

Grzegorz Formicki*

Efekt działania dopaminy na aktywność esterazy lizosomalnej w niektórych narządach myszy po zablokowaniu receptorów D₂

Streszczenie

Oznaczano zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w mózgu, mięśniu sercowym, mięśniu gładkim jelita cienkiego i mięśniu szkieletowym uda pod wpływem jednorazowych i chronicznych dawek dopaminy oraz jednorazowych dawek tego związku podawanych po zablokowaniu sulpirydem receptorów dopaminowych D₂.

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że jednorazowe dawki dopaminy spowodowały wzrost aktywności esterazy lizosomalnej we wszystkich badanych narządach. Zablokowanie receptorów D₂ sulpirydem w istotny sposób ograniczyło wzrost aktywności badanej esterazy pod wpływem dopaminy w mózgu i mięśniu sercowym. Podany sulpiryd całkowicie wyeliminował wpływ dopaminy na aktywność esterazy lizosomalnej w mięśniu szkieletowym. Chroniczne dawki dopaminy wywołały spadek aktywności badanego enzymu w mózgu i mięśniu szkieletowym uda.

W pracy tej dyskutowany jest mechanizm działania dopaminy na aktywność enzymów lizosomalnych.

Wstęp

Stwierdzono, że przestrzeń lizosomalna zawiera około 100 różnego rodzaju białek enzymatycznych, głównie hydrolaz estrów karboksylowych i tiolowych, a także esteraz siarczanowych, peptydaz, amidaz, glikozydaz

* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii WSP w Krakowie

i hydrolaz związków fosforanowych. Wśród hydrolaz można wyróżnić pewien typ esterazy lizosomalnej rozkładającej estry wyższych kwasów tłuszczowych i p-nitrofenolu. Enzym ten wykazuje największą aktywność w środowisku kwaśnym o pH 3,4–4,0. Jest on inhibowany przez NaCl, EDTA, siarczan protaminy, jony Hg^{2+} , jodoocetan, NaF, dezoksycholan i taurocholan, a aktywowany przez Triton X-100. Esteraza ta hydrolizuje głównie estry zawierające od 8 do 18 atomów węgla (Dingle, Dean 1984).

Badania lizosomów prowadzone w latach siedemdziesiątych wykazały, że hormony wpływające na wzrost stężenia c-AMP w komórce działają stabilizująco na błony lizosomalne, a co za tym idzie inhibują fagocytozę (Holtzman 1976). Interesujące może być zatem prześledzenie wpływu dopaminy działającej poprzez nasilanie lub hamowanie syntezy c-AMP w komórce na aktywność enzymów lizosomalnych.

Efekty fizjologiczne dopaminy związane są z obecnością receptorów dopaminowych. Wielu autorów wyróżnia dwa typy tych receptorów – D_1 i D_2 . Dzięki rozwijającym się w ostatnich latach technikom klonowania można wyróżnić szereg podtypów receptorów dopaminowych – D_5 dla receptora D_1 oraz D_3 i D_4 dla receptora D_2 (Civelli, Bunzow, Grandy, Quan-Young Zhou, Hubert, Van Tol 1991).

Dopamina łącząc się z odpowiednią podjednostką receptora D_1 wywołuje w nim konformacyjne zmiany, których wynikiem jest powstanie kompleksu Gs aktywującego cyklazę adenylową. Prowadzi to do zwiększenia poziomu c-AMP w komórce. W odróżnieniu od receptorów D_1 nie ma pełnej jasności co do mechanizmu działania receptorów D_2 . Przyłączenie ligandu aktywującego ten typ receptora prowadzi do powstania kompleksu Gi-Go i zmniejszenia aktywności adenylocyklazy (Missale, Castelletti, Pizzi, Spano 1986, Civelli, Bunzow, Grandy, Qun-Young Zhou, Van Tol 1991).

Interesujące może być zatem zbadanie wpływu dopaminy pobudzającej receptory D_1 i D_2 na aktywność wybranego enzymu lizosomalnego.

W pracy tej postanowiono odpowiedzieć na następujące pytania:

Jak zmieni się aktywność esterazy lizosomalnej w wybranych narządach pod wpływem jednorazowych i chronicznych dawek dopaminy.

Czy aktywność badanego enzymu zmieni się po zablokowaniu receptorów D_2 .

Material i metody

Do eksperymentu użyto samców myszy o średniej wadze 26 g. Zwierzęta podzielono na pięć grup, tj. cztery grupy doświadczalne i jedną grupę kontrolną. Osobnikom pierwszej grupy doświadczalnej (gr. dośw. I) podano dopaminę w jednorazowej dawce 308 mg/kg masy ciała. Myszy drugiej grupy doświadczalnej (gr. dośw. II) otrzymywały codziennie dopaminę w dawkach 154 mg/kg masy ciała przez pięć dni. Trzecią grupę doświadczalną zwierząt (gr. dośw. III) poddano iniekcji sulpirydem – blokerem receptorów D₂ w jednorazowej dawce 30 mg/kg masy ciała. Zwierzęta czwartej grupy doświadczalnej (gr. dośw. IV) otrzymały sulpiryd w jednorazowej dawce 30 mg/kg masy ciała, a po dwóch godzinach dopaminę w dawce jednorazowej 308 mg/kg masy ciała.

Po 24 godzinach od ostatniej iniekcji dokonywano dekapitacji i pobierano mózg, mięsień sercowy, mięsień gładki jelita cienkiego oraz mięsień szkieletowy uda.

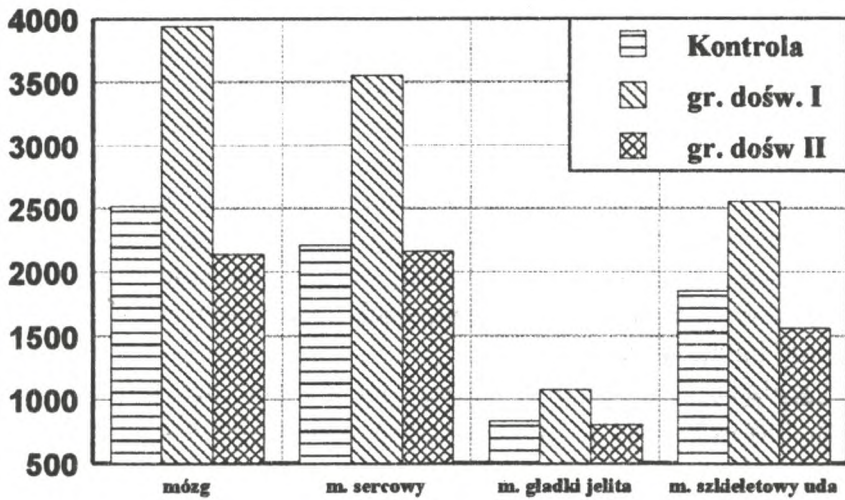
Wyizolowane narządy warzono i oczyszczano z krwi płynem fizjologicznym, a następnie homogenizowano w homogenizatorze teflonowym. Otrzymany homogenat pozostawiano na 24 godziny w temperaturze +4°C. Po upływie jednej doby homogenat wirowano przez 10 min. przy 13 tys. obr./min. W uzyskanym supernatancie oznaczano aktywność esterazy lizosomalnej oraz poziom białka metodą Lowry'ego.

Do oznaczenia esterazy lizosomalnej wykorzystano substrat palmitynian p-nitrofenolu. Tritonu X-100 użyto jako aktywatora badanego enzymu. Aktywność esterazy lizosomalnej podano w μM enzymu na mg białka i na godzinę.

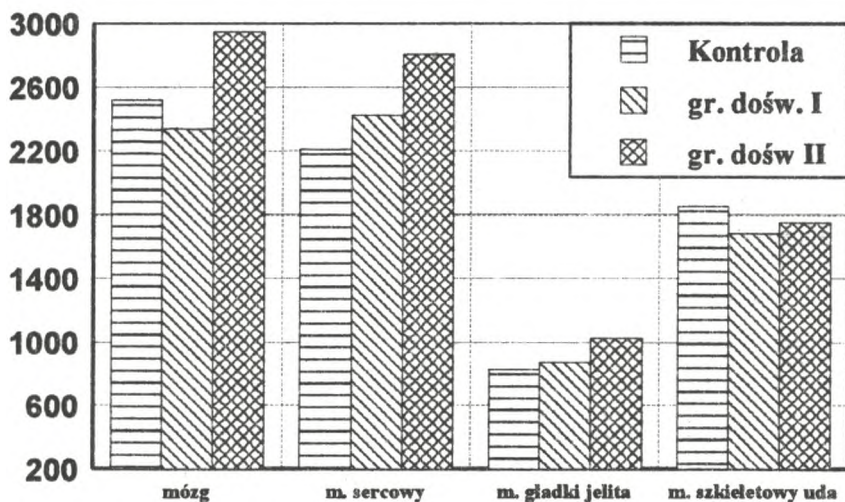
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej względem grupy kontrolnej testem "t" Studenta-Gosseta.

Wyniki

Uzyskane wyniki zebrane są w tabelach 1 i 2 oraz zilustrowane wykresami (ryc. 1 i 2). Analiza wyników wykazuje, że jednorazowe dawki dopaminy w ilości 308 mg/kg masy ciała podane zwierzętom pierwszej grupy doświadczalnej (gr. dośw. I) spowodowały wyraźny wzrost aktywności esterazy lizosomalnej w mózgu o 56,7%, mięśniu sercowym o 60,9%, mięśniu gładkim jelita cienkiego o 30%, i mięśniu szkieletowym uda o 37,8%.



Ryc. 1. Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w wybranych narządach samców myszy po jednorazowych i chronicznych dawkach dopaminy wyrażone w $\mu\text{M}/\text{mg}/\text{h}$



Ryc. 2. Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w wybranych narządach samców myszy po zablokowaniu receptorów D_2 i jednorazowych dawkach dopaminy wyrażone w $\mu\text{M}/\text{mg}/\text{h}$

Tab. 1. Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w wybranych narządach samców myszy po jednorazowych i chronicznych dawkach dopaminy

	Gr. kontrolna	Gr. dośw. I	Gr. dośw. II
Mózg	2517,57	3944,57	2139,71
SD	65,27	146,86	164,30
Test „t”	–	26,49*	5,65*
M. sercowy	2210,29	3556,29	2163,57
SD	83,40	184,80	104,3
Test „t”	–	17,56*	0,93
M. gładki jelita cienkiego	830,86	1079,71	802,14
SD	75,91	87,08	85,02
Test „t”	–	5,70*	0,67
M. szkieletowy uda	1853,29	2553,00	1562,29
SD	68,76	235,20	137,72
Test „t”	–	7,44*	5,00*

* istotne przy $p \leq 0,05$

Tab. 2. Zmiany aktywności esterazy lizosomalnej po zablokowaniu receptorów D₂ i jednorazowych dawkach dopaminy

	Gr. kontrolna	Gr. dośw. III	Gr. dośw. IV
Mózg	2517,57	2340,00	2947,14
SD	65,27	166,34	218,73
Test „t”	–	2,63	4,98*
M. sercowy	2210,29	2424,57	2804,43
SD	83,40	179,47	171,30
Test „t”	–	2,68	8,25*
M. gładki jelita cienkiego	830,86	874,29	1027,86
SD	75,91	61,33	95,59
Test „t”	–	1,18	4,28*
M. szkieletowy uda	1853,29	1686,57	1754,86
SD	68,76	148,12	110,29
Test „t”	–	2,70	2,00

* istotne przy $p \leq 0,05$

Chroniczne dawki dopaminy podane osobnikom drugiej grupy doświadczalnej (gr. dośw. II) w ilości 154 mg/kg masy ciała wywołują spadek aktywności esterazy lizosomalnej w mózgu o 15%, oraz mięśniu szkieletowym uda o 15,7%. W przypadku mięśnia sercowego i mięśnia gładkiego jelita cienkiego nie odnotowano istotnych zmian w aktywności badanego enzymu po chronicznych dawkach dopaminy.

Sulpiryd podany trzeciej grupie doświadczalnej zwierząt (gr. dośw. III) nie wpłynął w istotny sposób na aktywność esterazy lizosomalnej.

W przypadku zwierząt czwartej grupy doświadczalnej (gr. dośw. IV), dopamina podana wraz z sulpirydem – blokerem receptorów D_2 wywołała statystycznie istotny wzrost aktywności badanej esterazy w mózgu o 16,9%, mięśniu sercowym o 26,9% i mięśniu gładkim jelita cienkiego o 23,7%, oraz nie wywołała istotnych zmian w mięśniu szkieletowym uda.

Dyskusja

Wpływ dopaminy na metabolizm komórkowy, a tym samym na aktywność enzymów lizosomalnych związany jest z aktywacją tzw. drugich przekaźników. Pobudzenie receptorów dopaminowych D_1 nasila syntezą c-AMP. Receptory D_2 natomiast zmniejszają poziom c-AMP (Kebaian 1978, Misale, Castelletti, Pizzi, Spano 1986). Niedawno odkryto podtyp receptora D_2 , którego aktywacja prowadzi do koncentracji jonów Ca^{2+} w komórce (Civelli, Bunzow, Grandy, Qun Young Zhou, Hubert, Van Tol 1991). Wyniki nowszych badań wskazują, że pobudzenie receptora D_2 może również doprowadzić do mobilizacji wewnątrzkomórkowych zasobów jonów Ca^{2+} (Levavision, Ofir, Yaron 1995).

Z przytoczonych danych wynika, że dopamina może modyfikować aktywność enzymów lizosomalnych za pośrednictwem c-AMP lub jonów Ca^{2+} .

Przeprowadzone eksperymenty z radioaktywnym fosforem P^{32} wykazały, iż c-AMP może zmieniać przepuszczalność błon lizosomalnych przez ich fosforylację (Dingle, Dean 1984). Takie stymulujące fagocytozę i aktywność enzymatyczną lizosomów działanie wykazują wszystkie hormony aktywujące cyklazę adenylową (Wyroba 1986). Cykliczny AMP prawdopodobnie stymuluje także syntezę enzymów lizosomalnych. Lossner, Jork, Lindner, Lucke, Matthies (1984) podali, iż dopamina za pośrednictwem receptorów D_1 nasila

proces glikosylacji łańcuchów peptydowych. Okazuje się, że ważnym etapem syntezy enzymów lizosomalnych jest ich posttranslacyjna obróbka, polegająca na glikosylacji łańcuchów peptydowych (Dingle, Dean 1984, Holtzman 1976).

Innym czynnikiem biorącym udział w regulacji procesu endocytozy jest wapń Ca^{2+} (za: Kuźnicki 1989). Regulacja ta polega prawdopodobnie na labilizacji błon lizosomalnych (Dingle, Dean 1984). Zwiększenie przepuszczalności błon otaczających lizosomy, może być czynnikiem aktywującym enzymy lizosomalne. To przypuszczenie wydaje się być potwierdzone przez obserwacje zjawiska zwiększania się rozmiarów lizosomów w przednim płacie przysadki po pobudzeniu receptorów D_2 (Bascy, Vu Duc Moi, Reppay, Gaal 1983).

Wyniki uzyskane w niniejszym eksperymencie po zastosowaniu sulpirydu pozwalają sądzić, iż dopamina modyfikuje aktywność esterazy lizosomalnej działając zarówno poprzez receptory D_1 , jak i D_2 . Należy przy tym nadmienić, że obydwa typy receptorów dopaminowych mogą działać zarówno za pośrednictwem c-AMP, jak i jonów Ca^{2+} . Okazuje się bowiem, że fosforylacja kanału wapniowego przez kinazę zależną od c-AMP ułatwia napływ jonów Ca^{2+} do komórki, jony te zaś hamują aktywność cyklazy adenylowej i zmniejszają poziom c-AMP w komórce (Cooper, Mons, Carpen 1995).

Wzrost aktywności esterazy lizosomalnej po podaniu jednorazowych dawek dopaminy, może być również spowodowany przez pobudzenie receptorów adrenergicznych lub nasilenie zjawiska internalizacji ligandów (Pastan, Willingham 1983). Dopamina jest bowiem czynnikiem modyfikującym łącznie się hormonów i neurotransmiterów z odpowiednimi receptorami. Zwiększona ilość tej aminy w organizmie, wpłynęła zapewne na nasilenie procesów degradacyjnych polegających między innymi na pobudzeniu aktywności fagocytarnej i enzymatycznej lizosomów (za: Kamiński 1989).

Spadek aktywności esterazy lizosomalnej po chronicznych dawkach dopaminy można natomiast tłumaczyć zmniejszeniem gęstości lub wrażliwości receptorów dopaminowych (za: Klimek 1992, Woodruff 1988). Zjawisko to może być także związane z pobudzeniem autoreceptorów dopaminowych (Roth, Galloway, Tam, Ono, Wolf 1986).

Ciekawym zjawiskiem są wyraźne zmiany aktywności esterazy lizosomalnej w mózgu, pomimo iż dopamina była podawana ogólnoustrojowo bez pominięcia bariery krew – mózg. Zjawisko to może być związane z obwo-

dowym działaniem dopaminy. Związek ten działa rozszerzająco na naczynia krwionośne, oraz hamująco na aktywność pozazwojowych neuronów adrenergicznych (Woodruff 1987, Bar Andziak 1990). W odpowiedzi na takie działanie dopaminy może dojść do nasilenia aktywności ośrodków mózgowych regulujących czynnościami autonomicznego układu nerwowego.

Literatura

- Bascy E., Vu Duc Moi, Rappay G., Gaal G., 1983, *Lysosomal activity in prolactin cells under the effects of dopamine agonists*. Acta Histochem. Suppl. 33, 221–224.
- Bar Andziak E., 1990, *Dopamina w granicznym i utrwalonym pierwotnym nadciśnieniu tętniczym*. DWAM Warszawa.
- Civelli O., Bunzow J.R., Grandy P.K., Qun Young Zhou, Hubert H.M., Van Tol., 1991, *Molecular biology of dopamine receptors*. Eur. J. Pharmacol. 207, 277–286.
- Cooper D.M.F., Mons N., Carpen J.W., 1995, *Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling*. Nature. 374: 6521, 421–424.
- Dingle J.T., Dean R.T., 1984, *Lysosomes in biology and pathology*. North – Holland Publishing Company. Amsterdam.
- Holtzman E., 1976, *Lysosomes: Survey*. Springer – Verlag. Wien.
- Kamiński M., 1989, *Wybrane zagadnienia struktury i funkcji neuronu*. Fizjologia i farmakologia błony komórkowej. Zakł. Narod. im. Ossolińskich – Wyd. Wrocław, 43–74.
- Kebaian J.W., 1978, *Dopamine – sensitive adenylyl cyclase a receptor mechanism for dopamine*. Adv. in Biochem. Psychopharm. 19, 131–152.
- Klimek V., 1992, *Leki przeciwdepresyjne a ośrodkowy układ dopaminowy*. Wykłady monograficzne. nr 4, IF PAN Kraków.
- Kuźnicki J., 1989, *Transport i funkcje jonów wapnia u eukariota*. Fizjologia i farmakologia błony komórkowej. Zakł. Narod. im. Ossolińskich – Wyd. Wrocław, 103–122.
- Levavissian B., Ofir M., Yanon Z., 1995, *Possible sites of dopaminergic inhibition of gonadotropin release from the pituitary of teleost fish, tilapia*. Molec. and Cel. Endocrin. 109: 1. 87–95.
- Lossner B., Jork R., Lindner M., Lucke B., Matthies H., 1984, *Dopamine stimulated glycosylation of brain dopamine receptor antagonist proteins in vitro*

inhibited only partially by dopamine receptor antagonists. Biomed. Biochem. Acta. 6, 775–187.

Missale K.E., Casteletti L., Pizzi M., Spano P.F., 1986, *Transduction mechanism at dopamine receptors. Dopaminergic Syst. and their Reg. 10, 153–165.*

Pastan I., Willingham M.C., 1983, *Receptor mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi. TIBS. 8, 250–254.*

Roth R.H., Galloway M.P., Tam S.Y., Ono N., Wolf M.E., 1986, *Dopamine auto-receptors: studies on their distribution and mode of action. Dopaminergic Syst. and their Reg. 4, 46–63.*

Woodroff G.N., 1987, *Biochemical and pharmacological studies on dopamine receptors. Adv. in Biochem. Pharm. 19, 89–115.*

Woodroff G.N., 1988, *Mechanism of drug action. VCH Publishers London.*

Wyroba E., 1986, *Stimulation of Paramecium phagocytosis by phorbol ester and forskolin. Cell. Biol. Int. Rep. 11, 657–664.*

Grzegorz Formicki

Dopamine Influence on Lysosomal Esterase Activity in Some Mouse Organs after D₂ Dopamine Receptor Blockade

S u m m a r y

Activities of lysosomal esterase were estimated in brain, heart, intestine smooth muscle and thith skeletal muscle after single and chronic injections of dopamine, and single doses of D₂ blocker – sulpiride.

Single doses of dopamine were found to increase esterase activity in all examined tissues. Sulpiride doses given after dopamine single injections significantly delimited increased esterase activity in brain and heart. Activity of studied esterase did not change in thith skeletal muscle after dopamine and sulpiride single doses. Chronic doses of dopamine decreased esterase activity in brain and thith skeletal muscle. Dopamine in chronic doses did not change esterase activity in heart and intestine smooth muscle.

It is suggested that D₂ dopamine receptor is important but not the only way of dopamine influence on lysosomal esterase activity.