

Ewa Rzepecka-Woźniak, Barbara Próchnicka, Franciszek Trela

Apoptoza kardiomiocytów w diagnostyce immunohistochemicznej nagłych zgonów sercowych

Cardiomyocyte apoptosis in immunohistochemical diagnosis of sudden cardiac death

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej CM UJ w Krakowie
Kierownik: dr hab. F. Trela - profesor UJ

W wielu przypadkach nagłych zgonów z przyczyn sercowych rutynowa diagnostyka jest niewystarczająca dla potwierdzenia niedotlenienia mięśnia sercowego zwłaszcza we wczesnych fazach zawału. Jedną z metod poszerzenia zakresu badań pośmiertnych jest badanie metodą TUNEL wykrywające fragmentację DNA kardiomiocytów związaną z apoptozą. Praca stanowi sprawozdanie z programu badań, który obejmował 34 przypadki zgonów. W 19 przypadkach uzyskano dodatni odczyn potwierdzający obecność fragmentacji DNA. W 15 przypadkach wyniki odczynu były ujemne. W części przypadków (22) wykonano barwienie metodą Nielsena oceniając fuksynochłonność włókien. Autorzy na podstawie własnych wyników badań w konfrontacji z doniesieniami z piśmiennictwa przedstawiają zasady kwalifikacji i praktycznej interpretacji badań wykrywających fragmentację DNA kardiomiocytów.

In a considerable number of cases of sudden death "routine" diagnosis is insufficient to prove myocardial ischaemia especially in early myocardial infarction. One of the additional methods of postmortem diagnosis is detection of cardiomyocyte DNA fragmentation related to apoptosis. The authors presented research on 34 cases. All postmortem examinations were conducted in the Chair of Forensic Medicine of the Jagiellonian University in Kraków. The data from history were taken into account as well as the results of gross macroscopic and microscopic examination (hematoxylin et eosin staining). In 19 cases the result of TUNEL assay was positive, in 5 apoptotic cell count was 80-90%. "Positive" cases showed focal or diffuse apoptotic myocytes. In 15 cases apoptotic reaction was negative including 3 cases of fatal ethanol intoxication and 1 aminotryptiline intoxication. In 22 cases the acid fuchsin technique (Nielsen's) was applied. The authors confronted their results with the data from literature and presented principles of qualification and practical interpretation of immunohistochemical apoptosis reaction.

Słowa kluczowe: apoptoza, zawał mięśnia sercowego, niedotlenienie, fragmentacja DNA.

Key words: apoptosis, myocardial infarction, hypoxia, DNA fragmentation

Celem prowadzonych badań była ocena przydatności odczynu wykrywającego fragmentację DNA związaną z apoptozą w kardiomiocytach w diagnostyce nagłych zgonów ze szczególnym uwzględnieniem wczesnych faz zawału mięśnia sercowego. Inspiracją tych badań były doniesienia z prac badawczych, w których apoptoza została wykazana jako dominujący model śmierci komórek we wczesnych fazach niedotlenienia (1, 2, 6, 10, 16, 21). Niektóre z prac podkreślają szczególną rolę apoptozy tylko w sytuacji, gdy po niedotlenieniu dojdzie do ponownego ukrwienia danego obszaru (reperfuzja) (5, 7, 20).

Apoptoza, znana też jako „zaprogramowana śmierć komórki”, jako proces biologiczny wymaga energii. Stąd tezy, że o rodzaju śmierci jakiej podlegać będzie komórka decyduje poziom ATP w danym obszarze (8, 11). Apoptoza zainicjowana przez czynniki wyzwalające przebiega w sposób uporządkowany. W patogenezie apoptozy szczególną uwagę zwrócono na aktywację kaskady cytoplazmatycznych proteaz - kaspaz (8, 12, 17). Podkreśla się także udział mitochondriów i wolnych rodników (9). Stwierdzono, że proces wiąże się także ze wzrostem ekspresji fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie błony komórkowej (14). Konsekwencją procesu jest morfologicznie wyrażona śmierć komórki, na którą składają się - kondensacja jądrowej chromatyny - rozpad na pojedyncze ciała przy nieuszkodzonej błonie jądrowej oraz - zagęszczenie cytoplazmy z obkurczeniem komórki. Późniejszy etap to rozpad jądra i cytoplazmy na tzw. ciała apoptotyczne, bardzo szybko fagocytowane przez sąsiednie komórki. Rozpad jądrowego DNA w apoptozie odbywa się na drodze aktywacji lub syntezy „de novo” specyficznych endonukleaz, które dzielą DNA na określonej długości dwuniciowe fragmenty. Ten uporządkowany rozpad jądrowej chromatyny można wykazać metodą elektroforezy DNA na żelu agarozowym. Także ta właściwość została wykorzystana w odczynie immunohistochemicznym wykrywającym fragmentację DNA in situ.

Apoptozie w odróżnieniu od martwicy nie towarzyszy naciek zapalny, jednakże na co zwracają uwagę Majno i Joris (13) martwica (necrosis) jest sumą zjawisk jaką inicjuje śmierć komórek zarówno na drodze apoptozy jak i onkozy. Termin oncosis użyty został przez von Recklinghausena w 1910 roku i miał ilustrować śmierć komórki przebiegającą z jej obrzękiem. Odróżnienie czy śmierć komórki odbyła się na drodze apoptozy czy onkozy obejmuje ocenę danych począwszy od morfologii komórki (obkurczenie/obrzęk), przez przepuszczalność błony komórkowej (wzrost przepuszczalności w onkozie), ocenę rozpadu jądrowego DNA (uporządkowany w apoptozie), obecność fosfatydyloseryny na błonie komórkowej, wykrycie aktywności kaspazy, identyfikację zwiększonej ekspresji genów i ich produktów oraz identyfikację specyficznych endonukleaz (apoptoza) (4). Z tych wszystkich parametrów najczęściej ocenia się fragmentację jądrowego DNA, wykorzystując dostępne metody - elektroforezę i badanie immunohistochemiczne. Jakkolwiek elektroforeza DNA na żelu agarozowym jest

czułą metodą, to jednak wyniki z obszarów niedokrwionego mięśnia wykazują mieszaninę rozpadu DNA - jako rozpadu uporządkowanego i przypadkowego. Należy mieć na uwadze, że myocardium to mieszanina różnych populacji komórek, nie tylko kardiomiocytów, ale i obecnych tam komórek naczyń i podścieliska, czy komórek osiadłych. W metodzie identyfikacji apoptozy in situ wykazano, że na pewnych etapach wynik pozytywny dotyczy zarówno apoptozy jak i onkozy (6). W badaniach doświadczalnych Ohno i współpracowników (15) stwierdzono bowiem, że apoptotyczne kardiomiocyty mogą być onkotycznymi, w których doszło do rozpadu DNA. Badania nad rodzajem śmierci poszerzono tu o ocenę ich ultrastruktury poprzez wykorzystanie w tym celu mikroskopii elektronowej. Wnioskiem tych badań było stwierdzenie, że fragmentacja DNA nie zawsze jest tożsama z pojęciem apoptozy, co oznacza, że „apoptotyczne” kardiomiocyty strefy zawału mogą być wyrazem także innej śmierci komórki.

Odróżnienie tych dwóch rodzajów śmierci komórek ma istotne znaczenie z punktu widzenia klinicznego. Apoptoza jako proces uporządkowany może podlegać wpływom na różnych etapach - np. poprzez działania farmakologiczne. Wykrycie apoptozy w badanym materiale wymaga potwierdzenia w co najmniej dwóch odczynach (wykrywających różne typowe dla apoptozy zmiany). W naszym materiale wykorzystaliśmy odczyn immunohistochemiczny, wykrywający fragmentację DNA. Materiał sekcyjny ogranicza możliwości zastosowania wielu metod potwierdzających apoptozę. I to zarówno z powodu ograniczonej dostępności metod dla skrawków parafinowych, jak i z powodu samej specyfiki materiału (np. długi czas od zgonu do sekcji).

MATERIAŁ

Przedmiotem badań były wycinki mięśnia sercowego pobrane w czasie sądowo-lekarskich sekcji zwłok, wykonanych w Zakładzie Medycyny Sądowej w Krakowie w latach 1998-2001 w przypadkach nagłych zgonów. Głównym kryterium kwalifikującym do badań był makroskopowy obraz sekcyjny wskazujący na sercowy mechanizm śmierci. 16 przypadków zakwalifikowano na podstawie danych z wywiadu i makroskopowego obrazu sekcji. Wśród nich znalazły się 4 przypadki ostrego zatrucia alkoholem etylowym i 1 zatrucia amitryptyliną, w pozostałych alkohol był nieobecny. W 18 pozostałych przypadkach rozszerzono kryterium doboru tak, aby wyeliminować ewentualny wpływ zatrucia alkoholem etylowym.

Badana grupa objęła łącznie 34 przypadki, w tym 30 mężczyzn i 4 kobiety, średnia wieku badanych mężczyzn wyniosła 47,17, u kobiet 44,25.

W 3 przypadkach czas od chwili stwierdzenia zgonu do sekcji nie przekroczył 24h, w 18 wahał się w pobliżu 24h, w 9 nie był dłuższy niż 48h, w 4 przypadkach przekroczył 72h (zwłoki przetrzymywane w chłodni).

Analiza wywiadu obejmowała dane dotyczące chorób serca, nadciśnienia tętniczego, innych chorób samoistnych, dolegliwości poprzedzających zgon i ewentualnie prowadzoną reanimację:

- w 7 przypadkach uzyskano dane o wcześniejszych chorobach serca (w tym

2 przypadki po przebytych zawałach mięśnia sercowego, 1 po nagłym zatrzymaniu krążenia w przeszłości);

- w 2 przypadkach odnotowano nadciśnienie;
- w 18 przypadkach wywiad w kierunku chorób serca był ujemny;
- w 7 przypadkach brak było danych;
- dolegliwości poprzedzające zgon:(np. duszność, ból w klatce piersiowej, ból żołądka) wystąpiły w 6 przypadkach, w 10 odnotowano zastąpienie i nagłe zatrzymanie krążenia nie poprzedzone innymi dolegliwościami; w 18 przypadkach brak było danych o objawach przed zgonem;
- reanimację podjęto w 13 przypadkach;
- inne choroby (nie dotyczące układu krążenia) zgłaszane w wywiadzie występowały w 8 przypadkach, w 7 przypadkach brak było danych, w 19 przypadkach nie występowały.

Tabela I. Liczba przypadków w poszczególnych grupach wiekowych z uwzględnieniem płci.

Table I. Number of cases - age/sex groups.

Grupy wiekowe (Age groups)	Kobiety (Women)	Mężczyźni (Men)	Ogółem (Total)
21-30	1	1	2
31-40		7	7
41-50	1	11	12
51-60	2	10	12
>90		1	1
Ogółem (Total)	4	30	34

Oceniano zmiany makroskopowe stwierdzane w mięśniu sercowym, głównie blizny i stopień nasilenia miażdżycy. Blizny obecne były w 14 przypadkach, przy czym rozległe (obejmujące okolicę co najmniej dwóch ścian) w 3 przypadkach, więcej niż na jednej ścianie w 3 przypadkach, pojedyncze ograniczone do fragmentu jednej ze ścian w 8 przypadkach. Miażdżycza tętnic opisana została w 30 przypadkach, w tym w 18 ze zwiększeniem światła. Uwzględniono także zmiany mogące sugerować świeży zawał: w 13 przypadkach opisano ognisko przekrwienia, ujęto tu także przypadki, gdzie w całości mięsień przedstawiał nieregularną barwę.

Ocenie poddano także zmiany mikroskopowe widoczne w preparatach barwionych rutynowo hematoksyliną-eozyną.

METODA

Wycinki pobrane z trzech okolic mięśnia sercowego lewej komory: ze ściany przednioprzegrodowej, tylnej i okolicy koniuszka utrwalane były w 10% roztworze

formaliny, następnie w sposób rutynowy przeprowadzane i zatapiane w parafinie. Tak przygotowany materiał był skrawany do kolejnych barwień. We wszystkich przypadkach wykonano barwienie hematoksyliną/eozyną oraz odczyn TUNEL. Barwienie metodą Nielsena (ocena fuksynochłonności włókien) wykonane było w 22 przypadkach. Odczyn immunohistochemiczny wykonywano według procedury określonej dla skrawków parafinowych wykorzystując zestaw do wykrywania apoptozy in-situ ApoTag Peroxidase Kit (ONCOR, Gaithersburg, MD, USA). Każdorazowo jako kontrolę prawidłowości odczynu barwiono preparat z jelita cienkiego. Preparaty zostały ocenione przez dwóch patomorfologów.

Opisywano występowanie dodatniego odczynu w preparacie czy to w pojedynczych, rozsianych komórkach, czy też w skupiskach komórek.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Dodatni odczyn na obecność fragmentacji DNA w komórkach mięśnia sercowego uzyskano w 19 przypadkach: w 5 ilość komórek „apoptotycznych” osiągała 80-90% w preparacie, w 10 komórki „apoptotyczne” występowały w skupiskach, w 4 stwierdzono pojedyncze, rozsiane komórki „apoptotyczne”. W tej ostatniej grupie znalazł się 1 przypadek ostrego zatrucia alkoholem etylowym. Analizując wszystkie przypadki zatrucia alkoholem etylowym pod kątem uzyskanych danych zwróciliśmy uwagę, że właśnie ten jeden przypadek wyróżniał się spośród pozostałych, zarówno obrazem makroskopowym (blizna w mięśniu sercowym, zaawansowana miażdżycza) jak i danymi z wywiadu (zdiagnozowana choroba wieńcowa). W tej grupie przypadków barwienie metodą Nielsena wykonane zostało w 12 przypadkach - aż w 9 było ujemne. Tylko w 3 uzyskano zgodność obu odczynów, wśród był tylko jeden z grupy najbardziej pozytywnych immunohistochemicznie.

W 15 przypadkach uzyskano wynik ujemny (brak odczynu), wśród nich znalazły się 3 przypadki ostrego zatrucia alkoholem etylowym i 1 przypadek zatrucia amitryptyliną. W 10 przypadkach wykonano barwienie Nielsena. Tylko w 2 przypadkach uzyskano zgodność obu odczynów (oba ujemne), w 8 natomiast barwienie Nielsena dało wynik pozytywny.

W przypadkach ostrego zatrucia alkoholem etylowym barwienie metodą Nielsena wykazało fuksynochłonność włókien we wszystkich preparatach.

DYSKUSJA:

W opiniowaniu o nagłych zgonach z przyczyn sercowych najistotniejsze jest stwierdzenie takich zmian chorobowych samoistnych w narządzie krążenia, które tłumaczyłyby zgon właśnie z tych przyczyn. Najwięcej wątpliwości budzą przypadki, gdy zarówno obraz makroskopowy jak i mikroskopowy nie wskazują na sercową przyczynę zgonu. Stąd konieczność poszerzenia rutynowej diagnostyki.(18, 19) Zastosowane barwienie immunohistochemiczne preparatów

mięśnia sercowego jest takim właśnie przykładem rozszerzenia badań w wybranych przypadkach. Co za tym idzie (także z uwagi na koszt badań) kwalifikacja do badań powinna obejmować analizę następujących grup wskazań:

1. dane z wywiadu chorobowego (szczególnie przypadki z ujemnym wywiadem w kierunku chorób serca),
2. wyniki badania makroskopowego i mikroskopowego (rutynowego (H/E) i np. metody Nielsena),
3. wyniki badania toksykologicznego (analiza ewentualnego wpływu alkoholu etylowego ze szczególnym uwzględnieniem fazy eliminacji),
4. stopień autolizy materiału.

Odczyn powinien być przeprowadzony w trzech rutynowo pobranych wycinkach z typowych lokalizacji i ewentualne celowanym ognisku. Interpretacja wyników powinna być zarówno jakościowa jak i ilościowa w konfrontacji z wszystkimi informacjami dotyczącymi danego przypadku. Jako pozytywne - czyli wskazujące na wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia niedotlenienia bez wątplenia należy traktować te wyniki odczynu, w których pozytywnie wybarwia się znaczny odsetek komórek 80-90% oraz przypadki, gdzie pozytywny odczyn występuje w skupiskach ogniskowe. Wątpliwości interpretacyjne budzą przypadki, gdzie tylko pojedyncze komórki dają odczyn pozytywny. W pracach doświadczalnych w miarę oddalania się od ogniska zawału zmniejszała się ilość komórek apoptotycznych. Stąd w takich przypadkach należy rozważyć, czy pobrany wycinek obejmował „właściwą okolicę”. Wnioski z naszych obserwacji potwierdzają to spostrzeżenie. Pozwalają także na przyjęcie, że uzyskanie dodatniego odczynu w pojedynczych nawet komórkach przemawia za niedotlenieniem. Interpretacja jednak takich przypadków powinna opierać się na całości materiału i obejmować zarówno dane z wywiadu jak i okoliczności śmierci.

Autorzy składają podziękowanie dla Pani mgr Marii Bobek za współpracę i fachową techniczną pomoc.

PIŚMIENNICTWO

1. Bardales R.H., Hailey LS, Xie SS, et al. In situ apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infarction. *Am.J.Pathol.*, 1996, 149, 821-829.
 -2. Bialik S., Geenen D.L., Sasson I.E., et al. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 1363-1372. -3. Buja L.M., Eigenbrodt M.L., Eigenbrodt E.H. Apoptosis and necrosis: basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1993, 117, 1208-1214. -4. Buja L.M., Entman M.L. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischaemic heart disease. *Circulation*, 1998, 98, 1355-1357. -5. Fliss H., Gattinger D., Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ. Res.*, 1996, 79, 949-956. -6. Gold R., Schmied M., Giegerich G., Breitschopf H.,

Hartung H.P., Tokoya K.V., Lassman H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation. *Lab. Invest.*, 1994, 71, 219-225. -7. Gottlieb R.A., Burleson K.O., Kloner R.A., et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.*, 1994, 94, 1621-1628. -8. Hettis S.W., To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*. 1998, 279, 300-307. -9. Higuchi M., Aggarwal B.B., Yeh E.T.H. Activation of CPP 32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99, 1751-1758. -10. Itoh G., Tamura J. Suzuki M, et al. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am. J. Pathol.*, 1995, 146, 1325-1331.

11. Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemerson R., Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.*, 1996, 86, 147-157. -12. MacLellan W.R., Schneider M.D. Death by design: programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 1997, 81, 137-144. -13. Majno G. Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am. J. Pathol.*, 1995, 146, 3-15. -14. Maulik N., Kagan V.E., Tyurin V., Das D.K. Redistribution of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine precedes the reperfusion-induced apoptosis in heart. *Am. J. Physiol.*, 1998, 274, H242-H248. -15. Ohno M., Takemura G., Ohno A. et al. „Apoptotic” myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with in situ end-labeling. *Circulation*, 1998, 98, 1422-1430. -16. Piro F.R., diGioia C.R.T., Galio P., et al. Is apoptosis a diagnostic marker of acute myocardial infarction? An autopsy study comparing histologic, immunohistochemical, TUNEL, and DNA electrophoresis evidence. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2000, 124, 827-831. -17. Reed J.C. Mechanisms of apoptosis. *Am.J.Pathol.*, 2000, 157, 1415-1430. -18. Ribeiro-Silva A., Martin C.C.S., Rossi M.A. Is immunohistochemistry a useful tool in the postmortem recognition of myocardial hypoxia in human tissue with no morphological evidence of necrosis? *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2002, 23, 72-77. -19. Rodriguez-Calvo M.S., Turret M.N., Concheiro L, Munoz J.I., Suarez-Penaranda J.M. Detection of apoptosis in ischemic heart -usefulness on the diagnosis of early myocardial injury. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2002, 22, 278-284. -20. Saraste A., Pulkki K., Kallajoki M, et al Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*, 1997, 95, 320-323.

21. Venoit J.P., Gattinger D.A, Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum. Pathol.* 1997, 28, 485-492.

Adres pierwszego autora:
 Katedra i Zakład Medycyny Sądowej CM UJ
 ul. Grzegorzewska 16,
 31-531 Kraków