajdują się pod kontrolą wspomnianych wyżej białek rodziny BCL-2. Zidentyfikowano dotąd około 25 genów tej rodziny. Najbardziej znany jest gen samego BCL-2, odkryty w miejscu translokacji chromosomowej t(14;18) blastów chłoniaka *B cell lymphoma* (BCL) [42]. Kolejne białka rodziny opisano na podstawie homologii z czterema charakterystycznymi domenami α -helix czynnika BCL-2, tak zwanymi domenami homologii BH, ponumerowanymi od 1 do 4. Domeny BH odpowiadają za zdolność białek rodziny do wzajemnej homologicznej i heterologicznej di- oraz oligomeryzacji [8]. Wyróżniono trzy klasy (podrodziny) białek rodziny BCL-2:

Klasa I (właściwa podrodzina BCL-2; BH1234), obejmuje wyłącznie białka antyapoptotyczne. Zlokalizowane są one w zewnętrznej błonie mitochondrium; koniec N znajduje się po stronie cytoplazmy. Możliwe, że BCL-2 i BCL-xL mogą w dodatkowym mechanizmie blokować wprost apoptozę, hamując aktywność kaspaz [32, 43].

Klasa II (podrodzina BAX, BH123). Obejmuje czynniki BAX, BAK i BOK, które działają proapoptotycznie, blokując działanie białek antyapoptotycznych klasy I [44].

Klasa III (podrodzina *BH3-only*, BH3). Wspólną cechą jest obecność tylko jednej domeny homologii, BH3. Białka rodziny oddziałują z czynnikami klasy I i II, modyfikując ich aktywność. Działają z reguły proapoptotycznie [45, 46]. Typowymi przedstawicielami są: BAD, BID, BIM, PUMA i NOXA, w limfocytach także NIX i BNIP3 [21].

Przyjmuje się, że białka klasy III działają pośrednio, umożliwiając czynnikom BAX i BAK, wskutek interakcji z ich naturalnymi antagonistami, czyli białkami BCL-2 i BCL-xL, bezpośrednie otwarcie kanałów MPTP. Drogę mitochondrialną można zablokować hamując czynniki BAX i BAK. Białko BAX zlokalizowane jest w cytozolu, zaś BAK w mitochondrium. Nie jest jasne, na czym polegają różnice w ich czynności, gdyż dysfunkcję jednego z białek pary skutecznie kompensuje drugie białko [1].

Czynniki klasy III różnią się pomiędzy sobą swymi specyficznymi funkcjami. Przekazują one do czynników podrodzin BCL-2 i BAX pobudzenia z innych dróg i układów (ryc. 1), pełniąc nadrzędną rolę regulacyjną. Białko BAD aktywowane jest przez defosforylację swych reszt serynowych. Czynniki wzrostu, na przykład

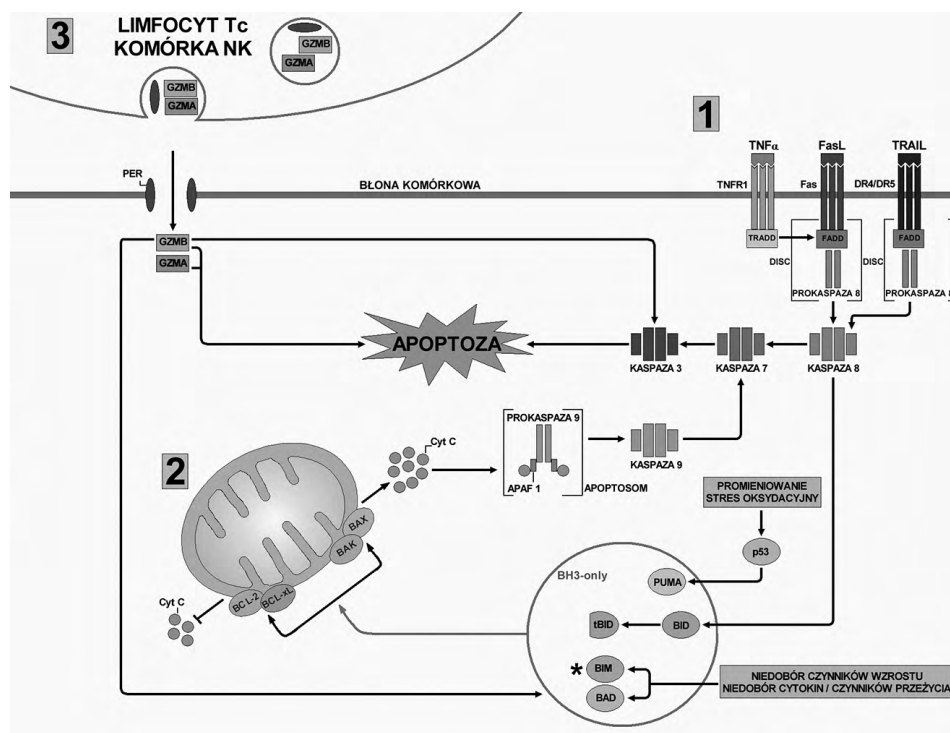
IGF-I, hamują apoptozę właśnie poprzez BAD, gdyż indukują szlak przeżycia kinaz PI3K/AKT, zaś kinaza AKT utrzymuje białko BAD w postaci ufosforylowanej (nieaktywnej), hamując mechanizm NID [47]. Czynniki PUMA i NOXA uczestniczą w indukcji apoptozy zależnej od aktywnej postaci P53 (stąd nazwa czynnika PUMA: *p53 up-regulated modulator of apoptosis*), a więc zwykle po uszkodzeniu genomu przez mutageny lub po aktywacji onkogenów [48]. Czynniki BID pełni tu rolę wyjątkową, gdyż integruje szlak zewnętrzny i wewnętrzny apoptozy: kaspaza-8 katalizuje BID do aktywnego czynnika apoptozy tBID (kadłubowy BID [truncated BID]). Białko BIM wydaje się stanowić kluczowy mediator apoptozy limfocytów T i ważny czynnik homeostazy tych komórek. Prawdopodobnie to BIM jest głównym czynnikiem proapoptotycznym, uczestniczącym w apoptozie obwodowych komórek T, czyli także limfocytów pęcherzykowych w przebiegu odczynów zapalnych dolnych dróg oddechowych. Głównym czynnikiem przeżycia tych komórek jest prawdopodobnie IL-2, która w kilku mechanizmach hamuje ekspresję aktywnej cząsteczki BIM. Jej brak może więc wywołać NID [1].

Na poziomie molekularnym działanie czynników proapoptotycznych wyjaśniają dwa uzupełniające się modele. Według pierwszego z nich białka *BH3-only* odciągają cząsteczki BCL-2 od molekuł BAX/BAK, te zaś tworzą homologiczne oligomery, otwierając kanały MPTP. Według drugiego, niektóre cząsteczki *BH3-only* bezpośrednio oddziałują na BAX i BAK. BAD i NOXA reagują z białkami podrodziny BCL-2, zaś bezpośrednimi aktywatorami BAX/BAK są pozostałe czynniki klasy *BH3-only* (z wyjątkiem tBID). W apoptozie limfocytów mogą uczestniczyć oba te procesy [1, 45].

Szlak perforyny/granzymów (pseudoreceptorowy)

Komórki, na powierzchni których pojawiają się obce antygeny, są zabijane przez uczulone antygenowo swoiste limfocyty CD8, inaczej cytotoksyczne komórki T. Są one zdolne niszczyć cele komórkowe, aktywując drogę receptorową FASL/FAS [49]. Apoptoza zachodzi skuteczniej, jeśli dodatkowo zadziała wspomniany wyżej szlak pseudoreceptorowy. Kanały w błonie komórki docelowej tworzy perforyna, następnie do wnętrza komórki wydzielane są ziarna cytoplazmatyczne zawierające granzymy [22].

Granzym B uruchamia apoptozę plejotropowo. Skuteczne zabicie komórki wymaga prawdopodobnie równoczesnego uruchomienia kilku mechanizmów. Zasadniczy (nie zależy od ka-



Rycina 1. Szlaki inicjatorowe apoptozy. 1. Szlak zewnętrzny. Uruchamia go przyłączenie do receptorów śmierci (TNFR1, FAS, DR4/DR5) ich ligandów (TNF- α , FASL, TRAIL). Do domen śmierci receptorów przyłączają się białka adaptorowe (FADD, TRADD), a następnie kaspaza-8; powstaje kompleks inicjatorowy (znany jako DISC, miejsce aktywacji kaspazy-8). 2. Szlak wewnętrzny. Dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy białkami podrodziny BCL-2 (działają antyapoptotycznie uszczelniając błony mitochondriów) a białkami podrodziny BAX (zwiększają przepuszczalność błon). Równowaga ta znajduje się pod kontrolą proapoptycznych białek podrodziny BH3-only, za pomocą których odgórne czynniki aktywujące mogą indukować szlak mitochondrialny. Uwolnione z mitochondriów czynniki APAF-1 i cytochrom C prowadzą do powstania apoptosomu, w obrębie którego zachodzi aktywacja kaspazy-9. 3. Szlak pseudoreceptorowy. Limfocyty cytotoksyczne lub NK, przy użyciu perforyny (PER), tworzą w błonie atakowanej komórki kanały, przez które do wnętrza przedostają się granzymy A i B. Granzymy działają częściowo w drodze niezależnej od kaspazy-3. Szlak zewnętrzny, wewnętrzny i początkowany przez granzym B, schodzą się w miejscu aktywacji kaspazy-3 (początek fazy wykonawczej). Dodatkowe objaśnienia zawarto w tekście; zmodyfikowano za [32]

Figure 1. Initiator apoptosis pathways. 1. Extrinsic pathway. Its induction starts with ligation of death receptors (TNFR1, FAS, DR4/DR5) to their ligands (TNF α , FASL, TRAIL). Receptor death domains associate with adaptor proteins (FADD, TRADD) and then caspase-8, forming initiator complex, known as DISC, the site of caspase-8 activation. 2. Intrinsic pathway. It depends upon the balance between BCL-2 subfamily proteins (with anti-apoptotic activity performed by mitochondrial membranes sealing) and BAX subfamily proteins (increase membranes permeability). Both subfamilies are under the control of pro-apoptotic proteins of BH3-only subfamily, by which the upper-stream activators can induce mitochondrial apoptosis. APAF-1 and cytochrom C, released from mitochondria, drive formation of apoptosome, the site of caspase-9 activation. 3. Pseudoreceptor pathway. Cytotoxic or NK cells form the channels in the target cell membrane with use of perforin (PER). Granzymes A i B. Granzyme proapoptotic function is partially caspase-3 independent. The majority of ways that apoptosis is induced, including extrinsic pathway (active caspase-8), intrinsic one (active caspase-9) and GZMB-derived path, come together at the site of caspase-3 activation (the beginning of executor phase). Additional explanations included into the text [32, modified]

spazy-3) polega na przecinaniu białek substratowych w miejscu reszt asparaginianu; aktywacji podlega wówczas między innymi kaspaza-10, uczestnicząca w indukcji szlaku receptorowego. Celami molekularnymi GZMB są również czynniki antyapoptotyczne, jak inhibitor DNA-zy CAD (ICAD), białka strukturalne (lamina B) i białka naprawy DNA, na przykład DNA-PK i polimeraza poli-ADP-rybozy [50]. Granzym B wykorzystuje też szlak mitochondrialny, aktywuje czynnik BID i zależne od niego cząsteczki BAK/BAX [51]. Ponadto GZMB bezpośrednio aktywuje kaspazę-3,

omijając wczesne, odwracalne fazy apoptozy i indukując fazę wykonawczą procesu [52, 53].

Apoptoza komórek opornych na granzym B (np. wskutek wysokiej ekspresji BCL-2) zachodzi w efekcie działania innej proteazy serynowej limfocytów, GZMA. Uruchamia ona we wnętrzu komórki docelowej niezależną od kaspaz degradację jądrowego DNA. Kaskada rozpoczyna się katalizą czynnika mitochondrialnego NDUFS3, uczestniczącego w transporcie elektronów łańcucha oddechowego, co prowadzi do uwolnienia wolnych rodników i przesunięciu do jądra kom-

pleksu SET, związanego wcześniej z retikulum endoplazmatycznym i działającego proapoptotycznie [54]. W efekcie zachodzi aktywacja ważnego supresora cyklu komórkowego, DNA-zy NM23-H1 [55]. GZMA degraduje histony, laminy jądrowe i białka naprawy DNA [56].

Szlak wykonawczy apoptozy

Opisane wyżej szlaki schodzą się w finalnym etapie apoptozy, w fazie wykonawczej. Kaspazy efektorowe degradują wówczas bezpośrednio lub pośrednio (poprzez endonukleazy cytoplazmatyczne i proteazy) szereg białek jądra i cytoskieletu, m.in. cytokeratyny, PARP, alfa-fodrynę (białko błonowe cytoskieletu) i białko jądrowe NuMA [57]. Degradacja aktyn i lamin jądrowych stanowi molekularne podłoże zmian morfologicznych apoptozy, jak wspomniana kariopyknoza. Zmiany morfologiczne i biochemiczne stają się nieodwracalne [8].

Kaspaza-3 uważana jest za najważniejszy enzym wykonawczy apoptozy, między innymi degraduje ona ICAD. W efekcie wspomniana już endonukleaza CAD, pozbawiona kontroli swego naturalnego inhibitora, przemieszcza się z mitochondriów do jądra i katalizuje oligonukleosomową fragmentację DNA (faza późna kondensacji chromatyny) [40, 58]. Kaspaza-3 indukuje także dezintegrację komórki do ciałek apoptotycznych. Jednym z kluczowych substratów aktywnej kaspazy-3 jest gelsolina, białko odpowiadające w jądrze za polimeryzację aktyny, a także wiążące się z dwufosforanem fosfatydyloinozytolu, łącząc w ten sposób szlaki przewodzenia sygnału z organizacją białek aktyny. Kaspaza-3 rozcina gelsolinę na mniejsze fragmenty, prowadząc do degradacji filamentów aktyny, rozpadu cytoskieletu, zahamowania transportu wewnątrzkomórkowego, podziałów komórkowych i dróg przewodzenia sygnału [59].

Fagocytoza umierających komórek i ciałek apoptotycznych jest możliwa między innymi dzięki przesunięciu na zewnętrzną powierzchnię błony komórkowej cząsteczek fosfatydyloseryny. Jest ona znacznikiem wczesnej apoptozy. W warunkach prawidłowych obecna jest tylko w wewnętrznej warstwie lipidowej błony komórkowej. Początek apoptozy zachodzi ze spadkiem aktywności translokazy aminofosfolipidowej i fosfolipidy różnych klas, w tym fosfatydyloseryna, pojawiają się wówczas losowo w obu warstwach błony. [60]. Za ekspozycję fosfatydyloseryny na uszkodzonych erytrocytach odpowiada receptor FAS, kaspaza-8 i kaspaza-3, ale na powierzchni apoptotycznych limfocytów T obecność fosfatydyloseryny nie zależy od czyn-

ności kaspaz [61]. Makrofagi rozpoznają fosfatydyloserynę (a także kalretikulinę i aneksynę I), co umożliwia fagocytozę komórki apoptotycznej bez uruchomienia reakcji zapalnej [13]. Z fosfatydyloseryną silnie swoiście reaguje aneksyna V, białko powszechnie używane do wykrywania wczesnej apoptozy [8].

Apoptoza fizjologiczna i patologiczna w układzie immunologicznym

Apoptoza fizjologiczna jest równie ważna, jak jej przeciwieństwo — podział mitotyczny. Oba procesy uzupełniają się, uczestnicząc w utrzymaniu homeostazy ustrojowej. W organizmie dorosłego człowieka powstaje codziennie około 10 miliardów komórek. Zbliżona liczba ginie w mechanizmie fizjologicznej apoptozy [62]. Liczba komórek eliminowanych w przebiegu tego procesu rośnie w okresie rozwojowym, ale wówczas jeszcze więcej komórek proliferuje i bilans obrotu komórkowego jest dodatni, podczas gdy w starzeniu jest ujemny, a apoptoza staje się narzędziem fizjologicznej inwolucji.

W rozwoju ustroju apoptoza pełni rolę kluczową. System odpornościowy i nerwowy wzrasta i nabywa pamięci dzięki zjawisku nadprodukcji komórek. Z czasem zbędne komórki wymagają eliminacji. Przykładem jest selekcja immunokompetentnych limfocytów w grasicy, podczas której ginie około 98% powstałych tymocytów [8].

Nawiązując do mechanizmów zapalenia dolnych dróg oddechowych, apoptoza objawia się jako ważny mechanizm obronny, racjonalnie samoograniczający odpowiedź ustroju [63]. W zasadzie jest to wciąż odmiana apoptozy fizjologicznej, gdyż jej rozmiary służą zadaniu utrzymania homeostazy ustrojowej, a celem jest ograniczenie niepożądanych skutków choroby. Apoptoza służy uprzątnięciu komórek zakażonych lub uszkodzonych działaniem patogenów, stanowi ważną składową gojenia ran i uczestniczy w ewolucji ziarniny do blizny [33]. Niewystarczająca apoptoza prowadzi do nadmiernej ekspansji uczulonych antygenowo klonów komórek T, limfadenopatii, stanu przewlekłej aktywacji układu immunologicznego i chorób z autoimmunoagresji. Poza tym niedostateczna eliminacja efektorowych komórek T może spowodować śmierć w razie reinfekcji danym patogenem, gdy rozwija się burzliwa odpowiedź układu immunologicznego. Nieprawidłowa, zbyt rzadka apoptoza komórek zapalnych skutkuje nadmiernym bliznowaceniem ran i włóknieniem ognisk zapalenia [64]. Można sądzić, że w przebiegu ILD taka niedostateczna apoptoza, w drodze

przewlekłej stymulacji fibroblastów płucnych, grozi nieodwracalnym włóknieniem narządu [32].

Nazbyt nasilona apoptoza antygenowo swoistych klonów komórek T może upośledzać generację komórkowej pamięci immunologicznej i grozi ciężkim przebiegiem choroby w razie ponownego napotkania patogenu (lub przedłużaniu się zapalenia przewlekłego) [1].

Limfocyty pęcherzykowe jako przedmiot miejscowej apoptozy

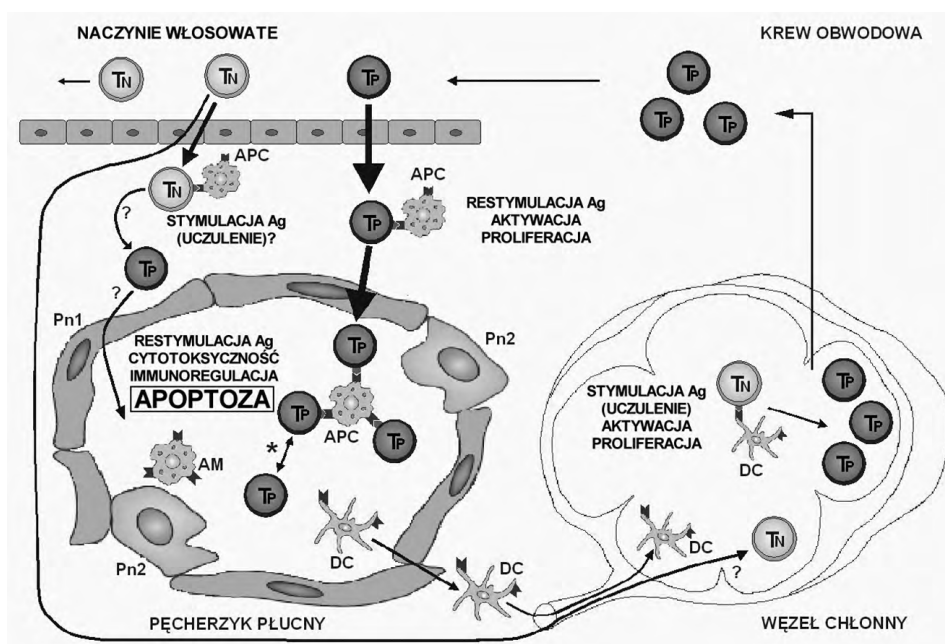
Limfocyty pęcherzykowe obecne fizjologicznie w dolnych drogach oddechowych i pełniące krytyczną rolę w szereguILD, w których z reguły rośnie znamienne ich liczba i zmienia się — w zależności od choroby — ich kompozycja fenotypowo-czynnościowa, są przedmiotem procesu apoptozy. Wypada podkreślić, że częstość apoptozy AL wpływa silnie na ich liczbę (a zapewne i czynność). Odsetek apoptotycznych AL jest silnie ujemnie skorelowany z ich odsetkiem i liczbą w materiale z BAL, niezależnie od badanej grupy osób chorych lub zdrowych [32].

Limfocyty pęcherzykowe odgraniczają się wyraźnie od limfocytów krwi obwodowej (co wiadomo) i innych limfocytów śródmiąższu, obecnych w otoczeniu pęcherzyków (co wymaga dalszych badań). WILD, według piśmiennictwa i obserwacji własnych, są to niemal wyłącznie limfocyty $T\alpha\beta$ o fenotypie uczulonych antygenowo komórek efektorowych T lub komórek pamięci T (CD3+CD45R0+) [65, 66]. Odsetki komórek B i NK w materiale BAL są znamienne niższe niż we krwi obwodowej tych samych osób. Dochodzi do miejscowej rekrutacji swoistych antygenowo limfocytów T i B. Jednak, podczas gdy limfocyty B pozostają w śródmiąższu płuc zwykle na zewnątrz pęcherzyków, syntetyzując immunoglobuliny, o tyle limfocyty T przechodzą do pęcherzyków i tam pełnią zasadnicze funkcje efektorowe [67, 68]. Są wśród nich komórki pomocnicze (Th), Tc, i regulatorowe (nTreg). WILD udokumentowano powszechną obecność w materiale BAL tylko dwóch pierwszych rodzajów tych komórek [69, 70]. Należy poczynić tu dwa zastrzeżenia. Po pierwsze, możliwe że nTreg mają znaczenie w pęcherzykach płucnych osób zdrowych [71]. Po drugie, część spośród komórek efektorowych T mogłaby różnicować się w stronę limfocytów pamięci T. Pabst i wsp. wykazali, że limfocyty mogą powracać ze światła dróg oddechowych do okolicznych węzłów chłonnych, więc generacja limfocytów pamięci T w pęcherzykach miałaby sens czynnościowy [72].

Podsumowując, rozwój i przebieg miejscowego odczynu zapalnego zależą wILD od czynności uczulonych antygenowo limfocytów T. Spośród trzech zjawisk (rekrutacja, apoptoza i proliferacja), potencjalnie regulujących liczbę limfocytów w drogach oddechowych, wszystkie zdają się pełnić rolę w śródmiąższu płuc, jednak — zgodnie z danymi piśmiennictwa i obserwacjami własnymi — w samych pęcherzykach istotne znaczenie wydają się mieć tylko rekrutacja i apoptoza:

1. Komórki prezentujące antygen (APC, *antigen presenting cells*), zwłaszcza dendrytyczne (DC, *dendritic cells*), transportują obce antygeny z przestrzeni śródmiąższowej płuc do regionalnych węzłów chłonnych.
2. W węzłach chłonnych zachodzi uczulenie swoistymi antygenami dziewiczych komórek T i ich proliferacja (podłoże obserwowanej wILD limfadenopatii płucnej, najbardziej typowej dla sarkoidozy).
3. Uczulone antygenowo limfocyty wędrują preferencyjnie do obszaru infiltrowanego przez odpowiednie węzły chłonne, w myśl koncepcji swoistej migracji tkankowej (*tissue specific homing*); do śródmiąższu płuc mogą przechodzić bezpośrednio z naczyń włosowatych krążenia płucnego.
4. W razie ekspozycji na niebezpieczne patogeny (ILD), w otoczeniu pęcherzyków płucnych organizują się nacieki zapalne, stanowiące miejsce restymulacji i proliferacji uczulonych limfocytów T; być może dochodzi tu również do uczulenia antygenowo dziewiczych komórek T i generacji dodatkowych komórek efektorowych.
5. Limfocyty T przechodzą do pęcherzyków jako komórki końcowe (nieproliferujące) i podejmują funkcje efektorowe; może dojść do ich restymulacji przez APC (DC, makrofagi pęcherzykowe, monocyty) ze zwrotną aktywacją tych ostatnich.
6. W miarę eliminacji zagrożenia, napływ nowych uczulonych komórek T do pęcherzyków stopniowo zmniejsza się, za to nasila się ich wewnątrzpęcherzykowa apoptoza; część komórek przyjmuje fenotyp limfocytów pamięci (ryc. 2) [66, 73–77].

Proponowany tu model kinetyki AL potwierdzono niedawno w odniesieniu do sarkoidozy, w publikacji podsumowującej wyniki wielośrodkowych badań [78]: wykazano równoległą aktywację limfocytów T, prawdopodobnie swoistych antygenowo, w regionalnych węzłach chłonnych i w materiale z BAL [78]. Podobne wnioski płyną z badania patogenezy berylozy, choroby stano-



Rycina 2. Kinetyka limfocytów śródmiąższu płuc i apoptoza AL. Szczegółowy opis w tekście. Tp, uczulone antygenowo limfocyty T (*primed T cells*); Tn, dziewicze limfocyty T (*naive T cells*); AM, makrofagi pęcherzykowe (*alveolar macrophages*); DC, komórki dendrytyczne (*dendritic cells*); APC, komórki prezentujące antygen (*antigen presenting cells*), w tym DC i AM; Pn1, pneumocyty typu 1; Pn2, pneumocyty typu 2

Możliwe, że recyrkulujące przez płuca dziewicze limfocyty T uczulają się *in situ* w przebiegu nasilonych odczynów limfocytowych śródmiąższu wILD, co zaznaczono znakiem zapytania (?). Ponadto gwiazdką (*) zaznaczono wzajemne interakcje między limfocytami pęcherzykowymi. Możliwe jest: a) działanie immunoregulacyjne (np. wzbudzające przez komórki T *helper*, immunosupresyjne ze strony nTreg), b) apoptoza w szlaku receptorowym i pseudoreceptorowym, c) generacja limfocytów pamięci. Ze względu na czytelność schematu nie ilustrowano pojedynczych doniesień o powrocie komórek Tp z pęcherzyków do miejscowych węzłów chłonnych

Figure 2. Kinetics of lung interstitium lymphocytes and AL apoptosis. Particular description in the text. Tp, primed T cells; Tn, naive T cells; AM, alveolar macrophages; DC, dendritic cells; APC, antigen presenting cells, including DC and AM; Pn1, type I pneumocytes, Pn2, type II pneumocytes.

It is possible that naive T cells recirculating in lungs are primed *in situ* in the course of intensive interstitial lymphocytic reactions inILD (question mark, ?). Additionally, the reciprocal alveolar lymphocytes were marked with asterisk (*). The opportunities are: a) immunoregulatory activity (e.g. stimulation by T helper cells, immune suppression by nTreg), b) apoptosis by receptor and pseudoreceptor pathway, and c) memory lymphocytes generation. With regard to chart legibility, single reports about Tp returned from alveoli to local lymph nodes were not illustrated

więcej dogodny modelILD, gdzie antygen jest dobrze znany [79].

Nasuwają się istotne uwagi. Po pierwsze, restymulacjaAL swoistymi antygenami w dolnych drogach oddechowych dotyczy prawdopodobnie nie tylko chorych naILD, ale także osób zdrowych. Ekspozycja jest zapewne minimalna i dotyczy szerokiego wachlarza antygenów. W przewodzie pozostają wówczas silne mechanizmy immunosupresyjne, jak czynność makrofagów pęcherzykowych, komórek nTreg i białek surfaktantu [71, 80, 81]. Według dotychczasowych badań własnych, u zdrowej niepalącej osoby, około 1% limfocytów pęcherzykowych znajduje się aktualnie w stanie zaawansowanej apoptozy. Przy założeniu, że średni czas przeżycia limfocytów dolnych dróg oddechowych jest długi, powyższy prezentowany model wydaje się dobrze tłumaczyć kinetykę limfocytów pęcherzykowych (i częściowo obraz cytoimmunologicznyBAL), także w grupie kontrolnej [32].

Po drugie, choroby z grupyILD przebiegające z limfocytoząBAL (jak sarkoidoza, EAA i beryloza) charakteryzują się z reguły mniejszą częstością apoptozyAL lub zwiększoną opornością komórek na ten proces, w porównaniu z grupą kontrolną [82–84]. Natomiast w idiopatycznym włóknieniu płuc (IPF, *idiopathic pulmonary fibrosis*) częstość apoptozyAL jest znamienne większa [32].

Po trzecie, na wyniki te nakłada się z reguły częstsza apoptoza u palaczy papierosów, w porównaniu z grupą osób niepalących (zarówno chorych naILD jak i u osób zdrowych) [76].

Po czwarte, wILD przebiegających z limfocytowym zapaleniem pęcherzyków i jego późniejszą remisją (np. sarkoidoza) można doszukać się fazy ekspansji (z przewagą mechanizmów przeżycia limfocytów), jak i kontrakcji (z przewagą apoptozy) [85]. Obie fazy zapalenia zachodzą na siebie i trwają dłużej niż w modelach doświadczalnych ostrej infekcji.

W przebiegu ekspansji zachodzi masywna (EAA, sarkoidoza) lub umiarkowana (azbestoza, IPF) rekrutacja swoistych antygenowo limfocytów do śródmiąższu płuc, ich oligoklonalna restymulacja i proliferacja [77, 86–88]. Limfocytowe zapalenie pęcherzyków toczy się następnie wraz przesunięciem równowagi w puli AL na rzecz efektorów odpowiedzi immunologicznej: w świetle pęcherzyków pojawiają się antygenowo swoiste, uczulone komórki Th1, Th2 i Tc; komórek pamięci T jest zapewne mało [74]. Przed apoptozą limfocyty chronione są prawdopodobnie przez czynniki przeżycia (IL-2, być może także IL-4, TNF- α , IL-7, IL-15), blokujące program NID [33]. Jeśli antygen zostanie wyeliminowany (co zdarza się w EAA, w przypadku sarkoidozy pozostaje domniemaniem), przeważa mniej lub bardziej nasilona kontrakcja odpowiedzi immunologicznej [32, 85].

Po piąte, odczyn zapalny wILD może przedłużyć się, z wytworzeniem nowego stanu dynamicznej równowagi, wzrostem częstości apoptozy i stopniową rezolucją zapalenia. Tak mogłaby przebiegać przewlekła stabilna sarkoidoza. Fazy ekspansji i kontrakcji ulegają tu przypuszczalnie zatarciu. Natomiast w przypadku choróbILD, charakteryzujących się przewlekłym i podstępny początkiem oraz niepodlegającym remisji, jak IPF i pylice, trudno wyróżnić fazę kontrakcji. Co charakterystyczne, choroby te cechuje odmienna dynamika apoptozy AL: odsetek apoptotycznych AL jest znamienne częstszy w IPF, NSIP i krzemicy, nie jest jednak jasne, czy dzieje się tak od samego początku choroby czy też w miarę jej postępu [32, 76, 89].

I wreszcie, przedmiotem dyskusji pozostaje, czy apoptoza AL (ewentualnie odpowiedzialna za kontrakcję odpowiedzi immunologicznej) zależy od procesu NID czy też AICD. Problemowi temu zostanie poświęcona bardziej szczegółowa publikacja pogładowa. Tymczasem, zastrzegając, że w każdej zILD mechanizm zaprogramowanej śmierci limfocytów dolnych dróg oddechowych może być odmienny, autorzy przychylają się do stanowiska, że zasadniczą przyczyną apoptozy AL wILD jest NID, zaś AICD pełni rolę modulującą. Kluczowe znaczenie regulacyjne w apoptozie limfocytów miałyby nierównowaga między parą ich najważniejszych czynników szlaku mitochondrialnego, antyapoptotycznym białkiem BCL-2, a jego antagonistą, należącym do podrodziny *BH3-only*, białkiem BIM (główna rola kontrolna przypada prawie na pewno IL-2) [1, 84].

Wśród licznych par ligand/receptor śmierci, rola układu FASL/FAS wydaje się przeceniona. Istotną funkcję regulacyjną można za to przypisać parze TNF- α /TNFR1 [32]. Nie można wykluczyć,

że w miarę przewlekłania się procesu zapalnego (IPF, sarkoidoza i pylice) wzrasta udział AICD w apoptozie AL [33]. Zbadania wymaga interesująca możliwość śmierci części limfocytów dróg oddechowych wILD w przebiegu szlaku pseudoreceptorowego, a więc jako konsekwencja śmierci samobójczej (ang. *autocrine suicide*) lub bratobójczej (*fratricide* lub *apoptosis mediated in neighbouring cells*) [25, 90].

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Kurtulus S., Tripathi P., Opferman J.T., Hildeman D.A. Contracting the 'mus cells' — does down-sizing suit us for diving into the memory pool? *Immunol. Rev.* 2010; 236: 54–67.
2. Marleau A.M., Sarvetnick N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78: 575–584.
3. Bourke S.J. Interstitial lung disease: progress and problems. *Postgrad. Med. J.* 2006; 82: 494–499.
4. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972; 2(4): 239–257.
5. Christofferson D.E., Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010; 22: 263–268.
6. Zhivotovsky B., Orrenius S. Clinical perspectives of cell death: where we are and where to go. *Apoptosis* 2009; 14: 333–335.
7. Kerr J.F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; 181–182: 471–474.
8. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007; 35: 495–516.
9. Buhling F., Wille A., Rocken C. i wsp. Altered expression of membrane-bound and soluble CD95/Fas contributes to the resistance of fibrotic lung fibroblasts to FasL induced apoptosis. *Respir. Res.* 2005; 6: 37.
10. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770–776.
11. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000; 301: 5–17.
12. Joza N., Susin S.A., Daugas E. i wsp. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410: 549–554.
13. Kurosaka K., Takahashi M., Watanabe N., Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol.* 2003; 171: 4672–4679.
14. Savill J., Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407: 784–788.
15. Rahman Z.S. Impaired clearance of apoptotic cells in germinal centers: implications for loss of B cell tolerance and induction of autoimmunity. *Immunol. Res.* 2011; 51: 125–133.
16. Chłap Z.C., Czarnobilska E., Kopiński P., Gil K., Jedynak U. Cytoimmunological atlas of bronchoalveolar lavage (BAL). CD. *Medycyna Praktyczna, Kraków* 2000.
17. Hu S., Snipas S.J., Vincenz C., Salvesen G., Dixit V.M. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 29648–29653.
18. Koenig U., Eckhart L., Tschachler E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285: 1150–1154.
19. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N. i wsp. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98–103.
20. Saleh M., Vaillancourt J.P., Graham R.K., i wsp. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 2004; 429: 75–79.
21. Igney F.H., Krammer P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Rev. Cancer.* 2002; 2: 277–288.

22. Pardo J., Wallich R., Martin P. i wsp. Granzyme B induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 567–579.
23. Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005; 22: 355–370.
24. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9: 271–285.
25. Kopiński P., Balicka-Ślusarczyk B., Dyczek A. i wsp. Enhanced expression of Fas Ligand (FasL) in the lower air-ways of patients with fibrotic interstitial lung diseases (ILDs). *Folia Histochem. Cytobiol.* 2011; 49: 636–645.
26. O'Reilly L.A., Tai L., Lee L. i wsp. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* 2009; 461: 659–663.
27. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305–1308.
28. Krammer P.H., Arnold R., Lavrik I.N. Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 532–542.
29. Kopiński P., Przybylski G., Jarzemska A. i wsp. Stężenie IF- γ w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w wybranych chorobach śródmiąższowych płuc jest dodatnio skorelowane z wartością stosunku CD4/CD8. *Pol. Merk. Lek.* 2007; 23: 15–21.
30. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 609–620.
31. Chang D.W., Xing Z., Pan Y. i wsp. C-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 2002; 21: 3704–3714.
32. Kopiński P. Apoptoza limfocytów pęcherzykowych w wybranych śródmiąższowych chorobach płuc. Rozprawa habilitacyjna. Wydawnictwo Naukowe UMK. Bydgoszcz 2012.
33. McKinstry K.K., Strutt T.M., Swain S.L. Regulation of CD4+ T-cell contraction during pathogen challenge. *Immunol. Rev.* 2010; 236: 110–124.
34. Zhang N., Hartig H., Dzhagalov I., Draper D., He Y.W. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Research.* 2005; 15: 749–769.
35. Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., van Gurp M., van Loo G., Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004; 23: 2861–2874.
36. Schuler M., Green D.R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2001; 29: 684–688.
37. Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig P.E., Didelot C., Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 1423–1433.
38. Schmitz I., Weyd H., Krueger A. i wsp. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J. Immunol.* 2004; 172: 2194–2200.
39. van Loo G., van Gurp M., Depuydt B. i wsp. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 2002; 9: 20–26.
40. Susin S.A., Daugas E., Ravagnan L. i wsp. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 571–580.
41. Li S., Zhao Y., He X. i wsp. Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 26912–26920.
42. Cory S., Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev. Cancer.* 2002; 2: 647–656.
43. Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M., Garewal H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2002; 511:145–178.
44. Galluzzi L., Joza N., Tasdemir E. i wsp. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 1113–1123.
45. Shamas-Din A., Brahmabhatt, Leber B., Andrews D.W. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2011; 1813: 508–520.
46. Yang Y., Yu X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.* 2003; 17: 790–799.
47. Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996; 87: 619–628.
48. Liu F.T., Newland A.C., Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 310: 956–962.
49. Chávez-Galán L., Arenas-Del Angel M. C., Zenteno E., Chávez R., Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 2009; 6: 15–25.
50. Cullen S.P., Martin S.J. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 251–262.
51. Barry M., Bleackley R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 401–409.
52. Lord S.J., Rajotte R.V., Korbitt G.S., Bleackley R.C. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol. Rev.* 2003; 193: 31–38.
53. Goping I.S., Barry M., Liston P. i wsp. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity.* 2003; 18: 355–365.
54. Lieberman J., Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15: 553–559.
55. Fan Z., Beresford P.J., Oh D.Y., Zhang D., Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003; 112: 659–672.
56. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol. Rev.* 2010; 235: 93–104.
57. Slee E.A., Adrain C., Martin S.J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, nonredundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 7320–7326.
58. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43–50.
59. Kothakota S., Azuma T., Reinhard C. i wsp. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278: 294–298.
60. Bratton D.L., Fadok V.A., Richter D.A., Kailey J.M., Guthrie L.A., Henson P.M. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 26159–26165.
61. Ferraro-Peyret C., Quemeneur L., Flacher M., Revillard J.P., Genestier L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J. Immunol.* 2002; 169: 4805–4810.
62. Renahan A.G., Booth C., Potten C.S. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322: 1536–8.
63. Norbury C.J., Hickson I.D. Cellular responses to DNA damage. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001; 41: 367–401.
64. Drakopanagiotakis F., Xifteri A., Polychronopoulos V., Bouros D. Apoptosis in lung injury and fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2008; 32: 1631–1638.
65. Agostini C., Chilosi M., Zambello R., Trentin L., Semenzato G. Pulmonary immune cells in health and disease: lymphocytes. *Eur. Respir. J.* 1993; 6: 1378–1401.
66. Kopiński P., Szczeklik J., Lackowska B. i wsp. Flow cytometric characteristics of alveolar lymphocytes (AL) obtained by bronchoalveolar lavage (BAL) in the control group — proposal of normal value range of AL subsets in nonsmokers. *Central. Eur. J. Immunol.* 2004; 29: 63–72.
67. Fujimori F., Shimizu T., Takada T., Narita J., Suzuki E., Gejyo F. Differences in lymphocyte profile between BAL fluid and human lung tissue from patients with interstitial lung disease. *Br. J. Biomed. Sci.* 2008; 65: 63–67.
68. Weissler J.C., Mendelson C., Moya F., Yarbrough W.C. Jr. Effect of interstitial lung disease macrophages on T-cell signal transduction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 149: 191–196.
69. Grunewald J., Eklund A. Role of CD4+ T cells in Sarcoidosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2007; 4: 461–464.
70. Kotsianidis I., Nakou E., Bouchliou I. i wsp. Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179: 1121–1130.
71. Heron M., Grutters J.C., ten Dam-Molenkamp K.M. i wsp. Bronchoalveolar lavage cell pattern from healthy human lung. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 167: 523–531.

72. Pabst R., Binns R.M. Lymphocytes migrate from the bronchoalveolar space to regional bronchial lymph nodes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151(2 Pt 1): 495–499.
73. Cose S. T-cell migration: a naive paradigm? *Immunol.* 2007; 120: 1–7.
74. Holt P.G., Strickland D.H., Wikstrom M.E., Jahnsen F.L. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8: 142–152.
75. Raju B., Tung C.F., Cheng D. i wsp. In situ activation of helper T cells in the lung. *Infect. Immun.* 2001; 69: 4790–4798.
76. Szczeklik J., Trojan J., Kopiński P. i wsp. Apoptosis in bronchoalveolar lavage lymphocytes (L-BAL) in pneumoconioses. *Przeg. Lek.* 2004; 61: 235–240.
77. Tschernig T., Hoffmann A., Pabst R. Local proliferation contributes to lymphocyte numbers in normal lungs. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2001; 53: 187–194.
78. Darlington P., Haugom-Olsen H., von Sivers K. i wsp. T-cell phenotypes in bronchoalveolar lavage fluid, blood and lymph nodes in pulmonary sarcoidosis — indication for an airborne antigen as the triggering factor in sarcoidosis. *J. Intern. Med.* 2012; doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.02543.x.
79. Fontenot A.P., Edwards D.M., Chou Y.K. i wsp. Self-presentation of beryllium by BAL CD4+ T cells: T cell-T cell interactions and their potential role in chronic beryllium disease. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36: 930–939.
80. Blumenthal R.L., Campbell D.E., Hwang P., DeKruyff R.H., Frankel L.R., Umetsu D.T. Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107: 258–264.
81. Borron P.J., Mostaghel E.A., Doyle C., Walsh E.S., McHeyzer-Williams M.G., Wright J.R. Pulmonary surfactant proteins A and D directly suppress CD3+/CD4+ cell function: evidence for two shared mechanisms. *J. Immunol.* 2002; 169: 5844–5850.
82. Herry I., Bonay M., Bouchonnet F. i wsp. Extensive apoptosis of lung T-lymphocytes maintained in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996; 15: 339–347.
83. Laflamme C., Israël-Assayag E., Cormier Y. Apoptosis of bronchoalveolar lavage lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis. *Eur. Respir. J.* 2003; 21: 225–231.
84. Mermigkis C., Polychronopoulos V., Mermigkis D. i wsp. Overexpression of bcl-2 protein in bronchoalveolar lavage lymphocytes and macrophages in sarcoidosis. *Respiration* 2006; 73: 221–226.
85. Stridh H., Planck A., Gigliotti D., Eklund A., Grunewald J. Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis. *Thorax* 2002; 57: 897–901.
86. Burastero S.E., Borgonovo B., Gaffi D. i wsp. The repertoire of T-lymphocytes recovered by bronchoalveolar lavage from healthy nonsmokers. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 319–327.
87. Shimizudani N., Murata H., Keino H. i wsp. Conserved CDR 3 region of T cell receptor BV gene in lymphocytes from bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2002; 129: 140–149.
88. Trentin L., Zambello R., Facco M. i wsp. Selection of T lymphocytes bearing limited TCR-Vbeta regions in the lung of hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 587–596.
89. Kopiński P., Śladek K., Szczeklik J. i wsp. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the lower airways immune cells. Evaluation of its possible role as an antiapoptotic agent. *Fol. Hist. Cytobiol.* 2006; 44: 249–258.
90. Dhein J., Walczak H., Baumler C., Debatin K.M., Krammer P.H. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373: 438–441.