

Ocena receptorowej drogi programowanej śmierci komórek nabłonka kanalików nerkowych indukowanej zmianami hormonalnymi w przebiegu ciąży

Evaluation of pregnancy induced receptor pathway of programmed cell death of renal tubular epithelial cells

Agnieszka Pedrycz¹, Grzegorz Zajac², Mariusz Zwierzyński², Agata Zajac³

¹Department of Histology and Embryology Medical University in Lublin

²Department of Rehabilitation, Provincial Specialist Hospital in Chelm

³Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Provincial Specialist Hospital in Chelm

Streszczenie

Celem pracy była immunohistochemiczna ocena egzogennej drogi indukcji sygnału do apoptozy w komórkach nabłonka nerek w fizjologicznej ciąży uwzględniająca czynnik czasu.

W pracy oceniono immunohistochemicznie ekspresję białka kaspazy 8 – aktywowanej podczas receptorowej, zewnętrznej drogi apoptozy.

Użyte do doświadczenia samice szczura podzielono na 4 równoliczne grupy – po 8 samic w każdej I grupa – samice, które zapłodniono i dekapitowano 10 dnia trwania ciąży II grupa – samice, które zapłodniono i dekapitowano 20 dnia trwania ciąży III grupa – samice, które zapłodniono i dekapitowano 10 dni po rozwiązaniu IV grupa – kontrolna – samice, które dekapitowano 30 dnia od początku doświadczenia.

Preparaty nerek pobrane do badań analizowano immunohistochemicznie standardową trójstopniową metodą wykrywając białko Kaspaza 8.

Odczyn immunohistochemiczny wzrósł we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną. Nie było różnic statystycznie istotnych między grupą samic 10 dnia ciąży i 10 dni po okoceniu.

Zmiany hormonalne w przebiegu ciąży wywołują apoptozę, w której sygnał do indukcji przebiega drogą zewnętrzną przez aktywację kaspazy 8 głównie pod koniec ciąży (20-tego dnia). Droga zewnętrzna zaangażowana jest również w połowie ciąży na podobnym poziomie jak po okresie połogu jednak istotnie mniejszym niż 20 tego dnia ciąży.

Słowa kluczowe: kaspaza 8, programowana śmierć komórki, nerki, ciąża

Abstract

The aim of this study was immunohistochemical evaluation of extrinsic pathway of apoptosis in renal epithelial cells in pregnant rats including time.

We evaluated in immunohistochemical way expression of caspase 8 – activated in receptor's pathway.

Rats used in this experiment was divided into 4 groups – 8 individuals each: I group – female rats which was fertilized and decapitated in 10 day of pregnancy, II group female rats which was fertilized and decapitated in 20 day of pregnancy III group female rats which was fertilized and decapitated in 10 day after delivery VI group – control - female rats which decapitated in 30 day of experiment.

Specimens of kidneys taken to examine we analyzed in immunohistochemical standard three-step method detecting caspase8 protein.

Immunohistochemical positive reaction increased in all experimental groups compared to control. There was no significant differences between groups examined in 10 day of pregnancy and in 10 day after delivery.

Pregnancy induced hormonal changes activated apoptosis by induction of extrinsic pathway by activation of caspase 8 mainly on the end of pregnancy (20th day of pregnancy).

Extrinsic pathway was induced in 10 day of pregnancy on the same level like 10 days after delivery. This level was lower than in 20day of pregnancy.

Keywords: Caspase 8, programmed cell death, kidney, pregnancy

Wstęp

Apoptoza komórki samobójcza śmierć warunkująca życie całego wielokomórkowego organizmu jest mechanizmem w naturalny sposób równoważącym zjawisko proliferacji komórek.

Zdrowa komórka stale otrzymuje *sygnały życia*. Są to sygnały przekazywane jej przez inne komórki za po-

średnictwem hormonów i czynników wzrostowych (cytokin). Są to także substancje odżywcze.

Istnieją czynniki takie jak bezpośrednie uszkodzenie DNA pobudzenie niektórych receptorów wewnątrzkomórkowych oraz pobudzenie niektórych receptorów błonowych (sygnały zewnętrzne) które kierują komórkę na drogę apoptozy [1,2].

Jeżeli komórka *nie otrzymuje sygnałów życia* przestaje pełnić swoją dotychczasową funkcję, uruchamia swój wewnętrzny program samobójczej śmierci. Czasami komórka taka rozpoznawana jest przez układ immunologiczny organizmu jako obca. Komórki układu immunologicznego stymulują ją z zewnątrz do rozpoczęcia procesu umierania.

Proces apoptozy został umownie podzielony na 3 fazy: Fazę decydującą, fazę wykonawczą i fazę degradacji [3].

Faza decydująca apoptozy jest odwracalna, liczona od chwili wygenerowania sygnału do apoptozy do uruchomienia kaskady kaspaz.

Istnieją dwa podstawowe szlaki wiodące do apoptozy komórki [4]: Droga zewnętrzna- „EXTRINSIC”. Jest to szlak indukowany sygnałem z zewnątrz i związany z błonowymi receptorami śmierci. Droga wewnętrzna – „INTRINSIC”, to ta, w której biorą udział mitochondria i siateczka śródplazmatyczna.

Droga zewnętrzna wiedzie głównie przez pobudzenie błonowych receptorów śmierci, które posiadają wewnątrzkomórkową domenę zwaną DD (domena śmierci – death domain) [5]. Droga zewnętrzna to także atak limfocytów T cytotoksycznych, które rozpoznają komórki zniszczone lub zainfekowane wirusem, i inicjują apoptozę by uchronić komórkę od przekształcenia nowotworowego lub infekcji wirusowej.

Niektóre komórki wchodzące na drogę apoptozy posiadają obydwa białka błonowe (Fas i FasL). Połączenie tych białek ze sobą aktywuje kaskadę kaspaz.

Indukcja apoptozy przez receptory śmierci prowadzi do aktywacji kaspazy inicjującej 8, która zawiera domenę efektorową śmierci (DED). W odpowiedzi na związanie receptorów śmierci Kaspaza ta jest aktywowana w wyniku dimeryzacji w wielobiałkowym kompleksie DISC (droga zewn.) [6].

Celem obecnej pracy była immunohistochemiczna ocena ekspresji kaspazy 8, aktywowanej w przebiegu egzogennej drogi indukcji sygnału do apoptozy w komórkach nerek (nabłonka kanalików nerek, śródbłonka naczyń nerkowych komórek mezangium) w fizjologicznej ciąży uwzględniająca czynnik czasu.

Nerki są organem, który najwcześniej reaguje zmianami w metabolizmie i morfologii komórek podczas ciąży [7].

Zmiany te dotyczą głównie miedniczek i moczowodów, poszerzających się w przebiegu ciąży pod wpływem progesteronu. Średnia ich pojemność zwiększa się z 10 do 40ml. W zaawansowanej ciąży powiększająca się macica uciska na moczowody, powodując zwolnienie przepływu moczu. Wraz ze wzrostem filtracji kłębuszkowej występuje upośledzenie pojemności resorpcyjnej cewek moczowych dla przesączonej glukozy-dochodzi do glukozurii, występuje białkomocz fizjologiczny w ciąży rzędu 200-300mg na dobę. Zmiany zachodzące w nerkach są jedną z przyczyn gestozy (za-

trucia ciążowego), którego zasadniczymi objawami są: nadciśnienie tętnicze, obrzęki i białkomocz [7].

Podczas tak dużej adaptacji nerek do zmienionych warunków z pewnością dochodzi do ich uszkodzenia lub eliminacji i kierowania na drogę samobójczej śmierci. Niniejsza praca ma na celu immunohistochemiczną ocenę zewnętrznej drogi indukcji sygnału do śmierci komórki.

Materiał i metody

Do doświadczenia użyto dobrane losowo szczury, samice szczepu Wistar o początkowej masie ciała 200-250g, w wieku od 2,5 do 3 miesięcy.

Na początku doświadczenia samice parowano z samcami. Każdego dnia pobierano wymaz z pochwy i oglądano rozmaz na szkiełku podstawowym pod mikroskopem świetlnym. Obecność czopu pochwowego lub plemników w wymazie pochwowym traktowano jako skuteczną kopulację – zaplemnienie.

Zwierzęta podzielono na 4 równoliczne grupy – po 8 samic w każdej; I grupa – samice, które zapłodniono i dekapitowano 10 dnia trwania ciąży; II grupa - samice, które zapłodniono i dekapitowano 20 dnia trwania ciąży; III grupa – samice, które zapłodniono i dekapitowano 10 dni po rozwiązaniu; IV grupa – kontrolna – samice, które dekapitowano 30 dnia od początku doświadczenia. Od wszystkich zwierząt po dekapitacji oglądano makroskopowo i opisano nerki.

Wycinki nerek szczurów pobrane do badań immunohistochemicznych utrwalone były w 10% formalinie, odwodnione we wzrastających stężeniach alkoholi, prześwietlone w ksylenie i zatopione w bloczkach parafinowych. Bloczki pocięto na 5µm preparaty, które umieszczono na szkiełkach silenizowanych.

Do badań użyto po dwa preparaty z każdego badanego narządu od każdego osobnika.

Preparaty odparafinowywano w ksylenie i malejących stężeniach alkoholu etylowego. Następnie poddane one były obróbce cieplnej w środowisku kwaśnym.

W preparatach blokowano endogenną peroksydazę i inkubowano z króliczym przeciwciałem pierwotnym dla kaspazy 8 w rozcieńczeniu 1/100 w buforze TBS/BSA1%.

W następnej kolejności do uzyskania reakcji immunohistochemicznej używano zestawu gotowych do użycia odczynników firmy DakoCytomation w skład którego wchodziły: biotynylowane przeciwciała wtórne przeciwko przeciwciałom mysim, króliczym; streptawidyna sprzęgnięta z peroksydazą chrzanową; AEC – substrat-barwnik reakcji z peroksydazą chrzanową.

Po zabarwieniu chromatogenem preparaty wkładano do roztworu hematoksyliny. Dokumentacji fotograficznej dokonano przy użyciu Colour Video Camera CCD-IRIS (Sony) połączonej z komputerem.

Do każdego badanego preparatu robiono kontrolę negatywną. Był to preparat do, którego nie dodano przeciwciała pierwotnego.

Wyniki badań immunohistochemicznych oceniano jakościowo biorąc pod uwagę intensywność barwnego odczynu w miejscu reakcji antygen-przeciwciała w badanych narządach szczura, w poszczególnych grupach. Oceniono również ilościowo przy użyciu programu komputerowego Analysis-pro. Analizę obrazu mikroskopowego w powiększeniu 125x oceniającą ekspresję białka przeprowadzono oceniając z każdego preparatu 3 losowo wybrane miejsca, każde o powierzchni $781193,35\mu m^2$. Liczono pole powierzchni komórek wykazujących odczyn dodatni (+).

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.

Analizie statystycznej poddano różnice w średnim polu powierzchni zajmowanym przez dodatni odczyn immunohistochemiczny w poszczególnych grupach dla wszystkich badanych przeciwciał.

Wyniki badań

Odczyn immunohistochemiczny wzrósł we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną. Nie było różnic statystycznie istotnych między grupą samic 10 dnia ciąży i 10 dni po okoceniu.

Zmiany hormonalne w przebiegu ciąży wywołują apoptozę, w której sygnał do indukcji przebiega drogą zewnętrzną przez aktywację kaspazy 8 głównie pod koniec ciąży (20-tego dnia). Droga zewnętrzna zaangażowana jest również w połowie ciąży na podobnym poziomie jak po okresie połogu jednak istotnie mniejszym niż 20 tego dnia ciąży.

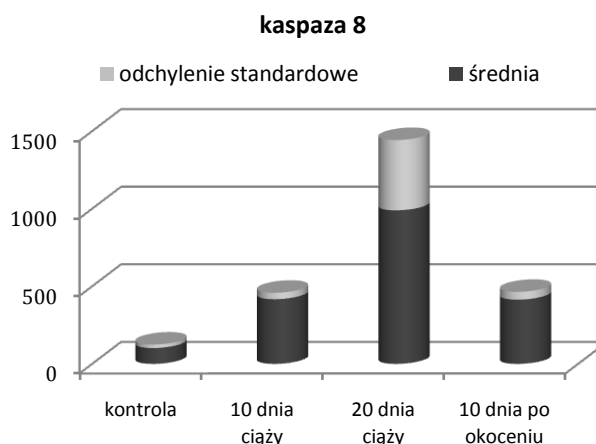
Tab. 1. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla białka Kaspaza 8 na badanej powierzchni: $781193,35 \mu m^2$ we wszystkich badanych grupach. Odchylenie standardowe i One way ANOVA test

	Nerka Kaspaza 8				One way ANOVA
	K	I	II	III	
średnia	102,32	416,89	989,95	413,92	$p < 0,001$
Odchylenie standardowe	22,37	41,53	452,95	50,62	

Tab. 2. test t-Studenta – istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8

	Nerka			
	K	I	II	III
I	$p < 0,001$			
II	$p = 0,001$	$p = 0,01$		
III	$p < 0,001$	$p = 0,91$	$p = 0,01$	

Wykr. 1. Średnie pole powierzchni zajmowane przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla kaspazy 8 w komórkach nabłonka kanalików nerkowych nerek ciężarnych samic szczura



Dyskusja

Kaspaza 8/FLICE/MAC/ Mch5(Fadd-like ICE/Mammalian CED-3 homologue). Aktywowana przez receptory śmierci, aktywuje kaskadę kaspaz ale jest również bezpośrednim aktywatorem kaspazy 3 - wykonawczej [8].

W drodze zewnętrznej apoptozy istotną rolę odgrywają błonowe receptory śmierci. Efektem wiązania receptora z ligandem jest aktywacja najczęściej kaspazy 8, rzadziej 10, czy 2. Aktywne formy kaspaz rozpoczynają kaskadę kaspaz. Do chwili obecnej opisano kilka błonowych receptorów śmierci. Najważniejsze z nich to *TNFR-1* (tumor necrosis factor receptor 1) wiąże się z TNF alfa, który produkowany jest przez limfocyty T lub aktywne makrofagi w odpowiedzi na infekcję [9]. Wiązanie to powoduje trimeryzację wewnątrzkomórkowych domen śmierci (DD-death domain), co z kolei prowadzi do wiązania wewnątrzkomórkowej cząsteczki adaptorowej i powstania TRADD (TNFR associated death domain). TRADD może powołać TRAF-2 (TNF associated factor 2), co w rezultacie prowadzi do pobudzenia genów prozapalnych i immunomodulujących. TRADD może również powołać FADD (Fas associated death domain), które trawi prokaspazę 8 i prowadzi tym samym do apoptozy [10].

TNFR-1 może łączyć się również z innym wewnątrzkomórkowym białkiem RAIDD (receptor interacting protein associated ICH-1/CED-3 homologous protein with DD), które przez interakcje z cząstką podobną do efektoru domeny śmierci zwaną CARD (caspase recruitment domain) aktywuje kaspazę 2, co również prowadzi do apoptozy.

Inny receptor śmierci to *CD95/Fas/Apo-1*. (CD95-cell death 95) Ligandem dla niego jest C95L (cell death 95 ligand) lub FasL. Jest to trimer, który w połączeniu z receptorem powoduje trimeryzację receptora. Połączenie się części receptora zwanej DD (domeną śmierci) z białkiem

adaptorowym FADD (Fas associated death domain) poprzez interakcje pomiędzy homologicznymi domenami śmierci na receptorze i na FADD. Powoduje powstanie kompleksu Fas-FADD. FADD oprócz DD ma również DED (death effector domain), co pozwala pro-kaspazie 8 lub 10 dołączyć się do kompleksu. Pro-kaspaza 8 (*FLICE* - FADD-like IL-1beta converting enzyme) lub 10 łączy się z FADD przez jej własny DED. Kompleks Fas-FADD- pro-kaspaza 8 lub 10 zwany jest DISC (Death Inducing Signaling Complex) [11]. Następuje przejście pro-kaspazy 8 lub 10 odpowiednio w kaspazę 8 lub 10.

Kolejnym opisanym receptorem śmierci jest *TRAIL-R1*, *TRAIL-R2* (DR4, DR5 – death receptor 4, 5) Ligandem dla tych receptorów jest cytokina TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) [12].

Inny receptor błonowy to *NGFR* (nerve growth factor receptor) ligandem dla niego jest NGF alfa.

W niniejszej pracy wykazano, że fizjologiczna ciąża jest czynnikiem indukującym komórki nerek matki do wzmożonej, apoptotycznej śmierci. Pod koniec ciąży sygnał do apoptozy jest przesyłany drogą zewnętrzną przez pobudzenie receptorów śmierci i aktywację kaspazy 8.

Piśmiennictwo

1. Motyl T. Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2 related proteins. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1999; 39: 49-59.
2. Maslińska D. Programowana śmierć komórki (apoptoza) w procesie zapalnym. *Nowa Medycyna-Reumatologia IV*, 1999; 12: 34-41.
3. Chmielewski M., Linke K., Zabel M., Szuber L. Apoptosis in the liver. *Gastroent. Pol.*, 2003; 10: 453-462.
4. Bielak-Żmijewska A. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2003; 52: 157-171.
5. Krammer P.H. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.*, 1999; 71: 163-210.
6. Pryjma J. Monocyty krwi obwodowej – apoptoza po fagocytozie bakterii oraz amian funkcjonalne w następstwie kontaktu z komórkami apoptotycznymi www.fnp.org.pl/programy/aktualne/jachranka/profPryjma.pdf. 2004; .1-19.
7. Brębowicz G. Położnictwo i ginekologia-Repetitorium 2010; 12-16: 75-81.
8. Stennicke HR. Caspases-at the cutting edge of cell death. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 2000; 52: 13-29.
9. Schmitz I., Kirchhoff S., Krammer P.H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2000; 32: 1123-1136.
10. Depuydt B., van Loo G., Vandenabeele P., Declercq W. Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a t-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 497-504.
11. Kischkel FC., Lawrence DA., Tinel A., Leblanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar AI. Death receptor recruitment of endogenous caspase -10 and apoptosis initiation in the absence of caspase 8. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 46639-46646.
12. Mroz P., Młynarczuk I. Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowania TRAIL w terapii nowotworów. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 113-122.

Correspondence address

A. Pedrycz

e-mail address: apw4@wp.pl