

Immunohistochemical assesment of etanol induced danger of hepatocytes' damage

Immunohistochemiczna ocena zagrożenia hepatocytów uszkodzeniem spowodowanym alkoholem etylowym

Agnieszka Pedrycz¹, Piotr Siermontowski², Dorota Polz³, Alicja Ciechan⁴,
Janusz Kocki⁵, Agnieszka Puchalska-Kosiecz⁶

¹Department of Histology and Embryology with Laboratory of Experimental Cytology, Medical University of Lublin, 20-080 Lublin, Poland

²Military Institute of Medicine, Maritime & Hyperbaric Medicine Department, Gdynia, Poland

³Department of Virology, Medical University of Lublin, Lublin, Poland.

⁴WSPRiTS Lublin, Poland

⁵Laboratory of Clinical Genetics, Medical University of Lublin, 20-080 Lublin, Poland

⁶Isth Department Oncologic Gynecology et Gynecology, Medical University of Lublin, Poland

Streszczenie

Biodegradacja alkoholu etylowego zachodzi głównie w wątrobie i to ona najbardziej jest narażona na toksyczne działanie jego i jego metabolitu aldehydu octowego. W patogenezie alkoholowego uszkodzenia wątroby istotną rolę odgrywają wolne rodniki i stres tlenowy komórki. Wolne rodniki uszkadzają błony komórkowe, wywołując peroksydację lipidów i zwiększają ich przepuszczalność.

W niniejszej pracy oceniono immunohistochemicznie ekspresję białka HSP70 – markera wczesnych zagrożeń komórkowych w hepatocytach wątroby szczurów poddanych działaniu etanolu. Zbadano wpływ czynnika czasu oraz dawki etanolu na ekspresję białka szoku cieplnego HSP70.

Użyte do doświadczenia samce szczura podzielono na 8 równolicznych grup – po 8 osobników. Grupy doświadczalne stanowiły samce, którym podano jednorazowo per os sondą dożołądkową 0,5ml 40% alkoholu etylowego i dekapitowano po 1, 3, 8 i 12 godzinach. Samice z grupy kontrolnej dekapitowano po 2 osobniki po 1, 3, 8 i 12 godzinach od początku doświadczenia.

Preparaty wątroby pobrane do badań analizowano immunohistochemicznie standardową trójstopniową metodą wykrywając białko HSP70.

Jednorazowa dawka etanolu 0,5ml podana w niniejszym doświadczeniu ok. 300 gramowym szczurom odpowiada dawce ok. 130ml etanolu podanej jednorazowo 80kg mężczyznom. Po godzinie od spożycia takiej ilości alkoholu zawartość jego we krwi wynosi około 0,95 promila, po 3 godzinach 0,6 promila, a po 8 godzinach alkohol jest już zupełnie eliminowany z krwi.

Wyniki badań w niniejszym doświadczeniu wskazują na zaangażowanie białek szoku cieplnego 70 w proces ochrony hepatocytów przed toksycznym, niszczącym działaniem etanolu. Wzrost ekspresji badanych białek odnotowano już w godzinę po dawce alkoholu. Utrzymywał się on na podobnym poziomie po 3 godzinach i po 8 godzinach czasie, w którym podana dawka alkoholu zwykle jest już eliminowana z krwioobiegu. Dopiero po 12 godzinach poziom ekspresji białka HSP70 spadł do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej.

Słowa kluczowe: etanol, HSP70, wątroba

Abstract

Biodegradation of ethanol takes place mainly in the liver and liver is the most exposed to alcohol-and its metabolite acetaldehyde. Free radicals and oxygen stress are responsible for alcohol induced destructions of the liver. Free radicals induce peroxidation of membranous lipids and increase membranes' permeability.

In present study we evaluated in immunohistochemical way expression of HSP 70 protein – biomarker of early ethanol induced danger in the cells. We examined an influence of time and dose of alcohol on HSP70 expression.

The study material consisted of white Wistar male rats divided into 5 equal groups - 8 individuals each. Experimental groups: rats received per os single dose of 0,5ml 40% ethanol and were decapitated after 1, 3, 8 and 12 hours. Control group: 8 rats decapitated after 1, 3, 8 and 12 hours of experiment – 8 individuals. Specimens of liver were examined using standard three-step immunohistochemical method to detect HSP70.

Single dose 0,5 ml of ethanol given to 300 g rats is similar to single dose 130ml of given to 80kg men. One hour after such a dose the concentration in blood is 0,95‰, after 3 hours 0,6‰ and after 8 hours alcohol is eliminated from blood.

Results in present study show that HSP70 takes part in protection of hepatocytes' proteins against ethanol induced toxicity.

Expression of HSP70 increased in one hour after dose of ethanol and was on the same level after 3 and 8 hours. Its level decreased after 12 hours and was like in control group.

Keywords: etanol, HSP70, liver

Wstęp

Etanol szybko wchłania się z przewodu pokarmowego i przenika do krwi. Jego lipofilny charakter sprawia, że łatwo wchłaniany jest w całym przewodzie pokarmowym począwszy od jamy ustnej przez żołądek (ok. 20%) i jelito cienkie (ok. 80%) [1]. Metabolizm alkoholu etylowego rozpoczyna się już w żołądku przy udziale dehydrogenazy alkoholowej (ADH) i aldehydowej (ALDH) [2]. Biodegradacja zachodzi jednak głównie w wątrobie i związana jest z utlenianiem zachodzącym w dwóch etapach [3]. Najpierw powstaje acetaldehyd, a następnie tworzy się kwas octowy. Enzymy katalizujące te reakcje to dehydrogenaza alkoholowa; enzymy MEOS (Microsomal Ethanol Oxidizing System) oraz mniej zbadany enzym peroksysomalny [4]. Wątroba jest więc głównym miejscem zachodzenia metabolizmu alkoholu, i zwykle ulega najpoważniejszym uszkodzeniom.

Toksyczne działanie acetaldehydu i alkoholu etylowego wpływa na naczynia krwionośne, mięsień sercowy, komórki nerwowe w korze mózgowej, przełyk dwunastnicę, żołądek, trzustkę [5].

W 1962 roku Ritoss odkrył, że w odpowiedzi na podwyższoną temperaturę organizm syntetyzuje liczne białka. Dziś wiemy, że są to białka szoku cieplnego (HSP - Heat Shock Proteins), a ich ekspresja rośnie w odpowiedzi na działanie na komórki czynników odbieranych przez nie jako stresowe [6]. Należą do nich: infekcje, toksyny, metale ciężkie, głódzenie, hipoksja, promieniowanie ultrafioletowe a także alkohol [7]. Można z powodzeniem uznać je za markery stresu komórkowego [8].

Inną funkcją białek szoku cieplnego jest „opieka” (stąd inna nazwa „białka opiekuńcze”) nad innymi białkami pełniącymi ważne funkcje życiowe. Ze względu na „zasięg” działania wyróżniono dwie grupy białek opiekuńczych:

Jedne działają jako monomery, rozpoznające odstąpięte, hydrofobowe odcinki białek. Odcinki takie można znaleźć np. w łańcuchu polipeptydowym, który wysuwa się z rybosomu podczas translacji. Białka opiekuńcze z tej grupy biorą więc udział w nadawaniu kształtu świeżo wytworzonym białkom. Do tej grupy zaliczamy badane w niniejszym doświadczeniu białko HSP70.

Inne to białka opiekuńcze mające zdolność do tworzenia znacznie większych kompleksów przestrzennych. Dzięki energii z ATP mogą one „rozplatać” uszkodzone białko, które następnie przyjmuje pożądany kształt.

Białka szoku cieplnego należą do kilku rodzin, różniących się między sobą masą cząsteczkową: rodzina HSP100(100kDa), HSP90, HSP70 (70kDa), hsp60, hsp20 (18-30kDa).

Oprócz roli opiekuńczej spełniają również rolę proteaz (białek stresowych). Ich rolą jest degradacja zdenaturowanych białek, których odbudowa nie jest możliwa nawet w wyniku działania białek opiekuńczych [9].

W niniejszej pracy oceniono immunohistochemicznie ekspresję białka HSP70 – markera wczesnych zagrożeń komórkowych w hepatocytach wątroby szczurów poddanych działaniu etanolu. Zbadano wpływ czynnika czasu oraz dawki etanolu na ekspresję białka szoku cieplnego HSP70.

Materiał i Metody

Do pracy użyto 40 szczurów – samców białych szczepu Wistar, o początkowej masie ciała ok. 300g, w wieku ok. 3 miesięcy.

Szczury pochodziły z hodowli wsobnej Zakładu Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Lublinie. Zwierzęta odżywiano standardową paszą – LSM, pojonno *ad libitum* wodą.

Przebywały one w Zwierzętarńi Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Lublinie, w temperaturze otoczenia 20 ± 2 stopnie Celsjusza i wilgotności ok. 60%.

Zwierzęta podzielono na 8 równolicznych grup – po 8 samców. Grupy doświadczalne I, II, III, IV – samce, którym podano jednorazowo per os sondą dożołądkowa 0,5ml 40% alkoholu etylowego i dekapitowano po 1, 3, 8 i 12 godzinach. Samce z grupy kontrolnej V – dekapitowano po 2 osobniki po 1, 3, 8 i 12 godzinach od początku doświadczenia.

Wycinki wątroby 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 badanego narządu od każdego osobnika. Preparaty odparafinowywano w ksylenie i malejących stężeniach alkoholu etylowego. Następnie preparaty poddane były obróbce cieplnej w środowisku kwaśnym. Potem w preparatach blokowano endogenną peroksydazę inkubując je w 0,3% roztworze H₂O₂. Następnie inkubowano z króliczym przeciwciałem pierwotnym HSP70 (Lab Vision Ab-3; RB-080-A0)

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, streptawidyna sprzęgnięta z peroksydazą chrzanową; AEC – substrat-barwnik reakcji z peroksydazą chrzanową Preparaty barwiono hematoksyliną.

Dokumentacji fotograficznej dokonano przy użyciu Colour Video Camera CCD-IRIS (Sony) połączonej z komputerem.

Wyniki badań immunohistochemicznych oceniano jakościowo biorąc pod uwagę intensywność barwnego odczynu w miejscu reakcji antygen-przeciwciała w badanych narządach szczura, w poszczególnych grupach. Oceniono także ilościowo przy użyciu programu komputerowego Analysis-pro, wersja 3 (Soft Imaging System GmbH, Niemcy). Analizę obrazu mikroskopowego w powiększe-

niu 125x oceniającą ekspresję białka przeprowadzono oceniając z każdego preparatu 3 losowo wybrane miejsca, każde o powierzchni 781193,35 μm^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 ONEWAY ANOVA. Przyjęto 5% ryzyka błędu wnioskowania i istotność statystyczną różnic przy p mniejszym lub równym 0,05.

Wyniki

Reakcja barwna w wątrobie samców szczura w miejscu wiązania białka HSP70 z przeciwciałem była obecna ogniskowo we wszystkich badanych grupach.

Odczyn immunohistochemiczny oceniany ilościowo wzrósł istotnie statystycznie godzinę po podaniu alkoholu etylowego w porównaniu z kontrolą.

Na podobnym poziomie utrzymywał się jeszcze po 3 i 8 godzinach. Po 12 godzinach zmniejszył się do poziomu obserwowanego kontroli (tab.1, 2).

Dyskusja

W metabolizmie etanolu w wątrobie istotną rolę odgrywa dehydrogenaza alkoholowa, która katalizuje reakcję przejścia etanolu w aldehyd octowy przy udziale cząsteczek NAD^+ . W tej reakcji NAD^+ zamieniany jest w NADH . Zmiana stosunku NADH/NAD^+ powoduje zaburzenie równowagi oksydo-redukcyjnej i powstanie stresu tlenowego [10].

Aldehyd octowy z powodu wysokiej reaktywności uważany jest za główny związek uczestniczący w patogenezie alkoholowego uszkodzenia wątroby.

Pod wpływem działania aldehydu octowego uszkodzenie ulegają lizosomy w komórkach uwalniające hydrolazy. Skutkiem tego są zaburzenia w usuwaniu wolnych rodników tlenowych [11]. Powoduje to wzrost wrażliwości komórek na

stres tlenowy. Wolne rodniki uszkadzają błony komórkowe wywołując peroksydację lipidów i zwiększają ich przepuszczalność [12]. Alkohol jest określany, jako związek, który nie ma swoistego receptora. Uważa się, że jego wpływ na tkanki jest związany ze zmianą przepuszczalności błon lipidowych.

Opisywane w literaturze zmiany obserwowane w wątrobie po działaniu alkoholu to alkoholowe stłuszczenie, alkoholowe zapalenie oraz alkoholowa marskość wątroby.

Stłuszczenie wątroby jest spowodowane nadmiernym gromadzeniem się w niej lipidów. Trójglicerydy gromadzą się w siateczce śródplazmatycznej hepatocytów, co powoduje powiększenie jej rozmiarów.

Aldehyd octowy tworzy trwałe związki addycyjne z białkami wątroby. Immunologiczna reakcja na te związki leży u podstaw patogenezy poalkoholowego zapalenia wątroby.

Jednorazowa dawka etanolu 0,5ml podana w niniejszym doświadczeniu ok. 300 gramowym szczurom odpowiada dawce ok. 130ml etanolu podanej jednorazowo 80kg mężczyznom. Po godzinie od spożycia takiej ilości alkoholu zawartość jego we krwi wynosi około 0,95 promila, po 3 godzinach 0,6 promila, a po 8 godzinach alkohol jest już zupełnie eliminowany z krwi.

Wyniki badań w niniejszym doświadczeniu wskazują na zaangażowanie białek szoku cieplnego 70 w proces ochrony hepatocytów przed toksycznym, niszczącym działaniem etanolu. Wzrost ekspresji badanych białek odnotowano już w godzinę po dawce alkoholu. Utrzymywał się on na podobnym poziomie po 3 godzinach i po 8 godzinach czasie, w którym podana dawka alkoholu zwykle jest już eliminowana z krwioobiegu. Dopiero po 12 godzinach poziom ekspresji białka HSP70 spadł do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej.

Białko HSP70 jest uważane za biochemiczny marker środowiskowego stresu, np. ekspozycji na toksyny [7], czy też endogenną cząstkę stanowiącą sygnał niebezpieczeństwa.

Tab. 1. Średnie pole powierzchni w μm^2 zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla białka HSP70 na badanej powierzchni: 781193,35 μm^2 w grupach kontrolnych. Odchylenie standardowe i One way ANOVA test

	Wątroba HSP70					ONEWAY ANOVA
Średnia	412640,7	344481,1	344343,4	198972,4	195514	p<0,001
Odchylenie standardowe	31653,53	47083,55	39657,66	11681,67	15157,22	

Tab. 2. Test t-studenta – istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi grupami w średnim polu powierzchni zajmowanej przez dodatni odczyn immunohistochemiczny dla HSP70

	wątroba HSP70			
	Po 1 godz	Po 3 godz	Po 8 godz	Po 12godz
Po 1 godz				
Po 3 godz	0,1			
Po 8 godz	0,08	0,99		
Po 12 godz	0,001	0,04	0,03	
kontrola	0,002	0,03	0,009	0,77

Zadaniem molekularnych przyzwoitek, do których należy HSP 70 jest zapobieganie uszkodzeniom białek, które mogłyby doprowadzić do ich degradacji. Schmitz i wsp. [13] opisali HSP70 jako białko, które ochrania komórkę przed sygnałami śmierci.

W niniejszym doświadczeniu wzrost odczynu dla HSP70 był odpowiedzią badanych komórek na uszkadzający je stres tlenowy (działanie wolnych rodników). Ekspresja HSP70 wzrosła już w godzinę po podaniu alkoholu, a zmniejszyła się dopiero gdy alkohol został wyeliminowany z krwioobiegu.

Etanol wywołał ekspresję białek chroniących hepatocyty przed jego toksycznym działaniem. Wzrost ilości białka HSP70 w komórkach pod wpływem alkoholu etylowego można uznać za czynnik prognostyczny ich zagrożenia.

Piśmiennictwo

- Chen T.H., Wang Y.H., Wu Y.H. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquat. Toxicol.* 2011; 102: 162-166.
- Jayaraman J., Namasivayam N. Naringenin modulates circulatory lipid peroxidation, anti-oxidant status and hepatic alcohol metabolizing enzymes in rats with ethanol induced liver injury. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2010, 24: 1472. [Epub ahead of print]
- Orywal K., Jelski W., Szmitkowski M. The participation of ethanol in induction of carbohydrates metabolism disturbances. *Pol. Merk. Lek.*, 2009, 27: 157-168.
- Bardina L.R., Pron'ko P.S., Satanovskaia V.I., Alieva E.V. Effects of catalase activators and inhibitors on ethanol pharmacokinetic characteristics and ethanol and aldehyde-metabolizing enzyme activities in the rat liver and brain. *Biomed. Khim.*, 2010 ; 6: 499-505.
- Werner J., Saghir M., Fernandez-del Castillo C. i wsp.: Linkage of oxidative and nonoxidative ethanol metabolism in the pancreas and toxicity of nonoxidative ethanol metabolites for pancreatic acinar cells. *Surgery*, 2001, 129, 736-744.
- Kuch M. Komentarz redakcyjny. Białko szoku cieplnego – czy mamy już do czynienia z nowym markerem niedokrwienia? *Kardiol. Pol.*, 2009; 67: 953-955.
- Yoo J.L., Janz D.M. Tissue-specific HSP70 levels and reproductive physiological responses in fishes inhabiting a metal-contaminated creek. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2003; 45: 110-120.
- Pedrycz A., Kosiecz D., Drelich G., Ossowska B.: Over-expression of biomarkers of environmental stress in renal epithelial cells resulting from proapoptotic activity of adriamycin: An immunohistochemical assessment. *Curr. Probl. Psychiatry*, 2010; 11(2): 161-165.
- Wang S.Z., Wang L., Gao X.D., Cheng Z., Bi H.G., Wang D.Z. Influence of the expression of heat shock protein 70 in maxillofacial squamous cell carcinoma by thermochemotherapy. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2005; 23: 277-279.
- Watson W.H., Song Z., Kirpich J.A., Deaciuc I.V., Chen T., McClain C.J. Ethanol exposure modulates hepatic S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine levels in the isolated perfused rat liver through changes in the redox state of the NADH/NAD(+) system. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 2. [Epub ahead of print].
- Cho S.Y., Yun J.W., Park P.J., Sohn J.H., Seo D.B., Lim K.M., Kim W.G., Lee S.J. Effects of chitoooligosaccharide lactate salt on activity of acetaldehyde dehydrogenase. *J. Med. Food*, 2010; 13:1061-1068.
- Firdous A.P., Sindhu E.R., Kuttan R. Hepato-protective potential of carotenoid meso-zeaxanthin against paracetamol, CCl4 and ethanol induced toxicity. *Indian J. Exp. Biol.*, 2011; 49: 44-49.
- Schmitz I., Kirchhoff S., Krammer P.H.: Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2000; 32: 1123-1136.

Correspondence address

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