

TEODORA KRÓL*

Zmiany morfologiczne w indukowanej autofagii hepatocytów myszy

S t r e s z c z e n i e

Badano wpływ czynników wyzwalających autofagię. Obserwacje przeprowadzono na wątrobie jednego gatunku - myszy. Zastosowano metody ultrastrukturalne. Stwierdzony wzrost procesów autofagowych miał różnorodny zakres w zależności od użytego czynnika.

Wstęp

Autofagia jest powszechnym mechanizmem występującym w wielu typach komórek, za pomocą którego organelle wewnątrzkomórkowe i cytozol są oddzielane od cytoplazmy, a potem degradowane. Pierwszym rozpoznawczym krokiem w tym procesie jest oddzielenie pewnego obszaru cytoplazmy przez podwójną membranę. W powstałej w wyniku tego procesu wakuoli autofagowej lub autofagosomie nie zachodzą jeszcze procesy degradacyjne ze względu na nieobecność enzymów

* Pracownia Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Kielcach.

hydrolitycznych (Arstila i Trump, 1968; Ericsson, 1969; Schworer i Mortimore, 1979; Schworer i wsp., 1981). Dopiero w następstwie fuzji z lizosomami pierwotnymi lub elementami Golgiego formułują się właściwe wakuole degradacyjne.

Z licznych badań wynika, że zahamowanie autofagii wiąże się ze zmniejszeniem degradacji i wzrostem komórki, a tym samym organizmu (Mortimore i wsp., 1989; Pfeifer, 1987; Pfeifer, 1981; Scornik i Botbol, 1976). Autofagia może być zatem bardzo ważnym źródłem energetycznym komórki w procesach zaburzenia jej homeostazy. Mechanizm procesów autofagowych nadal nie jest w pełni poznany i ciągle wzbudza duże zainteresowanie ze strony fizjologii, jak też hodowli zwierząt.

Celem niniejszej pracy było przesledzenie wpływu niektórych czynników wyzwalających autofagię na zmiany morfologiczne procesów autofagowych hepatocytów wątroby myszy.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na białych myszach rasy Porton o masie ciała 25-30 g. Zwierzęta podzielono na trzy grupy doświadczalne. Grupę pierwszą poddano głodzeniu przez 24, 72 i 96 godzin. W drugiej grupie doświadczalnej myszy otrzymały dootrzewnowo lek vinblastynę (Vinblastin, Richter, Węgry) w ilości 5 mg/100 g masy ciała. Zwierzęta tej grupy były poddane działaniu vinblastyny przez 4 i 24 godziny. Grupę kontrolną stanowiły myszy nie obciążone. Z wątroby poszczególnych grup zwierząt natychmiast po dekapitacji pobierano wycinki do badań mikroskopowych. Utrwalanie oraz osmowanie przeprowadzono wg Marzelli i Glaumanna (1980). Z zatopionych w eponie - 820 bloczków sporządzono skrawki półcienkie dla oceny ogólnej w mikroskopie świetlnym, a ponadto sporządzono skrawki ultracienkie do

mikroskopii elektronowej. Dodatkowe kontrastowanie skrawków ultracienkich wg Marzelli i Glaumanna (1980).

Omówienie wyników

Ultrastruktura komórek wątroby zwierząt kontrolnych odpowiada nie pobudzonej komórce wątrobowej. Badania ultrastrukturalnych zmian w wątrobie myszy wykazały po 24 godzinach głodzenia zwiększenie liczby i rozmiarów mitochondriów (ryc. 1 i 2). Widać wyraźnie różne stadia tworzenia się wakuol autofagowych. Autofagii ulegają w przeważającej mierze mitochondria. Zostają one otoczone elementami błoniastymi, dając typowe wakuole autofagowe w różnym stopniu rozwoju. Niektóre mitochondria są już częściowo zdegradowane, silnie rozwinięta jest siateczka śródplazmatyczna szorstka. Znaczna ilość wolnych rybosomów, zmniejszona ilość glikogenu, zwiększenie elementów układu Golgiego (zarówno cystern jak i wakuol), wszystko to wskazuje na wzmożone procesy biosyntezy białka.

Po 72 godzinach głodzenia (ryc. 3) wystąpiła ostro nasilona autofagia. Obserwuje się silny rozwój elementów układu Golgiego (cystern i wakuol), nagromadzenie się charakterystycznych wakuol wydzielniczych zawierających endogenne lipoproteiny bardzo małej gęstości (VLDL). Widocznej redukcji uległa siateczka śródplazmatyczna, natomiast pojawiła się znaczna ilość wolnych rybosomów, które najprawdopodobniej stały się przedmiotem dalszej autofagii.

Po 96 godzinie głodzenia (ryc. 4) przeważającą część składników cytoplazmy stanowiły różne formy wakuol autofagowych zawierające materiał w różnym etapie trawienia. Obserwowano również trawienie elementów cytoplazmatycznych jako wyraz daleko posuniętej autofagii wyrównawczej.

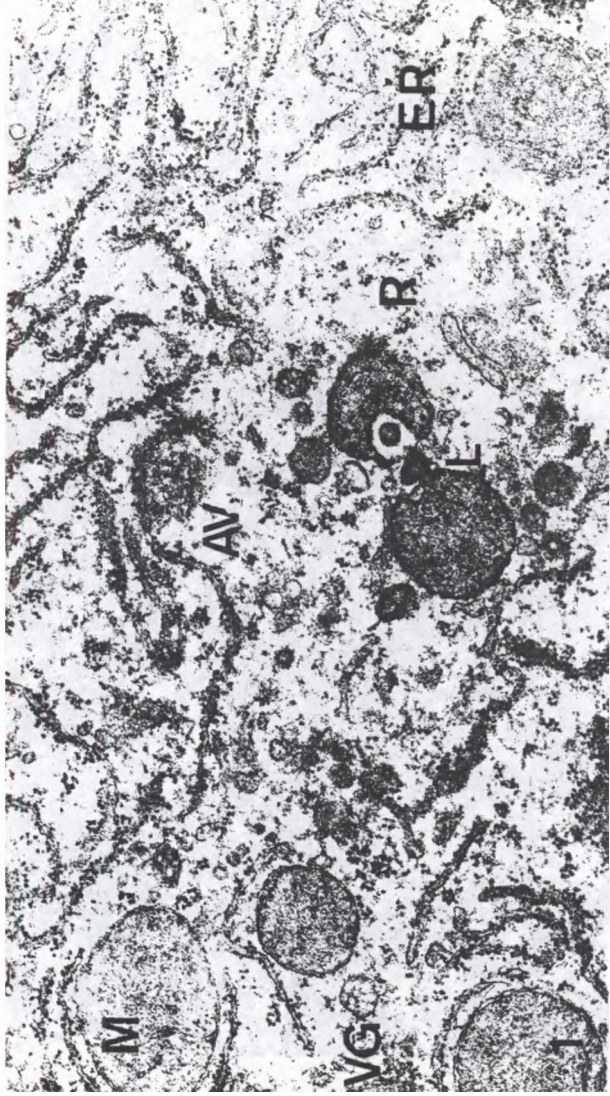
Podanie vinblastyny powodowało wzrost przedziału lizosomalnego, co wynikało najprawdopodobniej ze zwiększonego oddzielania i degra-

dadcji organelli komórkowych. Nowo utworzone wakuole były ograniczone przez różnorodne endoplazmatyczne membrany (ryc. 5). Widoczne były autofagosomy oraz fuzja między powstającymi autofagosomami i lizosomami. Retikulum endoplazmatyczne i mitochondria stanowiły przeważającą zawartość wakuol autofagowych wraz z możliwymi do rozpoznania składnikami cytozolu (ryc. 6). Obciążenie winblastyną doprowadziło do nagromadzenia się w hepatocytach wątroby endogennych lipoprotein bardzo małej gęstości (VLDL). Ultrastruktura komórki wątrobowej wskazuje na stan pobudzenia procesów autofagowych.

Dyskusja

Wzrost komórki jest kierowany przez stabilną równowagę między syntezą i degradacją białek (Arstila i Trump, 1968; Ericsson, 1969; Schworer i Mortimore, 1979; Schworer i wsp., 1981). Autofagia jest drogą degradacyjną indukowaną przez czynniki środowiska z możliwością brania udziału i być może nakazywania reakcji komórkowych na zmiany zachodzące w otoczeniu. Reakcja ta może być konieczna do ponownego uzupełnienia substratów metabolicznych w komórce w odpowiedzi na pozbawienie pokarmu lub usunięcia nietypowych składników komórki, które akumulują się podczas zatrucia lub uszkodzenia komórki (Holtzman, 1989; Mortimore i wsp., 1989). Poznano szereg czynników wyzwalających autofagię. Należą do nich m.in. długotrwałe głodzenie i vinblastyna.

Żaden stan fizjologiczny nie uwidacznia tak jasno jak głodzenie mechanizmów wyrównawczych, pozwalających na utrzymanie dopływu substratów energetycznych by zapewnić homeostazę. Przeprowadzona analiza ultrastrukturalnych zmian w wątrobie myszy poddanych długotrwałemu głodzeniu wykazała zwiększenie liczby i rozmiarów mitochondriów, a także pojawienie się wakuol autofagowych w różnych stadiach rozwoju (ryc. 1-4). Obserwowany wzrost liczby lizosomów z

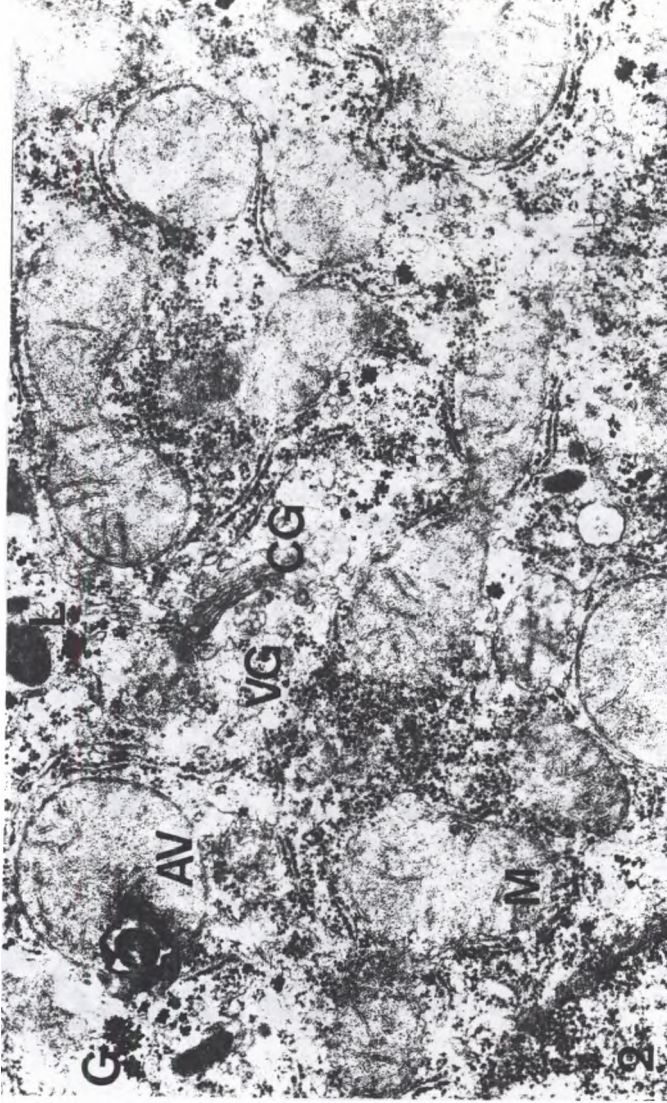


Ryc. 1. Komórki wątroby myszy po 24-godzinnym głodzeniu (X 25 000)

AV - wakuola autofagowa; R - rybosomy;

VG - wakuola Golgiego zawierająca VLDL;

ER - endoplazmatyczne retikulum



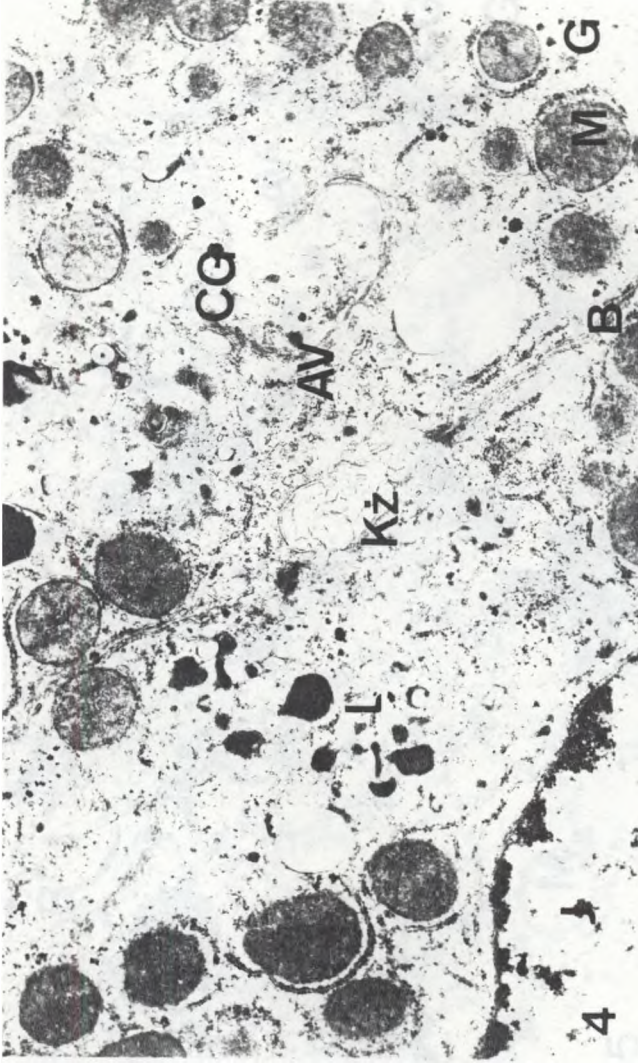
Ryc. 2. Komórki wątroby myszy po 24-godzinnyim głodzeniu (X 30 000)

AV - wakuola autofagowa; M - mitochondria;
CG - cysterny Golgiego; L - lizosomy;
VG - wakuole Golgiego; G - glikogen



Ryc. 3. Hepatocyt wątroby myszy po 72-godzinnym głodzeniu
(X 26 000)

- AV - wakuole autofagowe; B - błona komórkowa;
- CG - cysterny Golgiego; G - glikogen;
- KZ - kanalik żółciowy; L - lizosom;
- M - mitochondria; R - rybosomy;
- VG - wakuole Golgiego zawierające VLDL

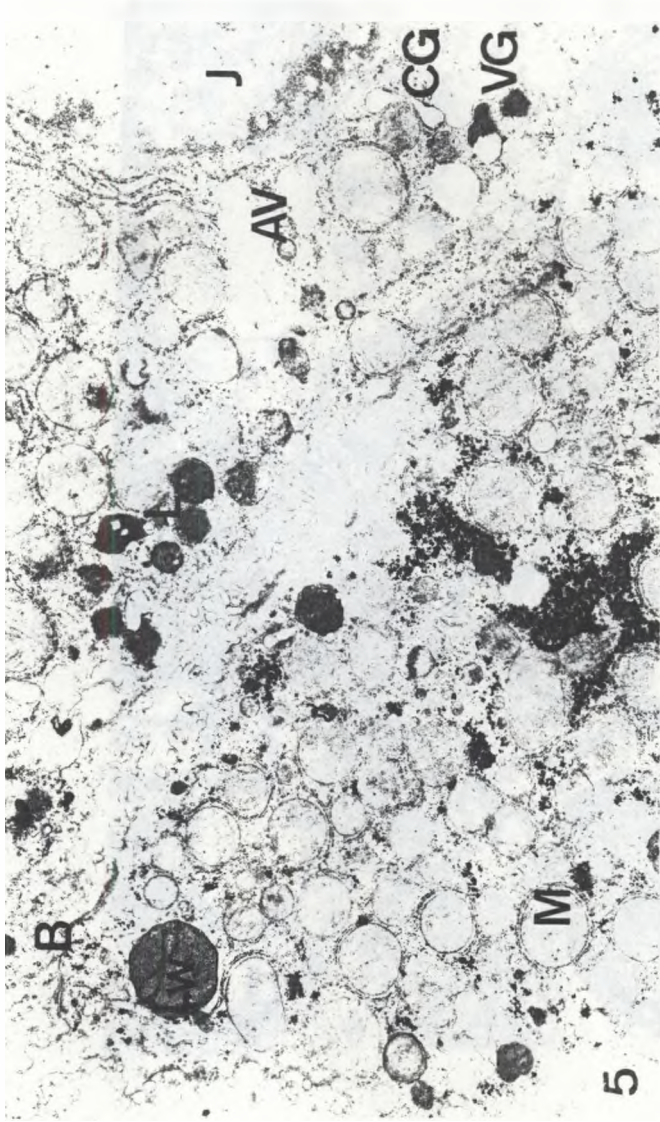


Ryc. 4. Komórki wątroby myszy po 96-godzinnej głodzeniu (X 16 000)

AV - wakuola autofagowa; B - błona komórkowa;

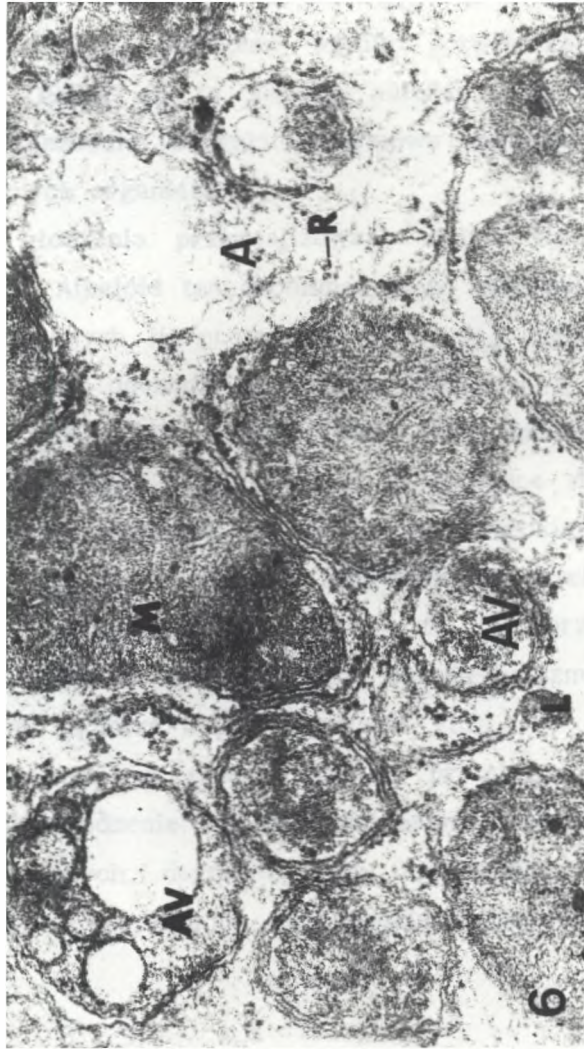
CG - cysterny Golgiego; L - lizosomy;

M - mitochondria; KZ - kanalik żółciowy



Ryc. 5. Komórki wątroby myszy w 4 godziny po obciążeniu
vinblastyną (X 10 000)

CG - cysterny Golgiego; AV - wakuole autofagowe;
LW - lizosom wtórny; G - glikogen; J - jądro;
VG - wakuole Golgiego zawierające VLDL



Ryc. 6. Komórki wątroby myszy w 24 godziny po obciążeniu
vinblastyną (X 40 000)

AV - wakuole autofagowe; A - autofagosom;
M - mitochondria; L - lizosomy; R - rybosomy

jednoczesnym nasileniem procesów autofagowych sugeruje m.in. adaptację komórki do przejścia na endogenne odżywianie. Zwiększenie przedziału lizosomalnego jest prawdopodobnie związane z rozkładem struktur organelli wewnątrzkomórkowych z jednoczesnym wykorzystaniem produktów degradacji do podtrzymania podstawowych funkcji życiowych komórki. Uzyskane wyniki potwierdzałyby przypuszczenia Ericssona (1969), że to właśnie autofagia może podczas głodzenia zapewnić niezbędne związki pokarmowe komórce przez pozbycie się mniej ważnych organelli.

Obok głodzenia przeanalizowano wpływ vinblastyny na procesy autofagowe. Alkaloid ten depolimeryzując mikrotubule hamuje wydzielanie endogennych lipoprotein bardzo małej gęstości (VLDL), w następstwie czego dochodzi do nagromadzenia ich w komórce (Marzella i Glaumann, 1980; 1987; Kopitz i wsp., 1990; Redman, 1975; Reunanen i wsp., 1985; Seglen, 1987). 4- i 24-godzinne działanie vinblastyny (ryc. 5 i 6) powodowało istotny wzrost przedziału lizosomalnego połączony z nagromadzeniem się charakterystycznych wakuol wydzielniczych zawierających VLDL. Wakuole te były przedmiotem autofagii. Wzrost autofagii w tym przypadku jest mechanizmem kompensacyjnym, usuwającym nadmiar wyprodukowanych VLDL.

Zastosowane w pracy czynniki pressingu środowiskowego, tj. długotrwałe głodzenie i podana vinblastyna powodowały wzrost procesów autofagowych i degradacyjnych. Obserwowany wzrost autofagii może być tylko adaptacyjną odpowiedzią komórki na działanie stresorów.

Literatura

- Arstila A.U., Trump B.F., 1968. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am<j, Pathol.*, 53: 687-733.
- Ericsson J.L.E., 1969. Mechanism of cellular autophagy in "Lysosomes in Biology and Pathology" Dingle J.T., Fell H.B. (ed.) North-Holland, Publ. Co. Amsterdam, V. 1, 345-394.
- Holtzman E., 1989. Lysosomes. Plenum Publishing Corp., New York, 439 pp.
- Kopitz J., Kisen G., Gordon P.B., Bohley P., Seglen P.O., 1990. Nonselective Autophagy of Cytosolic Enzymes by Isolated Rat Hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 111, 941-953.
- Marzella L., Glaumann H., 1987. Autophagy, Microautophagy, and Crinophagy as Mechanisms for Protein Degradation. In *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. H. Glaumann, and F.J. Ballard (ed.) Academic Press. Inc., London, 319-367.
- Marzella L., Glaumann H., 1980. Increased degradation in rat liver induced by vinblastine. II. Morphological characterization. *Lab. Invest.* 42, 18-27.
- Mortimore G.E., Poso A.R., Lardeux B.R., 1989. Mechanism and regulation of protein degradation in liver. *Diabetes. Metab. Rev.* 5: 49-70.
- Pfeifer U., 1987. Functional morphology of the lysosomal apparatus. In *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. H. Glaumann and F.J. Ballard (ed.) Academic Press Limited, London, 3-59.
- Pfeifer U., 1981. Morphological aspects of intracellular protein-degradation. *Acta Biol. Med. Germ.* 40: 1619-1624.

- Redman C.M., Benerjee D., Howell K., Palade G.E., 1975. Colchicine inhibition of plasma protein release from rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 66: 42.
- Reumanen H., Punnonen E.L., and Hirsimaki P., 1985. Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in mouse liver. *Histochemistry*, 83: 513-517.
- Schworer C.M., Mortimore G.E., 1979. Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprotection of intracellular amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3169-3173.
- Schworer C.M., Shiffer K.A., Mortimore G.E., 1981. Quantitative relationship between autophagy and proteolysis during graded amino acid deprotection in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 256: 7652-7658.
- Scornik O.A., Botbol V., 1976. Role of changes in protein degradation in the growth of regenerating livers. *J. Biol. Chem.* 251: 2881-2897.
- Seglen P.O., 1987. Regulation of autophagic protein degradation in isolated liver cells. *Their Role in Protein Breakdown*. H. Glaumann and F.J. Ballard (ed.) Academic Press. Inc. New York, 371-414.

Teodora Król

MORPHOLOGICAL CHANGES DURING INDUCED AUTOPHAGY OF
MOUSE HEPATOCYTES

S u m m a r y

Effect of agents on releasing autophagy were studied (long-draw starvation, vinblastin) the observations have been carried out over a liver of one mouse species. Ultrastructure methods have been applied. The ascertained increase of autophagic processes have had various range according to applied agent.

Тэодора Кроль

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
В ИНДУКТИРОВАННОЙ АВТОФАГИИ ГЕПАТИТОВ МЫШЕЙ

Р е з ю м е

Проводилось исследование влияния факторов вызывающих автофагию (нп. продолжительное голодание, винбластик).

Наблюдения проводились на печени одного вида мышей. Применялись ультраструктурные методы. Обнаруженное влияние процессов автофагии имело разнообразный диапазон в зависимости от использованного фактора.