



Apoptoza – mechanizmy molekularne procesu i wybrane metody wykrywania w aspekcie biologii rozrodu

Monika Trzcińska

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,
Balice k. Krakowa

Apoptosis – molecular mechanism of the process and selected detection methods in biology of reproduction

Summary

Many research centres around the world are involved in apoptosis studies. This physiological cell death, also known as programmed cell death, takes place during the entire growth period of an organism. As a result, an organism removes unnecessary cells during the differentiation of tissues and organs and eliminates damaged or mutated cells. This paper is focused on the molecular mechanisms behind this process and describes selected detection methods.

Key words:

apoptosis, molecular aspects, detection methods.

Adres do korespondencji

Monika Trzcińska,
Zakład Fizjologii Rozrodu
Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
ul. Krakowska 1,
32-083 Balice k. Krakowa;
e-mail:
mcala@izoo.krakow.pl

1. Wprowadzenie

Od wielu lat apoptoza budzi szczególne zainteresowanie przedstawicieli różnych dziedzin nauk biologicznych. Przyczyniła się do tego świadomość, że zjawisko to – niezależnie czy występuje fizjologicznie czy jako objaw patologii – jest aktywnym i podlegającym regulacji rodzajem śmierci komórki. Namnażanie i różnicowanie komórek, oraz proces ich obumierania jest regulowany przede wszystkim przez gospodarkę hormonalną ustroju, dostępność czynników wzrostowych i substancji odżyw-

czych. W każdym żywym organizmie o liczbie komórek decyduje równowaga, pomiędzy ich proliferacją i śmiercią. Równowaga ta niezbędna jest do prawidłowego funkcjonowania całego organizmu, a jej zachwianie prowadzi do zjawisk patologicznych. Istotne znaczenie ma tutaj mechanizm, który w naturalny sposób równoważy proliferację komórek zachodzący na drodze mitozy; proces który eliminuje komórki zbędne lub zmienione patologicznie, czyli zjawisko apoptozy.

Mechanizmy regulujące ten proces są przedmiotem wielu prac przeglądowych i doświadczalnych. Badania dotyczące apoptozy przeprowadzone w ciągu ostatnich lat koncentrują się głównie na aspektach molekularnych, oraz opracowaniu metod wykrywania tego zjawiska w jak najwcześniejszych stadiach. Pogłębienie wiedzy na temat śmierci komórki na poziomie molekularnym pozwoli bowiem lepiej poznać mechanizmy sterujące rozwojem poszczególnych narządów w wymiarze fizjologicznym i patologicznym.

Apoptoza jest bardzo ważnym procesem komórkowym; równie istotnym jak namnażanie się komórek. Fizjologiczna śmierć jest naturalnym regulatorem nie tylko w rozwijającym się, ale i w dojrzałym organizmie. Istnieje wiele przykładów apoptozy w rozwoju osobniczym m.in. w trakcie kształtowania jelit, rozwoju kończyn, chrząstek i kości, zrastania się podniebienia. Zjawisko to jest szczególnie nasilone w tkankach stale produkujących nowe komórki m.in. podczas rozwoju ośrodkowego układu nerwowego powstaje znacznie więcej neuronów niż będzie wykorzystywanych. Tylko te neurony, które tworzą kompetentne połączenia z innymi neuronami przeżywają, a wszystkie inne ulegają śmierci apoptotycznej (1). Znaczącą rolę pełni jednak apoptoza w eliminacji komórek uszkodzonych i zmutowanych. Komórki z uszkodzonym DNA ulegają zatrzymaniu w fazie G_1 i jeśli nie zostanie usunięty defekt genetyczny, włączają program samounicestwienia. Komórki nie wchodzące w fazę S nie mogą kontynuować cyklu, co indukuje ich proces apoptozy. Modulowanie skłonności komórki do ulegania apoptozie wzbudza zatem zainteresowanie onkologów. Poprzez mechanizmy regulujące apoptozą podejmuje się próby zmiany wrażliwości nowotworów na leki przeciwnowotworowe. Regresja wielu guzów nowotworowych zachodzi w mechanizmie apoptozy, jej selektywna indukcja w komórkach nowotworowych może stać się metodą leczenia nowotworów. Proces ten ma duże znaczenie w immunologii zwłaszcza w odniesieniu do prób wykorzystania apoptozy limfocytów, jako wskaźnika progresji AIDS.

Zjawisko apoptozy może mieć też, jak się wydaje, ogromne znaczenie w biologii rozrodu. O prawidłowej czynności jajnika w okresie reprodukcyjnym samicy decydują zarówno procesy związane z proliferacją jak i apoptozą. Zachwianie równowagi między tymi procesami doprowadzić może do przerostu komórek. Dokładne poznanie mechanizmu śmierci może ułatwić leczenie, np. torbieli jajnikowych.

Obecnie obserwuje się szybki rozwój badań nad klonowaniem, dziedziną biotechnologii umożliwiającą reprodukcję zwierząt metodami pozapłciowymi. Największe zainteresowanie budzi metoda klonowania za pomocą transplantacji jąder komórkowych (klonowanie somatyczne). W pracach nad klonowaniem transgenicznych

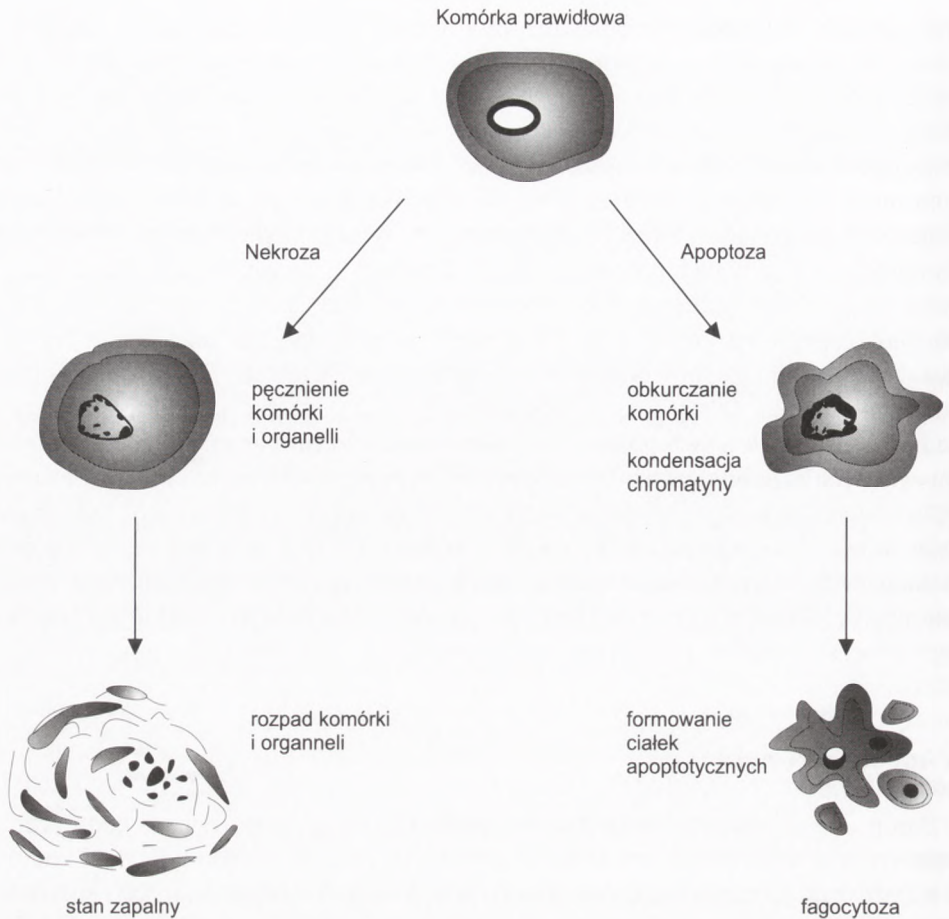
nych jagniąt po użyciu fibroblastów płodowych, jako dawców jąder, uzyskano 6,1-21,4% zarodków w stadium moruli lub blastocysty, oraz zaledwie 0,89-2,25% urodzonych jagniąt (2). Nieco wyższe wyniki uzyskano u kóz, bo aż od 34,8 do 56,4% dzielących się zarodków (3). Przypuszcza się, że do tak wysokiego, przekraczającego z reguły 50%, stopnia zamierania zarodków we wczesnych stadiach rozwoju może przyczyniać się występowanie zjawiska apoptozy w hodowlach *in vitro* komórek-dawców jąder. Można przypuszczać, że zalecana synchronizacja cyklu tych komórek indukuje w nich proces apoptozy. Komórki w początkowych stadiach apoptozy mogą ulegać jednemu, lub kilku podziałom w związku z czym są trudne do morfologicznego rozpoznania (4). Takie komórki mogą być użyte do fuzji z enukleowanym oocytem, co spowoduje, że rekonstruowany w ten sposób zarodek nie będzie miał szans na dalszy rozwój wykraczający poza początkowe, kilkukomórkowe stadia. W ostatnich latach pojawiło się wiele prac prezentujących przebieg apoptozy w różnych subpopulacjach komórkowych. Pomimo wnikliwych badań prowadzonych również w naszym ośrodku wiele aspektów apoptozy pozostało jeszcze nie wyjaśnionych. Szczególną uwagę należy poświęcić danym na temat sygnałów uruchamiających program samounicestwienia komórki. Poznanie mechanizmów molekularnych procesu, a co za tym idzie, opracowanie skutecznych metod wykrywania tego procesu znajdzie praktyczne zastosowanie w celach biotechnologicznych.

2. Apoptoza a nekroza

Apoptozę określa się często mianem śmierci fizjologicznej, jest ona genetycznie zaprogramowanym procesem, który charakteryzuje się aktywnym udziałem komórki we własnym unicestwieniu. Apoptoza jest alternatywną formą śmierci w stosunku do przypadkowej destrukcji zwanej nekrozą, która jest procesem biernym, katabolicznym i degradacyjnym (5). Różnice pomiędzy apoptozą a nekrozą przedstawiono na rysunku 1.

Śmierć nekrotyczna następuje, wówczas gdy komórki zostają uszkodzone przez czynniki fizyczne lub chemiczne, które powodują zaburzenia w integralności błony komórkowej. Szybko dochodzi do obrzęku komórki, rozpadu organelli, uszkodzenia błony komórkowej. Zawartość komórki zostaje wyrzucona do przestrzeni pozakomórkowej, niszcząc macierz i uszkodzając sąsiednie komórki. Powstaje ognisko martwicy, do którego napływają granulocyty obojętnochłonne, limfocyty i makrofagi, biorąc udział w procesie zapalnym (6).

Komórki ulegające apoptozie przechodzą charakterystyczny ciąg przemian. Przede wszystkim komórka, u której zostaje uruchomiony program śmierci oddziela się od pozostałych komórek i obkurcza się. Na powierzchni komórki tworzą się liczne drobne, pęcherzykowate uwypuklenia, które pod mikroskopem skaningowym wyglądają jak bąbelki w czasie gotowania (4,7). Przynajmniej w początkowych fazach procesu zachowana jest integralność strukturalna i większość funkcji przez błonę



Rys. 1. Schemat zmian zachodzących podczas śmierci nekrotycznej i apoptotycznej komórek.

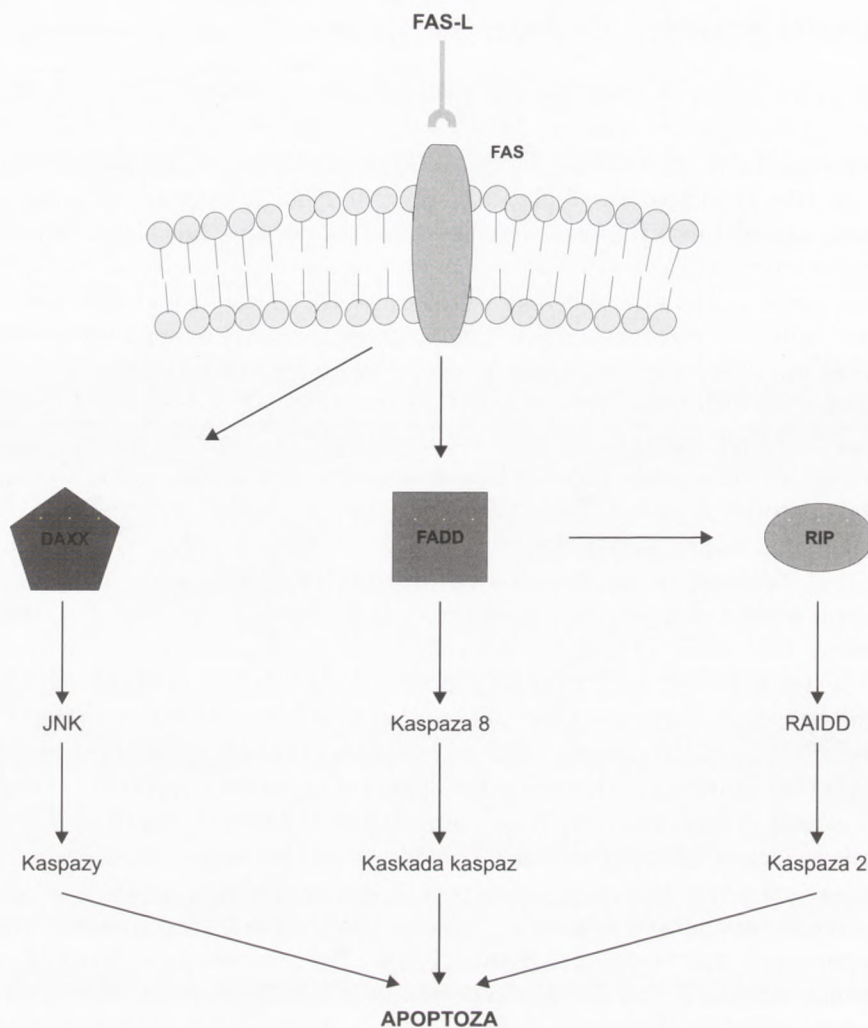
cytoplazmatyczną (5,8). Mimo znacznego spadku potencjału mitochondrialnego organelle komórkowe pozostają nieuszkodzone (9). W przypadku śmierci apoptotycznej dominują zmiany w obrębie jądra komórkowego. Początkowo chromatyna jądrowa ulega zagęszczeniu w pobliżu błony jądrowej, po czym zaczyna wypełniać całe jądro, które staje się pyknotyczne. Następuje fragmentacja DNA, w trawieniu którego biorą udział własne endonukleazy komórki, a w dalszym etapie destrukcji powstają tzw. ciała apoptotyczne, zbudowane z fragmentów jądra i nieuszkodzonych organelli komórkowych, otoczonych szczelnie błoną komórkową (10,11).

3. Czynniki indukujące apoptozę. Molekularny mechanizm apoptozy

Apoptozę wywołuje wiele czynników o efekcie regulacyjnym. Czynniki fizjologiczne występujące w organizmie mogą wywołać lub zahamować apoptozę. Są to przede wszystkim: czynniki uszkodzające DNA, działające przez aktywację genu p53, np. HSP (białka szoku cieplnego), aktynomycyna D, winblastyna. Inną grupę stanowią czynniki uszkodzające wrzeciono podziałowe, np. kolchicina. Silnym induktorem apoptozy są niektóre hormony, np. glikokortykoidy, które wywołują apoptozę w tymocytach, a także cytokiny z rodziny TNF (czynnika martwicy nowotworu). Do czynników cytotoksycznych, indukujących apoptozę, można zaliczyć perforyny oraz granzymy A i B wydzielane przez cytotoksyczne limfocyty T (12,13). Apoptoza może być wzbudzana w hodowlach *in vitro* przez tzw. „głodzenie” komórek – czyli pozbawienie komórki czynników odżywczych, czy wyeliminowanie surowicy z pożywki. Poznano także czynniki farmakologiczne, czy terapeutyczne o charakterze stymulatorów apoptozy. Do induktorów apoptozy należą leki przeciwnowotworowe (antymetabolity, winkrystyna itp.), a także promieniowanie UV i promieniowanie γ (14). Zdolność reakcji komórki na rozmaite czynniki poprzez apoptozę jest procesem wieloetapowym. To różnorodne czynniki indukują „prywatną” – zdaniem Kroemera, fazę śmierci komórek, o przebiegu której decyduje także typ komórek oraz ich stan fizjologiczny. Dalsze fazy apoptozy, wykonawcza (efektorowa) i degradacyjna zależą od aktywacji procesów biochemicznych w komórkach (15).

Modelowy przykład stanowi droga wzbudzania apoptozy w cytotoksycznym limfocycie T. Apoptozę w tych komórkach indukuje m.in. ligand FAS (CD95-L) i uwalniany z komórki czynnik martwicy nowotworu (TNF α i TNF β) (16). Są to białka błonowe, zakotwiczone N-końcem w błonie komórkowej, które mogą być uwalniane z błony działaniem metaloproteinaz i występować jako białka rozpuszczalne, które łączą się z receptorami innych komórek. Cytokina TRAIL (Apo-2L) jest również induktorem apoptozy, strukturalnie pokrewnym FAS-L i TNF. Różnica między tymi ligandami wynika stąd, że białko TRAIL efektywnie niszczy tylko komórki nowotworowe. Apoptoza wywołana przez pobudzenie receptora FAS i TNF-R wykrywalna jest już po kilku godzinach, a przez pobudzenie receptora TRAIL-R1, aktywowanego cytokiną TRAIL, po kilkunastu godzinach.

Receptor FAS (CD95; APO-1) zlokalizowany jest na powierzchni limfocytów B, limfocytów T, a także w komórkach grasicy, wątroby, serca, nerek, na powierzchni nowotworowych komórek limfoidalnych. Receptor TNF-R1 i TNF-R2 występuje równie powszechnie jak receptor FAS, natomiast receptor TRAIL charakteryzuje większość komórek nowotworowych. Receptory z nadrodziny TNF cechuje bogata zawartość cysteiny w zewnątrzkomórkowej części białka, a ich cytoplazmatyczne fragmenty nie mają domen katalitycznych, ich wpływ na białka efektorowe zachodzi przy udziale białek adaptorowych, pośredniczących w przekazywaniu sygnału z receptorów. Po związaniu liganda receptor ulega dimeryzacji i internalizacji do cytoplazmy. Cytoplazmatyczne fragmenty receptorów FAS, TNF, TRAIL-R1 charakteryzu-



Rys. 2. Receptor FAS i białka uczestniczące w przekazywaniu sygnału śmierci apoptycznej.

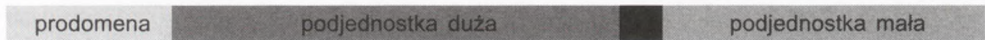
je wysoka homologia funkcjonalna, wynikająca z obecności sekwencji aminokwasowej (80-90 AA) zwanej domeną śmierci (*death domain*, DD). Występowanie domeny śmierci, umożliwia tworzenie kompleksów receptorów oraz wiązanie receptorów z innymi białkami z domeną DD.

Niektóre białka współdziałają z receptorem FAS, jak i TNF-R1 (białka adaptorowe FADD i RIP), lub też wyłącznie z receptorem FAS (białko adaptorowe DAXX). W przekazywaniu sygnału z receptora TRAIL-1 uczestniczą białka TRADD, FADD i RIP. Białko RIP nazywane jest adaptorem II rzędu, ponieważ nie wchodzi w bezpośrednią reak-

cję z receptorami FAS i TNF-R1, lecz z adaptorami FADD i TRADD, a następnie z efektorową kaspazą. W szlaku wykorzystującym adaptor DAXX końcowymi białkami efektorowymi są również kaspazy, lecz do ich aktywacji potrzebne jest działanie kinaz fosforylujących czynniki transkrypcyjne, zwłaszcza kinaz JNK (rys. 2).

Zaktywowane receptory z rodziny TNF, oddziałują poprzez specyficzne białka adaptorowe z proteinazami cysteinowymi z rodziny ICE zwane kaspazami („*caspases*”-*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*). Uważa się, że są centralnym punktem skupiającym różne sygnały apoptotyczne. Kaspazy syntetyzowane są jako nieaktywne proenzymy (zymogeny), składające się z dwóch podjednostek (~20 kDa i ~10 kDa), połączonych krótkim „łącznikiem” oraz z tzw. prodomeny, polipeptydu o różnej długości. Prodomena uczestniczy w dimeryzacji cząsteczek prokaspaz, zostaje następnie odszczepiona podczas aktywacji (17).

↓ łącznik



Schemat budowy kaspaz

Pierwszą kaspazą zidentyfikowaną w komórkach ssaków był enzym konwertujący interleukinę -1b (*interleukin – 1b converting enzyme, ICE*). W dalszych badaniach wykazano obecność wielu kaspaz podobnych do ICE. Wszystkie poznane kaspazy charakteryzują się tym, że przecinają łańcuch białkowy substratu w miejscu obecności w nim kwasu asparaginowego, oraz że same dla siebie są enzymami aktywnymi. W związku z tym, aktywacja jednej z kaspaz może wywołać kaskadową reakcję, podczas której uwalnia się z zymogenów wiele aktywnych kaspaz. Kaspazy niszczą białka enzymatyczne i strukturalne komórki. W większości komórek podczas apoptozy ulegają proteolizie takie białka jak laminy jądrowe, histony, polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP), białka strukturalne, białka decydujące o prawidłowym przebiegu cyklu komórkowego. Degradacja białkowej kinazy DNA i PARP uniemożliwia naprawę uszkodzonego DNA. W ekstraktach z komórek ulegających apoptozie po aktywacji receptorów FAS/TNF-R kaspazy przeprowadziły proteolizę prokaspazy 3, PARP, białka Rel-B, rybonukleoproteiny U1-70 kDa, α -fodryny i lamin. W komórkach Jurkat (*human T-cell leukaemia*) pierwszym proteolizowanym białkiem jest α -fodryna, następnie PARP, U1-70 kDa i lamina B. Zahamowanie aktywności kaspaz przez wirusowe inhibitory, blokuje apoptozę komórek Jurkat wywołaną stymulacją ich receptorów FAS, co zwiększa przeżywalność komórek (18).

Badania nad apoptozą, wykazują, że zasadnicze etapy regulacji tego procesu zachodzą przede wszystkim na poziomie genowym i związane są z regulacyjnym wpływem ekspresji protoonkogenów i genów przeciwnowotworowych. Badania nad molekularnym mechanizmem apoptozy w dużym stopniu opierają się na wiedzy

o budowie nicienia *C. elegans*. Stanowi on bowiem model doświadczalny głównie z powodu szybkiego namnażania się i łatwej analizy genetycznej. W przeprowadzonych badaniach genetycznych wykazano, że apoptoza u *C. elegans* zależy od dwóch genów: *ced-3* i *ced-4*, tzw. „geny śmierci”. Ich unieczynnienie (na przykład przez mutacje) powoduje, że komórki, które normalnie są eliminowane – nie giną. Oba geny pozostają pod kontrolą genu *ced-9*, który koduje białko powodujące zahamowanie procesu apoptozy. Produkt tego genu, białko CED-9 jest główną ochroną przed samobójczą śmiercią komórek (19). Odpowiednikiem genu *ced-9* u ssaków jest gen *bcl-2* (protoonkogen), który jest silnym inhibitorem apoptozy. Obniżenie aktywności tego genu powoduje skierowanie komórki na drogę apoptozy, zaś nadmierna aktywność supresję tego procesu. Białko Bcl-2 hamuje apoptozę wywołaną różnymi czynnikami, a jego obecność stwierdzono również w komórkach rozrodczych ssaków (20). Uważa się, że produkt białkowy tego genu blokuje jeden z krytycznych stopni w przekaznictwie sygnału apoptozy, a mianowicie wpływ jonów wapnia z mobilnej puli zlokalizowanej w siateczce śródplazmatycznej. Uwalniany z siateczki Ca^{2+} uczestniczy w aktywacji dwóch enzymów uczestniczących w procesach dezintegracyjnych: endonukleazy DNA oraz transglutaminazy biorącej udział w tworzeniu ciałek apoptotycznych (21). Znaczenie zależności pomiędzy wewnątrzkomórkowym stężeniem Ca^{2+} a apoptozą komórek ziarnistych opisane są w pracach Pelsuo i Murdoch (22). W wielu przypadkach spadek ilości wolnego wapnia opóźnia rozpoczęcie apoptozy (23). Wykazano jednocześnie, że glikokortykoidy podnoszące poziom wapnia w cytozolu, powodują aktywację kalmoduliny, która z kolei stymuluje endogenne nukleazy, rozkładające DNA.

Na rodzinę białek Bcl-2 składają się zarówno białka stymulujące apoptozę (Bax, Bak, Bcl-X_S, Bok/Mtd) jak i hamujące ten proces (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, NR-13) (24,25). Występują one w błonach siateczki śródplazmatycznej, okołojądrowej oraz mitochondrialnej. Białka te regulują przepuszczalność błon mitochondrialnych. W fazie wykonawczej dochodzi do zaburzenia w ΔY_m w mitochondriach i zwiększenia przepuszczalności błon mitochondrialnych, co prowadzi do uwolnienia z mitochondriów czynników indukujących apoptozę: AIF (*apoptosis inducing factor*) oraz cytochromu c (Apaf-2) (26). Cytochrom c w normalnych warunkach fizjologicznych bierze udział w przekazywaniu elektronów przez łańcuch oddechowy, natomiast w trakcie apoptozy łącząc się z kaspazą 9 powoduje stymulację kaspaz i samobójstwo komórki. Białka Bak i Bax mogą łączyć się z innym białkiem, określanym nazwą VDAC (*voltage-dependent anion channel*). Białko VDAC jest jednym z głównych składników zewnętrznej błony mitochondrialnej komórek eukariotycznych. W normalnych warunkach kanał VDAC jest nieprzepuszczalny dla cytochromu c, ale po połączeniu się z białkami Bax i Bak cytochrom c może swobodnie przechodzić przez kanał z mitochondriów do cytoplazmy. Białko Bcl-2 hamuje uwalnianie AIF i cytochromu c oraz bezpośrednią interakcję z Apaf-1 (odpowiednik CED-4 u *C. elegans*) (24). Innym, istotnym genem jest *p53*, tzw. „strażnik genomu”. Koduje on czynnik transkrypcyjny, który ma zdolność regulacji cyklu komórkowego. W wyniku uszkodzenia lub

mutacji DNA dochodzi do wzrostu ekspresji *p53*, czego skutkiem jest produkcja białka *p53*. Ponieważ białko to jest bezpośrednim lub pośrednim aktywatorem wielu genów, zostaje zatrzymany proces podziału komórki, a uruchomione mechanizmy naprawcze. Dokładny, molekularny mechanizm indukcji apoptozy zależnej od *p53* jest dotąd nie znany (7). Do tej pory wiadomo, że uszkodzenie genomu stymuluje zależną od *p53* ekspresję genu *bax*, który jest induktorem apoptozy (25). W jądrach młodych samców myszy, podczas pierwszych cykli spermatogenezy zaobserwowano nasiloną apoptozę, która zbiega się z wysokim poziomem białka *Bax*, które warunkuje późniejszy, prawidłowy przebieg spermatogenezy u dorosłych osobników (20). W przeprowadzonych badaniach *in vivo* i *in vitro* na pęcherzykach szczurzych wykazano, że indukcja apoptozy komórek ziarnistych związana jest ze zwiększonym poziomem białka *Bax* natomiast obniżony poziom tego białka związany jest z redukcją apoptozy (22).

W szeregu doświadczeniach wskazuje się na główną rolę mitochondriów w przebiegu apoptozy. Stres oksydacyjny jest jednym z czynników, które mogą powodować otwarcie megakanału mitochondrialnego. Otwarcie megakanału i wypływ jonów wapnia z mitochondriów poprzedza zdaniem Kroemera i wsp., inne zmiany charakterystyczne dla apoptozy jak kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA i zmiany w błonie komórkowej. Może to prowadzić do tworzenia dużych ilości reaktywnych form tlenu (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Podstawową rolę w tej złożonej współzależności odgrywa prawdopodobnie białko *Bcl-2*, dzięki swym właściwościom antyutleniającym zmniejsza uszkodzenia błon mitochondrialnych powodowane przez ROS, a tym samym mobilizację Ca^{2+} (15). W przypadkach apoptozy wywołanej przez: promieniowanie jonizujące, utleniacze, $TNF\alpha$ to właśnie ROS są mediatorami apoptozy. Są też dowody, że ROS odgrywają istotną rolę w apoptozie neuronów w przebiegu choroby Alzheimera, czy Parkinsona. Wykazano, że ROS wywołują zmiany apoptotyczne komórek gametogenicznych w jądrze (20).

4. Metody wykrywania apoptozy

Rosnące zainteresowanie apoptozą komórek i mechanizmami zaangażowanymi w regulację tego zjawiska sprawiło, że powstają co raz to nowsze metody wykrywania apoptozy, wśród których znaczącą większość stanowią metody fluorescencyjne. Przy wykorzystaniu tych metod oceniana jest apoptoza w różnych typach komórek.

Cechą charakterystyczną najwcześniejszych stadiów apoptozy jest zmiana w przepuszczalności błony komórkowej. Zmiany te można identyfikować na podstawie charakterystycznych dla apoptozy mikroporów w zewnętrznej błonie cytoplazmatycznej za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 (27). Zastosowanie w tej metodzie jodku propydyiny (PI) pozwala dodatkowo na wyeliminowanie komórek nekrotycznych. Wiadomo, że jodek propydyiny nie przenika przez nieuszkodzoną błonę komórkową. W przypadku naruszenia integralności błony komórkowej PI wnika do wnętrza

trza komórki barwiąc kwasy nukleinowe i po wzbudzeniu w świetle niebieskim komórka ta świeci na czerwono-pomarańczowo.

Wczesną diagnostykę apoptozy umożliwia też wykrywanie fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej. W żywej komórce fosfatydyloseryna wbudowana jest w wewnętrzną warstwę błony komórkowej. Sygnał apoptotyczny powoduje przeniesienie jej na powierzchnię, co umożliwia rozpoznanie komórki przez makrofaga. Do wykrywania fosfatydyloseryny wykorzystywana jest, zależna od Ca^{2+} , aneksyna V (związana chemicznie z fluoresceiną) (28,29). Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej jodku propydydy pozwala jednocześnie badać integralność błony komórkowej. Przy użyciu cytometru przepływowego w wyniku takiego testu możemy wyróżnić cztery populacje komórek: niebarwiące żadnym z odczynników (żywe), barwiące się jedynie jodkiem propydydy (komórki nekrotyczne), barwiące się w różnym stopniu aneksyną V (komórki apoptotyczne w różnych, początkowych stadiach apoptozy) i wreszcie komórki barwiące się jednocześnie oboma odczynnikami (komórki w stadium późnej apoptozy).

Objawem apoptozy jest także spadek mitochondrialnego potencjału transbłonowego (ΔY_m), który prowadzi do uwolnienia czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów. Zmiany ΔY_m mogą być wykryte przez zastosowanie fluorochromu – rodaminy 123, która gromadzi się w mitochondriach żywych komórek przy wysokim ΔY_m . Spadek ΔY_m w czasie apoptozy prowadzi do zmniejszenia koncentracji rodaminy 123 w mitochondriach, co przejawia się osłabieniem fluorescencji znakowanej komórki (28,29). Podczas procesu apoptozy dochodzi często do wzrostu koncentracji ROS w komórce, którą można wykryć badając utlenianie diocetanu 6-karboksy-2'7'-dichlorofluoresceiny przez zmiany intensywności jego fluorescencji.

Jednym z kryteriów pozwalających na odróżnienie apoptozy od nekrozy jest fragmentacja DNA. W przypadku apoptozy enzymy tną dwuniciowy DNA między nukleosomami, co można wykryć w postaci charakterystycznej „drabinki” fragmentów DNA, zawierających 180-200 par zasad i wielokrotność tej liczby, stosując elektroforezę DNA w żelu agarozowym (30). Należy jednak pamiętać, że nie we wszystkich przypadkach apoptozy następuje międzynukleosomalna fragmentacja DNA, często komórka tnie DNA na odcinki 300 i 50 tys. par zasad (8,31). Tego typu fragmentację wykrywa się za pomocą elektroforezy pulsacyjnej. W przypadku nekrozy dochodzi do przypadkowej, nieregularnej fragmentacji DNA, co daje obraz równomiernej smugi DNA tzw. rozmazu (32).

Fragmentacja DNA powoduje, jego zmniejszoną zawartość w komórce, którą wykrywa się w ocenie ilościowej apoptozy, stosując pomiar fluorescencji DNA związanego z fluorochromami. Stwierdzenie tego zjawiska jest możliwe dzięki wielu testom. Jednym z nich jest opisana przez Darzynkiewicz'a elucja drobnocząsteczkowego DNA w buforze cytrynianowym. Po inkubacji komórek w tym buforze komórki apoptotyczne cechują się niższą niż charakterystyczna dla fazy G1 zawartością DNA. Metodą pozwalającą na ilościową ocenę komórek żywych oraz komórek we wczesnych i późnych stadiach apoptozy i nekrozy jest barwienie jodkiem propydydy (DNA

i RNA komórek martwych) oraz fluorochromem Hoechst 33342, barwiącym DNA komórek żywych i apoptotycznych, z różną intensywnością (33).

Pęknięcia łańcucha DNA można też wykrywać przez wbudowywanie dUTP sprzężonego z fluoresceiną, lub digoksygeniną w łańcuchach DNA w miejscach pęknięć, przy zastosowaniu terminalnej transferazy lub polimerazy DNA (34). System pozwala uwidocznić pojedyncze komórki apoptotyczne w mikroskopie fluorescencyjnym lub mierzyć apoptozę populacji komórek w cytometrize przepływowym.

Wybór metod identyfikacji apoptozy, zależy nie tylko od rodzaju induktora, ale także od rodzaju komórek i aktywacji w nich różnych procesów biochemicznych. Podkreślić należy, że sam proces przygotowywania i znakowania komórek często może powodować fałszywy pozytywny wynik przy użyciu wybranej metody (28). Należy pamiętać, że metody wykrywania mają ograniczoną czułość i swoistość, co może być przyczyną trudności w identyfikacji fragmentacji DNA. Drabinka DNA jest wykrywana, tylko wtedy gdy odpowiednio duża liczba komórek ulegnie apoptozie. Pozostałe metody służące do jej identyfikacji, takie jak *terminal deoxy-transferase-mediated bio-dUTP nick end labelling* (TUNEL) oraz *in situ nick translation* dają niekiedy fałszywe dodatnie wyniki, ponieważ fragmenty DNA mogą również powstawać w nekrozie w wyniku nieswoistego rozpadu jądra. Według Ackermana najważniejszą cechą apoptozy pozostają zmiany morfologiczne, ale tutaj również pojawiają się pewne wątpliwości. Zjawisko „gotowania komórki” – morfologiczna cecha apoptozy – bywa często mylona z tworzeniem pęcherzyków – zjawiskiem charakterystycznym dla nekrozy. Pęcherzyki nekrotyczne w przeciwieństwie do apoptotycznych, są wypustkami błony komórkowej, nie zawierają skondensowanych fragmentów jądra i organelli komórkowych, nie prowadzą do powstawania ciałek apoptotycznych (35). Aktualnie szerokie zastosowanie ma metoda polegająca na wykrywaniu aktywności kaspaz w komórkach apoptotycznych (18). Uważa się bowiem, że bez kaspaz apoptoza w ogóle nie może zachodzić. Obecnie przyjęło się apoptozą nazywać „proces, w którym pośrednikami w przekazywaniu sygnału śmierci są kaspazy”. Wiele firm oferuje różne zestawy odczynników do oceny apoptozy poprzez pomiar aktywności kaspaz. Zasada tej metody opiera się na zastosowaniu substratu kaspazy znakowanego fluorescencyjnie, np. rodaminą 110 oraz bufor powodujący lizę komórek. Po trawieniu przez kaspazy peptyd substratowy zaczyna emitować światło o długości zależnej od rodzaju zastosowanego barwnika fluorescencyjnego.

Występowanie apoptozy w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych spowodowało powstanie wielu metod identyfikacji tego zjawiska. Pamiętać jednak należy o tym, że żadna z tych metod nie jest uniwersalna dla wszystkich typów komórek.

5. Podsumowanie

Zjawisko apoptozy odgrywa szczególną rolę w embriogenezie, stałym podtrzymaniu czynności organizmu, w procesach starzenia się tkanek, w sytuacji gdy komórka staje się zbędna lub zaczyna stwarzać zagrożenie dla zdrowia organizmu.

Znaczenie programowanej śmierci komórki w rozwoju tkanek i narządów zwróciło uwagę embriologów. To właśnie od apoptozy zależy prawidłowe kształtowanie tkanek i narządów w czasie embriogenezy. Wystąpienie apoptozy w niezaplanowany sposób w przypadku, np. zaindukowania przez toksyczne związki występujące w środowisku może powodować pojawienie się wad wrodzonych. W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są obecnie badania mające na celu opracowanie skutecznych metod klonowania ssaków. Uzyskiwanie zwierząt transgenicznych metodą klonowania ma ogromne znaczenie dla medycyny, w związku z możliwością otrzymywania z tych zwierząt białek, które mogą znaleźć zastosowanie w terapii u ludzi. Dlatego tak ważne jest opracowanie skutecznych metod wykrywania apoptozy w hodowanych *in vitro* komórkach-dawców jąder. Zjawisko to może mieć negatywny wpływ, jak się wydaje, na efektywność klonowania, zmniejszając odsetek prawidłowo rozwijających się zarodków.

Ponadto należy pamiętać, że zjawisko apoptozy dotyczy każdego narządu i każdej tkanki. Zbadanie mechanizmów molekularnych regulujących ten rodzaj śmierci stanowi zatem jedno z ważniejszych zadań współczesnej nauki.

Literatura

1. Duke R. C., Ojcius D. M., Young J., (1997), Świat Nauki, 2, 24-32.
2. Schnieke A. E., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scott A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K. H. S., (1997), Science, 278 (5346), 2030-2033.
3. Baguisi A., Behboodi E., Melican D. T., Pollock J. S., Destrempe M. M., Cammuso C., Williams J. L., Nims S. D., Porter C. A., Midura P., Palacios M. J., Ayres S. L., Denniston R. S., Hayes M. L., Ziomek C. A., Meade H., Godke R. A., Gavin W. G., Overstrom E. W., Echelard Y., (1999), Nat. Biotechnol., 17 (5), 456-461.
4. Darzynkiewicz Z., Juan G., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F., (1997), Cytometry, 27, 1-20.
5. Israel L. G., Israel E. D., (1999), Apoptosis. Stem Cells, 17, 306-313.
6. Bortul R., Zweyer M., Billi A. M., Tabellini G., Ochs R. L., Bareggi R., Cocco L., Martelli A. M., (2001), J. Cell. Biochem., 81 (S36), 19-31.
7. Lowe S. W., Lin A. W., (2000), Carcinogenesis, 21(3), 485-495.
8. Nagata S., (2000), Exp. Cell. Res., 256(1), 12-18.
9. Pollack M., Leeuwenburgh Ch., (2001), The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 56, B457-B482.
10. Cory S., (1998), Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 12077-12079.
11. Halicka H. D., Bednar E., Darzynkiewicz Z., (2000), Exp. Cell. Res., 260, 248-256.
12. Motyl T., (1998), Postępy Biologii Kom., 25 (3), 315-334.
13. Madej J. A., (1998), Med. Wet., 54(1), 4-8.
14. Grzelakowska-Sztabert B., (1998), Post. Bioch., 44 (1), 8-20.
15. Bartosz G., (1998), Post. Bioch., 44 (1), 22-29.

16. Nagata S., (1997), *Cell*, 88, 355-365.
17. Bednar E., Smolewski P., Amstad P., Darzynkiewicz Z., (2000), *Exp. Cell. Res.*, 259, 308-313.
18. Smolewski P., Bednar E., Du L., Hsieh T., Wu J. M., Phelps D. J., Darzynkiewicz Z., (2001), *Cytom.*, 44, 73-82.
19. Rudner J., Lepple-Wienhues A., Budach W., Berschauer J., Friedrich B., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., Belka K., (2001), *Journal of Cell Science*, 114, 4161-4172.
20. Gączarzewicz D., Udała J., Błaszczuk B., (2000), *Med. Wet.*, 56 (10), 639-644.
21. Nakamura K., Bossy-Wetzel E., Burns K., Fadel M. P., Lozyk M., Goping I. S., Opas M., Bleackley R. Ch., Green D. R., Michalak M., (2000), *The Journal of Cell Biology*, 150 (4), 731-740.
22. Błaszczuk B., Udała J., Gączarzewicz D., (2000), *Med. Wet.*, 56 (3), 158-163.
23. Fuller G. M., Shields D., (2000), *Podstawy molekularne biologii komórki. Aspekty medyczne*, PZWL, Warszawa,
24. Fadeel B., Zhivotovsky B., Orrenius S., (1999), *The FASEB Journal*, 13, 1647-1654.
25. Gross A., McDonnell J. M., Korsmeyer S. J., (1999), *Genes & Development*, 13, 1899-1911.
26. Shimizu S., Matsuoka Y., Shinohara Y., Yoneda Y., Tsujimoto Y., (2001), *Journal of Cell Biology*, 152 (2), 237-250.
27. Idziorek T., Estaquier J., de Bels F., Ameisen J. C., (1995), *Immunol. Methods.*, 185 (2), 249-258.
28. Darzynkiewicz Z., Bednar E., Smolewski P., (2001), *Sem. Hem.*, 38 (2), 179-193.
29. Martinez M. C., Freyssinet J. M., (2001), *BMC. Cell. Biol.*, 2 (1), 20.
30. Kravtsov V. D., Fabian I., (1996), *Lab. Invest.*, 74 (2), 557-570.
31. Ioannou Y. A., Chen F. W., (1996), *Nucleic Acids Res.*, 24 (5), 992-993.
32. Micoud F., Mandrand B., Malcus-Vocanson C., (2001), *Cell Prolif.*, 34, 99-113.
33. Zamai L., Canonico B., Luchetti F., Ferri P., Melloni E., Guidotti L., Cappellini A., Cutroneo G., Vitale M., Papa S., (2001), *Cytom.*, 44, 57-64.
34. Li X., Darzynkiewicz Z., (2000), *Exp. Cell. Res.*, 255, 125-132.
35. Malmusi M., Ackerman A. B., (1999), *Ardor Scribendi*, New York.