

Apoptozisin Morfolojik Bulgularının Klasik Histolojik Boyama Metodu İle Gösterimi

EXPLANATION OF THE MORPHOLOGICAL FEATURES OF APOPTOSIS STAINED WITH CLASSICAL HISTOCHEMICAL METHOD

Murat TOSUN*, Serpil KALKAN**, Hasan CÜCE**

* Dr., Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD,

** Prof.Dr., Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD, KONYA

Özet

Amaç: Biz bu çalışmada apoptotik sürecin ısı ile uyarılmış olduğu kan dokusunda tespit edilen lökositlerdeki apoptozisin morfolojik özelliklerini, klasik bir histokimyasal boyama metodu ile boyamak suretiyle açıklamayı amaçladık.

Materyel ve Metod: Anti-koagülanlı tüpe alınan kan örnekleri 43 °C'ye dek ısıtıldı ve temiz lamlara yayılarak Hematoksilin-Eosin ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi.

Bulgular: Isının uygulanmaya başladığı ilk yarım saatlik sürede hücre konturlarında şişme ve şekil bozukluğu dikkati çekerken; 1 saat ve sonrası dönemde apoptotik cisimlerin ortaya çıktığı tespit edildi.

Tartışma: Apoptotik hücrelerin tanınması amacıyla içinde klasik histokimya, immunohistokimya, Flow cytometry gibi değişik metodların da olduğu birçok teknik mevcuttur. Klasik histokimya bu metotlar içinde en ucuz ve kullanımı kolay olması nedeniyle dikkati çekmektedir. Ancak spesifitesinin diğer metotlara göre az olması ve deneyim gerektirmesi nedeniyle ancak rutin çalışmalarda tercih edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Fizyolojik hücre ölümü, Histokimya, Hematoksilin-Eosin

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:258-261

Summary

Purpose: Our aim of study is to explain the morphological features of apoptosis at leucocytes, stimulated by heat and stained with classical histochemical staining method.

Materials and Methods: Blood samples, smeared on clear slides, were heated to 43 °C, stained with Hematoxylin-Eosin and evaluated under light microscope.

Results: After beginning to heat, during first 30 minutes we had determined cellular membrane abnormalities and swelling. 1 hour later apoptotic bodies was appeared in the cytoplasm.

Conclusion: So many methods including classical histochemistry, immunohistochemistry, flow cytometry etc., were developed by scientists to identify apoptosis in tissues. However, classical histochemistry is useful because of inexpensiveness and practical. But, this method is preferred only rutin laboratory studies because of low sensitivity and also it needs to experienced person.

Key Words: Apoptosis, Physiological cell death, Histochemistry, Hematoxylin-Eosin

T Klin J Med Sci 2002, 22:258-261

İlk olarak 1970 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından hücrenin fizyolojik ölümü olarak tanımlanan apoptozis, organizma içinde gerek doğum öncesi ve gerekse doğum sonrası dönemde yapısal anlamda çok önemli değişikliklerin ortaya çıkması için gerekli bir süreçtir. Nitekim embriyonik dönemde preimplantasyon, implantasyon dönemlerinde ve organogenezin tüm basamaklarında apoptozis oldukça yaygın olarak gözlenebilmektedir (1-4). Organogenezis döneminde görülen apoptozise örnek olarak Müllerian ve Wolffian kanalların gerilemesi, parmak arası perdelerin yok olması ve kalp gibi lümeneye sahip organların lümenlerinin oluşması verilebilir (3,4). Doğum sonrasında ölüme dek olan dönemde ise immün korunma mekanizmalarının işleyişi, vücudun hücre sayısının dengede tutulması, malignitelere karşı koruyucu etki oluşturulması gibi birçok önemli mekanizmanın işleyişinde

apoptozis çok önemli bir görev üstlenmektedir (5). Dolayısıyla tüm bu gelişimlerin izlenmesi ve gelişim sırasında meydana gelen aksaklıkların ortaya konması için organizma içinde apoptozisin varlığının ve derecesinin ortaya konması gerekmektedir. Günümüzde bu amaçla birçok metot uygulanmaktadır. Bu metotlar içinde en yaygın olarak kullanılanları immunohistokimyasal metotlar ve Hematoksilin-Eosin boyamadır. İmmunohistokimyasal metotlar uygulanması suretiyle apoptotik sürecin gelişiminde etkin oldukları bilinen bcl-2, p53, caspase'lar gibi daha birçok proteinin doku örneklerindeki varlıkları tespit edilmek suretiyle apoptozise giden hücreler kolaylıkla ve rakamsal değerlerle elde edilebilmektedir. Hematoksilin-Eosin boyama metodu ise birçok rutin histopatoloji laboratuvarında değişik değerlendirmelerde fikir sahibi olmak amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin

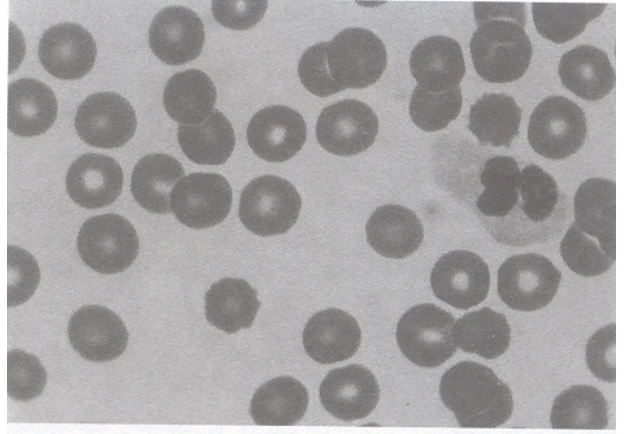
dokunun maligniteye yatkın olup olmadığı konusunda fikir verici bir kriter olan ve dokudaki apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranını belirten apoptotik indeksin hesaplanmasında veya hemopoetik sisteme ait malignitelerde tedaviye verilen cevabın değerlendirilmesinde kullanılan apoptotik hücre varlığı tespitinde bu metod efektif olarak kullanılmaktadır. Ancak bu metodlarla yapılan değerlendirmelerde doğru tanı için mutlaka apoptozisin morfolojik özelliklerinin iyi bilinmesi şarttır. Bizim bu çalışmamızdaki amacımız kan hücrelerindeki apoptozise ait morfolojik bulguların Hematoksilin-Eosin metodu ile gösterimini sağlamaktır.

Materyel ve Metod

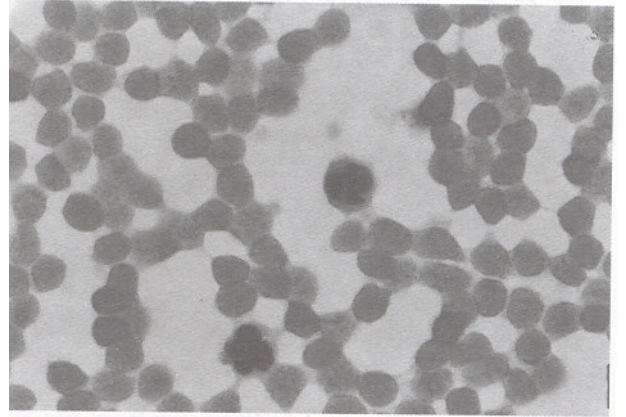
Organizma içinde apoptosisi uyaran etkenlerden biride ısı'dır (6). Çalışmamızda, venöz yoldan alınıp antikoagülanlı tüpe (Vacuette 2ml K3E EDTA K3 GREINER) konarak pıhtılaşması önlenen kan dokusu örneklerinin ısıya maruz bırakılması suretiyle apoptotik sürecin uyarılması sağlandı. Bu amaçla alınan kan örnekleri 43°C'lik etüve konarak 15 dakika, 30 dakika, 60 dakika, 4 saat ve 24 saat ısıtıldı. Süreler sonunda kan örneği homojenize edildi ve 50 µl alınıp temiz lamlara yayıldı. Kan yayması havada kurumaksızın hemen metanol içine konarak 2 dakika süreyle fikse edildi. Fiksasyon tamamlandıktan sonra lamlar azalan alkol serilerinden geçirilmek suretiyle hidrate edildi. Hidrasyonun tamamlanmasını takiben yaymalar Hematoksilin-Eosin boyama tekniğiyle boyandı. Boyama için Mayer's Hematoksilen ve %1'lik alkolik Eosin kullanıldı. Hidrate edilen preparatlar, Hematoksilin'de boyandıktan sonra ılık akar suda iyice yıkandı ve Eosine konuldu. Eosin'den çıkartılan preparatlar tekrar ılık akar su ile yıkanarak artan dereceli alkol serilerinden geçirilmek suretiyle dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaflandırma yapıp Entellan ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar Olympus BH-2 mikroskopta değerlendirilerek görüntülendi.

Bulgular

Isı uyarımlı apoptotik yolağın uyarıldığı dönemin başlangıcından sonuna kadar devam eden süreçte apoptozise ait morfolojik kriterler belirgin bir şekilde tespit edildi. İlk olarak ısıya maruz bırakıldıktan sonra 15. ve 30. dakikalarda alınan görüntülerde apoptozisin ilk morfolojik belirtilerinden biri kabul edilen hücre konturlarında büzüşme ve kıvrımlaşma dikkati çekmekteydi. Ayrıca çekirdek kromatin yapısının kabalaşmaya başladığı gözlemlendi. Hücre zarı bütünlüğünü korumaktaydı (Şekil 1,2). Bu dönem ısı faktörünün ortadan kaldırılması ile hücrenin apoptosise gidişinin durup geriye normal hücre yapısına dönüşümüne olabildiği başlangıç fazıydı. Bu süreçte preparatlardaki hücrelerin bir kısmının apoptotik sürece girdiği ancak belirgin bir kısmının bu süreçten

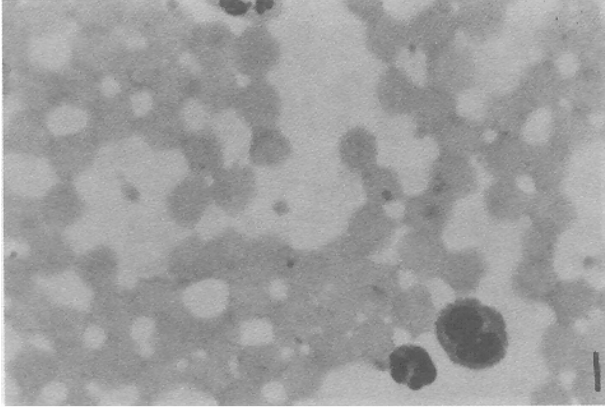


Şekil 1. Isıya maruz bırakılan kan dokusunda 15. dakikada bulunan bir lökositte apoptozisin ilk morfolojik belirtileri. Hücre yuvarlak konturlarını yitirmeye başlamış ve büzüşme ve kıvrımlaşmalar başlamış. Ancak hücre zarı bütünlüğünü korumakta. Çekirdek kromatininde belirginleşme mevcut. Eritrositlerin normal yapıda olduğu görülüyor. FMB: x330. Hematoksilen Eosin. Bar:6 µ.

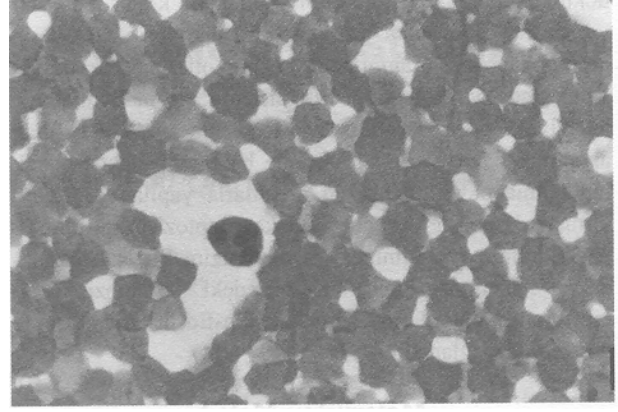


Şekil:2. Isıya maruz bırakılan kan dokusunda 30. dakikada alınan fotoğrafta 2 adet lökositte apoptozise ait erken dönem morfolojik bulgular gözlenmektedir. Her iki hücrenin çapındaki azalmaya ve her iki hücrenin çekirdek yapısında meydana gelen kromatin belirginleşmesine ve ayrıca çekirdek bütünlüğünün bozulmaya başladığına dikkat ediniz. FMB: x330. Hematoksilen Eosin. Bar:6 µ.

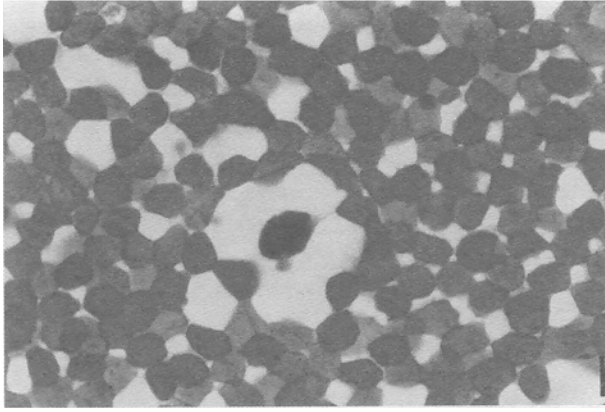
etkilenmediği tespit edildi (Şekil 3). İlerleyen dönemler olan 60. dakika, 4. saat ve 24. saatte alınan kan örneklerinden yapılan yaymalarda hücrelerin yine bir kısmında apoptotik sürecin ilerleyerek hücre içinde apoptotik cisimlerin ortaya çıkmaya başladığı ve hücre konturlarındaki bozulmanın daha belirgin olduğu görüldü. Ayrıca çekirdek kromatin yapısında belirgin derecede bozulma olduğu görüldü. Eritrositlerin yapısında 4. saat ve



Şekil 3. Isıya maruz bırakılan kan dokusunda 1. saatte bulunan iki hücreden eozinofil normal yapısını korurken, diğer lökositte belirgin derecede büzüşme, kromatin yapısında kabalaşma ve apoptotik cisimlerin ortaya çıktığı görülüyor. Eritrositlerin yapısında da şekil bozuklukları olduğu görülmektedir. FMB: x 330. Hematoksilen-Eosin. Bar: 6 µ.



Şekil 5. Isıya maruz bırakılan kan dokusunda 24. saat sonunda tespit edilen apoptotik bir hücrede büzüşme, hücre konturlarında bozulma ve apoptotik cisimlerin görünümü. Eritrositlerin yapısında da şekil bozuklukları olduğu görülüyor. FMB:x 330. Hematoksilen Eosin. Bar:6 µ.



Şekil 4. Isıya maruz bırakılan kan dokusunda 4. saatte bulunan apoptotik bir hücrede hücre çapında azalma ve büzüşme yanında sitoplazma içinde bulunan apoptotik cisimlerin görünümü. Eritrositlerin yapısında da şekil bozuklukları ve adezyonlar olduğu görülmektedir. FMB:x 330. Hematoksilen Eosin. Bar:6 µ.

24. saat'lerde alınan yaymalarda şekil bozuklukları olduğu görüldü (Şekil 3,4,5).

Tartışma

Fizyolojik hücre ölümü olarak da tanımlanan apoptozis, embriyogenezis döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca organizmanın şekillenmesi, hücreler arasında dengenin sağlanması ve savunulmasında oldukça önem arz eden kompleks bir mekanizmadır. Diğer hücre ölüm şekilleri olan onkosis ve nekrosis'den farklı olarak fizyolojik bir süreç olması nedeniyle vücuda zarar vermemektedir. Ancak değişik ölüm sinyallerine maruz

kalan hücrenin hangi tip ölümü seçeceği ilgili sinyalin türü, şiddeti ve süresi ile yakından ilgilidir. İlginç olarak nekroza neden olan ölüm sinyalleri tüm hücreleri etkilemesine karşın apoptozise neden olan sinyaller hücrelerin ancak bir bölümünü etkilemektedir. Bunun yanında nekroz sürecine giren hücrenin geriye dönüşü mümkün olmamakla birlikte; apoptozis sürecine giren bir hücre mitokondrial transmembran potansiyeli etkilenmedikçe uyarının kalkması durumunda normal yapısına geri dönebilir (7-9). Bu reversibl dönemde hücrede ilk görülen morfolojik değişiklik hücre konturlarında büzüşme ve kıvrımlaşmadır. Ancak hücre zarı normal görünümündedir. Çekirdek kromatin yapısında yoğunlaşma başlaması dikkati çeken başka bir morfolojik özelliktir. İlerleyen dönemlerde kromatin oldukça kaba bir görünüm alır ve sonunda çekirdek zarı dağılır. Sitoplazma içine salınan kromatin hemen zarla sarılı veziküller haline getirilir ki bu yapılar apoptotik cisimler olarak adlandırılır. Apoptotik süreçte kritik dönem, hücrede mitokondrial düzeyde değişikliklerin ortaya çıkmaya başladığı dönemdir. Eğer hücrede mitokondrial transmembran potansiyeli artmışsa artık hücre irreversibl döneme girerek apoptozis sürecini tamamlar ve dağılır. Dağılan hücre partikülleri çevrede mevcut makrofajlar tarafından fagosite edilir. Tüm bu sürecin sonunda ortamda geriye hiçbir hücresel artık kalmaksızın hücre yok edilmiş olur (8-11).

Çalışmamızda da kan hücrelerinde apoptotik sürecin uyarılıp başlatılması için edinilmesi ve kontrolü kolay ve etkin bir uyarıcı olan ısı kullanılmıştır. Daha önceden yapılan çalışmalarda (12) ısı etkenine maruz bırakılan kan materyalinde ilk yarım saat içinde morfolojik bozukluklar oluşmaya başlaması dikkati çekmiştir. Nitekim çalışmamızda da kritik derece olarak kabul edilen 43°C

(12) ısıya maruz bırakılan kan materyalinde 15. dakikada alınan örneklerde bazı hücrelerin konturlarında bozulma ve büzüşme olduğu dikkati çekmiştir. Ayrıca kromatin yapısında meydana gelen kabalaşma ve dağılma tarzındaki değişiklikler apoptozisin ilk dönemi olan reversibl döneme uygunluk göstermektedir. Isıya daha uzun süre maruz bırakılan materyallerden yapılan yayma örneklerinde yine hücrelerin bir kısmında kromatin yapısının oldukça kabalaştığı hatta bazı hücrelerde apoptotik cisimlerin ortaya çıktığı görülmüştür. Bu apoptotik cisimlerin varlığı artık apoptotik sürecin kritik dönemi aştığı ve hücrenin ölüm kararının alındığı irreversibl döneme girdiği şeklinde yorumlandı. Çalışmada dikkati çeken bir diğer nokta aynı metoda maruz bırakılan materyalden alınan örneklerde farklı fazlarda apoptotik hücrelerin bir arada olması yanında normal hücrelerin de bulunmasıydı. Bu bulgular hücrelerin apoptoze karşı direnç gösterme derecesinin hücrenin kendi direnci yanında bir çok farklı faktörlere de bağlı olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla apoptosis'in oldukça kompleks karar mekanizmaları sonrasında geliştiğini söylemek yanlış olmayacaktır. Bununla birlikte preparatlarda birçok alanda eritrositlerde meydana gelen şekil değişikliklerinin uzun süre yüksek ısıya maruz bırakılmaya bağlı olarak ortaya çıkmış yapısal değişiklikler olduğuna karar verildi. Bu değişiklikler artan ortam ısısına bağlı olarak gelişen hücre membranı hasarları sonucu ortaya çıkan şekilsel anomaliler olarak yorumlandı. Nitekim bu hücreler yüzeylerindeki elektriksel yük ve yapılarında mevcut sıvı ile plasmanın izoosmolar olmaları nedeniyle normalde birbirlerine yapışma eğilimi göstermemektedir (13). Ancak hem yüzey membranında meydana gelen hasarlar sonucu bu elektriksel aktivitelerin bozulması hem de eritrositlerin hipoosmolar duruma geçmesi nedeniyle ve çok sayıda eritrosit büzüşmeleri ve adezyonları görülmektedir.

Sonuç

Apoptosisin morfolojik bulgularının klasik bir histolojik boyama tekniği olan Hematoksilen-Eosin metodu ile ortaya konması ve değerlendirilmesi bilimsel çalışmalarda ve tanısal yaklaşımlarda oldukça kullanışlıdır. Ancak imkanlar elverdiği sürece bu sonuçların immunohistokimyasal metotlarla ve/veya Flow-Cytometry tekniği ile de desteklenmesi daha yararlı olacaktır. Bununla birlikte, immunohistokimyasal metotlarla yapılan değerlendirmenin boyamadan sonraki 2-3 gün içerisinde olması gerekmektedir. Dolayısıyla ilerleyen bir dönemde

aynı materyal incelenmek istendiğinde immunohistokimyasal boyanın etkisi azaldığı veya kalmadığı için tekrar boyama yapılması gerekecektir ki bu zaman ve kaynak kaybına neden olacaktır. Bu nedenle immunohistokimyasal olarak boyanıp tanı konulan materyallerin saklanması için Hematoksilen-Eosin metodu ile boyama yapılması bu israfı önleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Da Paeppe ME, Sardesai MP, Johnson BD, Lesieur-Brooks AM, Papadakis K and Luks FI. The role of apoptosis in normal and accelerated lung development in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 34(5):863-870.discussion 870-871. 1999 May.
2. ElShamy WM, Linnarsson S, Lee KF, Jaenisch R and Ernfors P: Prenatal and postnatal requirements of NT-3 for sympathetic neuroblast survival and innervation of specific targets. *Development*. 1996 Feb; 122(2): 491-500.
3. Catlin EA, Tonnu VC, Ebb RG, Pacheco BA, Manganaro TF, Ezzell RM, Donahoe PK and Teixeira J: Mullerian inhibiting substance inhibits branching morphogenesis and induces in fetal rat lung. *Endocrinology*. 1997 Feb; 138(2):790-6.
4. Ganam Y, Macias D, Dutturque-Coquilland M, Ros MA and Hurler JM: Role of TGF beta s and BMPs signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* 1996 Aug; 122(8):2349-57.
5. King-LB, Vacchio-MS, Dixon-K, Hunziker-R, Margulies-DH, Ashwell-JD: A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity* 1995 Nov; 3(5): 647-56.
6. Williams GT and Smith CA: Molecular Regulation of Apoptosis: Genetic Controls on Cell Death. *Cell* 1993; 74:777-9.
7. Majno G and Joris I: Apoptosis, Oncosis and Necrosis. An overview of cell death. *Am J of Pathology* 1995 Jan; 146(1): 3-15.
8. Green DR and Kroemer G: The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. *Trends in Cell Biology*. 1998 July; 8(7):267-71.
9. Green DR: Apoptotic pathways: Paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000 July;102:1-4. 7.
10. Hockenbery D. Defining Apoptosis. *Am J of Pathology*. 1995 Jan.; 146(1): 16-9.
11. Kroemer G, Zamzami N and Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* 1997 Jan.; 18(1):44-51.
12. Harmon BV, Winterford CM, O'Brien BA and Allan DJ. Morphological criteria for identifying apoptosis in *Cell Biology*. 2nd ed. 1994: 1:327-41.
13. Carola R, Harley JP, Noback CR. *Red Blood Cells in Human Anatomy & Physiology*. 1992; 555-60.

Geliş Tarihi: 14.06.2001

Yazışma Adresi: Dr.Murat TOSUN
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji Embriyoloji AD, KONYA
murat_tosun@yahoo.com