

**Magdalena Okłota, Anna Niemcunowicz-Janica, Janusz Załuski,
Iwona Ptaszyńska-Sarosiek**

Udział etanolu w indukcji procesu apoptozy

Contribution of ethanol in apoptosis induction

Z Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. J. Janica

Alkohol etylowy jest najbardziej powszechną i ogólnie dostępną trucizną protoplazmatyczną. Destrakcja komórek i tkanek następuje nie tylko u osób uzależnionych od alkoholu, ale także wśród osób nieuzależnionych, które sytuacyjnie lub okresowo nadużywają alkoholu. Proces apoptozy stanowi istotne ogniwo patogenetyczne zarówno w ostrym zatruciu alkoholem etylowym, jak i przy przewlekłym nadużywaniu. Zarówno etanol, jak i jego metabolity indukują samobójczą śmierć komórek w ważnych dla życia narządach wewnętrznych. Mimo licznych badań nad udziałem alkoholu i jego metabolitów w indukcji procesu zaprogramowanej śmierci komórki, problem pozostaje wciąż szeroko dyskutowany i jednoznacznie niewyjaśniony. Niniejsza praca stanowi przegląd aktualnego piśmiennictwa dotyczącego indukującego wpływu alkoholu na proces apoptozy w różnych narządach.

Ethanol is the most common and widespread protoplasmatic poison. The destruction of cells and tissues occurs in both addicted and non-addicted individuals, who use alcohol occasionally or temporarily. Apoptosis constitutes a very crucial factor in the pathogenesis of acute alcohol poisoning and chronic addiction. Ethanol and its metabolites induce suicidal cell death in crucial internal organs. However, despite extensive research on the role of alcohol and its metabolites in programmed cell death induction, the problem continues to be widely discussed and has no unambiguous explanation. The aim of this study is to present a review of up-to-date literature addressing the inducing influence of alcohol in apoptosis.

Słowa kluczowe: zatrucie alkoholem, apoptoza
Key words: alcohol poisoning, apoptosis

PROCES ZAPROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI

„Apoptosis” w języku greckim oznacza „opadanie liści z drzew” lub „wiednięcie płatków kwiatów”. Termin „apoptoza” wprowadzony został w 1972 roku przez Kerr [1]. Aktualnie termin ten określa zaprogramowaną śmierć komórki zależną od informacji zapisanej w genomie [2]. Proces apoptozy obejmuje zmiany w fizjologii, morfologii i biochemii komórki. W komórkach apoptotycznych obserwuje się: odwodnienie cytoplazmy, rozłączenie połączeń międzykomórkowych, lizę organelli i fragmentację DNA. Fizjologicznie apoptoza pozwala na zachowanie równowagi pomiędzy proliferacją a obumieraniem. Proces może być indukowany przez różne czynniki nieswoiste m.in.: toksyny – w tym etanol i jego metabolity, promieniowanie jonizujące, hormony, drobnoustroje, bodźce termiczne, chemoterapeutyki, a także poprzez aktywację swoistych receptorów śmierci: Fas, TNF α (Tumor Necrosis Factor α) i TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand). Finalnie powoduje czynną śmierć komórek docelowych i jest jednym z mechanizmów biorących udział w patogenezie ostrego zatrucia alkoholem etylowym.

MECHANIZMY APOPTOZY

Indukcja apoptotycznej śmierci komórki może zachodzić w kilku różnych mechanizmach. Pierwszy z nich polega na degranulacji ziaren cytotoksycznych pobudzonych limfocytów T. Po związaniu komórki docelowej przez limfocyt wytwarza się tzw. synapsa lityczna, w której ob-

serwuje się zmiany w ultrastrukturze limfocyta. W konsekwencji dochodzi do uwolnienia do przestrzeni międzykomórkowej perforyn pośrednio aktywujących układ kaspaz i granzymu B aktywującego bezpośrednio kaspazy, w tym efektorową kaspazę 3 [3]. Drugi mechanizm jest zależny od aktywacji swoistych receptorów dla cząsteczek nadrodziny TNF, jak: Fas, TNFR1, DR4, DR5 obecnych na komórkach. Najlepiej poznanym szlakiem receptorowym w przypadkach apoptozy indukowanej etanolem jest Fas [4, 5]. Alkohol etylowy indukuje ekspresję receptora śmierci Fas (Apo-1, CD95) na komórkach docelowych. Ligand dla receptora Fas znajduje się na pobudzonej komórce immunokompetentnej, jak limfocyt T CD4+, T CD8+, makrofag. Po połączeniu receptora Fas z ligandem FasL aktywowane są cytoplazmatyczne domeny śmierci i pojawia się kompleks białek adaptacyjnych DISC (Death Inducing Signal Complex). Receptor Fas posiada cytoplazmatyczne domeny śmierci, poprzez które indukuje apoptozę na drodze zależnej od FADD (Fas Associated Death Domain) i kaspaz. W efekcie finalnym aktywowana jest kaspaza 8, a następnie kaspazy efektorowe m.in. kaspaza 3 określana egzekutorem procesu apoptozy [3].

Oprócz receptora Fas w procesie zaprogramowanej śmierci biorą udział receptory TNFR1, które są na powierzchniach wszystkich komórek jądrzastych. Receptor ten podobnie jak Fas posiada domenę śmierci będącą ogniwem szlaku apoptotycznego. Proces śmierci komórki zachodzi poprzez aktywację kaskady kaspaz [6, 7]. Rola apoptozy zależnej od TNFR1 przy ekspozycji na etanol nie została jeszcze dostatecznie poznana. Dowiedziono, iż odgrywa on główną rolę w procesach nowotworowych, autoimmunologicznych i zapalnych. Kolejnymi z receptorów śmierci nadrodziny TNF są DR4 i DR5 dla liganda TRAIL. Podobnie jak wszystkie receptory tej rodziny posiadają one cytoplazmatyczne domeny śmierci indukujące apoptozę na drodze zależnej od FADD i kaspaz. Ligand TRAIL odgrywa główną rolę w indukcji zaprogramowanej śmierci komórek nowotworowych. Komórki prawidłowe, mimo iż posiadają receptory śmierci DR4, DR5 nie reagują na obecność TRAIL aktywacją procesu apoptozy [3, 8].

Proces zaprogramowanej śmierci komórki może zachodzić również na drodze zależnej od mitochondriów i jest on opisywany przy ekspozycji na alkohol etylowy. Aby doszło do inicjacji procesu muszą zaistnieć czynniki spustowe, które doprowadzą do uszkodzenia błony mito-

chondrialnej, zmiany jej przepuszczalności, gradientu chemicznego oraz zaburzenia równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyapoptotycznymi [9, 10]. Powyższe zmiany mogą powstać na skutek działania czynników egzo- i endogennych, w tym alkoholu etylowego i jego metabolitów. Zmiany błony mitochondrialnej doprowadzają do uwolnienia cytochromu c poprzez zależne od napięcia kanały jonowe (VDAC) do cytozolu komórki [9, 11]. W cytoplazmie cytochrom c łączy się z czynnikiem Apaf 1 (Apoptotic protease activating factor 1) przy udziale ATP [12]. Takie połączenie indukuje przejście nieaktywnej kaspazy 9 w aktywną, która bezpośrednio działa na efektorową kaspazę 3. Kluczową rolę w regulacji procesu zaprogramowanej śmierci komórek przypisuje się równowadze pomiędzy czynnikami proapoptotycznymi, jak białko Bax, Bad, Bcl-Xs, Bid i antyapoptotycznymi, jak Bcl-2 i Bcl XL, które hamują uwalnianie cytochromu c i czynnika Apaf1 z mitochondriom [10].

WPŁYW ALKOHOLU NA AKTYWACJĘ PROCESU APOPTOZY

Destrukcyjny wpływ alkoholu etylowego na organella komórkowe, a także na błony biologiczne obserwuje się zarówno przy jednorazowym spożyciu dużej ilości, jak i przy przewlekłym nadużywaniu. Wysokie jednorazowe dawki alkoholu etylowego powodują fizyko-chemiczną interakcję z błonami komórkowymi, zmieniając ich „płynność” i architektoniczne uporządkowanie, powodują przejście podwójnej warstwy lipidowej w żel [12]. Zmiana potencjału błonowego mitochondrium, zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej bądź zmiana jej struktury są sygnałami indukującymi mitochondrialny szlak apoptozy, któremu przypisuje się jedną z głównych ról [13]. Alkohol etylowy w dużych stężeniach oraz nadużywany przewlekle wywala reakcję zapalną. W reakcji tej biorą udział zaaktywowane komórki immunokompetentne. Poprzez HLA klasy II prezentowane są antygeny i uwalniane substancje cytolityczne. Granzymy i perforyny uwalniane z komórek nacieku zapalnego indukują bezpośrednio proces apoptozy. Ponadto w reakcji zapalnej dochodzi do wzmożonej prezentacji receptorów nadrodziny TNF w tym receptora Fas. Kluczową rolę w indukowanym alkoholem etylowym procesie apoptozy przypisuje się mechanizmowi receptorowemu [4, 5].

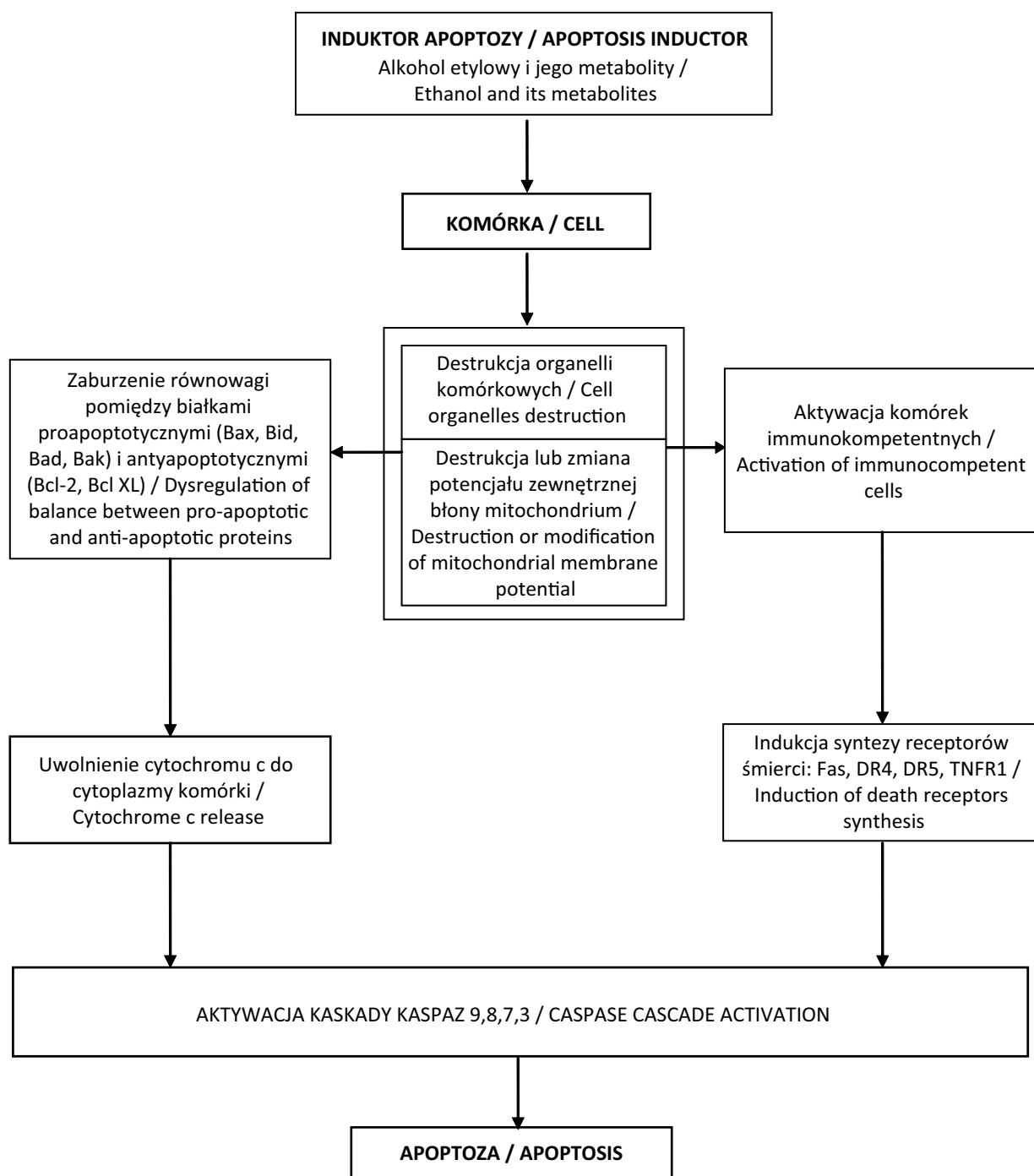
Toksyczne działanie alkoholu etylowego na wątrobę było szeroko opisywane zarówno

w badaniach na modelu zwierzęcym, jak i na ludziach [13, 14, 15]. Apoptoza hepatocytów oceniana była w badaniach klinicznych, a także eksperymentalnych w zależnych od etanolu chorobach wątroby [15, 16]. Alkohol etylowy w dużych dawkach indukuje śmierć hepatocyta na drodze nekrozy i apoptozy, natomiast w małych stężeniach spożywanych przewlekłe aktywuje

Fas zależny proces apoptozy [17, 18]. Etanol powodował doświadczalnie produkcję cytokin jak TNF α , pojawienie się stresu oksydacyjnego, ekspresję receptorów Fas oraz uwolnienie cytochromu c z mitochondriów hepatocyta [13]. Doświadczenia na modelu zwierzęcym pozwoliły na przypisanie głównej roli Fas zależnemu szlakowi apoptotycznej śmierci komórek wątro-

Ryc. 1. Szlaki apoptozy indukowanej alkoholem.

Fig. 1. Pathways of apoptosis induced by alcohol.



by [4]. Eksperymentalnie udowodniono również, iż etanol zwiększa ilość receptorów TNFR1 dla TNF α w wątrobie, jelicie i kardiomiocytach indukując zależną od domen śmierci i kaspaz śmierć komórek [19]. Badania nad wpływem małych stężeń alkoholu etylowego na komórki nowotworowe wątroby dowiodły jego leczniczego wpływu. Alkohol aktywował proces apoptozy komórek nowotworowych wątroby na drodze receptorowej [17, 18].

Ekspresji receptorów Fas (Apo-1, CD95) przypisuje się również główną rolę w neuroapoptozie. Badania na modelach zwierzęcych dowiodły, iż ekspozycja płodów szczurzych w czasie rozwoju i kształtowania układu nerwowego, w tym narządu wzroku na etanol powodowała aktywację apoptozy i skutkowała znaczną utratą liczby neuronów, deficytami neurologicznymi, a także zaburzeniami behawioralnymi w późniejszym życiu [20, 21, 22]. W okresie synaptogenezy etanol indukuje proces apoptozy również na drodze wewnątrzkomórkowej zależnej od białek proapoptycznych rodziny Bcl-2, w tym Bax aktywującego kaspazę 3 [23]. Wewnątrzkomórkowy, mitochondrialny mechanizm inicjujący proces zaprogramowanej śmierci kardiomiocytów opisano u osób długoterminowo nadużywających alkoholu. Ekspozycja na alkohol etylowy powodowała zmiany w potencjale i przepuszczalności błony mitochondrialnej, skutkujące uwolnieniem cytochromu c i aktywacją kaspaz efektorowych w tym kaspazy 3 [24, 25]. Aktualnie coraz większą rolę przypisuje się procesowi apoptotycznej śmierci kardiomiocytów w kardiomiopatii alkoholowej [26]. Częstszą zapadalność na infekcje, u osób nadużywających alkoholu, tłumaczy się znacznym obniżeniem komórek fagocytycznych, makrofagów i limfocytów T. Etanol indukuje receptorowy proces apoptozy makrofagów i zależny od cytochromu c proces śmierci limfocytów T. Obniżenie liczby tych komórek powoduje osłabienie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, czym tłumaczy się zwiększoną zapadalność na infekcje u osób nadużywających przewlekle alkoholu [27, 28].

PODSUMOWANIE

Alkohol etylowy jest istotnym czynnikiem indukującym wewnątrz- i zewnątrzkomórkowy proces zaprogramowanej śmierci komórek. Zarówno proces zewnątrzkomórkowy zależny od receptorów śmierci, jak i wewnątrzkomórkowy związany z uwolnieniem cytochromu c w przypadkach ekspozycji na alkohol etylowy

pozostaje wciąż w świetle badań naukowych i nie został jeszcze dostatecznie poznany. Badania eksperymentalne wykazały, że w zależności od stężenia i czasu ekspozycji na etanol indukował się proces apoptozy komórek, jak i ich nekrotycznej śmierci. Oba rodzaje śmierci leżały u podłoża dysfunkcji wielu narządów wewnętrznych, jak wątroba, serce, mózg. Aktualnie trwają próby wykorzystania niskich stężeń etanolu do indukcji apoptozy komórek nowotworowych wątroby i komórek białaczkowych [29, 30]. W literaturze medycznej szeroko opisywano również próby wykorzystania procesu zaprogramowanej śmierci w diagnostyce nagłych zgonów sercowych i zawału mięśnia sercowego [31, 32]. Apoptoza stanowi ważny element patogenetyczny wielu chorób i zatruc. Proces śmierci komórek jest niezwykle istotny z punktu widzenia diagnostyczno-terapeutycznego. Postęp wiedzy na temat wpływu alkoholu na struktury komórkowe daje nadzieję na odkrycie skutecznego sposobu ingerencji w proces apoptozy i tym samym ograniczenie destrukcji narządów wewnętrznych.

PIŚMIENNICTWO

1. 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, 26, 239.
2. Peter M. E., Heufelder A. E., Hengartner M. O.: Advance in apoptosis research. *PNAS* 1997, 94, 12736.
3. Gołąb J., Jakubisiak M., Lasek W., Stokłosa T.: *Immunologia*. PWN 2009, 15, 242-249.
4. Zhou Z., Sun X., Kang Y. J.: Ethanol induced apoptosis in mouse liver: Fas – and cytochrom c – mediated caspase – 3 activation pathway. *Am. J. Pathol.* 2001, 159, 329-338.
5. Lambert J. C., Zhou Z., Kang Y. J.: Suppression of Fas-mediated signaling pathways is involved in zinc inhibition of ethanol induced liver apoptosis. *Exp. Biol. Med.* 2003, 228, 406-412.
6. Mathurin P., Deltenre P.: Effect of binge drinking on the liver: an alarming public health issue? *BMJ* 2009, 58, 613-617.
7. Zhou Z., Wang L., Song Z., Lambert J. C., McClain C. J., Kang Y. J.: A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol -induced hepatic TNF -alpha production. *Am J Pathol.* 2003, 163, 1137-1146.
8. Ibrahim S. M., Ringel J., Schmidt C.: Pancreatic adenocarcinoma cell lines shown

variable susceptibility to TRAIL – mediated cell death. *Pancreas* 2001, 23, 72.

9. Shimizu S., Konishi A., Kodama T., Tsujimoto Y.: BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *PNAS* 2000, 97, 7, 3100.

10. Zhang H., Xu Q., Krajewski S. i wsp.: BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *PNAS* 2000, 97, 6, 2597.

11. Shimizu S., Konishi A., Kodama T., Tsujimoto Y.: BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *PNAS*, 2000, 97, 7, 3100-3103.

12. Lieber C. S.: Alcohol and liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic disease. *Mount Sinai J Med*, 2000, 67, 84-94.

13. Hoek J. B., Pastorino J. G.: Ethanol, oxidative stress and cytokine – induced liver cell injury. *Alcohol*, 2002, 27, 63-68.

14. Jaeschke H., Gores G. J., Cederbaum A.: I et al. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci*, 2002, 65, 166-176.

15. Lieber C. S.: Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy. *Path. Biol*, 2001, 49, 738-752.

16. Zhou Z., Liu J., Song Z., McClain C. J., Kang J.: Zinc supplementation inhibits hepatic apoptosis in mice subjected to a long-term ethanol exposure. *Sci, Exp Biol Med*. 2008, 2, 540-548.

17. Castaneda F., Kinne K. H.: Apoptosis induced in HepG2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the Fas - receptor pathway. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol*. 2001, 127, 418-424.

18. Castaneda F., Rosin-Steiner S.: Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: Role various signal transductions pathways. *Int. J. Med. Sci*. 2006, 3, 160-167.

19. Rodriguez D. A., Moncada C., Nunez M. T., Lavandero S., Ponnappa B. C., Israel Y.: Ethanol increases tumor necrosis factor -alpha receptor-1 (TNFR1) levels in hepatic, intestinal, cardiac cells. *Alcohol*. 2004, 33, 1, 9-15.

20. Cheema Z. F., West J. R., Miranda R. C.: Ethanol induces [Fas/Apo -1] apoptosis, mRNA and cell suicide in the developing cerebral

cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2000, 24 (4), 535-543.

21. Hwang D. W., Givens B., Niwshijima I.: Ethanol-induced developmental neurodegeneration in secretin receptor-deficient mice. *Neuroreport*. 2009, 6; 20, 7, 698-701.

22. Cudd T.: A. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp. Biol. Med.* 2005, 230, 389-393.

23. Nowoslawski L., Klocke B. J., Roth K. A.: Molecular regulation of acute ethanol – induced neuron apoptosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005, 64, 6, 490-497.

24. Hajnoczky G., Buzas Ch. J., Pacher P., Hoek J. B., Rubin E.: Alcohol and mitochondria in cardiac apoptosis: Mechanisms and visualization. *Alcoholism, Clin. Exp. Res.* 2005, 29, 5, 693-701.

25. Guan Z., Lui C. Y., Morkin E., Bahl J. J.: Oxidative stress and apoptosis in cardiomyocyte induced by high -dose alcohol. *J. Cardiovasc. Pharm.* 2004, 44, 6, 696-702.

26. Fernandez-Sola J., Fatjo F., Sacanella E., Estruch R., Bosch X., Urbano-Marquez A., Nicolas J. M.: Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. *Elsevier*. 2006, 37, 8, 1100-1111.

27. Singhal P. C., Reddy K., Ding G., Kapasi A., Franki N. et al.: Ethanol induced macrophage apoptosis. The role of TGF β . *Am. Asc. Immunol.* 1999, 54, 3031-3036.

28. Kapasi A. A., Patel G., Goenka A., Nahar N., Modi N., Bhaskaran M., Reddy K. et al.: Ethanol promotes T cell apoptosis through the mitochondrial pathway. *Immunol.* 2003, 108, 313-320.

29. Holownia A., Ledig M., Menez J. F.: Ethanol-induced cell death in cultured rat astroglia. *Neurotoxicol. Teratol.* 1997, 19, 2, 141-146.

30. Annayya R. A., Baker R.: Ethanol – induced apoptosis in human HL-60 cells. *Life Sci.* 1997, 61, 23, 2345-2350.

31. Rzepecka-Woźniak E., Próchnicka B., Trela F.: Apoptoza kardiomiocytów w diagnostyce immunohistochemicznej nagłych zgonów sercowych. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2003, 53, 2, 109-115.

32. Rzepecka-Woźniak E.: Diagnostyka immunohistochemiczna wczesnego zawału mięśnia sercowego dla celów pośmiertnego badania sądowo-lekarskiego. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2008, 58, 1, 5-16.