

Teodora Król\*, Marian Schmidt\*

## Wpływ adrenaliny na procesy autofagowe w hepatocytach myszy

### Streszczenie

Badania dotyczą wpływu egzogennej adrenaliny na zmiany biochemiczne i ultrastrukturalne w hepatocytach myszy. Zmiany biochemiczne przeanalizowano badając aktywność wybranych hydrolaz lizosomalnych. Jednocześnie od tych samych zwierząt pobierano wycinki do badań ultrastrukturalnych. Obserwowane istotne zmiany w ultrastrukturze hepatocytu pozostawały w ścisłej korelacji z równoległym wzrostem aktywności badanych hydrolaz lizosomalnych.

### Wstęp

Adrenalina (*Epinephrine, Adrenalinum*) od dawna stosowana w leczeniu, charakteryzuje się krótkim biologicznym okresem półtrwania. Adrenalina działa pobudzająco na receptory  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenenergiczne. Wpływa na przemianę węglowodanową, uczynniając fosforylację zwiększa glikogenolizę. Jej działanie hiperglikemiczne wywołane jest pobudzającym wpływem na cAMP. Uczynnienie fosforylacji prowadzi do lipolizy, co wyraża się zwiększeniem stężenia wolnych kwasów tłuszczowych.

Już Freeman i wsp. (1970) stwierdzili, że iniekcja egzogennej adrenaliny wywołuje w organizmie zmiany charakterystyczne dla stresu, zaś Turner i wsp. (1978) sugerują, że adrenalina może działać na poziomie błon komórkowych, zmniejszając szybkość wnikania glukozy do komórek. Natomiast w dostępnej literaturze jest wiele rozbieżnych danych dotyczących

---

\* Instytut Biologii WSP Kielce, Konopnickiej 23.

wplywu adrenaliny na procesy autofagowe w komórce. Wychodząc z tych przesłanek w niniejszej pracy prześlędzono wplyw egzogogennej adrenaliny na procesy autofagowe w hepatocytach wātrobry myszy.

## **Material i metody**

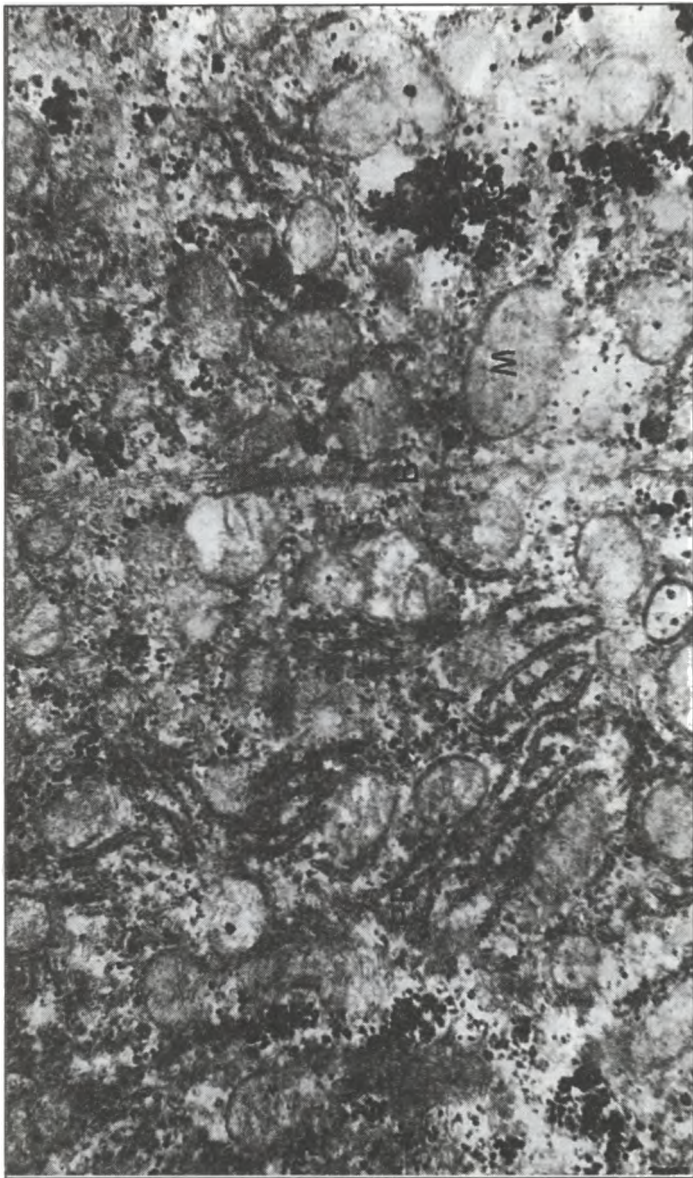
Material eksperymentalny stanowilo 40 samic myszy bialej szczepu Swiss pochodzacych z jednej hodowli, o masie 23-25 g. Wszystkie zwierzęta uzyte do badan utrzymywane byly w jednakowych warunkach. Zwierzęta zywno pelnowartościowym pokarmem standartowym. Zwierzęta podzielono na dwie grupy doświadczalne. Grupę pierwszā stanowily myszy kontrolne, zaś zwierzęta drugiej grupy (doświadczalnej) otrzymały dootrzewnowo adrenalinę (*Adrenalinum Polfa*) w ilości 200µg/kg masy ciāła. Zwierzęta zabijano przez przerwanie rdzenia kręgowego w 3 godziny po iniekcji adrenaliny. Z wātrobry poszczęglych grup zwierzęat natychmiast po dekapitacji pobierano wycinki do badan mikroskopowych. Utrwalanie oraz osmowanie przeprowadzono wg Marzelli i Glaumanna (1980b). Z zatopionych w eponie bloczków sporzādzono skrawki ultracienkie do mikroskopii elektronowej. Ponadto pobrano skrawki wātrobry do badan biochemicznych.

Różnicowe frakcjonowanie homogenatu przeprowadzono wedlug metody Marzelli i Glaumanna (1980a). W uzyskanych frakcjach lizosomalnych wātrobry oznaczono poziom białka w oparciu o zmodyfikowanā metodę Lowry'ego (Kirschke i Wiederanders 1984), aktywność kateptycznā (Kat D i L EC 3.4.23.5 i EC 3.4.22.15), metodā Langnera i wsp. (1973), ponadto aktywność esterazy lizosomalnej EL (EC 3.1.1.-), beta-glukuronidazy (BGRD EC 3.2.1.31), beta-galaktozydazy (EC 3.2.1.23), beta-glukozydazy (BGAL; EC 3.2.1.21), kwasnej fosfatazy (KF; EC 3.1.3.2), wedlug metody podanej przez Baretta (1972).

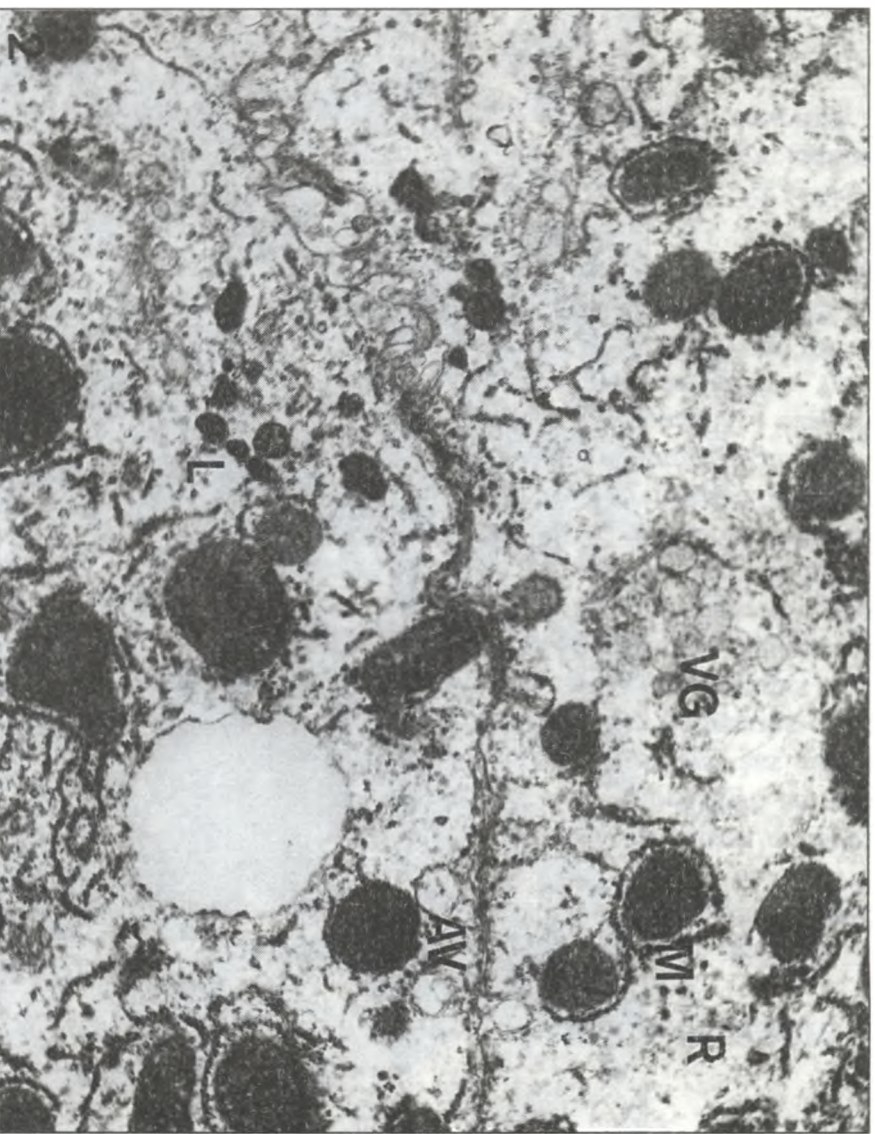
Aktywność badanych enzymów wyrażano w nmol/mg białka/godzinę.

## **Omówienie wyników**

Aktywność badanych enzymów lizosomalnych w wātrobie myszy nie obciążonych przyjęto za 100%. Ultrastruktura komórek wātrobry tych zwierzęat odpowiada opisowi nie pobudzonej komórki wātrobowej (fot. 1).



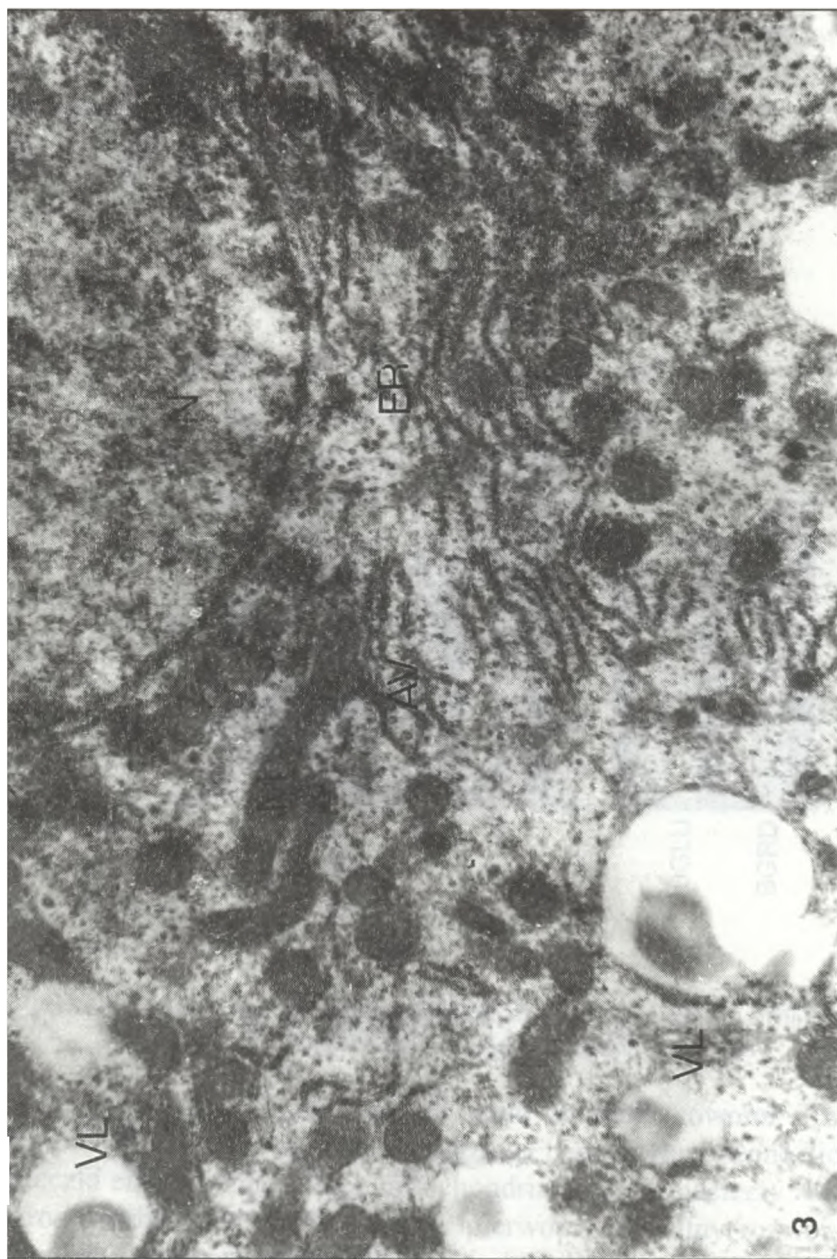
**Fot. 1.** Fragment hepatocytu myszy nie obciążonych: ER – endoplazmatyczne retikulum,  
G – złogi glikogenu, M – mitochondria, 12.000 x



**Fot.2.** Hepatocyty myszy w 3 godziny po iniekcji egzogennej adrenalinu : L - lizosomy

R- rybosomy , ER- retikulum endoplazmatyczne ,AV -wakuole autofagowe

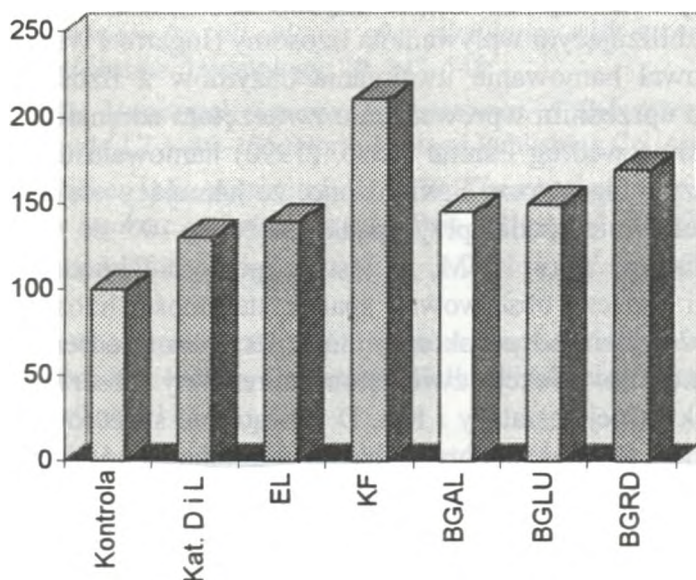
M. -mitochondria , VG -wakuole zawierające VLDL .15.000 x



**Fot.3.Hepatocyt myszy w 3 godziny po iniekcji egzogennej adrenaliny :  
M.-mitochondria ,AV - wakuole autofagowe , VL -wakuole lipidowe , N- jądro , 14.000 x**



W następstwie podania tego hormonu obserwowano bardzo głębokie zmiany aktywności enzymów przedziału lizosomalnego. Aktywność proteolityczna wzrosła po trzech godzinach o około 30%, natomiast istotny wzrost aktywności obserwowano w przypadku esterazy lizosomalnej o 40%, kwasnej fosfatazy o 110%. Równie dużemu wzrostowi uległa aktywność badanych glikozydaz lizosomalnych BGRD o 70%, BGAL o 45% i BGLU o 50%. (ryc. 1).



Ryc. 1. Procentowe zmiany zawartości hydrolaz lizosomalnych w wątrobie samic myszy po 3 godzinach od jednorazowej iniekcji adrenaliny

Egzogenna adrenalina w sposób istotny zmieniła również strukturę hepatocytów myszy (fot. 2). W cytoplazmie hepatocytu obecne liczne kanały siateczki endoplazmatycznej, mitochondria o gęstej macierzy. Obserwuje się wzrost liczby lizosomów, głównie pierwotnych i silny rozwój elementów Golgiego, zarówno cystern jak i wakuol wydzielniczych zawierających lipoproteiny (VDLD). Widocznym efektem działania egzogennej adrenaliny jest obecność w cytoplazmie hepatocytu licznych wakuol lipidowych wypełniających prawie całkowicie komórkę (fot. 3). Widoczne struktury degrada-

cyjne oraz mitochondria o gęstej macierzy z prawidłowym rysunkiem błon mitochondrialnych. Ultrastruktura komórki wątrobowej wskazuje na stan pobudzenia procesów autodegradacyjnych.

## Dyskusja

Hormony, których produkcja gwałtownie wzrasta pod działaniem stresu, to katecholaminy. Adrenalina i noradrenalina są rozpatrywane jako naturalne czynniki przeciwzapalne. Przeciwzapalne działanie adrenaliny jest związane z jej stabilizującym wpływem na lizosomy (Ingarro i wsp. 1973). Autor ten obserwował hamowanie uwalniania enzymów z lizosomów wątroby szczurów po uprzednim wprowadzeniu zwierzętom adrenaliny i noradrenaliny. Adrenalina według Panina i wsp. (1990) hamowała uwalnianie beta-glukuronidazy i fagocytozę. Stwierdzono, że hamujący efekt katecholamin *in vitro* gwałtownie spadał przy spadku stężenia  $10^{-3}$  do  $10^{-5}$ M i prawie nie przejawiał się przy  $10^{-6}$ M, to jest na poziomie koncentracji fizjologicznej. Inni badacze obserwowali spadek stabilności lizosomów wątroby po upływie 2 godzin od podskórnej iniekcji szczurom adrenaliny w dawce 2 mg/kg m.c. Po iniekcji zwierzętom adrenaliny obserwowano wzrost aktywności kwaśnej fosfatazy i Kat. D w wątrobie szczurów (Panin i wsp. 1990). Znajduje to również potwierdzenie w uzyskanych wynikach.

Konsekwencją 3-godzinnego działania egzogennej adrenaliny (w dawce 200  $\mu$ g/kg m.c) jest wzrost aktywności badanych enzymów przedziału lizosomalnego (aktywność proteolityczna wzrosła o około 30%, esterazy lizosomalnej o 40%, kwaśnej fosfatazy o 110%, beta-glukuronidazy o 70%, beta-galaktozydazy o 45% i beta-glukozydazy o 50%).

Badania morfologiczne potwierdzają założenia Turnera i wsp. (1978), że adrenalina działa stabilizująco na poziomie błon komórkowych, zaś zmiany w strukturze hepatocytu wskazują na wzrost procesów autofagowych. O stymulującym wpływie katecholamin na procesy fagocytozy donoszą Wyroba (1989), Okuda i wsp. (1992) i Athari i wsp. (1994). Zaś Tripathi i wsp. (1989) wykazał, że efektem działania adrenaliny są istotne zmiany morfologiczne z utratą mikrofilamentów aktynowych włącznie. Zaburzenia syntezy lipoprotein VLDL a także upośledzenie funkcji mitochondriów leżą u podstaw ostrego stłuszczenia wątroby (Sherlock 1983). Widocznym efektem działania egzogennej adrenaliny jest obecność w cytoplazmie hepatocytu mikrowakuol wypełnionych tłuszczem (fot. 3). Autofagia jest tu me-



chanizmem kompensacyjnym. Podobne efekty uzyskał Shkurupii (1988) po podaniu glukagonu i hydrokortyzonu.

Reasumując możemy powiedzieć, iż obserwowana degradacja struktur wiąże się z aktywacją procesów autofagowych, co znajduje potwierdzenie w równoległym wzroście aktywności badanych hydrolaz lizosomalnych.

## Literatura

- Athari A., Hanecke K., Jungermann K., 1994, *Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and D<sub>2</sub> release from primary Ito cell cultures after stimulation with noradrenaline and ATP but not adenosine*. *Hepatology*, 20, 142–148.
- Barrett A.J., 1972, *Lysosomal enzymes*. In *Lysosomes. A Laboratory Handbook*. (Edited by Dingle J.T.), 46–135. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.
- Freeman C.P., Noakes D.E., Annison E.F., 1970, *The metabolism of glucose, acetate, palmitate stearate and oleate in pigs*. *Brit. J. Nutr.*, 24, 705–716.
- Ignarro L.J., Krassikoff N., Sliwka J., 1973, *J. Pharmacol. and Exptl Therap.*, v.186, p. 86.
- Kirschke H. and Wiederanders B., 1984, *Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Proteinases*. Martin Luther Universität Halle-Wittenberg Wissenschaftliche Beitrage Halle/Saale 11.
- Langner J., Wakil A., Zimmerman A., Ansorge S., Bohley P., Kirschke H. and Wiederanders B., 1973, *Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme mit Azokasein als Substrat* *Acta Biol. Med. Germ.* 31, 1–18.
- Marzella L. and Glaumann H., 1980a, *Increased degradation in rat liver induced by vinblastine. I. Biochemical Characterization*. *Lab. Invest.* 42, 8–17.
- Marzella L. and Glaumann H., 1980b, *Increased degradation in rat liver induced by vinblastine. II. Morphological Characterization*. *Lab. Invest.* 42, 18–27.
- Okuda M., Lee H.C., Kumar C., Chance B., 1992, *Comparison of the effect of a mitochondrial uncoupler, 2,4-dinitrophenol and adrenaline on oxygen radical production in the isolated perfused rat liver*. *Acta Physiologica Scandinavica*. 145, 159–168.
- Panin L.E., Maianskaia N.N., Klimenteva T.K., 1990, *The mechanism of action of hydrocortisone and adrenaline on the hepatic lysosomal apparatus*. *Problemy Endokrynologii*. 36, 62–66.
- Sherlock S., 1983, *Acute fatty liver of pregnancy and the microvesicular fat diseases*. 24, 265–269.

- Shkurupii V.A., 1988, *Morphologic study of the effects of acute stress and the separate administration of „adaptive hormones” on the mouse hepatocytes*. *Journal Tistiologia i Genetika*. 22(4), 3–8.
- Tripathi B.J., Tripathi R.C., Millard C.B., 1989, *Epinephrine-induced toxicity of human trabecular cells in vitro*. *Toxicity Research*. 6(1–2), 141–156.
- Turner D.C., Bagnara J.T., 1978, *Endokrynologia ogólna*. PWRiL, Warszawa.
- Wyroba E., 1989, *Beta-adrenergic stimulation of phagocytosis in the unicellular eukaryote. Paramecium aurelia*. *Cell Biology International Reports*. 13(8), 667–678.

*Teodora Król, Marian Schmidt*

## **The Adrenaline Effect on Autophagic Processes in Mouse Hepatocytes**

### **S u m m a r y**

The adrenaline effect on biochemical and ultrastructural changes in selected strain mouse liver, 3 hours after administration was studied. The activity of cathepsin D and L, N-acetylo-beta-D-glucosaminidase, beta-glucuronidase, lysosomal esterase acid phosphatase, beta-glucosidase and beta-galactosidase was examined, determining biochemical changes. Simultaneously fragments of tissue were collected from the same animals for further ultrastructural study. Observed significant autodegradative cell changes were strictly correlated with parallel growth of activity of examined lysosomal hydrolases.