

Apoptoza w nowotworach gruczołu sutkowego u psów

Anna M. Badowska-Kozakiewicz, **Elżbieta Malicka**

z Zakładu Patomorfologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Warunkiem istnienia i funkcjonowania organizmów wielokomórkowych jest utrzymanie precyzyjnej kontroli liczby komórek. Jest to zapewnione dzięki zachowaniu równowagi między czterema procesami: podziałem, różnicowaniem, dojrzewaniem i śmiercią komórek (1). Istnieją

dwa główne mechanizmy śmierci komórki: martwica i apoptoza. Komórki uszkodzone w wyniku działania czynników zewnętrznych ulegają martwicy, podczas gdy komórki pobudzone do zaprogramowanej śmierci przez bodziec zewnętrzny lub wewnętrzny ulegają apoptozie (2).

Apoptoza jest fizjologicznym procesem obumierania komórek, który jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Po raz pierwszy zjawisko programowanej śmierci komórki opisał Walther Flemming, który w 1885 r. opublikował pracę o degradacji komórek w jajniku królika (3). Termin apoptoza wprowadził dopiero Kerr i wsp. (4) jako zjawisko zamierania komórek, w których dochodzi do kondensacji chromatyny, fragmentacji jądra i tworzenia tzw. ciałek apoptotycznych. Morfologia komórki ginącej z powodu apoptozy znacznie się różni od obrazu komórki nekrotycznej. Proces programowanej śmierci rozpoczyna się w jądrze komórkowym, w którym dochodzi do kondensacji i agregacji chromatyny, a tym samym do

zmniejszenia jego objętości. Sprawia ono wrażenie zapadniętego i skurczonego, przy zachowanej integralności błon i czynności organelli. W następnym etapie, z powodu utraty wody, dochodzi do zmniejszenia objętości całej komórki, nawet do ok. 30–50%. W końcowej fazie apoptozy komórka ulega fragmentacji i powstają otoczone błoną komórkową kwasochłonne cząsteczki zwane ciałkami apoptotycznymi zbudowane z części zagęszczonych chromatyn, organelli i cytozolu. (5). Ciałka apoptotyczne są usuwane z tkanek w procesie fagocytozy, w którym istotną rolę odgrywa obecność receptora witronektynowego na błonie komórkowej makrofagów (6). Apoptotyczna śmierć komórek oraz ich fagocytoza nie powodują uwolnienia enzymów proteolitycznych, nie towarzyszy więc jej reakcja zapalna, a śmierć poszczególnych komórek nie wywołuje rozległej destrukcji tkanek.

Apoptoza jest procesem przeciwnym do mitozy i wspólnie z nią decyduje o liczbie komórek w każdej populacji (7). Wynika stąd ogromne znaczenie tego procesu w fizjologii: w embriogenezie, wzroście i rozwoju narządów oraz ich inwolucji. Obydwa procesy (podziały i śmierć komórek) czuwają nad prawidłowym przebiegiem różnicowania się komórek nabłonkowych i krwiotwórczych, a także dojrzewania limfocytów T, które odbywa się w grasicy. Uważa się, że apoptoza jest jednym z mechanizmów obronnych, polegającym na usuwaniu komórek zbędnych, uszkodzonych i uległych mutacji (8). Ten aktywny proces wymaga ekspresji odpowiednich genów, syntezy mRNA i białek oraz aktywacji kaskady enzymów proteolitycznych (9). Apoptoza jest głównym mechanizmem prowadzącym do śmierci komórki, jeśli uszkodzone DNA nie zostanie naprawione (10). Uważa się, że sygnałem wywołującym proces apoptozy w komórce jest zmiana integralności błon mitochondrialnych, wartości potencjału błonowego mitochondriów, wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych i uwalniania z mitochondriów czynników apoptogennych (11).

Apoptoza przebiega dwoma głównymi szlakami. Pierwszy, określane jako zewnętrzny – receptorowy lub cytoplazmatyczny, jest uruchamiany przez receptor śmierci Fas należący do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów (tumor necrosis factor – TNF; 2). Drugim jest wewnętrzny szlak mitochondrialny, który w odpowiedzi na pobudzenie powoduje uwolnienie cytochromu-c z mitochondriów i aktywację sygnału śmierci (13). Oba szlaki ostatecznie łączą się w jeden wspólny obejmujący aktywację kaskady proteaz nazywanych kaspazami, prowadząc do śmierci komórki. Obydwa

szlaki są od siebie zależne, np. nadmierne ekspresja Bcl-2 w szlaku wewnętrznym może prowadzić do zahamowania apoptozy przebiegającej w szlaku zewnętrznym (14). W regulację apoptozy zaangażowanych jest wiele genów, szczególnie p53 oraz białka z rodziny Bcl. Białko p53 wraz z zależnym od siebie białkiem bax aktywuje apoptozę, natomiast białko Bcl-2 hamuje ten proces. Aktywacja tych genów może następować pod wpływem różnych czynników, np. hormonów, czynników wzrostu czy jonów. Prawidłowa regulacja umożliwia utrzymanie równowagi między namnażaniem się komórek i ich umieraniem (15).

W wielu nowotworach złośliwych obserwowana jest spontaniczna apoptoza (9). Są także dane wskazujące na to, że w komórkach nowotworowych następuje niejednokrotnie zahamowanie apoptozy (16). Wśród komórek nowotworowych pojawiają się komórki odporne na indukcję apoptozy i one mogą być odpowiedzialne za wiele niepowodzeń terapeutycznych. Komórki odporne na indukcję apoptozy mają być niewrażliwe na działanie leków i promieni jonizujących (17). Istnieją doniesienia na temat ekspresji białka Bcl-2 i jego związku z rokowaniem w nowotworach sutka u ludzi. Wysoka ekspresja tego białka wiąże się z mniejszym prawdopodobieństwem nawrotu choroby oraz powstania odległych przerzutów (18). Stwierdzono, że Bcl-2 podlega zwiększonej ekspresji w nowotworach o mniejszym stopniu histologicznej złośliwości. Istnieją nieliczne prace dotyczące apoptozy i czynników z nią związanych w nowotworach u zwierząt. Stwierdzono ekspresję białka Bcl-2 w wolno namnażających się komórkach guza podstawonokomórkowego u kotów (19). W nowotworach złośliwych gruczołu sutkowego u suk Funakoshi (20) wykazał większą liczbę komórek apoptotycznych oraz wysoką ekspresję PCNA w porównaniu z nowotworami niezłośliwymi.

Celem podjętych badań była ocena apoptozy w nowotworach gruczołu sutkowego psów w korelacji z typem histologicznym guza, stopniem jego histologicznej złośliwości oraz aktywnością proliferacyjną.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły guzy gruczołu sutkowego suk. Materiał utrwalano w 8% formalinie buforowanej fosforanami, następnie odwadniano i zatapiano w parafinie. Skrawki parafinowe grubości 4 µm barwiono metodą przeglądową hematoksylina-eozyna, w celu określenia rodzaju nowotworu zgodnie z klasyfikacją WHO (21) oraz stopnia histologicznej złośliwości (22), a także metodami

Apoptosis in canine mammary gland neoplasms

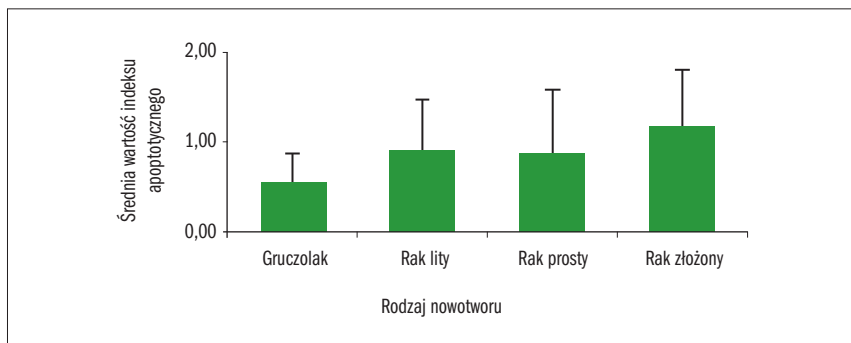
Badowska-Kozakiewicz A.M., Malicka E.
Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of this paper was to study apoptosis in mammary gland tumors in bitches and to establish its correlation with histological type of tumor, degree of histological malignancy and neoplasm proliferation activity. Studies were performed on tumors collected during surgical procedures. All together 150 mammary gland neoplasms were diagnosed using histopathological, histochemical and immunohistochemical methods. 138 tumors were of epithelial origin and among them 14 adenomas, 66 complex carcinomas, 47 simple carcinomas and 6 solid carcinomas were identified. For carcinomas, degree of histological malignancy was established: 1st degree – 48 tumors, 2nd degree – 39 tumors, 3rd degree – 32 tumors. The number of cells undergoing apoptosis was similar in different types of neoplasms. Significantly higher apoptotic index was observed in 1st degree of malignancy carcinomas. Further detailed evaluation of examined neoplasms was made.

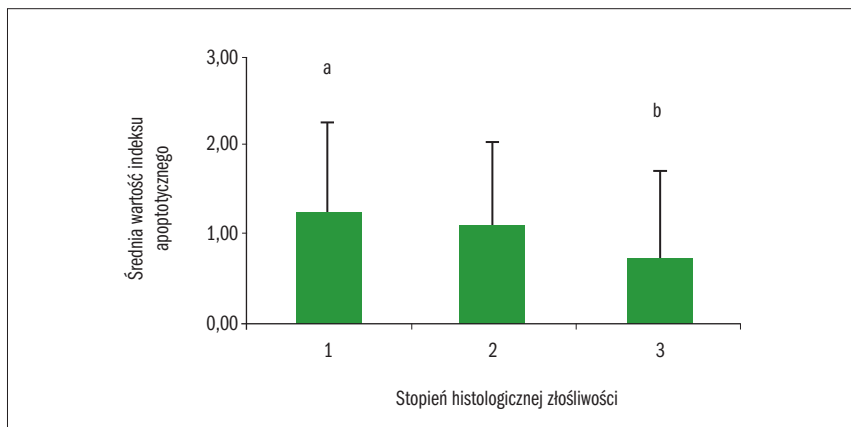
Keywords: dogs, mammary gland, neoplasms, apoptosis.

immunohistochemicznymi. W badaniu immunohistochemicznym użyto mysie monoklonalne przeciwciała przeciw ludzkiemu antygenowi jądrowemu Ki-67 (Dako) w rozcieńczeniu 1:75 w 1% BSA (Sigma; 23). Materiał badawczy poddawano obróbce termicznej w kuchence mikrofalowej (1 × 5 minut przy 600 W, 2 × 5 minut przy 300 W) w celu odsłonięcia epitopu. Do wizualizacji reakcji immunohistochemicznej stosowano zestaw En Visio +TM System (Dako). Do interpretacji wyników zastosowana została komputerowa analiza obrazu i program Lucia v. 4.21, za pomocą których zliczano zabarwione jądra w 1000 komórek nowotworowych.

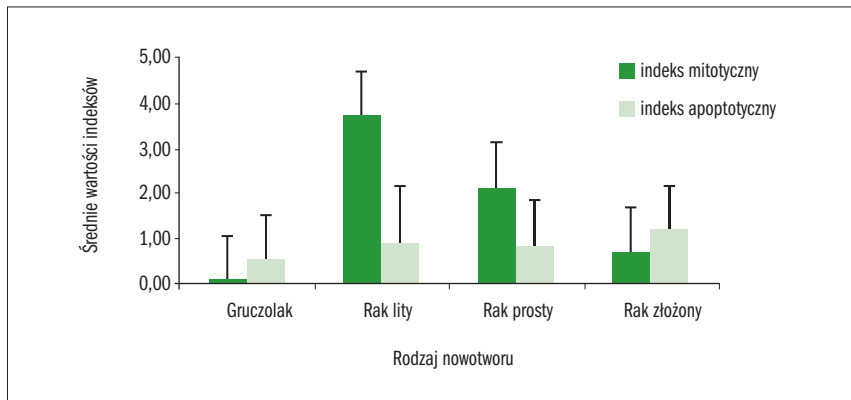
W celu identyfikacji komórek apoptotycznych zastosowano metodę TUNEL. Metoda TUNEL (TdT – mediated deoxyuridine triphosphate – biotin/digoxygenin nick end-labeling) wykorzystuje aktywność terminalnej deoksynukleotydylotransferazy (TdT) enzymu wprowadzającego biotylnyowaną trifosforodeoksyurydynę dUTP do 3' końca pofragmentowanej cząsteczki DNA. W badaniach zastosowano gotowy zestaw ApopTag[®] Peroxidase Kits firmy Q* Biogene. Komórki wykazujące dodatnią reakcję liczono w 10 polach widzenia przy powiększeniu obiektowy 400x. Obliczano indeks apoptotyczny jako średnią liczbę komórek wykazujących reakcję pozytywną.



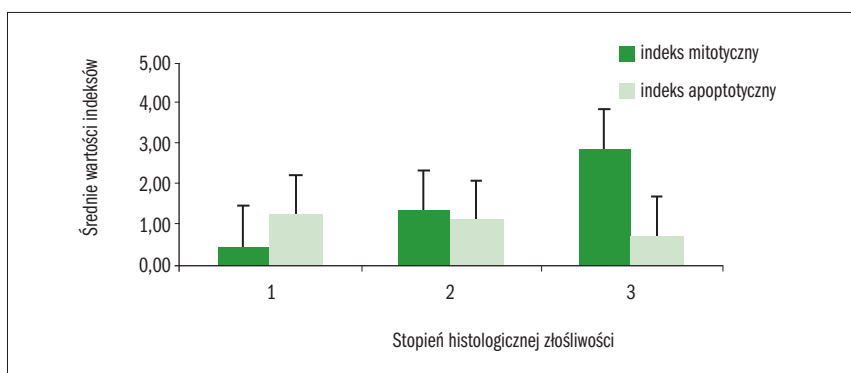
Ryc. 1. Średnia wartość indeksu apoptotycznego (\pm SD) w poszczególnych rodzajach nowotworów



Ryc. 2. Średnia wartość indeksu apoptotycznego (\pm SD) w nowotworach o różnych stopniach histologicznej złośliwości. Różne litery nad słupkami odnoszą się do tego samego parametru i świadczą o różnicy istotnej statystycznie ($p \leq 0,05$) między średnimi



Ryc. 3. Średnia wartość indeksów apoptotycznego i mitotycznego (\pm SD) w poszczególnych rodzajach nowotworów. Różne litery nad słupkami odnoszą się do tego samego parametru i świadczą o różnicy istotnej statystycznie ($p \leq 0,05$) między średnimi



Ryc. 4. Średnia wartość indeksów apoptotycznego i mitotycznego (\pm SD) w nowotworach o różnym stopniu histologicznej złośliwości

Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych ($\times \pm$ SD). Wyniki opracowano przy użyciu programu SPSS v. 12.0 PL Windows. Różnice uznano za istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

Liczba komórek, które ulegały apoptozie nie różniła się istotnie w poszczególnych rodzajach nowotworów pochodzenia nabłonkowego, największą liczbę komórek ulegających apoptozie stwierdzono w rakach złożonych (ryc. 1), mniej komórek ulegających apoptozie wykazano w rakach litych i prostych. Stwierdzono natomiast statystycznie istotne różnice w liczbie komórek ulegających apoptozie pomiędzy nowotworami o I i III stopniu histologicznej złośliwości ($p=0,035$; ryc. 2). Wyższą wartość indeksu apoptotycznego obserwowano w nowotworach o I stopniu histologicznej złośliwości (ryc. 2, 4). Statystycznie istotną różnicę pomiędzy indeksem mitotycznym a apoptotycznym obserwowano w raku litym, który wykazywał najwyższy stopień złośliwości histologicznej (ryc. 3). Obserwowana była przewaga aktywności proliferacyjnej nad procesem apoptozy w nowotworach o najwyższym (III) stopniu histologicznej złośliwości (ryc. 4).

Ważną rolę w przeciwdziałaniu apoptozie przypisuje się białkom szoku cieplnego. Najbardziej istotne w procesie hamowania apoptozy wydają się białka szoku cieplnego Hsp70 i Hsp27. Istnieje wciąż wiele niejasności co do sposobu przekazywania sygnału śmierci wzbudzanego przez różnorodne czynniki apoptotyczne, jak też molekularnych uwarunkowań komórki do włączenia programu śmierci. Ponieważ indukcja apoptozy i ekspresja białek szoku cieplnego są wywoływane przez te same czynniki, można doszukiwać się korelacji między tymi dwoma procesami.

Mimo iż apoptoza jest fizjologiczną śmiercią komórki, to pełni ona ważną rolę w patogenezie wielu chorób. Ograniczenie tego zjawiska prowadzi do powstawania złośliwych chorób proliferacyjnych oraz autoagresji komórek układu odpornościowego, natomiast nasilenie apoptozy jest typowe dla chorób zwyrodnieniowych (7). Rola apoptozy w powstawaniu nowotworów nie jest do końca określona. Występowanie tego zjawiska w obrębie guza może powodować utratę nieśmiertelności komórek raka. Apoptoza może zarówno hamować rozwój komórek nowotworowych, jak stymulować ich klonalny rozwój poprzez eliminację sąsiadujących komórek.

Lepsze poznanie zaburzeń genetycznych oraz procesów regulacji złożonych szlaków sygnałowych, zwłaszcza regulacji apoptozy, może pomóc w stworzeniu racjonalnych strategii leczenia nowotworów.

Piśmiennictwo

- Baldi A., Santini D., Russo P., Catrical C., Amantea A., Picardo M., Tatangelo F., Botti G., Drogonetti E., Murace R., Tonini G., Natali P.G., Baldi F., Paggi M.G.: Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Exp. Dermatol.* 2004, **13**, 93-97.
- Ghobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A.: Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.* 2005, **55**, 178-194.
- Tilly J.L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, **2**, 838-848.
- 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**, 239-257.
- Sulejczuk D.: Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post. Biol. Kom.* 2000, **4**, 527-568.
- Góra-Tybor E., Robak T.: Apoptoza-zaprogramowana śmierć komórki. *Post, Hig. Med. Dośw.* 1994, **48**, 209-221.
- Motyl T.: Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post. Biol. Kom.* 1998, **25**, 315-333.
- Raff M.C.: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992, **356**, 397-399.
- Chabowski A., Sulkowska M.: Połączenia GAP i ich udział w apoptozie i kancerogenezie. *Post. Biol. Kom.* 2001, **28**, 277-292.
- Lowe S.W., Lin A.W.: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000, **21**, 485-495.
- Krzyżowska M., Niemiałowski M.: Supresja apoptozy w zakażeniach chodopoksowirusami. *Post. Biol. Kom.* 2003, **30**, 273-292.
- Sikora E.: Mechanizmy programowanej śmierci komórki (apoptozy). *Post. Biochem.* 1994, **40**, 150-160.
- Hockenbery D., Nunez G., C.: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990, **348**, 334-336.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A.: Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998, **17**, 1675-1687.
- Garl R., Vaux D.L.: Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* 2005, **26**, 263-270.
- Thompson C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, **267**, 1456-1462.
- Brown J.M., Wouters B.G.: Apoptosis, p53 and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999, **59**, 1391-1399.
- Kapranos N., Karaiosifidi H., Valavanis C., Kouri E., Vasilaros S.: Prognostic significance of apoptosis related proteins Bcl-2 and Bax in node-negative breast cancer patients. *Anticancer Res* 1997, **17**, 2499-2505.
- Madewell B.R., Grittey S.M., McEntee M.C., Leppert V.J., Munn R.J.: Feline vaccine – associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet Pathol* 2001, **38**, 196-202.
- Funakoshi Y., Nakayama H., Uetsuka K., Nishimura R., Sasaki N., Doi K.: Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet. Pathol.* 2000, **37**, 177-183.
- Misdorp W., Else R.W., Hellmen E., Lipscomb T.P.: Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. *World Health Organization*, Geneva 1999.
- Misdorp W.W. Meuten D. (edit.): *Tumors in Domestic Animals*. Iowa State Press, Black Publishing Company. 4th ed., 2002, s. 575-606.

Dr Anna M. Badowska-Kozakiewicz, Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny, e-mail: abadowska@op.pl