

## Az apoptózis jellemzői és szerepe az ischaemiás agykárosodásban

Hortobágyi Tibor  
Nagy Zoltán

THE CHARACTERISTICS OF APOPTOSIS AND ITS ROLE IN CEREBRAL ISCHEMIA Apoptosis is a distinct type of cell death, in which the cell actively contributes to its own demise. The „suicide program” is initiated by pathological changes in the cell's stimuli and in the environment. Apoptosis differs from necrosis in its morphological, biochemical and molecular biological characteristics. The series of events in apoptosis (apoptotic cascade) exhibits some differences depending on the cell type and stimuli. In general, the cytoplasmic level of ionized calcium elevates in an early phase, which activates calcium-dependent enzymes: endonucleases result in internucleosomal DNA-fragmentation and chromatin condensation, proteases disrupt the cytoskeleton which leads to cell shrinkage, whereas transglutaminases crosslink cytoplasmic proteins with subsequent formation of cytoplasmic blebs and apoptotic bodies. The cell surface alterations induce cell phagocytosis without inflammation. In the regulation of this process several modulator genes, growth factors and receptors, cell-cycle regulators, ions, free radicals, enzymes and their interactions are involved. Apoptosis plays role in some of the neurological diseases, including cerebral ischemia. Apoptotic neurons are present as short as 10 minutes after the onset of focal cerebral ischemia, and are still detectable after 4 weeks. It has been suggested, that the apoptotic process can be initiated any time during the insult and for a relative long time thereafter. On the basis of this assumption, antiapoptotic treatment might effectively reduce cell loss and infarct size even days, or weeks after the ischemic insult. There are promising experimental results (e.g. introduction of antiapoptotic genes and their protein products into the ischemic territory, receptor-mediated therapeutic strategies) to switch the cell's program from suicide to survival.

Az apoptózis a sejtpusztulás azon formája, amikor a sejt a külső feltételek megváltozására, öngyilkos genetikai programja révén aktívan közreműködik saját pusztulásában. Az apoptózis különbözik a sejtpusztulás nekrotikus típusától mind morfológiail, mind biokémiai és molekuláris biológiail jellemzőiben. Az apoptózist eredményező kaskádyszerű, egymást követő folyamatok sora a sejttípustól és az apoptózist beindító noxától függően különböző lehet. Általában a citoszol ionizáltkalcium-tartalma már a korai fázisban megemelkedik. Ez kalciumfüggő enzimeket aktivál: endonukleázok internucleosomálisan bontják a DNS-t és a kromatin sejtmagmembrán menti tömörülését okozzák, a proteázok bontják a cytoskeletont fehérrjélt, és ez a sejt zsugorodását eredményezi, míg a transzglutaminázok a citoplazma-fehérrjek között keresztkötéseket hoznak létre, aminek az eredménye a „bimbóképződés” és az apoptotikus testek képződése. Az új sejtfelszíni markernek megjelenése a sejtek gyulladásos reakcióval nem kísért fagocitózist indukálja. A folyamat szabályozásában gének, növekedési faktorok és receptorok, sejtciklus-regulatorok, ionok, szabad gyökök, enzimek vesznek részt. Az apoptózis számos neurológiai kórállapotban, így az agyi ischaemiás szövetkárosodás kialakulásában is szerepet játszik. Apoptotikus neuronok már tízperces fokális agyi ischaemiát követően megjelennek, és még négy héttel az ischaemiás inzultust követően is kimutathatóak. Feltételezhető, hogy az apoptotikus kaskád az ischaemiás epizód alatt és után hosszú ideig bármikor beindulhat. Az antiapoptotikus terápiás beavatkozások még az ischaemiás hatást követően napokkal, sőt hetekkel is eredményesen csökkentik a sejtpusztulást és az infarktus kiterjedését. Kísérletes modellekben ismételt próbálkozások történtek antiapoptotikus genetikai manipulációval, receptorgátlással az öngyilkos sejtprogram befolyásolására és a túlélést szolgáló celluláris mechanizmusok elősegítésére.

Correspondence:  
Zoltán Nagy, MD

National Institute of Psychiatry and Neurology,  
National Stroke Center  
H-1021 Budapest, Hűvösvölgyi út 116.

Levelezési cím:  
dr. Nagy Zoltán

Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet,  
Agyérbetegségek Országos Központja  
1021 Budapest, Hűvösvölgyi út 116.

apoptosis, cerebral ischemia

apoptózis, agyi ischaemia

A sejtműködés genetikai regulációjának pontosabb megismerése tárta fel a sejtpusztulás genetikusan programozott formáit. Már a férgeknél ismert egy, a lény élete során aktiválódó genetikai program, amely bizonyos sejtek pusztuláshoz vezet. Nyilvánvalóvá vált, hogy a programozott sejthalál mindig azonos időben és azonos sejtek pusztulását eredményezi. Ennek a fiziológiai sejtpusztulásnak a során a sejt addig nyugvó, „önnyilkos” genetikai programja aktiválódik, ezért a sejtpusztulásnak ezt a formáját *programozott sejtpusztulásnak* nevezik.

A sejt életkörülményeinek kóros megváltozása szintén az önnyilkosprogram aktiválódását eredményezheti: a sejtpusztulás ezen sajátos, aktív formája az *apoptózis*. A programozott sejtpusztulás tökéletes regulációja és/vagy az apoptózis szerepet játszhat többek között a daganatnövekedés, az AIDS, az autoimmun betegségek, a neurodegeneratív kórállapotok kialakulásában.

## Történeti áttekintés

*Chromatolysis* — így nevezte el *Walter Fleming* 1885-ben megjelent közleményében a regrediáló emlősovárium-follikulusok epithelialis sejteiben gyakran megfigyelhető jelenségeket (1). Művészi camera lucida rajzokban hagyta az utókorra a ma programozott sejthalál vagy apoptózis néven ismert és az egyik legintenzívebben kutatott biológiai jelenség első ábrázolásait. Néhány hónappal később *Franz Nissen*, német orvostanhallgató laktáló emlőben figyelt meg hasonló morfológiai elváltozásokat (2). A sejtmagra vonatkozó vizsgálatokat így összegezte 1914-ben *Ludwig Graper*: „Chromatolysis valamennyi szervben, ahol sejtelimináció zajlik, jelen kell legyen...”, s ez a mitózis ellentéte (3). Ezek a kutatók az apoptózist a ma is helytálló fénymikroszkópos morfológiai leírását adták.

Új nevet *Kerr* adott a korábban *chromatolysis*-nek nevezett jelenségnek: a véna portae ágának lekötése után az ischaemiás májsejtkárosodást vizsgálva egyes sejtek több lépésben zajló „elhullását” figyelte meg. Ekkor a zsugor- (*shrinkage*) nekrosis, majd egy évvel később az archaikus és festői apoptózis nevet adta a jelenségnek (a szó a fákról itt-ott lehulló levelekre utal, ami jól jelzi ezen sejtpusztulástípus izolált és lassabb voltát, szemben a nekrosis általában nagy sejtömeget érintő és gyorsan lezajló folyamatával) (4). Szintén *Kerr* érdeme, hogy a patológiai állapotok, elsőként az ischaemia felé irányította a figyelmet. Néhány évvel később írták le, hogy az irradiált szövetek kromatinja  $nx180$  bázispárnyi nucleosomára töredezik, s ez elektroforetikusan jellegzetes „létraszerkezetben” nyilvánul meg (5). *Wyllie* igazolta, hogy ennek hátterében apoptózis áll (6). Ezzel nemcsak

specifikus biokémiai markerét adta a morfológiailag már jól ismert folyamatnak, hanem elindította az apoptóziskutatás újabb korszakát.

A programozott sejthalál (apoptózis) biológiai és patológiai jelentőségének magyar nyelvű összefoglaló ismertetése 1992-ben jelent meg (7). Jelen közleményünkben ismertetjük a kutatások újabb eredményeit is, és az apoptózis jelentőségét az agyi ischaemiás inzultust követően.

## Az apoptózis jellemzői

### Morfológia

Az apoptózist mindmáig leginkább a morfológiai, ultrastrukturális elváltozások egymást követő meghatározott sorával lehet jellemezni, amelyek a sejtípustól függetlenül hasonlóak egymáshoz (4). A sejt zsugorodik, a tömörülő kromatin a magmembránhoz csapódik (kromatinmarginalizálódás), gyakran patkó vagy félhold alakban. A sejtmag szintén feltöredezik (karyorrhexis). A sejt felszínén hólyagszerű kitérkedések alakulnak ki (bimbóképződés), amelyek gyakran magtöredékeket tartalmaznak. Ezek a nyulványok könnyen leválnak a sejtről, apoptotikus testeket alkotnak, amelyeket phagocyták, illetve a szomszédos sejtek kebelezhetnek be, de szabadon is maradhatnak, s harmadik eshetőségként az egész sejt egyetlen nagyobb, lekerekített apoptotikus testté is zsugorodhat. Neutrophil granulocyták és lymphocyták - ellentétben a nekrozissal - nincsenek az izolált sejtpusztulás környezetében. Fontos jellemző, hogy a sejtmembrán, a mitochondriumok s a többi sejtalkotórész relatív hosszú ideig megőrzik ép szerkezetüket.

### Biokémia

Általában a citoszol ionizáltkalcium-tartalma már a korai fázisban megemelkedik, amely kalciumfüggő enzimek aktiválódását eredményezi: endonukleázok hasítják a genom DNS-ét mintegy  $nx180$  bázispár nagyságú oligonucleosomalis fragmensekre (8). A DNS ezen jellegzetes feltöredezése megelőzi a legkorábbi morfológiai elváltozások jelentkezését.

### Hisztokémia

A TUNEL [terminális deoxinukleotidil-transzferáz (TdT) közvetített dUTP-biotin end-labeling] a DNS-hasítási végek in situ jelölésére igen érzékeny és csekély számú

dr. Hortobágyi Tibor  
dr. Nagy Zoltán  
Országos Pszichiátriai  
és Neurológiai Intézet,  
Agyérbetegségek Országos  
Központja,  
Budapest  
Érkezett: 1997. április 29.  
Elfogadva: 1997. július 23.



sejtek gyulladáshoz való reakcióval nem kísért *fagocitózist* indukálja (12, 13). Ez történhet specializált phagocyták (makrophagok) vitronektinreceptoraihoz kapcsolódva (17), de szerepe lehet a fagocitózisindukcióban az eredendően jelen lévő receptoroknak is. Sajátságos módon a sejtelimináció történhet a szomszédos, alapvetően nem fagocitáló sejteket kannibalizmusra készítve is. A *gyulladás hiánya* igen fontos jellemző, mert így az izolált sejtpusztulás a környező sejtek károsítása nélkül történhet. Feltételezzük, hogy a pusztuló sejtekből felszabaduló kemokinek mennyisége olyan elenyésző, hogy az emigráció elindításában fontos endothel nem érik el a szükséges koncentrációt.

### Az apoptózist szabályozó molekuláris genetikai mechanizmusok

A programozott sejtpusztulás szabályozására vonatkozó első ismereteink a *Caenorhabditis elegans* nevű gyűrűs férgen végzett megfigyelésekből származnak, amely szervezetenek viszonylagos egyszerűsége miatt genetikai vizsgálatokra jól használható. Kifejlődése során 1090 szomatikus sejt képződik, amelyből 131 genetikailag programozottan pusztul el. Tizennégy olyan géne ismert, amely a sejthalálprogram működésében fontosak (ced-gének az angol cell death kezdőbetűből) (18).

Ma már az emlős, illetve a humán genom számos apoptózist indukáló és gátló géne ismert. Géntermékek kivételével (amelyek közül a proapoptotikus hatásúakat „gyilkos” fehérjéknek, tanatinoknak is nevezik) számos lipid, glikolipid, ion is részt vesz az apoptózis szabályozásában (19).

Fontos annak szem előtt tartása, hogy különböző sejttípusok igen eltérő molekuláris mechanizmusokat használnak mind a túlélést jelentő proliferáció, mind önpusztításuk során – sőt, azonos molekuláris mechanizmusok egyik sejttípusnál öngyilkos sejtpusztulást okozhatnak, másikon hatástalanok vagy akár a sejtpusztulás ellen hatnak. Az alábbiakban csupán néhány, elsősorban az idegrendszerben kulcsszerepet játszó szabályozó és -molekula szerepét ismertetjük.

#### Moduláló gének

A *bcl-2* gén transzlokációját *Tsujimoto* és munkatársai írták le 1984-ben, follicularis B-sejtes lymphomák többségében. Több onkogéntől eltérően, a *bcl-2* nem a sejtproliferációt serkenti, hanem az apoptózis gátlása révén vesz részt a tumor növekedésében. Mivel a *bcl-2* gátolja különböző proapop-

totikus ingerek hatását, közös biokémiai út meglétét feltételezzük. Ismert, hogy a *Bcl-2* fehérje a mitochondriális membrán, a sejtmagmembrán és az endoplazmatikus retikulum egyes területein helyezkedik el, s így összefügghetne a metabolikus funkciókkal (20); ma már azonban egyértelmű, hogy nem a terminális oxidációban fontos fehérjeként vagy ionszotorna-alkotóként, hanem mint a sejten belüli kalciumhomeosztázis és így számos kalciumfüggő enzim szabályozója, illetve mint fontos antioxidáns éri el antiapoptotikus hatását (21). Újabb adatok szerint a *bcl-2* fokozott expressziója mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejtpusztulást csökkenti (22). A *bcl-2* azonban csupán egyik - kétségtelenül legismertebb - tagja a ma már több mint tiztagú géncsaládnak, amelyek központi idegrendszeri neuronokban expresszálódnak. A *bax*, a *bad*, a *bak*, a *bcl-X<sub>s</sub>*, proapoptotikus, míg például a *bcl-2*, a *bcl-X<sub>l</sub>* antiapoptotikus hatású. Feltételezzük, hogy az adott agyterületen a géncsalád tagjainak lokális aránya határozza meg a vulnérabilitás mértékét számos inzultussal szemben (a *bcl-2* és a *bax* például homo- és heterodimereket alkotnak, s arányuk határozza meg annak valószínűségét, hogy apoptotizál-e a sejt: a Purkinje-sejtek pedig magas *bax*- és alacsony *bcl-2*-expressziójuk miatt igen érzékenyek hipoxiára, s könnyen pusztulnak apoptózis sál) (23).

A *p53* gén apoptózist gátló hatása igen kifejezett, s az feltehetően a proapoptotikus IGE (interleukin-1 $\beta$ -konvertáló enzim) -családba tartozó cisztein-proteázok közvetlen gátlása révén történik (24, 25).

A tumorprognosztikában is fontos *p53* gén apoptózist indukál, elsősorban a DNS károsodása esetén - mégpedig közvetve, a *bax* promóterhez kötődve (26). A *p53* gén mutáns formái számos tumorfejlődésben igazolhatóak (például Wilm's tumor, colon-, emlő- és cervixcarcinoma), s ezek csökkentik e daganatokban az apoptotikus sejtek számát (23).

Az indukálható transzkripció faktorok (ITF) (*c-jun*, *c-fos*, *c-myc* stb.) szerepe nem tisztázott. Ezen „sejthalál-elkötelezett” gének változatos külső hatásra (például az excitátoros aminosav glutamát-szintjének számos körülményben, így ischaemiában is tapasztalható emelkedésekor) aktiválódhatnak, s a sejtpusztulás kivitelezésében fontos más gének expresszióját kontrollálhatják, s feltehetően az apoptotikus kaskád részét képezik (27, 28). Míg a *c-myc* és az apoptózis viszonya bizonyítottan tekinthető, addig két másik fontos indukálható transzkripció faktor, a *c-fos* és a *c-jun* közvetlen szerepét újabb közlemények vitatják (29).

A fentiekből is kitűnik, hogy az apoptózishoz géniindukció és -represszió egyaránt szükséges. Ez összehangoltan valósul meg: *Estus* a génextpresszió „fel is, le is” (some up, some down) modelljének

nevezte megfigyelését, hogy gének csoportjai egymás tükröképeként csökkenő (fra-1, rb, bcl-2), illetve növekvő (c-jun, c-fos, ciklin D1, c-myb) expressziót mutatnak az apoptózis folyamán (30).

### Növekedési faktorok, hormonok, citokinek és sejtfelszíni receptorok

Az NGF (nerve growth faktor) a strukturális és funkcionális hasonlóságok alapján a neurotrofin-családhoz tartozó fehérjék legismertebbje. Míg a neurotrofinmegvonás apoptózist indukál, addig NGF jelenlétében az apoptotikus ingerek hatására létrejövő sejtvesztés mértéke csökken, s az apoptózis korai történései visszafordíthatóak (31). Anti-apoptotikus hatásában fontos tényező a sejtvezérlő fehérjéknek csökkent lebomlása és/vagy regenerációja új fehérjék szintézise révén (32). A *glükokortikoidok* apoptózisindukáló hatása jól ismert, s ezt számos apoptózismodellben felhasználják (33).

A TNF $\alpha$  a TNF (tumor nekrosis faktor) -fehérjecsald mintegy tíz ismert tagja közül az egyik, a TNF/NGF-receptor-család transzmembránreceptor-fehérjéhez kötődve hat. A TNF szupercsalád négy tagja (TNFR-1, FAS/APO-1, CD40,  $\gamma$ 75NTR) úgynevezett „haláldomént” tartalmaz, s a megfelelő ligand kötődése esetén apoptózisindukció jön létre (34).

### Sejten belüli jelátvitel, másodlagos hírvivők

A citoplazma jelátviteli továbbítják a sejten kívüli ingerek receptoron kifejtett hatását a sejtmag génjei felé. Az *ionizált kalcium* koncentrációváltozása és az apoptózisindukció ok-okozat viszonya bizonyított (35). A *reaktív oxigénszármazékok* (ROS) és a szabad gyökök fontos szerepe az apoptózisban szintén egyértelmű. Számos apoptózisinger, legalább részben, reaktív oxigénszármazék-jelátviteli útján hat. A reaktív oxigénszármazék mint korai apoptotikus szignál az inger után három órával el el csúcsát (36). *Saraffin* modellje szerint a reaktív oxigénszármazékok alapvetően eltérő módon vennék részt a nekrosis és az apoptózis folyamatában: míg nekrosisban effektor-ként működve lipidek, proteinek, nukleinsavak oxidatív károsodását okozzák, addig apoptózisban redox-szenzitív celluláris faktorokra hatva szignálmolekulaként működnek (37). Ezt támasztja alá, hogy a — szintén redox-szenzitív — transzkripciófaktor, a c-jun, a trofikus faktoraitól megvont szimpatikus neuronok apoptózisához elengedhetetlenül szükséges (30). A reaktív oxigénszármazékok szintjét csökkentő szuperoxid-dizmutáz enzim hiánya vagy mutációja (például az amyotrophias laterális sclerosis familiaris

formájában) szintén fokozott apoptotikus sejtpusztulással jár (19).

Az arachidonsav-származék *eikozanoidok* (prostaglandinok, zsírsavak, leukotriének), a szfingomielinmetabolizmus-termék *ceramid*, valamint a *proteinkináz C* kettős (pro- és antiapoptotikus) hatású, amely sejtípustól és -állapottól függő (23).

### Sejtciklus-regulatorok

Már *Graper* is a mitózis ellentétéként értelmezte az apoptózist (3). A sejtciklus és az apoptózis eseménysora valóban számos hasonlóságot mutat, s egyesek ma is az apoptózis némely formáját „hibás mitózisként” értelmezik. A legújabb kutatások a két folyamat igen bonyolult, sejtípus- és metabolikus állapottól függő viszonyát igazolták, s óvnak az általánosításoktól. Az egyik hipotézis szerint egy primer stimulus aktiválja a proliferáció/apoptózis kezdeti lépéseinek közös útját, s a szekunder stimulus határozza meg, hogy apoptózis vagy proliferáció történik-e. E folyamat a géneaktiváció/inaktiváció arányával szabályozott: a c-myc aktiválódása a még nem determinált folyamat elindításához szükséges; a bcl-2-szint emelkedése proliferációt, míg a p53 és az apó-1/fas expressziójával kísért csökkenése apoptózist indít el (13).

### Sejt-sejt, sejt-mátrix kölcsönhatás

Ezek jelentőségét érzékelteti, hogy a legtöbb sejt életben maradásához legalább kétféle szignál szükséges: 1. diffuzibilis faktorok (hormonok, növekedési faktorok, citokinek) és 2. sejtadhéziós molekulák közvetítette sejt-sejt, sejt-mátrix kölcsönhatások. A sejtadhéziós molekulák (amelyek az integrin-, kadherin-, szelektin-, immunglobulin-családokba sorolhatók) legalább részben, a bcl-2 expressziójának fokozása, az ICE-működés gátása, s a ras jelátviteli rendszeren keresztül megvalósuló antiapoptotikus mechanizmusok révén szolgálják a sejtélétét (18).

### Enzimek

#### Endonukleázok

A biokémiai jellemzőknél említettük, hogy a géllétra (ladder pattern) endonukleázhatás eredménye. A sejt endonukleázrepertoárja mgerfüggő: különböző apoptózisingerrel más-más endonukleázcsoportokat aktiválnak. Bizonyos apoptózisingerrel endonukleázaktiválás nélkül érik el hatásukat (10), míg endonukleázhatás a jellegzetes apoptózismorfológia nélkül is végbermehet (11).

1. táblázat. A fiziológiás programozott sejtpusztulás, az apoptózis és a nekrozis jellemzőinek összehasonlítása

	Programozott sejthalál	Apoptózis	Nekrozis
Kiváló környezeti inger	elettani	kóros	
Előfordulás	sejtcsoportok, illetve különálló sejtek	különálló sejtek	sejtcsoportok
Reverzibilis a morfológiai eltérések meglétekor	nincs		lehetséges, ha még nem irreverzibilis a károsodás
Sejtkapcsolatok fellazulása	korán		kesőn
A sejt alak- és terülatváltozása	apoptotikus testek, zsugorodás		duzzadás, majd dezintegráció és lizis
Mitochondriumok	epek		korai károsodás
Sejtmembránok, ozmoreguláció	normális		korai károsodások
A sejtmag jellemző morfológiai elváltozása	karyopycnosis, karyorrhexis		karyolysis
Kromatin	tömörül, marginalizálódik		fellazul
DNS-bomlás	endonukleázokkal nucleosomákra		lysosomaenzimekkel, random degradáció
Fagocitózis	van		csak késői fázisban
Exsudatív gyulladás	nincs		van
Hegkepződés	nincs		van

#### Proteázok

A közelmúlt egyik legfontosabb felismerése, hogy az ICE-család molekulái az apoptózis korai lépéseinek fontos szabályozói. Pontos szerepük az apoptózis folyamatában nem ismert; legvalószínűbb, hogy széles hatású apoptózisinduktorok, amelyek jelátvitel útján a proteázok kaskádszerű aktiválódását váltják ki. Az ICE-proteázok lehetséges szubsztrátjai a cytoskeleton proteinjei, így a fodrin- és az aktinfilamentumok. Azonban nem minden apoptózisformában igazolható ICE-proteáz-aktiválódás, és egyéb proteázok (mint például a kalpain) is fontosak lehetnek a sejthalál kivitelezésében (23).

### Az apoptózis elkülönítése a sejtpusztulás más formáitól

#### Apoptózis és programozott sejtpusztulás

A szervezet normális működése során megvalósuló programozott sejtpusztulás olyan sejthalált jelent, amely bekövetkezésének időpontja genetikailag meghatározott, s azt a célt szolgálja, hogy a szervezetben csak normális működésre képes és így működő sejtek legyenek. A sejtek valószínűleg „beépített” öngyilkos-programmal születnek, s ha a létükhöz szükséges pozitív szignálok elmaradnak (például hormonok, növekedési faktorok) vagy genetikai „órájuk” lejár, az ön-

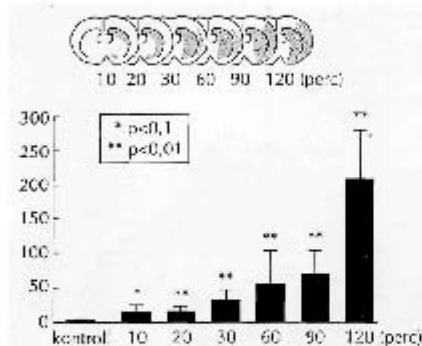
gyilkos program aktiválódása révén eliminálódnak. Elettani példái ennek a laktáló emlő regressziója, a bélhámsejtek lelködése és megújulása vagy az embrionális morfogenezis. Másrészt, a proliferációra képes sejtek esetében a sejtszám állandóságát a proliferáció és a fiziológiás programozott sejtpusztulás egyensúlya biztosítja. A folyamat igen összetett szabályozásának zavara fontos kóros tényező, hiszen mind a fokozott sejtpusztulás, mind a sejtpusztulás gátlása káros lehet. Alzheimer-kórban és Parkinson-betegségben bizonyos neuronpopulációk idő előtti pusztulása zajlik, míg a sérült sejtek eliminációjának zavara a tumorképződés és -propagáció serkentője.

Az apoptózis esetében azonban patológiás tényezők felelősek ezen genetikai program beindulásáért, s a szervezet számára még szükséges sejtek idő előtti, aktív pusztulása következik be.

A programozott sejtpusztulás az esetek többségében mind morfológiailag, mind biokémiailag az apoptózis jellemzőit hordozza (38) (1. táblázat).

#### Apoptózis és nekrozis

A nekrozis definíciója és klasszifikációja, csakúgy mint a programozott sejtpusztulásé és az apoptózisé, napjainkban élénk vita tárgya. „Nincs a sejtbioológiának és patológiának még egy területe, ahol nagyobb »rendetlenség« uralkodna, mint az apoptózis és nekrozis kérdéseiben” - írja Farber (39). Majno például az ischaemiás nekrozist sajátos jellemzői miatt onkózisnak nevezi



2. ábra. Az apoptotikus sejtek (pontokként ábrázolva) megoszlása és száma az artéria cerebri média 10-120 perces lezárítása után 48 órával az artéria cerebri média ellátási területén, a commissura anterior frontális síkjában TUNEL-módszerrel vizsgálva (40). Megfigyelhető volt, hogy noha az apoptotikus sejtek 10-120 perces elzárást követően az artéria cerebri média teljes ellátási területén felszaporodnak, 90-120 perces ischaemiát követően elsősorban az infarktus (aranykék rész) belső határzónájában csoportosulnak. Az oszlopdiagram az apoptotikus sejtszám progresszív növekedését mutatja. (Árva a kiadó engedélyével.)

- A nekrozis morfológiai jellemzői jól ismertek (karyopycnosis, karyorrhexis, karyolysis; a citoplazma kifejezett eozinofília, organelumainak membránkárosodása; demarkáció és fagocitózis a reaktív lobsejtes infiltráció révén; általában a sejtek nagyobb csoportjait érinti; erős vagy hosszan tartó károsító behatásokra alakul ki), s ezen jegyek alapján különíthető el mindmáig legbiztosabban az apoptózistól.

- Mivel nekrozisban a DNS lebomlása random, elektroforézis után elkenet csak látszik a gélen, szemben az apoptózis „létrájával”.

- A nekrozis folyamatában - ellentétben az apoptózissal - a membránpermeabilitás ugrásszerűen megemelkedik, s ez jelenti a visszafordíthatatlanság! pontot.

- Nekrozis esetében a membránkárosodás és a sejtduzzanat általában összefüggő sejtcsoportokra terjed ki. Apoptózisban a sejtmembránok épek, s jellemzően izolált sejteket érint.

- A sejtalkotókból nagy mennyiségben felszabaduló citokinek és egyéb kemotaxinok gyulladási reakciót indítanak el, amely a nekrotikus sejtek eltakarítása mellett a környező szövetek károsodását is okozzák. Az elpusztult szövet helyén - túlélés esetén - kötőszövetes heg marad vissza. Az apoptózist nem kíséri lobsejtes beszűrődés és hegképződés.

- A nekrozist nem kíséri génaktiváció és fehérjeszintézis - szemben az apoptózissal -, azaz a sejt nem vesz részt aktívan saját pusztulásában.

- A kiváltó ingerekről általában kijelenthetjük, hogy azonosak; bármilyen behatás, amely nekrozist képes kiváltani, apoptózist indukálhat, ha a sejt túléli a behatás kezdeti fázisát: az apoptózis tehát nem közvetlenül letális noxákra adott, összehangolt sejtválasz (13).

Mind ezek alapján kijelenthetjük, hogy a nekrozis alapvetően különbözik az apoptózistól (1. táblázat).

## Apoptózis a központi idegrendszerben

Az idegrendszeri károsodások, az idegsejtpusztulás hátterében egyre több körképben igazolták az apoptózis jelentőségét (19). A különböző neurodegeneratív kórállapotokban (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór, amyotrophiás laterális sclerosis, spinalis izomatófia) és fertőző körképben (HIV-encephalopathia, prionbetegségek) apoptotikus sejtpusztulást igazoltak.

## Agyi ischaemia és apoptózis

Elsősorban állatkísérletes vizsgálatok eredményeire támaszkodhatunk a probléma ismertetésekor. A rágcsálókban különböző módszerekkel előidézett artéria cerebri média okklúzió és reperfüzió az agyi ischaemiakutatás alapmodellje, s így az apoptózisvizsgálatok-hoz is a leggyakrabban használt módszer. E modellben már tíz perc ischaemia elegendőnek bizonyult az apoptózis biokémiai markerének tekintett „güllétra” megjelenéséhez; szövettani metszeten TUNEL-technikával vizsgálva az apoptotikus sejtek 10-90 perc ischaemiát követő 48 óras reperfüzió után elszórtan, az artéria cerebri média teljes ellátási területének megfelelően, míg 90-120 perc ischaemiát követő kétnapos reperfüzió után elsősorban az infarktus határzónájában (az úgynevezett ischaemiás penumbra) nekrotikus sejtekkel keverten helyezkedtek el (40, 41) (2. ábra). Ez a 90 perc tartható mind a nekrozis, mind az apoptózis elsődleges terápiás ablakának: ha ekkor reperfüzió történik, kisebb az infarktus, kevesebb az apoptotikus sejt. Hangsúlyozzuk, hogy a mintegy 90 perces meghaladó időtartamú fokális agyi ischaemiában a pusztuló sejtek többsége nekrozist szenved - a nekrozis ép szövetet határos, úgynevezett nekrobiotikus zónájának (ischaemiás penumbra) csökkentésére alkalmas az antiapoptotikus kezelés. (A jelenlegi neuroprotektív stratégiákban a cél a penumbrazóna megmentése, amely volumenében gyakran többszöröse az ischaemiás nekrotikus területek.) Az apoptotikus sejtek az

arteria cerebri média okklúzióját követően már fél óra reperfüziós idő után megjelennek, 24–48 óra között látható a legtöbb, de négy hét után is még megtalálhatóak. [Megjegyezzük, hogy mivel a kromatintömörüléstől az apoptotikus testek képződéséig csupán néhány perc telik el (42), s az apoptotikus sejtek 4-9 óráig ismerhetők fel a szövetekben, magas apoptózisráta mellett is csak relatíve kevés apoptotikus sejt mutatható ki (12).]

Az apoptózis és az aktív proteinszintézis összefüggését *Linnik* igazolta kísérletes agyi ischaemiában (43): a fehérjeszintézis-gátló cikloheximid hatására csökkent az apoptózis gyakorisága és az infarktus kiterjedése (a fehérjeszintézis gátlása azonban nem mindig ilyen hatású: ez az apoptózist indukáló és gátló fehérjék sejttípusra jellemző arányától függ - míg például neuronokban és lymphocytákban a fehérjeszintézis gátlása az apoptózist gátolja, addig neutrophyl granulocytákban azt indukálja). Valószínű, hogy az erős ischaemiás inzultust szenvedett neuronokban a proteinszintézis leáll, és azok nekrotizálódnak, míg az egy fokkal gyengébb behatások az apoptóziskaskád beindulását eredményezik. Indukálható transzkripciós faktorok ischaemiát követően hosszan kimutathatóak az apoptotikus neuronokban (27), de szerepük itt sem tisztázott: a c-jun például regenerálódó neuronokban is fokozottan expresszálódik, így a „túlélési” programban is szerepet játszhat (44).

Az apoptózis folyamata tehát az ischaemiás inzultus során és utána hosszú ideig bármikor beindulhat - joggal várhatjuk, hogy az antiapoptotikus terápiás beavatkozások még az ischaemiás inzultust követően napokkal, sőt hetekkel is eredményesen csökkentsék a sejtpusztulást és az infarktus kiterjedését (41).

Nem hagyhatók figyelmen kívül az apoptózis jelenségét megkérdőjelező közlemények sem: *Garcia* 148, az arteria cerebri média permanens okklúzióján (0,5-96 óra) átesett patkány agyának fény-, elektronmikroszkópos és DNS-elektroforézis-vizsgálata alapján tagadja az érdemleges neuronális apoptózis jelenlétét - annyit állít csupán, hogy egyes neuronok 4-6 órás érelzárás után mutatják irreverzibilis károsodás jeleit (45).

## Antiapoptotikus stratégiák agyi ischaemiában

### bcl-2-transzfekció

Az apoptózisnak négy fázisa különíthető el: 1. a sejtciklus leállása, 2. reverzibilis preapoptotikus fázis, 3. irreverzibilis preapoptotikus fázis, 4. apoptózis morfológiai jelekkel. A neuronális apoptózis potenciális terápiájában az 1-2., illetve a 2-3. változások gátlása jöhet szóba. (Az 1-2., illetve a 2-3.

átalakulásban kiemelkedő szerepet játszó gének: bax, bcl-x<sub>s</sub>, bad, bak, ICE, priICE, ICE-1<sub>L</sub>, ezzel ellentétes hatásúak: bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>, bcl-x<sub>s</sub>, A1, Mcl-1, BAG-1, raf-1, ICH-1s.)

Agyi ischaemiában a bcl-gén-család szerepének kutatása látszik kiemelkedően ígéretesnek. Replikációdefektív, bcl-2-transzfektált herpes simplex vírus (HSVlac) intracerebrális injekciója arteria cerebri média elzáródását megelőzően jelentősen csökkentette a stroke kiterjedését (46). A bcl-2 plazmáddal transzfektált neurontranszfectáns pedig számos apoptotikus inger hatása csökkenthető eredményesen (47). Bcl-2-t fokozottan expresszáló transzgenikus egérben mind a fiziológias programozott sejtpusztulás, mind az ischaemiaindukálta apoptózis gyakorisága csökkent, s az infarktus kiterjedés mintegy 50%-kal bizonyult kisebbnek (48).

### Neurotrofinok

Ischaemiás modellekben az NGF-infüzió eredményei (32, 49) mellett ígéretesek a neuralis sejtszuszpenzió és szövetdarabok beültetésével végzett kísérletek is - ezek a morfológiai és funkcionális neurológiai deficitet egyaránt kedvezően befolyásolják (50). Saját vizsgálatainkban az ischaemiás inzultust megelőzően beültetett, neurotrofinokban (és egyéb antiapoptotikus fehérjékben, mint például a Bcl-2) gazdag neurális szövet a később létrehozott arteria cerebri média okklúzió okozta agyi infarktus kiterjedését szignifikánsan csökkentette. NGF és egyéb, neurotrofinokat termelő, genetikailag manipulált sejtenyészetekből származó sejtek beadásával pedig az apoptotikus ingerek hatása mérsékelhető (51, 52).

### p75NGFR

Az NGF antiapoptotikus hatását a nagy affinitású NGF-receptoron keresztül fejt ki. Az NGF-nek azonban kis affinitású receptora is van (p75NGFR), amelynek funkciója csak részben ismert. Ha ez a kis affinitású receptor expresszálódik a sejt felszínén és nem kötődik hozzá NGF, apoptózis indukálódik. A p75NGFR-mediálta apoptózis befolyásolása, például ezekhez a receptorhoz kötődő molekulák kifejlesztésével, szintén ígéretes antiapoptotikus stratégia, elsősorban az Alzheimer-kórban, de agyi ischaemiában is (53).

### Sejtdhéziós molekulák

A sejttúlélést szolgáló sejt-sejt, sejt-mátrix kölcsönhatások közvetítésében kulcsszerepet játszanak a sejtdhéziós molekulák, s a mechanizmus

- legalábbis részben - antiapoptotikus. Ezeknek a fehérjéknek az expresszióját humorális faktorok is befolyásolják, mint azt egyes citokinek és hemoszta- zisfaktorok vonatkozásában kutatócsoportunk is igazolta (54). További vizsgálatok szükségesek, hogy ezen sejtfelszíni molekulák befolyásolásának antiapoptotikus lehetőségeit jobban megismerjük.

### Antiapoptotikus hatású farmakonok

Az N-acetil-cisztein (NAC) ismert oxigénszabad- gyök-fogóról újabban bizonyították, hogy a gén- transzkripció gátlása révén antiapoptotikus hatású

(55, 56). A (-) -deprenil, ismert MAO-B-gátlóról igazolták, hogy egyik metabolitja, a (-)-dezmetil- deprenil csökkenti a neuronális apoptózist (57), mivel emeli az antiapoptotikus bel géncsalád fehérjetermékeinek szintjét, emeli a különböző gyökfogyó molekulák (például SOD-1) szintjét, valamint mérsékli a Bax-fehérjék szintézisét (58). A (-)-deprenil antiapoptotikus hatását igazolták újabban melanoma- és PC 12 -sejteken (59).

Az apoptózis molekuláris genetikai hátterének jobb megismerése, az apoptotikus neuronpusztulás mechanizmusának feltárása új antiapoptotikus neuroprotektív stratégiák lehetőségét ígéri a nem távoli jövőben.

### IRODALOM

- Flemming W. Über die Bildung von Richtungsfiguren in Saugtierereien beim Untergang Craafscher Polikell. Arch Anat EntwGesch T 005;221-244.
- Nissen F. Über das Verhalten der Kern- in den Milchdrüsenzellen bei der Absonderung. Arch Mikroskop Anat 1886;26:337-342.
- Grüber L. Eine neue Anschauung über physiologische Zellau- schaltung. Arch Zellforsch 1914; 12:373-394.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phe- nomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-257.
- Skalka M, Mátyásová J, Čejková M. DNA in chromatin of irradiat- ed lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. FEBS Lett 1976;72:27-274.
- Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol 1984; 142:67- 77.
- Szendé B. A programozott sejthalál (apoptosis) biológiai és patológiai jelentősége. Lege Artis Medicinae 1992;2:4-11.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. Am J Pathol 1990;136:593-599.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of pro- grammed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501.
- Martin SJ, Newmeyer DD, Mathias S. Cell-free reconstruction of Fas- UV irradiation and ceramide-induced apoptosis. EMBO J 1995;14:5191-5200.
- Ueda N, Walker PD, Hsu S-M. Activation of a 15-kDa endonuclease in hypoxia/reoxygenation injury without morphologic features of apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:7202-7206.
- Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in patho- logy. Int Rev Exp Path 1991;32:223-254.
- Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. Lancet 1993;341: 1251-1254.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994;73:2013-2026.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995;146:3-15.
- Pésös L, Thomazy V, Falus A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. FEBS Lett 1997;224:104-110.
- Savill J, Dransfield N, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor- mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Nature 1990;343:170-177.
- Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode C. Elegans. Cell 1986;44:817-829.
- Bredesen DE. Neural apoptosis. Ann Neurol 1995;38:630-661.
- Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 1991;348:334-336.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 1993;76:241-251.
- Bredesen DE. Neuronal apoptosis: genetic and biochemical modu- lation. In: Tomei LD, Cope FO (eds.) Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1994;8:397-421.
- Tang DG, Porter AT. Apoptosis: a current molecular analysis. Pathol Oncol Res 1996;2:117-131.
- Rabizadeh S, LaCount DJ, Friesen PD, Bredesen DE. Expression of the baculovirus p35 gene inhibits mammalian neural cell death. J Neurochem 1993;61:2316-2321.
- Bump NJ, Brady K, Chen P. Molecular interaction of baculovirus p35 and Interleukin-1 P converting enzyme (ICE): proposed mecha- nism for the regulation of an apoptotic pathway. J Cell Biochem 1995;(suppl 106):294.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 1995;80:293-299.
- Dragunow M, Preston K. The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. Brain Res Rev 1995;21:1-20.
- Kiessling M, Gass P. Stimulus-transcription coupling in focal cerebral ischemia. Brain Pathol. 1994;4:77-83.
- Gajate C, Alonso MT, Schimmang T. C-fos is not essential for apo- ptosis. Biochem Biophys Res Commun 1990;218:267-272.
- Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr. Altered gene expression in neurons during programmed cell death. Identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. J Cell Biol 1994;127:1717-1727.
- Declawer TL, Johnson EM Jr. Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. J Cell Biol 1993;123:1207-1222.
- Tanaka K, Tsukahara T, Hashimoto N, Ogata N, Yonekawa Y, et al. Effect of nerve growth factor on delayed neuronal death after cerebral ischaemia. Acta Neurochir (Wien) 1994; 129:64-71.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 1980;284: 655-656.
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. J Biol Chem 1993;268:10932-10937.
- Trump BF, Berezsky IK. Calcium mediated cell injury and cell death. FASEB J 1995;9:219-226.
- Greenlund LJS, Declawer TL, Johnson EM, Jr. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. Neuron 1995;14: 303-315.
- Sarafian TA, Bredesen DE. Invited commentary: Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? Free Rad Res Commun 1994: 2:1-8.
- Schwartz LM, Smith SW, Jones MEE, Osborne BA. Do all programmed cell death occur via apoptosis? Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:950- 954.

39. Farber E. Ideas in pathology: programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* 1994;7:606-609.
40. Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1996;28:1262-1268.
41. Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 1995;146: 1045-1061.
42. Russel SW, Rosenau W, Lee JC. Cytolysis induced by human lymphokine. Cinematographic and electron microscopic observations. *Am J Pathol* 1972;69:103-111.
43. Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993;24:2002-2009.
44. Soares HD, Curran T, Morgan JI. Transcription factors as molecular mediators in cell death. *Ann NY Acad Sci* 1994;747: 173-182.
45. Garda JH, Joseph R, Herpolshelmer BC, Liu K-F, Ho K-L. Neuronal ischemic injury to the brain after focal ischemia: apoptosis or necrosis (?). *Stroke* 1994;25:201.
46. Linnik MD, Zahos P, Geschwind MD, Federoff HJ. Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996;28: 1670-1676.
47. Zhong L-T, Sarrafian T, Kané DJ, Charles AC, Mah SP, et al. Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4633-4637.
48. Martinou J-C, Dubois-Dauphin M, Stapie JK, Rodriguez I, Frankowski H, et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994;13:1017-1030.
49. Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferreira DM. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 1996;39:114-122.
50. Johansson BB, Grabowski M. Functional recovery after brain infarction: plasticity and neural transplantation. *Brain Pathol* 1994; 4:86-96.
51. Kim DH, Guhn PH, Noble LJ, Nathan D, Yu IS, Nockels RP. Treatment with genetically engineered fibroblasts producing NGF or BDNF can accelerate recovery from traumatic spinal cord injury in the adult rat. *Neuroreport* 1996;7:2221-2226.
52. Schumacher JM, Shori MP, Hyman BT, Breakfield XO, Isacson O. Intracerebral implantation of nerve growth factor-producing fibroblasts protects striatum against neurotoxic levels of excitatory amino acids. *Neuroscience* 1991;46:661-670.
53. Rabizadeh S, Oh I, Zhong L, Yang J, Bitler CM, et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 1993; 261:346-348.
54. Nagy Z, Vastag M, Skopál J, Kolev K, Machovitch R, et al. Human brain microvessel endothelial cell culture as a model system to study vascular factors of ischemic brain. *Kelo J Med* 1996; 46:200-206.
55. Ferrari G, Yan CY, Greene LA. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neuroscience* 1996; 16:2867-2868.
56. Yan CY, Ferrari G, Greene LA. N-acetylcysteine-promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription dependent. *J Biol Chem* 1996;270:26827-26832.
57. Tatton WG, Ju WY, Holland DP, Tai C, Kwan M. (-)-Deprenyl reduces PC12 cell apoptosis by inducing new protein synthesis. *J Neurochem* 1994;63:1672-1676.
58. Tatton WG, Ju WJH, Wadla J, Tatton NA. Reduction of neuronal apoptosis by small molecules: promise for new approaches to neuroprotective therapy. In: Olanow W, Youdim M, Jenner P (eds.) *Neuroprotection and Neurodegeneration*. London, Academic Press Ltd. 1996:209-229.
59. Magyar K, Szende B, Lengyel J, Tekes K. The pharmacology of B-type selective monoamine oxidase inhibitors: milestones in (-)-Deprenyl research. *J Neural Transm Suppl* 1996;48:29-43.

