

Prozapalne oddziaływanie ksenobiotyków dymu tytoniowego

Proinflammatory effects of tobacco smoke xenobiotics

Halina Milnerowicz^(a, b), Milena Ściskalska^(c, d, e), Magdalena Dul^(c)

Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. H. Milnerowicz.

Rektor Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu: prof. dr hab. M. Ziętek

^(a) koncepcja

^(b) nadzór nad pisaniem pracy

^(c) opracowanie literatury

^(d) opracowanie tekstu

^(e) tłumaczenie streszczenia

STRESZCZENIE

Zdolność dymu tytoniowego do pobudzania miejscowego i ogólnoustrojowego zapalenia uważana jest za mechanizm patogenetyczny prowadzący do rozwoju wielu chorób płuc i schorzeń pozapłucnych. Celem pracy było dokonanie przeglądu wiadomości dotyczących patomechanizmów prozapalnego działania składników dymu tytoniowego, które prowadzą do uruchomienia kaskady procesów skutkujących stanem zapalnym i uszkodzeniem tkanek.

Zaktywowane makrofagi płucne przyczyniają się do rozwoju miejscowej odpowiedzi zapalnej poprzez uwalnianie cytokin, proteaz i wolnych rodników tlenowych. Uwalnianie cytokin indukowane przez dym tytoniowy związane jest z wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnałowymi, głównie z aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Rozwijający się proces zapalny może indukować zwiększoną produkcję utleniaczy przez komórki zapalne, przez co dochodzi do intensyfikacji reakcji zapalnej. Składniki dymu tytoniowego stymulują ekspresję cyklooksygenazy-2 oraz zwiększają syntezę prostaglandyn i białek ostrej fazy (białka C-reaktywnego, fibrynogenu). Większość zmian wywołanych paleniem tytoniu jest odwracalna, ale poziom niektórych mediatorów zapalenia jest nadal wysoki także wtedy, gdy czynnik o działaniu prozapalnym zostanie wyeliminowany. Uważa się, że aldehydy obecne w środowisku i będące składnikami dymu tytoniowego tworzą połączenia kowalencyjne z nukleofilowymi grupami aminowymi lizyny, argininy lub histydyny w białkach, zaburzając ich funkcje. Aldehydy mogą też powodować powstawanie wolnych rodników oraz osłabiać wewnątrzkomórkowe mechanizmy antyoksydacyjne. Wyczerpanie zapasów glutationu prowadzi do zmiany statusu redoks komórek, który wpływa na szlaki transdukcji sygnału i regulację transkrypcji genów. Upośledze-

nie mechanizmów przeciwzapalnych i nasilone uwalnianie mieloperoksydazy przez neutrofile powodują zaburzenie homeostazy naczyniowej. Mieloperoksydaza może powodować oksydację białek i peroksydację lipidów.

Utlenianie lipoprotein oraz podwyższone stężenia białek ostrej fazy związane z paleniem, mogą wywierać bezpośredni efekt promujący wystąpienie chorób sercowo-naczyniowych i odgrywać rolę w patogenezie miażdżycy i uszkodzenia śródbłonna.

Słowa kluczowe: dym tytoniowy, nikotyna, stres oksydacyjny, cytokiny prozapalne

SUMMARY

Tobacco smoke capability of stimulating local and systemic inflammation is considered to be a pathogenetic mechanism leading to the development of pulmonary and extrapulmonary diseases. The study was aimed at reviewing information concerning the pathomechanisms for the pro-inflammatory effect of tobacco smoke components, which lead to initiating cascade processes resulting in tissue damage.

A retained lungs macrophages contributing to the development of local inflammatory response by the release of cytokines, proteases and radicals were shown. Cytokine release induced by tobacco smoke with intracellular signaling pathways, mainly NF-κB activation, is associated with this. Developing inflammatory process as a driving mechanism for further oxidants production was shown, which caused the intensification of inflammatory response. Tobacco smoke components stimulating cyclooxygenase-2 expression and an increase in prostaglandins and acute phase proteins synthesis were demonstrated. It was shown that most of the changes

induced by smoking is reversible, but the level of some inflammatory mediators remains still high even when the damaging agent is removed. It is believed that aldehydes present in the environment that are components of the smoke can make a covalent bond with nucleophilic amino groups of lysine, arginine or histidine in proteins. They can cause radicals formation and weaken an intracellular antioxidant mechanisms. The glutathione depletion leading to change in cells redox status was demonstrated. Anti-inflammatory mechanisms impairments and intensification of neutrophils myeloperoxidase release

causing vascular homeostasis disruption were shown. Myeloperoxidase can cause proteins oxidation and lipid peroxidation.

Lipids peroxidation and increased acute phase proteins level associated with smoking, may exert a direct effect promoting the occurrence of cardiovascular diseases and play a role in pathogenesis of atherosclerosis and endothelial damage.

Keywords: smoke, nicotine, oxidative stress, proinflammatory cytokines

WSTĘP

Z powodu swoich właściwości fizycznych i składu chemicznego, dym papierosowy jest złożonym, dynamicznym układem. Skład strumienia głównego i bocznego dymu tytoniowego jest dobrze poznany [1, 2]. Zidentyfikowano kilka tysięcy substancji należących niemal do wszystkich grup związków organicznych oraz metali [3]. W strumieniu głównym dymu tytoniowego stwierdzono obecność kancerogenów, takich jak policykliczne węglowodory aromatyczne (ang. *Polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs) i specyficzne dla tytoniu N-nitrozoaminy (ang. *Tobacco-specific nitrosamines*, TSNAs) [2]. Również wiele składników strumienia bocznego wykazuje działanie kancerogenne i genotoksyczne. Zauważono, że stężenie wielu toksyn w strumieniu bocznym dymu tytoniowego jest nawet stukrotnie większe, niż w strumieniu głównym, co uwydatnia potencjalnie szkodliwy wpływ biernego palenia na zdrowie [4].

Aerozol głównego strumienia dymu tytoniowego składa się fazy gazowej i fazy cząsteczkowej (smoły). Faza gazowa złożona jest głównie ze składników powietrza, azotu i tlenu. Znajdują się w niej takie składniki, jak 1,3-butadien, formaldehyd, acetaldehyd, benzen, cyjanowodór. Składniki, takie jak PAHs, TSNAs, fitosterole i metale są charakterystyczne tylko dla fazy cząsteczkowej [2]. Zarówno faza gazowa, jak i stała, zawierają wysokie stężenia utleniaczy i wolnych rodników [5]. Indukcja stresu oksydacyjnego przez składniki dymu tytoniowego, jego toksyczność i choroby jakie wywołuje są dobrze poznane. Mniej znana jest rola produkowanych w organizmie cytokin prozapalnych w odpowiedzi na stymulację dymem tytoniowym.

Celem pracy było dokonanie przeglądu wiadomości dotyczących patomechanizmów prozapalnego działania składników dymu tytoniowego, które prowadzą do uruchomienia kaskady procesów skutkujących uszkodzeniem tkanek.

ROLA DYMU TYTONIOWEGO W PATOMECHANIZMIE ZAPALENIA. CYTOKINY PROZAPALNE

Proces zapalny jest wysoce złożoną, współzależną biochemicznie i fizjologicznie odpowiedzią organizmu, który ma na celu obronę przed działaniem bodźców uszkodzających, ograniczenie uszkodzenia, a także pobudzenie naprawy i regeneracji tkanek. Niekontrolowany stan zapalny może prowadzić do nadmiernych miejscowych uszkodzeń i potencjalnie zagrażających życiu ogólnoustrojowych powikłań [6]. Patogeneza rozwoju wielu chorób płuc i schorzeń pozapłucnych związana jest ze zdolnością dymu tytoniowego do pobudzania miejscowego i ogólnoustrojowego zapalenia. Istnieją dowody świadczące o tym, iż u palaczy tytoniu występuje charakterystyczna reakcja zapalna, zarówno w układzie oddechowym, jak i poza nim [7].

Zapalenie w układzie oddechowym

Wykazano, że dym tytoniowy odgrywa istotną rolę w patogenezie chorób płuc i jest czynnikiem wywołującym wystąpienie ostrych objawów. U wszystkich palaczy tytoniu z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP) rozwija się zapalenie nasilające się w czasie zaostrzeń choroby [8]. Jest ono wzmożoną reakcją na długotrwałe działanie czynników drażniących, w tym dymu papierosowego. Ekspozycja na dym tytoniowy aktywuje kaskadę zapalenia w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych, co skutkuje produkcją licznych silnie działających cytokin i chemokin, a także uszkodzeniem nabłonka płuc, wzrostem przepuszczalności i rekrutacją makrofagów i neutrofilów w układzie oddechowym. Komórki dendrytyczne aktywując wiele innych komórek zapalenia odgrywają ważną rolę w odpowiedzi tkanki płucnej na dym tytoniowy i są ważnym komórkowym elementem zapalenia w POChP [9]. Nieprawidłowa kumulacja komórek stanu zapalnego ma miejsce przez cały czas trwania choroby, także wtedy, kiedy czynnik

uszkodzający, jakim jest dym tytoniowy, jest usunięty [10]. Zaobserwowano, że oksydanty obecne w dymie tytoniowym mogą powodować uwalnianie cytokin prozapalnych: IL-1, IL-8, IL-17, IL-22 i czynnika martwicy nowotworu (ang. *Tumor necrosis factor*, TNF- α). Wywołana przez dym tytoniowy reakcja zapalna w drogach oddechowych występuje także u zdrowych i asymptomatycznych palaczy. U tych ostatnich stwierdza się zwiększoną liczbę neutrofilii, eozynofili, komórek tucznych i makrofagów. Jedni badacze nie stwierdzają różnic w ilości cytokin w drogach oddechowych pomiędzy zdrowymi palaczami i osobami niepalącymi, inni natomiast przedstawiają całkowicie odmienne rezultaty [11].

Zapalenie ogólnoustrojowe

U palaczy tytoniu, poza zapaleniem toczącym się w układzie oddechowym, stwierdza się także ogólnoustrojową reakcję zapalną. Długotrwałe palenie powoduje zwiększenie we krwi ilości białych krwinek oraz zwiększoną ekspresję L-selektyny. Ta cząstka adhezyjna może inicjować adhezję neutrofilii do śródbłonna i zwiększać ich rekrutację do tkanek objętych zapaleniem [7]. U palaczy zaobserwowano podwyższoną ilość białka C-reaktywnego (ang. *C-reactive protein*, CRP) i fibrynogenu. Stwierdzono ponadto, że pomiędzy stężeniem fibrynogenu w osoczu, a ilością wypalanych papierosów istnieje zależność typu dawka – efekt. Większość zmian wywołanych paleniem tytoniu jest odwracalna, jakkolwiek poziom niektórych mediatorów zapalenia (np. CRP) jest nadal wysoki nawet przez 10 do 20 lat po zaprzestaniu palenia, co wskazuje na toczący się proces zapalny [7]. W osoczu palaczy obserwuje się podwyższone stężenie kwaśnej α_1 -glikoproteiny, ceruloplazminy i α_2 -makroglobuliny względem osób niepalących. Podwyższone stężenia białek ostrej fazy (ang. *Acute phase proteins*, APP) związane z paleniem mogą wywierać bezpośredni efekt promujący wystąpienie chorób sercowo-naczyniowych i odgrywać znaczącą rolę w patogenezie miażdżycy i uszkodzenia śródbłonna. Podwyższone stężenie APP w osoczu może częściowo odzwierciedlać wzrost ilości cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 i TNF- α , które są głównymi induktorami APP i regulatorami ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej. Wzrost poziomu tych cytokin może być jednym z czynników predysponujących do wystąpienia choroby wieńcowej czy zawału serca [7]. Cytokiny prozapalne mogą pobudzać proliferację, różnicowanie, chemotaksję i fagocytozę określonych komórek stanu zapalnego. Jednak nadmierna indukcja cytokiny może wywierać efekt toksyczny [12]. Sieć cytokin wpływa na otaczające populacje zarówno komórek układu immunologiczne-

go, jak i komórki nienależące do tego układu, co prowadzi do produkcji chemokin, które z kolei pośredniczą w rekrutacji i umiejscowieniu leukocytów w miejscu zapalenia [6].

WPŁYW α,β -NIENASYCONYCH I NASYCONYCH ALDEHYDÓW OBECNYCH W DYMIE TYTONIOWYM NA WYDZIELANIE MEDIATORÓW ZAPALENIA

Prozapalne oddziaływanie nienasyconych aldehydów dymu tytoniowego

α,β -Nienasycone aldehydy są ważnymi stymulatorami indukowanej przez dym tytoniowy aktywacji makrofagów i przyczyniają się do rozwoju stanu zapalnego w płucach spowodowanego paleniem. Mechanizm, poprzez który akroleina stymuluje makrofagi, może być związany z jej zdolnością do aktywacji wielu cząstek wrażliwych na zmiany potencjału redoks. Uwalnianie cytokin z ludzkich makrofagów indukowane przez dym tytoniowy związane jest z wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnałowymi: NF- κ B i kinazy regulowanej przez sygnał zewnątrzkomórkowy (ang. *Extracellular-signal-regulated kinases*, ERK $\frac{1}{2}$) [13]. W badaniu przeprowadzonym na komórkach śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej (ang. *Human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) wykazano, że akroleina stymuluje ekspresję cyklooksygenazy-2 (ang. *Cyclooxygenase-2*, COX-2) (EC 1.14.99.1) i zwiększa syntezę prostaglandyn w HUVECs poprzez aktywację szlaków kinazy białkowej C (ang. *Protein kinase C*, PKC) (EC 2.7.11.1), kinazy białkowej p38 aktywowanej przez mitogeny (ang. *Mitogen-activated protein kinase*, MAPK) (EC 2.7.11.24) i białka wiążącego się z elementem odpowiedzi na cAMP (ang. *cAMP response binding element*, CREB). Odkrycie to sugeruje, że akroleina może odgrywać znaczącą rolę w rozwoju miażdżycy poprzez indukcję odpowiedzi zapalnej, w którą zaangażowany jest COX-2 [14].

Akroleina zwiększa sekrecję IL-8, która jest jednym z czynników będących przyczyną opóźnienia apoptozy neutrofilii [15]. Hamujące działanie akroleiny na apoptozę neutrofilii może być związane ze zdolnością tego aldehydu do tłumienia w nich produkcji reaktywnych form tlenu (RFT, ang. *Reactive oxygen species*, ROS) [16]. Akroleina może też bezpośrednio hamować aktywację kaspazy 3 (EC 3.4.22.56) kluczowej dla procesu apoptozy granulocytów obojętnochłonnych, poprzez alkilację jej reszt cysteinowych. Kaspaza 3 jest także wrażliwa na zmiany potencjału redoks. Powodowany przez akroleinę spadek ilości GSH, biorącego udział

w utrzymaniu prawidłowej równowagi pro/antyoksydacyjnej, może mieć wpływ na modyfikację aktywności kaspazy 3 [15].

Wykazano, że także aldehyd krotonowy może indukować apoptozę makrofagów pęcherzykowych dzięki zdolności do generowania wolnych rodników i obniżania poziomu zredukowanego glutationu (GSH). Zaobserwowano, że indukcja apoptozy w tych komórkach była także związana z utratą potencjału błony mitochondrialnej, wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , aktywacją kaspaz: 3, 7 (EC 3.4.22.60), 9 (EC 3.4.22.62) i indukcją ekspresji białka p53 [17].

Związek pomiędzy wyczerpaniem zapasów GSH i apoptozą nie jest jednak jasny i sam tylko spadek stężenia zredukowanego glutationu może nie być wystarczającym czynnikiem dla uruchomienia tego procesu. Uważa się, że w czasie apoptozy dochodzi do zwiększonego wypływu GSH z komórki i w ten sposób wyczerpanie zapasów jego zredukowanej formy może być konsekwencją, a nie przyczyną apoptozy. Zahamowanie przez akroleinę apoptozy neutrofilii może znacznie zwiększać możliwość uszkodzenia tkanek gospodarza poprzez przedłużenie przeżycia tych komórek lub zmieniać ich sposób śmierci z apoptozy na nekrozę [15].

Prozapalne oddziaływanie nasyconych aldehydów dymu tytoniowego

Wykazano, że aldehyd octowy znacząco zwiększa produkcję czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) w ludzkich oskrzelach i powoduje jądrową translokację NF- κ B w komórkach nabłonka dróg oddechowych. Mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska nie został poznany, ale przypuszcza się, że GM-CSF aktywuje komórki zapalenia, takie jak eozynofile, makrofagi i komórki dendrytyczne [18]. Natomiast aldehyd malonowy, który jest produktem peroksydacji lipidów, oraz aldehyd octowy, będący zarówno składnikiem dymu tytoniowego, jak i produktem metabolizmu etanolu, mogą stymulować uwalnianie IL-8 w komórkach nabłonkowych oskrzeli, w którym pośredniczy PKC, co może skutkować rozwojem przewlekłego uszkodzenia dróg oddechowych, upośledzać mechanizmy obronne i prowadzić do powstawania infekcji, takich jak zapalenie oskrzeli i zapalenie płuc [19].

Modyfikacja białek przez aldehydy dymu tytoniowego i jej skutki

Każdy ze związków karbonylowych obecnych w dymie tytoniowym ma potencjalną zdolność mo-

dyfikowania białek, ale jedynie w przypadku niewielu z nich zostało to udowodnione [20]. Wykazano, że aldehyd octowy i akroleina mogą zaburzać strukturę i funkcję białek, co indukuje proces zapalny [20, 21]. Uważa się, że aldehyd octowy tworzy połączenia kowalencyjne z nukleofilowymi grupami aminowymi lizyny, argininy i histydyny [20]. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* zaobserwowano, że zmodyfikowane przez akroleinę białka posiadają zdolność aktywowania makrofagów i powodują zwiększone wydzielanie chemoatraktantów (np. MCP-1). Zatrzymane w płucach makrofagi przyczyniają się do rozwoju miejscowej odpowiedzi zapalnej poprzez uwalnianie chemokin, proteaz i ROS. W efekcie następuje destrukcja tkanki płucnej. W odpowiedzi na uwalniane przez makrofagi chemokiny dochodzi do zwiększonego napływu makrofagów/ monocytów i powstania pozytywnej pętli sprzężenia zwrotnego. Wzrost ilości produkowanych utleniaczy przez te komórki skutkuje nasileniem powstawania związków karbonylowych i zmodyfikowanych białek, co pozwala podtrzymać miejscową reakcję zapalną [20]. Rozwijający się proces zapalny może być mechanizmem napędowym dla produkcji utleniaczy przez komórki zapalne, przez co dochodzi do zaostrzenia i intensyfikacji reakcji zapalnej [22].

Indukcja zmian komórkowego statusu redox przez utleniacze obecne w dymie tytoniowym

Zdolność aldehydów dymu tytoniowego do powodowania stresu oksydacyjnego najlepiej udokumentowana jest w przypadku akroleiny i formaldehydu. Akroleina może bezpośrednio reagować z antyutleniaczami, takimi jak GSH i na zasadzie addycji Michaela tworzyć produkty pośrednie addycji 1,4, które następnie izomeryzują do produktów addycji 1,2 [23]. Ponadto takie połączenia mogą ulegać kumulacji wewnątrz komórek i kolidować z enzymami związanymi z GSH. Za redukcję ilości GSH odpowiedzialne mogą być także obecne w dymie tytoniowym aldehydy nasycone, takie jak aldehyd octowy i formaldehyd, które mogą reagować z grupami aminowymi GSH i w ten sposób częściowo przyczyniać się do zmniejszenia jego ilości. Aldehydy dymu tytoniowego posiadają zdolność hamowania wielu enzymów zaangażowanych w homeostazę GSH, w tym syntetazę γ -glutamylcysteiny (EC.6.3.2.2), reduktazę glutationu (ang. *Glutathione reductase*, GR) (EC 1.8.1.7) i peroksydazę glutationu (ang. *Glutathione peroxidase*, GPx) (EC 1.11.1.9) [23]. Wykazano, że GSH uczestniczy w aktywacji (redukcji) NF- κ B następującej po ekspozycji na czynniki utleniające. Stąd stężenie GSH lub stosunek

GSH/GSSG może mieć istotne znaczenie w regulacji NF- κ B. Akroleina może wpływać na aktywację tego czynnika w sposób pośredni, poprzez zmiany w ilości komórkowego GSH, a także bezpośrednio poprzez wiązanie się z resztą nukleofilową cysteiny w podjednostce p50 i/lub p65 NF- κ B. Ekspozycja na akroleinę może prowadzić do zwiększenia poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , który powoduje aktywację NF- κ B niezależną od statusu redoks tioli, co udowodniono w przypadku komórek nerkowych [24].

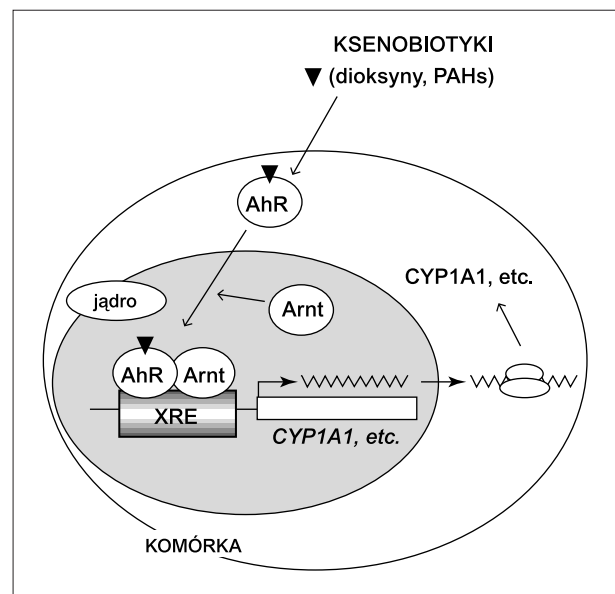
Akroleina może w bezpośredni sposób stymulować powstanie stresu oksydacyjnego w mitochondriach. Wykazano, że ekspozycja mitochondriów pochodzących z mózgu na ten aldehyd skutkuje zależnym od dawki wzrostem ilości ROS i spadkiem zawartości GSH w komórkach, aktywności GPx i dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *Superoxide dismutase*, SOD) (E.C. 1.15.1.1). Nie stwierdza się przy tym znaczącego zwiększenia napływu Ca^{2+} do komórek, czy też zmiany przepuszczalności mitochondriów. Obserwowane modyfikacje związane są raczej z upośledzeniem funkcji mitochondrialnego systemu transportu elektronów [25].

PROZAPALNE ODDZIAŁYWANIE POLICYKLICZNYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH (PAHs)

Rola węglowodorowego receptora arylowego (AhR) w prozapalnym działaniu PAHs. Agoniści receptora AhR obecni w dymie tytoniowym

Ostatnie badania pokazują, że dym tytoniowy zawiera znaczną ilość związków będących agonistami AhR (dioksyny, polichlorowane dibenzo-p-dioksyny, polichlorowane dibenzo-p-furany, polichlorowane bifenyle). W większości toksycznych działań dioksyn i związków dioksynopodobnych pośredniczy receptor AhR [26]. Po rozpoznaniu ligandu przez receptor dochodzi do ich połączenia się i powstania kompleksu AhR-ligand, który zostaje przeniesiony do jądra komórkowego. Powstały kompleks tworzy heterodimer ze swoim koaktywatorem – translokazą jądrową (ang. *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, Arnt). Następnie heterodimer AhR/Arnt wiąże się z odpowiednimi sekwencjami DNA, określanymi jako element odpowiedzi na ksenobiotyk (ang. *Xenobiotic response element*, XRE) i daje sygnał do rozpoczęcia transkrypcji odpowiednich genów (Ryc. 1) [27].

Duża grupa genów związanych z zapaleniem posiada w regionie regulatorowym jeden lub więcej XRE, bądź sekwencji podobnych do XRE. Geny, któ-



Ryc. 1. Odpowiedź komórki na dioksyny i substancje dioksynopodobne [27]

Fig. 1. Cell response to dioxins and dioxin-like substances [27]

re prawdopodobnie regulowane są przez receptor AhR, to geny dla: IgE, cytokin prozapalnych (IL-1 β , TNF- α), receptorów cytokinowych (receptor dla IL-2 i IL-8 oraz receptor p75/80 TNF), chemokin (IL-8, RANTES (ang. *Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*), receptor II IFN- γ), enzymów zapalenia – indukowalnej syntazy tlenku azotu, COX-2, lipooksygenaz, mikrosomalnej syntazy prostaglandyny E₂ (ang. *Microsomal prostaglandin E₂ synthase*, mPGES), a także dla ICAM-1 i podjednostek p50 i p65 NF- κ B [28].

Udowodniono, że agoniści AhR mają zdolność indukowania ekspresji tych genów. Co więcej, dowiedziono, że proteiny degradujące macierz i ROS, kluczowe mediatory odpowiedzialne za powodowane przez dym tytoniowy niszczenie tkanki płucnej, są generowane przez ligandy AhR [27].

Okazuje się jednak, że ilość dioksyn w dymie tytoniowym jest bardzo mała i w związku z tym nie tłumaczy obserwowanego wysokiego poziomu potencjału aktywacji XRE przez dym tytoniowy [27]. Inną grupą agonistów AhR obecną w dymie, są policykliczne węglowodory aromatyczne, które występują w nim w ilości większej, niż dioksyny. Strumień boczny może być głównym czynnikiem warunkującym ekspozycję na PAHs tak u czynnych, jak i biernych palaczy. PAH są składnikami dymu tytoniowego najsilniej odpowiedzialnymi za aktywację AhR [29].

Rola stresu oksydacyjnego i ERK $1/2$ w indukcji COX-2 przez benzo[a]piren

COX-2 jest enzymem, który w większości prawidłowych tkanek jest nieobecny, a którego ekspresja zachodzi pod wpływem czynników proliferacyjnych i zapalnych. Enzym ten odgrywa istotną rolę w zapaleniu i patogenezie nowotworów, także tych związanych z paleniem tytoniu [30]. Wpływ benzo[a]pirenu jako przedstawiciela PAHs na indukcję COX-2 wykazano w ludzkich i szczurzych komórkach mięśni gładkich tętnic (ang. *Smooth muscle cells*, SMC) i w ludzkich komórkach nabłonkowych oskrzeli [30, 31]. W komórkach SMC benzo[a]piren w stężeniu 1 μ M powodował zwiększenie ilości białka COX-2 oraz mRNA COX-2 i spotęgował produkcję prostaglandyn. W aktywacji COX-2 pośredniczył czynnik NF- κ B, niezbędna okazała się również aktywacja ERK $1/2$ [31]. W ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli węglowodór ten w stężeniu 8 μ M także spowodował indukcję COX-2, która, jak dowiedziono, wymagała aktywacji szlaków sygnałowych czynnika jądrowego aktywowanych limfocytów T (ang. *Nuclear factor of activated T-cells*, NFAT) i NF- κ B [30].

W przypadku SMC dowiedziono, że indukcja COX-2 przez benzo[a]piren zależy od potencjału antyoksydacyjnego w komórkach. W SMC, które uprzednio zostały potraktowane inhibitorem syntazy glutationu, indukcja COX-2 była znacznie nasilona, natomiast w komórkach poddanych działaniu N-acetylocysteiny była silnie zahamowana [31].

PROZAPALNE ODDZIAŁYWANIE NIKOTYNY

Nikotyna jest najbardziej aktywnym farmakologicznie składnikiem dymu tytoniowego. Z jednej strony istnieją doniesienia o jej działaniu prozapalnym, zwłaszcza w stosunku do układu krążenia, z drugiej – o działaniu przeciwzapalnym [32]. Odkryte mechanizmy prozapalnego działania nikotyny związane są głównie z jej zdolnością do indukcji stresu oksydacyjnego oraz wpływem na komórki biorące udział w reakcji zapalnej.

Pod wpływem nikotyny dochodzi do zachwiania równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej [33]. Mechanizmy odpowiedzialne za generację ROS przez nikotynę nie są jasne. Prawdopodobnie alkaloid ten wykazuje działanie chemotaktyczne dla leukocytów wielojądrowych i nasila ich reakcję na zaktwowany składnik C5a dopełniacza i w ten sposób powoduje produkcję ROS [34]. Dodatkowo uważa się, że alkaloid ten przerywa łańcuch oddechowy i prowadzi do zwiększonej produkcji anio-

nów ponadtlenkowych i nadtlenu wodoru [33]. Wzmoczoną produkcję ROS tłumaczy się w tym przypadku indukcją przez nikotynę izoenzymu CYP2A6 (EC 1.14.14.1), który powoduje jej utlenienie [34]. Zaobserwowano również wpływ nikotyny na status antyoksydacyjny. U szczurów, którym podawano nikotynę w postaci iniekcji podskórnych stwierdzono obniżenie poziomu GSH, które może być tłumaczone nasilonym zużyciem tego peptydu w czasie detoksykacji nikotyny. U badanych zwierząt zanotowano również spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych: katalazy (EC 1.11.1.6), SOD i GPx w płucach, wątrobie i nerkach. Może być to spowodowane zmniejszeniem ich syntezy, bądź też inaktywacją [33, 34].

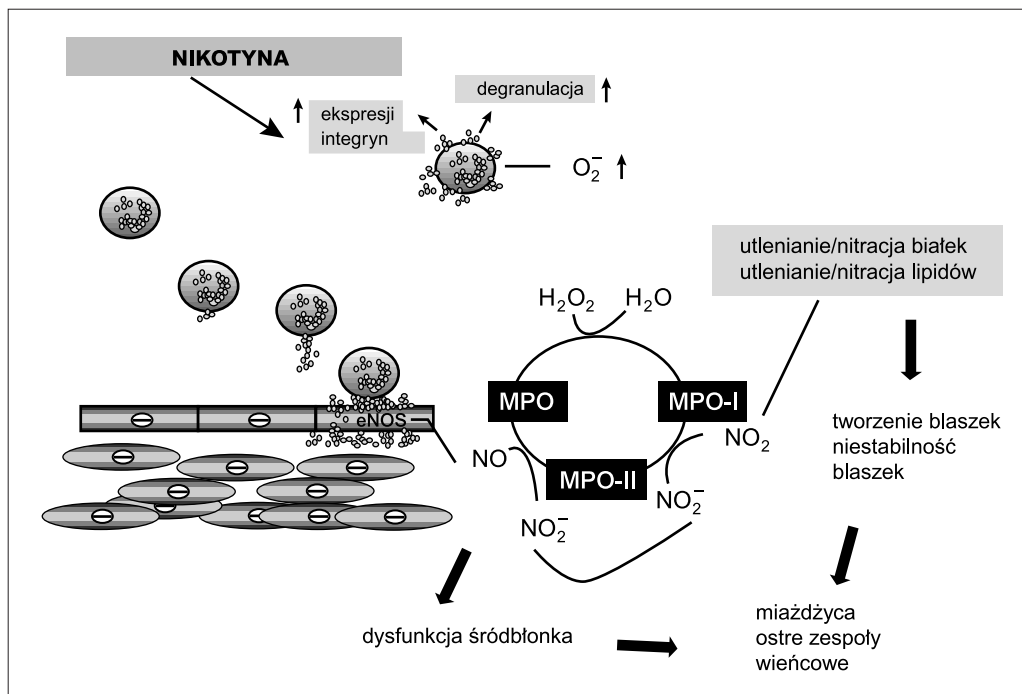
Konsekwencje wpływu nikotyny na neutrofile. Rola mieloperoksydazy

Udowodniono, że nikotyna stymuluje monocyty, makrofagi i neutrofile. Badania przeprowadzone *ex vivo* dowodzą, że nikotyna powoduje zwiększenie produkcji IL-8 przez neutrofile oraz aktywuje oksydazę NADPH, wskutek czego dochodzi do zwiększenia produkcji nadtlenu. Zaktwowane przez nikotynę neutrofile generują ROS oraz enzymy prooksydacyjne, takie jak mieloperoksydaza (ang. *Myeloperoxidase*, MPO) (EC 1.11.1.7). Enzym ten katalizuje tworzenie się kwasu chlorowego I z nadtlenu wodoru i jonów chlorkowych. Kwas chlorowy I jest utleniaczem i ma silne właściwości bakterio- i wirusobójcze. W ostatnim czasie zaczęto podkreślać rolę tego enzymu w inicjacji i progresji chorób zapalnych naczyń [35].

Mieloperoksydaza powoduje zaburzenie homeostazy naczyniowej wskutek upośledzenia mechanizmów przeciwzapalnych. MPO ma właściwości kationowe i z tego względu może oddziaływać z ujemnie naładowanymi, bogatymi w siarczan heparanu, glikozaminoglikanami na powierzchni komórek śródbłonna. Po związaniu się z tymi komórkami, MPO dociera do warstwy podśródbłonkowej na zasadzie transcytozy i gromadzi się w warstwie pomiędzy komórkami nabłonkowymi i komórkami mięśni gładkich. Przy braku nadtlenu wodoru, MPO może także powodować utlenianie jonów azotanowych III do wysoce reaktywnego ditlenku azotu, który z kolei nitruje wolne i związane z białkami reszty tyrozynowe do 3-nitrotyrozyny. MPO może również powodować peroksydację i nitrację lipidów. Utleniając lipoproteiny o niskiej (ang. *Low density lipoproteins*, LDL) i wysokiej gęstości (ang. *High density lipoproteins*, HDL), mieloperoksydaza powoduje odkładanie się cholesterolu w makrofach i tworzenie komórek piankowatych (Ryc. 2) [35]. Kluczo-

wą rolę w rozwoju procesu miażdżycowego odgrywa zapalenie naczyń [36]. Nikotyna aktywuje monocyty/makrofagi poprzez wiązanie się z nikotynowym receptorem acetylocholinowym. Zaktywowane makrofagi, powodują przy udziale wydzielanych cytokin prozapalnych i generowanych wolnych rodników, aktywację NF- κ B w komórkach śródbłonna, mięśni gładkich i makrofagach. Jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B w pierwszej kolejności nasila transkrypcję genów dla cząsteczki adhezyjnej komórek śródbłonna (ang. *Vascular cell adhesion protein 1*, VCAM-1) i COX-2, a następnie dla płytko-

pochodnego czynnika wzrostu (ang. *Platelet-derived growth factor β* , PDGF). Zwiększona przez nikotyne ekspresja VCAM-1 sprzyja przechodzeniu makrofagów przez śródbłonek. COX-2 natomiast powoduje zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń, nasila proliferację komórek i chemotaksję oraz napływ białych krwinek, w tym limfocytów i komórek fagocytujących. Zastymulowana przez nikotyne synteza PDGF indukuje 12-lipooksygenazę (EC 1.13.11.12) i nasila angiogenezę oraz zakrzepicę. Dochodzi do powiększania się i rozrostu powstałych uszkodzeń [36].



Ryc. 2. Aktywacja neutrofilii przez nikotyne i jej skutki [35]

Fig. 2. Neutrophil activation by nicotine and its effects [35]

PODSUMOWANIE

Zarówno aldehydy zawarte w dymie tytoniowym, jak i policykliczne węglowodory aromatyczne wykazują działanie prozapalne jednocześnie powodując obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych (GPx, SOD) oraz stężenia glutationu. To może indukować stres oksydacyjny oraz zmiany potencjału redox komórek, które mają wpływ na aktywację czynników transkrypcyjnych. Rozwijający się proces zapalny może być mechanizmem napędowym dla dalszej produkcji utleniaczy przez komórki zapalne, przez co dochodzi do zaostrzenia i intensyfikacji reakcji zapalnej. Stymulowane przez nikotyne neutrofile przyczyniają się do inicjacji i pro-

gresji zapalenia naczyń powodowanego przez palenie tytoniu. Dużą rolę w tym procesie odgrywa wydzielana przez neutrofile mieloperoksydaza, gdyż zmniejsza ona biodostępność tlenu azotu, wzmacnia utlenianie LDL i HDL i nasila tworzenie się blaszek miażdżycowych.

PIŚMIENICTWO

1. Streibel T, Mitschke S, Adam T, et al.: Time-resolved analysis of the emission of sidestream smoke (SSS) from cigarettes during smoking by photo ionisation/time-of-flight mass spectrometry (PI-TOFMS): towards a better description of environmental tobacco smoke. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 7071-7082.

2. Thielen A., Klus H., Muller L.: Tobacco smoke: unraveling a controversial subject. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 60: 141-147.
3. Dube M. F., Green C. R.: Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Rec Adv Tob Sci* 1982; 8: 42-102.
4. Raupach T., Schaefer K., Konstantinides S., Andreas S.: Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm. *Eur Heart J*, 2006; 27: 386-392.
5. Ghosh M., Ionita P.: Investigation of free radicals in cigarette mainstream smoke. 3rd Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research, 2007; 49-55.
6. Said S. I.: Proinflammatory and antiinflammatory peptides. Taylor & Francis, 1998; 2, 9, 26-28, 36.
7. Yanbaeva D. G., Dentener M. A., Creutzberg E. C., et al.: Systemic effects of smoking. *Chest* 2007; 131: 1557-1566.
8. Tamimi A., Serdarevic D., Hanania N. A.: The effects of cigarette smoke on airway inflammation in asthma and COPD: therapeutic implications. *Respir Med* 2012; 106: 319-328.
9. Barnes P. J., Shapiro S. D., Pauwels R. A.: Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672-688.
10. Barnes J., Drazen J. M., Rennard S., et al.: Asthma and COPD. Academic Press, San Diego 2002; 4-6, 99, 105, 350.
11. Amin K., Ekberg-Jansson A., Loeffdahl C. G., et al.: Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. *Thorax* 2003; 58: 135-142.
12. Nelson S., Martin T. R.: Cytokines in pulmonary disease. Infection and inflammation. *Informa Healthcare* 2000; 2; 19-21.
13. Demirjian L., Abboud R. T., Li H., et al.: Acute effect of cigarette smoke on TNF-alpha release by macrophages mediated through the ERK1/2 pathway. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 592-597.
14. Park Y. S., Kim J., Misonou Y., et al.: Acrolein induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in human umbilical vein endothelial cells: roles of p38 MAP Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1319-1325.
15. Finkelstein E. I., Nardini M., Van Der Vliet A.: Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: 732-739.
16. Nguyen H., Finkelstein E., Reznick A., et al.: Cigarette smoke impairs neutrophil respiratory burst activation by aldehyde-induced thiol modifications. *Toxicology* 2001; 160: 207-217.
17. Yang B. C., Pan X. J., Yang Z. H., et al.: Crotonaldehyde induces apoptosis in alveolar macrophages through intracellular calcium, mitochondria and p53 signaling pathways. *J Toxicol Sci* 2013; 38: 225-235.
18. Chadwick D., Goode J., Novartis Foundation: Acetaldehyde-related pathology: bridging the trans-disciplinary divide. John Wiley, 2007, 103-104.
19. Wyatt T. A., Kharbanda K. K., Tuma D. J., et al.: Malonaldehyde-acetaldehyde-adducted bovine serum albumin activates protein kinase C and stimulates interleukin-8 release in bovine bronchial epithelial cells. *Alcohol* 2001; 25: 159-166.
20. Kirkham P. A., Spooner G., Ffoulkes-Jones C., et al.: Cigarette smoke triggers macrophage adhesion and activation: role of lipid peroxidation products and scavenger receptor. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 697-710.
21. Kehrer J. P., Biswal S. S.: The molecular effects of acrolein. *J Toxicol Sci* 2000; 57: 6-15.
22. Kirkham P., Rahman I.: Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 476-494.
23. Reddy S., Finkelstein E.I., Wong P. S. Y., et al.: Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1490-1498.
24. Kehrer J. P., Biswal S. S.: The molecular effects of acrolein. *J Toxicol Sci* 2000; 57: 6-15.
25. Luo J., Shi R.: Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochem Int* 2005; 46: 243-252.
26. Tsay J. J., Tchou-Wong K. M., Greenberg A. K., et al.: Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Res* 2013; 33: 1247-1256.
27. Kitamura M., Kasai A.: Cigarette smoke as a trigger for the dioxin receptor-mediated signaling pathway. *Cancer Lett* 2007; 252: 184-194.
28. Savouret J. F., Berdeaux A., Casper R. F.: The aryl hydrocarbon receptor and its xenobiotic ligands: a fundamental trigger for cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2003; 13: 104-113.
29. Podechard N., Lecrueur V., Ferrec E., et al.: Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett* 2008; 177: 130-137.
30. Ding J., Wu K., Zhang D., et al.: Activation of both nuclear factor of activated T cells and inhibitor of nuclear factor-kB kinase -subunit/nuclear factor-kB is critical for cyclooxygenase-2 induction by benzo(a)pyrene in human bronchial epithelial cells. *Cancer Sci* 2007; 98: 1323-1329.
31. Yan Z., Subbaramaiah K., Camilli T., et al.: Benzo[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB. *J Biol Chem* 2000; 275: 4949-4955.
32. Mills C. M.: Cigarette smoking, cutaneous immunity and inflammatory response. *Arch Dermatol* 1997; 133: 823-825.
33. Sudheer A. R., Muthukumaran S., Devipiriya N., et al.: Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine. *Toxicology* 2008; 243: 317-329.
34. Kalpana C., Sudheer A. R., Rajasekharan K. N., et al.: Comparative effects of curcumin and its synthetic analogue on tissue lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Singapore Med J* 2007; 48: 124-130.
35. Rudolph T. K., Rudolph V., Baldus S.: Contribution of myeloperoxidase to smoking-dependent vascular inflammation. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 820-823.
36. Lau P., Li L., Merched A. J., et al.: Nicotine induces proinflammatory responses in macrophages and the aorta leading to acceleration of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor (-/-) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 143-149.

Adres do korespondencji:

Milena Ściskalska

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław

tel: (71) 784 01 78

e-mail: milena.topola@wp.pl