

(31)

Ekspresja białek Bcl-2, Bcl-xl, Bak i Bax w aksonach nerwu wzrokowego u chorych z jaskrą dokonaną

The expression of Bcl-2, Bcl-xl, Bak and Bax proteins in axons of the optic nerve in absolute glaucoma

Renata Zalewska¹, Joanna Reszeć², Zofia Mariak¹, Stanisław Sulkowski²

¹ Z Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: dr hab. n. med. Zofia Mariak

² Zakład Patomorfologii Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Lech Zimnoch

Summary: Purpose: The aim of our study was the evaluation of Bcl-2, Bcl-xl, Bak and Bax immunoexpression in axons of the optic nerve with absolute glaucoma.

Material and methods: This study was conducted on 19 patients with absolute glaucoma, suffered from severe ophthalmalgia, treated of necessity by enucleation in 1991-2003 in our Department of Ophthalmology. The samples were immuno-stained with antibodies for Bcl-2, Bak, Bax and Bcl-xl protein. The reactions were performed in Labelled Streptavidin Avidin Biotin (LSAB) technique. The evaluation of immuno-staining was calculated as the percentage of cells with positive reaction to the total number of cells encountered in 10 representative fields, by light microscopy using a x 20 objective lens. Scores were based on the following scale: (+ +), over 50% of the field showing positive immuno-staining, (+) 10-50% with positive immuno-staining.

Results: In our study proapoptotic Bak and Bax protein expression was stronger than antiapoptotic Bcl-2, Bcl-xl protein expression; Bak/Bcl-2 ($p = 0,008$), Bax/Bcl-2 ($p = 0,0007$), Bak/Bcl-xl ($p = 0,0356$), Bax/Bcl-xl ($p = 0,0077$).

Conclusions: The results of our study demonstrate high proapoptotic trends in axons of the optic nerve in the stage of absolute glaucoma.

Słowa kluczowe: aksony, nerw wzrokowy, jaskra, apoptoza, Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Bak.

Key words: axons, the optic nerve, glaucoma, apoptosis, Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Bak.

W doświadczalnym modelu jaskry Quigley i wsp. wykazali, że komórki zwojowe siatkówki i ich aksony tworzące nerw wzrokowy obumierają na drodze patologicznie nasilonej apoptozy (12). W procesie neuropatii jaskrowej działa kilka patomechanizmów (zbyt wysokie ciśnienie wewnątrzgałkowe, mechanizm niedokrwienności i ekscytotoksyczny, uwarunkowania genetyczne), które przenikając się wzajemnie, doprowadzają do uruchomienia przebiegających kaskadowo procesów apoptozy, w konsekwencji czego powstają nieodwracalne uszkodzenia morfologiczne i czynnościowe nerwu wzrokowego.

Główną rolę w regulacji apoptozy w jej fazie decyzyjnej odgrywają białka z rodziny Bcl-2. Ich cechą charakterystyczną jest występowanie homologicznych sekwencji BH1-4. Domeny te determinują zdolność do dimeryzacji białek należących do tej rodziny, ułatwiając formowanie homo- i heterodimerów.

Na podstawie występowania poszczególnych domen i wynikających stąd właściwości białek rodzinę Bcl-2 podzielono na 3 podrodziny: podrodzinę Bcl-2 (należą do niej białka hamujące apoptozę

– antyapoptotyczne: Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1, oraz białko pobudzające apoptozę – proapoptotyczne Bcl-xs), podrodzinę Bax (Bax, Bak, Bok) i podrodzinę BH3 (Bak, Bik, Bid) – obie promują apoptozę (9,10,11).

Bcl-xl reguluje apoptozę w komórkach nerwowych. Został wykryty w dojrzałych strukturach tkankowych, głównie w mózgu, gdzie jego ekspresja jest znacznie wyższa niż Bcl-2 (3,5,7,8,9).

Nie jest wiadome, jaki jest poziom ekspresji poszczególnych białek apoptotycznych w komórkach zwojowych siatkówki człowieka w warunkach fizjologicznych. Obecnie nie dysponujemy metodami, które pozwoliłyby na taką ocenę przyżyciowo. Niewiele jest również prac dotyczących ekspresji białek apoptotycznych w ludzkich komórkach zwojowych siatkówki i ich aksonach, tworzących nerw wzrokowy, w warunkach patologii. Nie wiadomo, jak zachowuje się ekspresja białek z rodziny Bcl-2 w schyłkowej fazie neuropatii jaskrowej. Tym bardziej zasadna jest ich ocena w unikatowym materiale, jaki stanowią enukleowane z konieczności gałki oczne z powodu jaskry dokonanej bolesnej.

Cel pracy

Celem naszej pracy jest ocena ekspresji białek Bcl-2, Bcl-xl, Bak i Bax w aksonach nerwu wzrokowego u chorych na jaskrę dokonaną bolesną.

Materiał i metody

Badaniom poddano 19 gałek ocznych enukleowanych w Klinice Okulistyki Akademii Medycznej w latach 1991-2003 z powodu jaskry dokonaną bolesną. Pacjenci, od których pochodził materiał do badań, byli w wieku od 21 do 86 lat, średnia wieku $59,7 \pm 19,7$ roku; 42% stanowiły kobiety, 58% – mężczyźni. W pięciu przypadkach (26%) wyjściową przyczyną tragicznego stanu oka była jaskra wrodzona, w siedmiu (37%) – jaskra neowaskularna i również w siedmiu przypadkach – jaskra zamkniętego kąta przesączania. Pobrany podczas operacji materiał utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie i zatapiano w parafinie w temperaturze 56°C. Badania przeprowadzono metodą immunohistochemiczną z użyciem przeciwciał poliklonalnych przeciwko ludzkim białkom Bcl-2, Bcl-xl, Bak i Bax. Immunolokalizację Bcl-2, Bcl-xl, Bak i Bax wykonano, stosując metodę LSAB (the labeled streptavidin biotin). W celu uwidocznienia kompleksów antygen – przeciwciało użyto diaminobenzydyny (DAB). Ekspresję białek Bcl-2, Bcl-xl, Bak i Bax w aksonach nerwu wzrokowego sklasyfikowano jako (+), gdy 10-50% komórek wykazywało pozytywną reakcję immunohistochemiczną, natomiast jako (++)), gdy reakcję pozytywną wykazywało powyżej 50% badanych aksonów. Oceny procentowego udziału komórek z pozytywną ekspresją białek dokonywano, niezależnie od siebie, dwóch patologów.

Przeprowadzono badania statystyczne zależności pomiędzy ekspresją badanych białek a wiekiem i płcią pacjentów (test Levena dla równości wariancji, test Pearsona, test Mantal-Haenszela), porównano ekspresję poszczególnych białek proapoptotycznych z ekspresją białek antyapoptotycznych (test U Manna – Whitneya, test sumy rang Wilcoxon) oraz zbadano korelacje ekspresji wszystkich badanych białek (test Pearsona). Wartości $p < 0,05$ zostały uznane za znamienne statystycznie.

Wyniki

Ekspresja białek nie była zależna od płci pacjentów. Średnia wieku chorych, u których nie stwierdzono ekspresji Bcl-2, wynosiła $70,1 \pm 17$ lat i była wyższa od średniej wieku chorych z nadekspresją Bcl-2, równej $53,7 \pm 18,8$ roku. Różnica ta znajdowała się na granicy istotności statystycznej ($p = 0,078$). Analogiczne różnice dotyczące wieku i ekspresji białek Bcl-xl, Bak i Bax nie były istotne statystycznie.

W badanym materiale ekspresja białek proapoptotycznych Bak i Bax była silniejsza niż białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xl: Bak/Bcl-2 ($p = 0,008$), Bax/Bcl-2 ($p = 0,0007$), Bak/Bcl-xl ($p = 0,0356$), Bax/Bcl-xl ($p = 0,0077$).

Korelacje ekspresji poszczególnych białek, analizowane testem Pearsona, przedstawiały się następująco: Bcl-2/Bcl-xl ($p = 0,5816$), Bcl-2/Bak ($p = 0,2851$), Bcl-2/Bax ($p = 0,0155$), Bcl-xl/Bak ($p = 0,7153$), Bcl-xl/Bax ($p = 0,2535$), Bak/Bax ($p = 0,2496$). A zatem tylko ekspresje białek Bcl-2 i Bax były ze sobą skorelowane.

Nie wykazano przewagi ekspresji Bcl-xl nad ekspresją Bcl-2 w aksonach nerwu wzrokowego w badanym materiale.

Dyskusja

Do roku 1993 procesu apoptozy nie brano pod uwagę w rozważaniach nad patogenezą chorób dotyczących komórek nerwowych (1,12). Zaburzenia apoptozy są w literaturze szczególnie szeroko omawiane w kontekście procesu nowotworowego. Następtwem jej osłabienia czy zahamowania może być szkodliwa proliferacja komórek nieprawidłowych z wydłużonym czasem przeżycia (6,8,10). Zupełnie inną sytuację obserwujemy w przypadku jaskrowego zaniku nerwu wzrokowego. Mamy tu do czynienia z patologicznym nasileniem procesu apoptozy, manifestującym się nieodwracalnym uszkodzeniem komórek zwojowych siatkówki i ich aksonów, a w konsekwencji utratą wzroku (2,4). W naszym materiale nadekspresja białek promujących apoptozę (Bak i Bax) zdecydowanie dominowała, co potwierdza założenia teorii apoptotycznego uszkodzenia nerwu wzrokowego. Białka Bcl-2 i Bcl-xl, będące silnymi inhibitorami apoptozy, w aksonach nerwu wzrokowego w stanie dokonaną neuropatii jaskrowej wykazywały nadekspresję w istotnie mniejszej liczbie próbek. Nie wykazaliśmy przewagi ekspresji białka Bcl-xl, charakterystycznego dla tkanki nerwowej, nad ekspresją białka Bcl-2 prawdopodobnie z powodu skrajnie zaawansowanego procesu o cechach uszkodzenia apoptotycznego, w którym czynniki antyapoptotyczne dawno zostały zepchnięte do defensywy. Natomiast korelacja ekspresji białek Bcl-2 i Bax w badanym materiale może sugerować tworzenie się heterodimerów Bcl-2-Bax, które warunkują powstawanie porów w błonie mitochondrialnej, umożliwiających przepływ jonów. Efektem tego jest uwolnienie cytochromu c i tworzenie apoptosomu, co przemawiałoby za kontynuacją procesu apoptotycznego mimo definitywnego zniszczenia nerwu wzrokowego pod względem czynnościowym (9).

Wniosek

W schyłkowej fazie neuropatii jaskrowej w aksonach nerwu wzrokowego występuje duża przewaga białek proapoptycznych hamujących tendencje prożyciowe.

PIŚMIENNICTWO: 1. Cellerino A., Bahr M., Isenmann S.: *Apoptosis in the developing visual system*. Cell Tissue Res., 2000, 301 (1), 53-69. 2. Chang C. J., Lai W. W., Edward D. P., Tso M. O.: *Apoptotic photoreceptor cell death after traumatic retinal detachment in humans*. Arch. Ophthalmol., 1995, 113, 880-886. 3. Chittendent T., Harrington E. A., O'Connor R., Flemington C., Lutz R. J., Evans G. J., Guild B. C.: *Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak*. Nature, 1995, 374, 733-736. 4. Cook B., Lewis G. P., Fisher S. K., Adler R.: *Apoptotic Photoreceptor Degeneration in Experimental Retinal Detachment*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1995, 36, 990-996. 5. Kiefer M. C., Brauer M. J., Powers V. C., Wu J. J., Umansky S. R., Tomei L. D., Barr P. J.: *Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak*. Nature, 1995, 374, 736-739. 6. Korsmeyer S. J.: *Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death*. Blood, 1992, 80, 879-886. 7. Levin L. A., Schlamp C. L., Spiedoch R. L., Geszvain K. M., Nickells R. W.: *Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1997, 38, 2545-2553. 8. Motyl T., Gajkowska B., Płoszaj T., Waręski P., Orzechowski A.: *Rola Bax i Bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka gruczołu mlekowego*. Postępy biologii komórki, 2000, 1, 31-51. 9. Reszeć J., Sulkowska,

Guzińska-Ustymowicz K., Zalewska R., Sulkowski S.: *Wirus brodawczaka ludzkiego a proces apoptozy*. Postępy biologii komórki, 2003, 2, 311-325. **10.** Rupniewska Z. M., Rożynkowa D., Kurowska M.: *Rodzina genów bcl-2*. Postępy biologii komórki, 1997, 33-47. **11.** Sulejczak D.: *Apoptoza i metody jej identyfikacji*. Postępy bio-

logii komórki, 2000, 4, 527-568. **12.** Tatton W. G.: *Apoptotic mechanisms in neurodegeneration: possible relevance to glaucoma*. Eu. J. Ophthalmol., 9, S22-29.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.01.2004 r. (398).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

dr n. med. Renata Zalewska
Klinika Okulistyki AMB
ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok

XALATAN OPIS LEKU

cz-b