

Morfološke spremembe med apoptozo Morphological changes of apoptosis

Draga Štiblar Martinčič*

Ključne besede
apoptoza – morfologija, fiziologija
imunohistološke metode

Key words
apoptosis – morphology, physiology
immunohistochemical methods

Izvleček. Apoptoza, imenovana tudi programirana celična smrt, je ena od oblik celične smrti, ki ima odločilno vlogo v homeostazi tkiv. Poleg tega pa je vpletena tudi v številna patološka stanja, kot so tumorji, avtoimunske bolezni in virusne okužbe. Morfološke spremembe apoptoze so skrčenje celice, zgostitev jedrnega kromatina in oblikovanje apoptotskih telesc. Apoptoza je genetsko nadzorovan proces celične smrti, katerega biokemično ozadje je delovanje različnih encimov, od endonukleaz, ki cepijo jedro DNA, do transglutaminaz, ki so odgovorne za oblikovanje apoptotskih telesc. Apoptoza predstavlja v večceličnih organizmih čist in zadosten mehanizem za odstranjevanje nezaželenih celic, ki so ali nastale v višku, bile poškodovane, ali katerih naloge niso več potrebne.

Abstract. Apoptosis, named as programmed cell death, represents one form of cell death and has a crucial role in the tissue homeostasis. Besides this, apoptosis is involved in a number of pathological conditions, such as cancer, autoimmune diseases and viral infections. Morphological characteristics of apoptosis are cell shrinkage, nuclear chromatin condensation and formation of apoptotic bodies. Apoptosis is genetically regulated process of cell death with biochemical feature of enzymes activation, involving cleavage of nuclear DNA by endonuclease and responsibility of transglutaminase for formation of apoptotic bodies. In multicellular organisms apoptosis serves as a clean and efficient mechanism for the elimination of unwanted cells, that may have been produced in excess, which have been damaged or whose function is no longer required.

Uvod

Obstoj večceličnih organizmov, kot tudi človeka, ni odvisen samo od sposobnosti organizma, da tvori nove celice z mitozo, ampak tudi od sposobnosti, da se celice same uničijo z apoptozo, ko za to nastopijo določene okoliščine. Apoptoza je eden od osnovnih procesov v razvoju celice in predstavlja eno od oblik celične smrti. Apoptozo imenujejo tudi programirana celična smrt, ker celica umre na kontroliran način, saj pri tem sledi nekemu notranjemu programu.

Leta 1972 je izraz apoptoza uvedel Kerr (1), prvi pa je naravno celično smrt s fragmentacijo DNA opisal Bessis leta 1955 (2). Beseda apoptoza je grškega izvora in pomeni odpadati, v literarnem smislu pa predstavlja odpadanje listja.

Apoptoza je v bistvu fiziološka smrt celice. Njena vloga je pomembna tako v procesu razvoja zarodka kot tudi v obdobju po končani organogenezi. Pojavlja se neprestano v počasi proliferirajoči celični populaciji, kot sta prostata in skorja nadledvične žleze, in v hitro proliferirajoči celični populaciji, kot je epitelij črevesnih resic in diferencirani sper-

*Doc. dr. Draga Štiblar Martinčič, dr. stom., Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

matogoniji. Posebno pomembna je vloga apoptoze v imunskem sistemu, kjer je odgovorna npr. za selekcijo limfocitov B v reakcijskih središčih pri humoralnem imunskem odzivu (2).

Apoptoza – nekroza

Morfološko razlikujemo dve osnovni celični smrti: nekrozo in apoptozo. Za nekrozo je značilna smrt tkiva z vnetno reakcijo in kemotakso makrofagov. Morfološke spremembe pri apoptotski obliki celične smrti se razlikujejo od morfoloških sprememb pri nekrozi. Jedro nekrotične celice ne razpade v z membrano obdane delce. Pri nekrozi celica hitro nabrekne, membrane se poškodujejo in celična vsebina se izlije v izvencelični prostor. Posledica je vnetna reakcija. Apoptoza zajame posamezne celice v določenem predelu brez vnetne reakcije, nekroza pa skupine celic (3). Vpletenost skupine bližnjih, sosednjih celic in prisotnost vnetnega eksudata so dodatni dokazi celične smrti v obliki nekroze.

Morfologija apoptotske celice

Morfološke spremembe v apoptotski celici zajemajo naslednje osnovne faze:

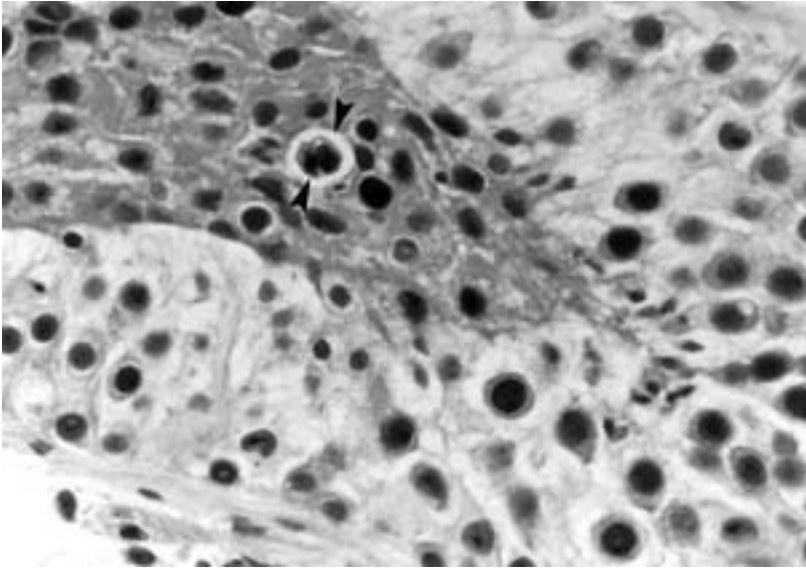
- skrčenje celice: citoplazma se zgosti, citoplazmatski organeli se stisnejo, ostanejo pa nepoškodovani; ker se celica zmanjša, izgubi stik s sosednjimi celicami in se od njih oddvoji;
- zgostitev kromatina: kromatin se zgosti pod jedrno membrano v dobro razpoznavno gosto maso različnih oblik in velikosti. To je najznačilnejša sprememba v apoptotski celici;
- oblikovanje citoplazmatskih brstičev in apoptotskih telesc: apoptotska celica razpade v z membrano obdana apoptotska telesca, ki vsebujejo citoplazmo, in tesno se prilegajoče citoplazmatske organele z jedrnimi fragmenti ali brez njih;
- fagocitoza apoptotskih telesc: fagocitirajo jih sosednje, zdrave celice, ki so ali parenhimske ali makrofagi. Apoptotska telesca se hitro razgradijo znotraj lizosomov, sosednja normalna celica pa izpolni izpraznjen prostor propadle celice.

Svetlobnomikroskopska raven

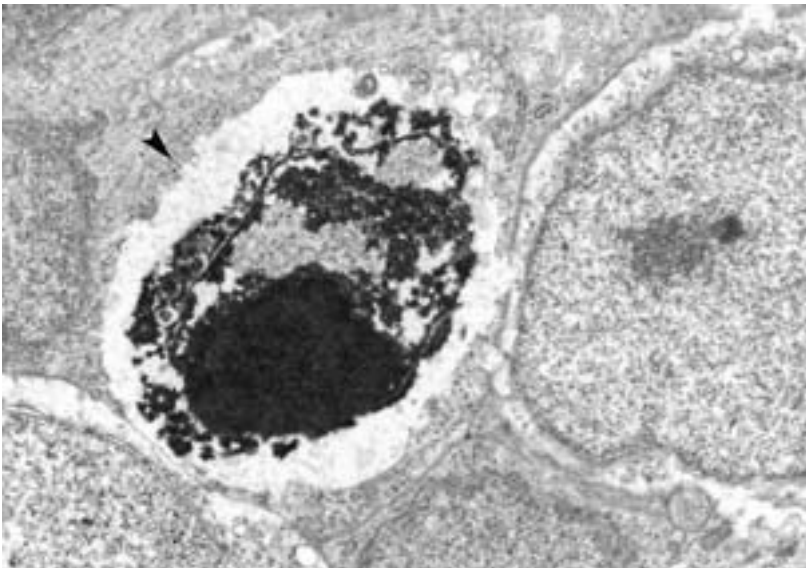
V tkivnem vzorcu ležijo apoptotske celice posamezno ali v manjših skupkah. Po barvanju s hematoksilinom in eozinom predstavljajo apoptotske celice okrogle ali ovalne mase z intenzivno eozinofilno citoplazmo in gostimi drobcji kromatina. Apoptotske celice so odmaknjene od svoje okolice, kar je vidno kot svetel pas, ki jih obdaja (slika 1).

Elektronmikroskopska raven

Najzgodnejša morfološko prepoznavna sprememba apoptoze je zgostitev in razporeditev jedrnega kromatina na periferijo jedra (4). Kromatin se oblikuje v ostro ločeno drobno zrnato maso, ki se zbira ob robu jedrne ovojnice (slika 2). Istočasno se začne zgoščevati citoplazma. Napredovanje apoptotskega procesa spremljata gubanje celice in oblikovanje brstičev. Sledi razpad celice v apoptotska telesca, ki so obdana z dobro ohranjeno notranjo in zunanjo membrano. Velikost in sestava apoptotskih telesc znatno variirata; številna telesca vsebujejo več jedrnih fragmentov, medtem ko jih nekatera



Slika 1. Apoptotska celica (puščica) v semenskem epiteliju človeškega moda (barvanje: hematoksilin-eozin, 40-kratna povečava objektivna).



Slika 2. Apoptotska celica (puščica) v čutnem epiteliju miške mrežnice (elektronmikroskopsko fotografijo je naredila M. Kralj na Inštitutu za biologijo celice MF, 10.000-kratna povečava).

nimajo. Velikost apoptotskih telesc je prav tako odvisna od tipa celice. Pri celicah z velikim razmerjem med jedrom in citoplazmo, npr. pri limfocitih, so apoptotska telesca relativno majhna (3).

Mehanizem apoptoze

Proučevanje mehanizmov in dogajanj v celici, ki je v procesu apoptoze, je težko predvsem zaradi tega, ker proces prizadene posamezne celice in ker je sam potek apoptoze zelo kratkotrajen. Od skrčenja celice do fagocitoze naj bi preteklo manj kot 30 minut (3).

Zgostitev kromatina je povezana s cepljenjem jedrne DNA v predelu vrzeli med nukleosomi. Pri tem nastanejo številni fragmenti, sestavljeni iz 180 do 200 baznih parov. Za internukleosomsko fragmentacijo DNA so odgovorne endonukleaze (5). Encim je v nekaterih vrstah celic stalno prisoten (npr. v timocitih), aktivira pa se s povišanjem koncentracije kalcija v citosolu (6). Celice, ki nimajo endonukleaze, jo dobijo s transkripcijo pred začetkom apoptoze.

Spremembo velikosti celice in oblike pripisujejo aktiviranju transglutaminaz. Fesus in sodelavci (7) poročajo o porastu koncentracije encima transglutaminaze v celici, ki gre v apoptozo. Visoko koncentracijo tega encima so našli tudi v apoptotskih telescih (8). Delovanje transglutaminaz naj bi vodilo v tvorbo križnih vezi med beljakovinami v citoplazmi in v oblikovanje trdnega ščita znotraj apoptotskih telesc. S tem naj bi bilo preprečeno uhajanje celične vsebine v izvencelični prostor. V različnih tipih celic so pri povišani aktivnosti transglutaminaz dokazali tudi povišano raven ustrezne mRNA (7).

Pri tvorbi citoplazmatskih brstičev sodelujejo mikrotubuli citoskeleta, predvsem aktin in β -tubulin (4, 9). Pri celici, ki gre v apoptozo, so odkrili povečano količino mRNA za β -tubulin pred razvojem morfoloških sprememb in pojavom fragmentacije DNA. V kasnejših fazah apoptoze se povečuje količina β -tubulina v citoplazmi (9).

Fagocitoza apoptotskih celic z makrofagi ali drugimi celicami je posredovana preko receptorjev, ki apoptotsko celico vežejo nase in jo nato fagocitirajo. Tak receptor na površini makrofagov je npr. vitronektin, ki je β_3 -integrin in posreduje fagocitozo apoptotskih celic nevtrofilcem (10). Hitra fagocitoza apoptotskih telesc, preden se le-ta razkrojijo, je pomembna pri preprečevanju vnetja in poškodb v tkivu, v katerem apoptoza poteka, posebno, če je proces nastal zaradi fizioloških pogojev.

Metode za prikaz apoptoze

Svetlobna in elektronska mikroskopija omogočata prepoznavanje morfoloških sprememb apoptoze. Spremembe na molekularni ravni pa nam razkrijejo biokemične metode.

Fragmentacijo DNA v apoptotski celici lahko prikažemo z elektroforezo in pretočno citometrijo. Pri elektroforezi dobimo značilno sliko lestve DNA v agaroznem gelu, pretočna citometrija pa nam odkrije z biotiniziranimi nukleotidi označene fragmente DNA.

Pri proučevanju apoptoze celic je pomembna prepoznavna in lokalizacija teh celic v tkivnem vzorcu, česar pa zgoraj omenjeni metodi ne omogočata. Metode za prikaz apoptotskih

celic ne smejo poškodovati morfologije tkiva, biti morajo zanesljive in dovolj enostavne, da jih lahko uporabljajo v rutinskih histoloških laboratorijih na klasičnih v formalinu fiksiranih in v parafin vklopljenih tkivnih vzorcih. Vse to pa omogočata metodi ISEL in TUNEL.

Metoda ISEL (iz angl. *in situ end labeling*) omogoča prikaz apoptotskih celic v fazi fragmentacije DNA v histoloških rezinah. Vezava z biotinom označenih nukleotidov na fragmente DNA (nukleosome) poteka s pomočjo DNA-polimeraze. Zaključek metode je imunohistokemični prikaz označenih koncev nukleosomalnih fragmentov.

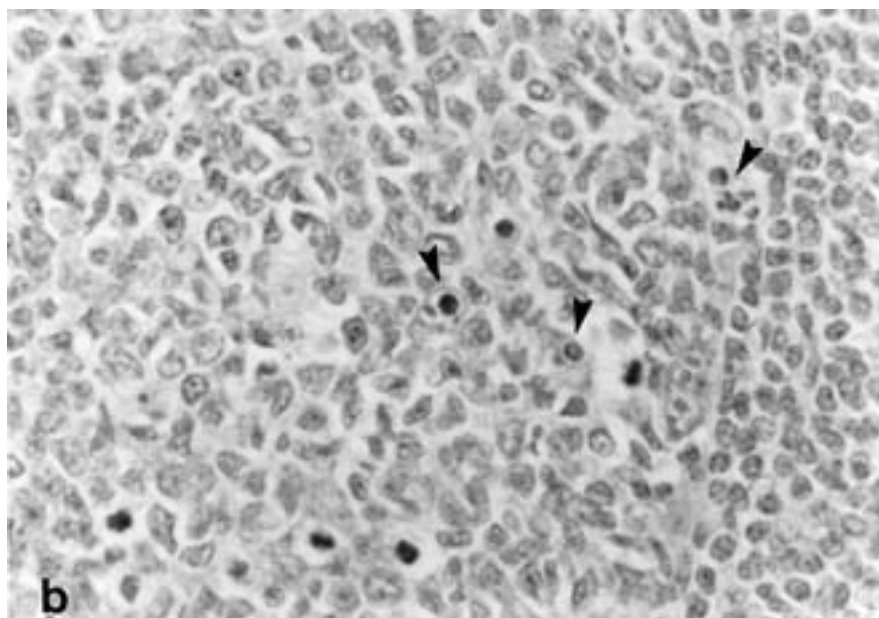
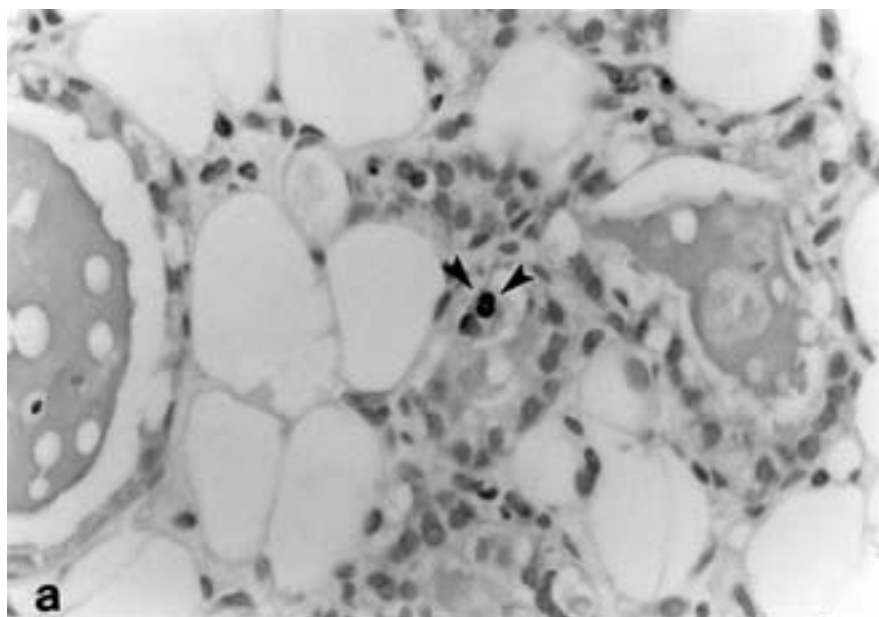
Metoda TUNEL (iz angl. *terminal-deoksinukleotidil-transferaze mediated d-UTP – biotin nick end labeling*) prav tako omogoča prikaz apoptotskih celic v fazi fragmentacije DNA v histoloških rezinah. Vezava z digoksinom označenih nukleotidov na proste 3'-konce DNA (konci DNA, ki nastanejo med fragmentacijo DNA v apoptotskem procesu) poteka s pomočjo encima terminal deoksinukleotidil transferaze (TdT). Zaključek metode je imunohistokemični prikaz označenih koncev nukleosomalnih fragmentov s peroksidazno reakcijo. Tehnika je dovolj občutljiva, da odkrije fragmente DNA, ki spremljajo zgodnjo fazo zgostitve kromatina, in je zato uporabna za odkrivanje celic v zgodnji fazi apoptoze. Metodo smo vpeljali na Inštitutu za histologijo in embriologijo na različnih tkivih (slika 3).

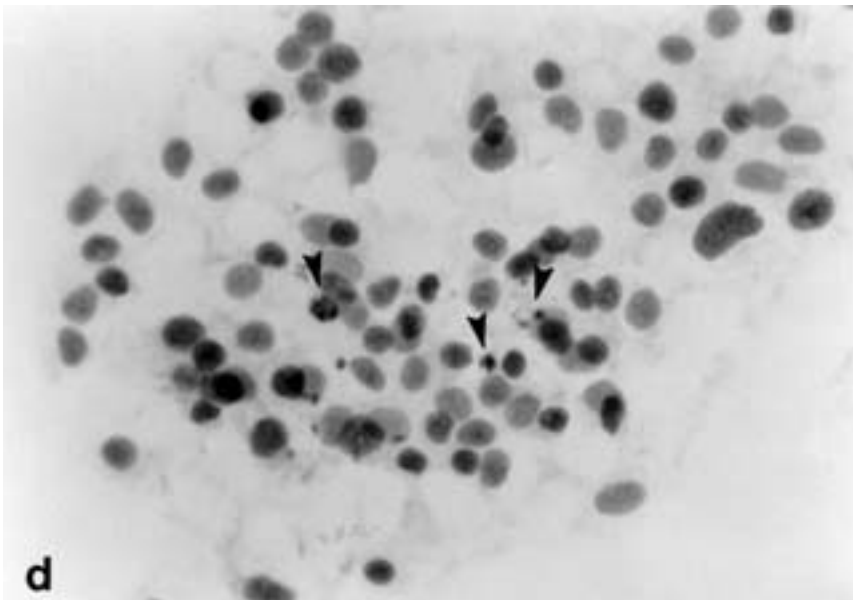
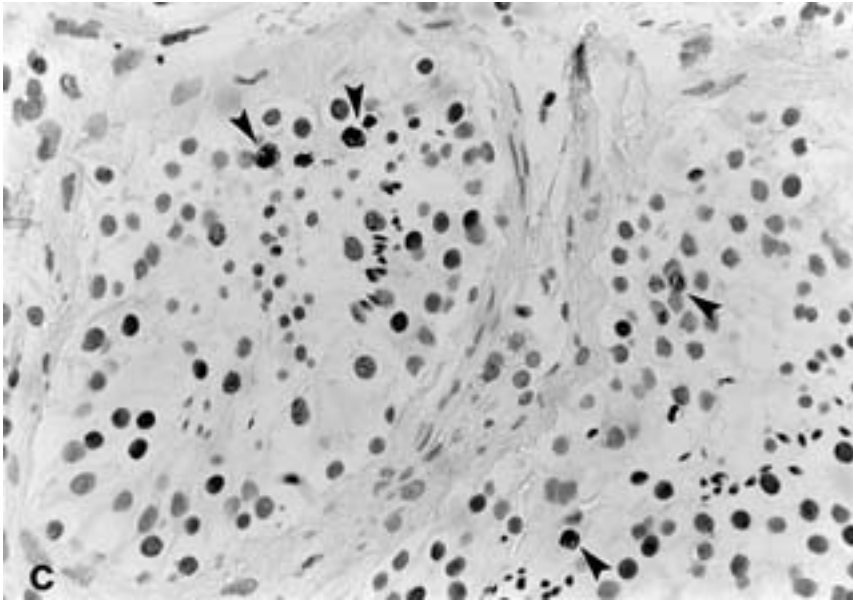
S številom apoptotskih celic lahko proučujemo dinamiko apoptotskega procesa v tkivu. Štetje lahko izvedemo na tri načine: z ugotavljanjem števila celic na površini tkivnega vzorca, z določanjem odstotka apoptotskih celic (to je tako imenovani apoptotski indeks) ali z ugotavljanjem števila apoptotskih celic na površini jedrnega vzorca. V mnogih patoloških procesih, npr. pri tumorjih, lahko predstavlja izračunan apoptotski indeks klinično pomemben parameter. Apoptoza v tumorjih je povečana po obsevanju in imunskem zdravljenju (11). Poznavanje dinamike apoptotskega procesa s pomočjo apoptotskega indeksa je lahko pomemben pokazatelj uspešnosti zdravljenja.

Sklep

Apoptozo opisujejo kot samomor celice, za katerega je značilna vrsta morfoloških in biokemičnih sprememb. Smrt celice je lahko posledica fizioloških procesov (npr. zmanjšanje števila žleznih celic v mlečni žlezi po končani laktaciji) ali pa nastopi kot odgovor na različne škodljivosti, povzročene z nefiziološkimi procesi (npr. ionizirajoče sevanje).

Poglavitna dogajanja, ki vodijo v apoptozo, so fragmentacija DNA, zgozstitev jedrnega kromatina in tvorba citoplazmatskih brstičev. Ostanke odmrle celice se hitro odstranijo s fagocitozo sosednjih celic brez vnetnega odgovora. Ker apoptoza zahteva energijo v obliki ATP in pogosto tudi sintezo novih beljakovin, predstavlja aktivno obliko celične smrti. Zato služi apoptoza v večceličnih organizmih kot čist in zadosten mehanizem za odstranjevanje nezaželenih celic, ki so nastale v višku, bile poškodovane, ali njihove naloge niso več potrebne.





Slika 3. Z metodo TUNEL prikazane apoptotske celice (puščice) v mlečni žlezi (a), nebnici (b), modu (c) in celični kulturi (d) (40-kratna povečava objektiva).

Literatura

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon in wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J Cancer* 1972; 26: 239–57.
2. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3–15.
3. Verhaegen S. Microscopical study of cell death via apoptosis. *Eur Microscop Analysis* 1998; 31–3.
4. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. *Cancer* 1994; 73/8: 2013–26.
5. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136/3: 593–608.
6. Cör A, Pajer Z. Apoptoza – programirana celična smrt in tumorji. *Zdrav Vestn* 1994; 63: 521–4.
7. Fesus L, Davies PJA, Piacentini M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 1991; 56: 170–7.
8. Piacentini M, Autuori F, Dini L, et al. Tissue transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cell undergoing apoptosis upon epidermal growth factor-stimulation. *Cell Tissue Res* 1991; 263: 227–35.
9. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell* 1995; 82: 349–52.
10. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders, 1994: 1–33.
11. Ross DW. Apoptosis. *Arch Pathol Lab* 1997; 121: 83.

Prispelo 16. 2. 1998