

Ocena mitochondrialnej drogi indukcji sygnału do apoptozy wywołanej L-argininą w hepatocytach szczura

Evaluation of mitochondrial pathway in L-arginine induced apoptosis of rat's hepatocytes

Agnieszka Pedrycz¹, Ewa Zwierzyńska², Marcin Orłowski³, Agata Zając⁴,
Mariusz Zwierzyński⁵

¹Department of Histology and Embryology Medical University in Lublin

²Isolation Ward Hospital in Chelm

³Centrum of Diagnosis and Therapy of Digestive System's Diseases

⁴Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Provincial Specialist Hospital in Chelm

⁵Department of Rehabilitation, Provincial Specialist Hospital in Chelm

Streszczenie

Wewnętrzna droga indukcji sygnału do apoptozy jest aktywowana przez stres komórkowy. Droga ta angażuje mitochondria w pośrednio i bezpośrednio. Celem obecnej pracy była immunohistochemiczna ocena ekspresji białek kaspazy 9, bax, bcl-2 zaangażowanych w mitochondrialną drogę śmierci komórki podczas apoptozy hepatocytów szczura indukowanej L-argininą.

Szczury użyte w niniejszej pracy zostały podzielone na 2 równe grupy. Zwierzęta z grupy doświadczalnej otrzymywały L-argininę - 40mg/kg masy ciała per os co drugi dzień przez 2 tygodnie i zostały dekapitowane po 3 tygodniach doświadczenia. Szczury z grupy kontrolnej dostawały 2ml wody destylowanej per os co drugi dzień i zostały dekapitowane po 3 tygodniach doświadczenia.

Wycinki wątroby pobrane do analizy były oceniane immunohistochemicznie przy użyciu standardowej trójstopniowej metody by wykryć immunolokalizację kaspazy 9, bax i bcl-2. Wyniki badań były oceniane jakościowo opisując intensywność i lokalizację dodatniego barwnego odczynu w miejscu pojawiania się reakcji antygen-przeciwciała. Do oceny ilościowej użyto programu komputerowego Analysis-pro i obliczono pole powierzchni zajętej dodatnim odczynem.

Badania wykazały, że L-arginina jako prekursor egzogenego tlenu azotu nie aktywuje mitochondrialnej drogi indukcji sygnału do apoptozy przez pośrednie i bezpośrednie uszkodzenie mitochondriów w hepatocytach i aktywację kaspazy 9 i białka bax.

Słowa kluczowe: tlenek azotu, apoptoza, kaspaza 9, białka Bcl-2, wątroba

Abstract

The intrinsic pathway of apoptosis is activated by cellular stress. This pathway initiates apoptosis via involvement of mitochondria: indirect and direct. The aim of present study was immunohistochemical evaluation of expression of proteins: caspase 9 bax and bcl-2 involved in mitochondrial pathway of cell death in L-arginine induced apoptosis of rats' hepatocytes.

The rats used in this experiment were divided into 2 equal groups. Experimental: rats received per os L-arginine 40mg/kg body weight, every other day for 2 weeks and were decapitated after 3 weeks of the experiment. Control rats received per os 2ml of distilled water every other day for 2 weeks and were decapitated after 3 weeks of the experiment.

Specimens taken after decapitation were examined in immunohistochemical way using standard three step method to detect immunolocalization of caspase 9, bax and bcl-2. The results of immunohistochemical examinations were subjected to qualitative evaluation taking into account the intensity of colour reaction at the antigen-antibody site in rat liver examined in individual groups. The quantitative evaluation was using the Analysis-pro software. The surface area of cells with positive reaction (+) was calculated.

The study shows, that L-arginine as a donor of exogenous nitric oxide did not induced mitochondrial way of apoptosis by direct and indirect damage of hepatocytes' mitochondria and activation of bax and caspase 9.

Keywords: nitric oxide, apoptosis, caspase 9, Bcl-2 proteins, liver

Wstęp

Tlenek azotu (NO) znany jest jako regulator wielu procesów zachodzących w organizmie [1]. Posiada on zdolność wywoływania apoptozy poprzez wolne rodniki tlenowe i szok tlenowy w komórce.

Produkowany jest on z L-argininy przy udziale enzymu-syntazy tlenu azotu (NOS), przez wiele komórek w tym: komórki śródbłonna, makrofagi [2] i hepatocyty [3].

Poznano korzystne i niekorzystne działanie NO w wielu chorobach na drodze hamowania lub też pobudzania programowanej śmierci komórki [4,5].

Zarówno nadprodukcja jak i zmniejszona produkcja NO są przyczyną licznych chorób. Istnieje możliwość regulowania poziomu NO w organizmie poprzez podawanie egzogenego NO.

Opisane zostały dwa szlaki wiodące do apoptozy komórki [6]. Droga zewnętrzna indukowana jest sygnałem z zewnątrz po połączeniu ligandów z błonowymi receptorami śmierci. W drodze wewnętrznej natomiast zaangażowane są mitochondria lub siateczka śróplazmatyczna. Pobudza ją stres komórkowy [7], który może wystąpić podczas ekspozycji komórki na promieniowanie, środki chemiczne, infekcję wirusową. Może również być konsekwencją uszkodzenia czynnika wzrostu lub stresu tlenowego.

Droga wewnętrzna może zaangażować mitochondria pośrednio i bezpośrednio: W zaangażowaniu pośrednim uszkodzenie DNA prowadzi do nagromadzenia się w komórce białka p-53 i zahamowania cyklu komórkowego. Białko p-53 stymuluje komórkę do produkcji białka BAX. Białko BAX ma zdolność otwierania kanałów w mitochondriach, z których uwalnia się cytochrom C. Cytochrom c wraz z białkiem Apaf 1 tworzą kompleks aktywujący prokaspazę 9 i aktywujący tym samym kaskadę kaspaz. Bezpośrednie uszkodzenie mitochondriów również uwalnia do cytoplazmy cytochrom c, który z apaf1 i prokaspazą 9 tworzą apoptosom aktywując kaspazę 9 i rozpoczynając kaskadę Kaspas.

Wpływ NO na śmierć komórki nadal nie jest do końca poznany, W zależności od dawki może on chronić komórkę przed śmiercią lub wręcz tę śmierć indukować [8]. Działa on również zależnie od typu komórek i narządów. W obecnej pracy przeanalizowano wewnętrzny tor indukcji sygnału do apoptozy angażujący mitochondria w hepatocytach wątroby szczurów poddanych terpii L-argininą. Immunohistochemicznie oceniono ekspresję kaspazy 9, białka bcl-2 i bax.

Materiał i metody

W pracy użyto samice szczurów białych szczepu Wistar, o początkowej masie ciała 200-250g, w wieku od 3,5 do 4 miesięcy.

Samice dobrano losowo zgodnie z zasadą jednoczasowości grup kontrolnych i badanych.

Zwierzęta podzielono na 2 równoliczne grupy – po 8 samic w każdej. I grupa – samice, którym podawano *per os* 40 mg/kg m.c. L-argininy co drugi dzień, przez 2 tygodnie i dekapitowano po 3 tygodniach trwania doświadczenia. II grupa – kontrolna, samice, którym podawano *per os* ok. 2 ml wody destylowanej co drugi dzień, przez 2 tygodnie i dekapitowano po 3 tygodniach trwania doświadczenia.

Pobrane do badań immunohistochemicznych wycinki prawego płata wątroby szczurów utrwalono w 10% formalinie i po odwodnieniu we wzrastających stężeniach

etanolu prześwietlano w ksylenie i zatapiano w parafinie. Bloczki pocięto na 5µm preparaty, które umieszczono na szkiełkach silenizowanych. Do badań użyto po dwa preparaty z każdego badanego narządu od każdego osobnika. Następnie preparaty odparafinowywano w ksylenie i malejących stężeniach alkoholu etylowego oraz poddano obróbce cieplnej w środowisku kwaśnym dla przeciwciał przeciwko białkom: Kaspaza 9, BAX i w środowisku zasadowym dla przeciwciał przeciwko białku Bcl-2. Zastosowano metodę trzech kroków (three step, metoda trójwarstwowa). Najpierw oczyszczono preparaty z endogennych peroksydaz (H₂O₂). Krok pierwszy to reakcja antygen – przeciwciała pierwotne. Krokiem drugim była reakcja przeciwciała pierwotnego z biotynylowanym przeciwciałem wtórnym. Ostatnim etapem była reakcja biotyny ze streptawidyną (BSA-biotin-streptavidin) połączoną z peroksydazą chrzanową. Dodanie barwnika (AEC), który jest utleniany przez peroksydazę chrzanową w miejscu reakcji antygen-przeciwciała dało czerwone (AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)) zabarwienie w miejscu występowania poszukiwanego antygenu.

Wyniki badań immunohistochemicznych oceniano: jakościowo biorąc pod uwagę intensywność barwnego odczynu w miejscu reakcji antygen-przeciwciała w wątrobie szczura, w poszczególnych grupach oraz ilościowo przy użyciu programu komputerowego Analysis-pro, oceniając 3 losowo wybrane miejsca na preparatach i licząc pole powierzchni komórek wykazujących odczyn dodatni (+) porównując grupę kontrolną z doświadczalną. Analizie statystycznej poddano różnice w średnim polu powierzchni zajmowanym przez dodatni odczyn immunohistochemiczny w poszczególnych grupach dla wszystkich badanych przeciwciał.

Uzyskane wyniki badań zestawiono w postaci średnich oraz odchylenia standardowego średniej i opracowano statystycznie posługując się testem ONE WAY ANOVA. Przyjęto 5% ryzyka błędu wnioskowania i istotność statystyczną różnic przy p mniejszym lub równym 0,05.

Wyniki badań

Odczyn immunohistochemiczny dla białka BAX o słabym natężeniu obserwowany był w wątrobie samic szczura ogniskowo we wszystkich badanych grupach. Czerwony, grudkowy odczyn cytoplazmatyczny obserwowany był głównie wokół jąder hepatocytów.

Odczyn immunohistochemiczny dla białka Bcl-2 we wszystkich badanych grupach był podobnie, słabo nasilony.

Reakcja barwna miejscu wykrytej kaspazy 9 w grupie kontrolnej i doświadczalnej była miernie nasilona i w komórkach, w których ją odnotowano wypełniała całkowicie i jednolicie cytoplazmę W wątrobie wszystkich badanych grup samic szczura odczyn dla kaspazy 9 widoczny był ogniskowo.

Oceniany ilościowo odczyn immunohistochemiczny dla białka BAX, kaspazy 9 i bcl-2 w grupie samic po L-argininie był porównywalny z kontrolą.

Tab. 1. Średnie pole powierzchni zajmowanej przez odczyn immunohistochemiczny dla białka BAX, Bcl-2 i kaspazy 9 na badanym polu w wątrobie samicy szczura we wszystkich grupach. Istotność statystyczna różnic. Test ONE WAY ANOVA

grupy	Kontrola	V	ONE WAY ANOVA
Białko BAX	242,94µm ² ±95,94	101,13µm ² ±16,38	p=0,06
Białko Bcl-2	152,87µm ² ±100,43	198,54µm ² ±87,74	p=0,16
Kaspaza 9	1863,61µm ² ±118,69	1577,36µm ² ±299,35	p=0,15

Dyskusja

W fazie decyzji apoptozy uczestniczą między innymi białka z rodziny Bcl-2. Białka te regulują apoptozę poprzez wpływ na istotne dla komórki procesy: Regulują wypływ czynników proapoptotycznych z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (cytochrom C, AIF (apoptosis inducing factor) poprzez [9]: oddziaływanie czynników proapoptotycznych z tzw.: megakanałami (mega-channels, permeability transition pore-PTpore) oraz wpływ na mitochondrialny potencjał transbłonowy [10]. Przepuszczalność błon mitochondrialnych zależy od białek z rodzin Bcl-2. Pełnią one nadzór nad stanem redox. Kontrolują komórkowy poziom jonów (wapnia, wodoru, potasu, chloru). Aktywują kaspazy i Dnazy.

Białka Bcl-2 umiejscowione na błonie wewnętrznej mitochondriów działają zarówno antyapoptotycznie (białko: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-2L1, Bcl-2L2) jak i proapoptotycznie (białko: Bax, Bcl-xS, Bak, Bik, Bad, Bim). Stosunek białek antyapoptotycznych do proapoptotycznych decyduje o śmierci lub przeżyciu danej komórki [11].

Białko Bcl-2 – (B cell lymphoma/leukemia-2) antyapoptotyczne oprócz błony wewnętrznej mitochondrium znajduje się również w błonie jądrowej i w błonach siateczki śródplazmatycznej [12]. Fosforyluje ono białka promotorowe takie jak Bad, co uniemożliwia komórce wejście w proces apoptozy. Fosforylacja ta stymulowana jest przez krążące czynniki przeżycia (czynnik wzrostu nabłonka, czynnik stymulacji linii granulocytarnej). Do czynników proapoptotycznych uwalnianych z mitochondriów należy Cytochrom C uwalniany z mitochondriów, który aktywuje wraz z białkiem Apaf-1 kaspazę 9, co rozpoczyna kaskadę kaspaz.

Kaspaza 9 zalicza się do kaspaz inicjujących apoptozę. Kaspazy inicjujące zawierają domeny rekrutujące kaspazy (CARD). W odpowiedzi na sygnały z wnętrza komórki (droga wewn.) kaspazy inicjujące są aktywowane w wyniku dimeryzacji w wielobiałkowym kompleksie - apoptosomie składającym się z Apaf 1, 2, i 3. [13]. Apaf-2/cytochrom C (apoptotic protease activating factor 2).

W nieuszkodzonych mitochondriach bierze udział w łańcuchu oddechowym i syntezie ATP.

Apaf-3/Kaspaza 9/ICE-LAP6/Mch6 (apoptotic protease activating factor 3/ICE-like apoptotic protease 6/Mammalian CED-3 homologue 6) jest aktywowana dzięki formowaniu apoptosomu. Kaspaza 9 aktywuje kaspazę 3, 7.

W niniejszym doświadczeniu zbadano wpływ egzogenego NO na hepatocyty. W tym celu podano szczurom L-argininę jako substrat NO [14].

Użycie endogenego tlenku azotu w doświadczeniu badającym wpływ NO na różne procesy życiowe komórek, w tym na apoptozę nie sprawdza się, gdyż, komórki śródbłonna naczyń po wytworzeniu porcji NO mają zdolność do natychmiastowej regeneracji L-argininy, z L-cytruliny [15]. Udowodniono natomiast, iż egzogenie podana L-arginina zostaje przetworzona do NO.

W niniejszym doświadczeniu dawka L-argininy była zbliżona do tej, którą stosuje się u kobiet ciężarnych, w przypadku leczenia gestozy. Dawka ta powinna być więc bezpieczna dla matki i dla płodu (tzw. dawka wymiatająca wolne rodniki) [15].

Badania w niniejszym doświadczeniu wykazały, że L-arginina jako prekursor egzogenego tlenku azotu nie aktywuje mitochondrialnej drogi indukcji sygnału do apoptozy przez pośrednie i bezpośrednie uszkodzenie mitochondriów w hepatocytach i aktywację kaspazy 9 i białka bax.

Piśmiennictwo

- Maleck W.H., Piper S.N., Koetter K. Joseph Priestley, nitrous oxide and oxygen. *Anaesthesist*, 2005; 54: 395-396.
- Hibbs J.B. Jr, Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988; 157: 87-94.
- Ignarro L.J. Endothelium derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.*, 1989; 3: 31-36.
- Laskowska E. Małe białka szoku termicznego-rola w apoptozie, karcynogenezie i chorobach związanych z agregacją białek. *Postępy Bioch.*, 2007; 53: 19-26.
- Każmierczuk A. HSP 27 antyoksydacyjne właściwości, które chronią komórki nerwowe przed uszkodzeniem i zapobiegają wielu chorobom neurodegeneracyjnym. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 273-283.
- Bielak-Żmijewska A. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2003; 52: 157-171.
- Igney F.H., Krammer P.H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 277-288.
- Eu J.P., Liu L., Zeng M., Stamler J.S. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry*, 2000; 39: 1040-1047.
- Wolter K.G., Hsu Y.T., Smith C.L., Nechushtan A., Xi X.G., Youle R.J. Movement of BAX from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 1997; 139: 1281-1292.
- Castedo M., Hirsch T., Susin S.A., Zamzami N., Marchetti P., Macho A., Kroemer G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.*, 1996; 157: 512-521.

11. Domiński Z. Apoptoza: śmierć komórek w życiu organizmów zwierzęcych. Kosmos, 1999; 48: 385-396.
12. Hockenberry M. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature, 1990; 348: 334-338.
13. Pryjma J. Monocyty krwi obwodowej – apoptoza po fagocytozie bakterii oraz amiany funkcjonalne w następstwie kontaktu z komórkami apoptotycznymi [www.fnp.org.pl/programy aktualne/jachranka/profPryjma.pdf](http://www.fnp.org.pl/programy/aktualne/jachranka/profPryjma.pdf). 2004, 1-19.
14. Cherla G., Jaimes E.A. Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease. J. Nutr. 2004; 134: 2801S-2806S.
15. Rytlewski K., Olszanecki R., Korbut R., Zdebski Z. Effects of prolonged oral supplementation with l-arginine on blood pressure and nitric oxide synthesis in preeclampsia: Eur. J. Clin. Invest., 2005; 35: 32-7.

Correspondence address

A. Pedrycz
e-mail address: apw4@wp.pl