

Zmiany aktywności enzymów lizosomowych w wątrobie i nerkach myszy po iniekcjach glukagonu

BOŻENA WITEK, AGATA GRANICZKA, EWA OCHWANOWSKA, ADAM KOŁĄTAJ*

Instytut Biologii Akademii Świętokrzyskiej, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce
*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, ul. Postępu 1, 05-5542 Wólka Kosowska

Witek B., Graniczka A., Ochwanowska E., Kołataj A.

Changes of the lysosomal enzyme activity in the liver and kidney of mice after glucagon injections

Summary

Changes in the activity of β -glucuronidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, cathepsin D and cathepsin L in the liver and kidney of mice, injected intraperitoneally with 15 μ g/kg b.w. of glucagon were investigated. The experiment was carried out on 24 8-week-old mice, whose parents were chosen from random match. The homogenates of the liver and kidney were subjected to differentiate centrifuging, and in the lysosomal fractions of the liver and kidney the activities of β -glucuronidase [β -GlcUr], N-acetyl- β -glucosaminidase [NAG], cathepsin D [Cath. D], and cathepsin L [Cath. L] were estimated. Injection of glucagon caused a decrease in the activity of β -glucuronidase in the liver and kidney, cathepsin L in the liver, N-acetyl- β -glucosaminidase in the kidney, and an increase cathepsin D and cathepsin L in the kidney of mice. The results suggest that exogenous glucagon had a significant influence on the activity investigated lysosomal enzymes. The range of the reaction remained in a relationship with the kind of the organ and type of enzyme.

Keywords: lysosomal enzymes, glucagon, mice

Glukagon będący antagonistą insuliny jest elementem specjalnego mechanizmu – „glukostatu wątrobowego”, dzięki któremu możliwe jest utrzymanie stałej koncentracji glukozy we krwi (26). Podczas niedoboru glukozy glukagon mobilizuje potencjalne źródła energetyczne ustroju, pobudza glukoneogenezę, glikogenolizę i lipolizę, przejawia też działanie ketogenne.

Lizosomy stanowią jeden z najważniejszych układów degradacyjnych komórek (18, 30, 31) wszystkich kręgowców, owadów i morskich bezkręgowców (29). Ich cechą charakterystyczną jest obecność w ich wnętrzu enzymów hydrolitycznych, o optymalnym działaniu w środowisku o kwaśnym zakresie pH (8). Zawarte w lizosomach hydrolazy degradują substancje pochłonięte przez komórkę (7, 20), odpowiadają za usuwanie uszkodzonych organelli komórkowych, uczestniczą również w likwidacji komórki po jej śmierci. Lizosomy są miejscem reaktywacji wielu enzymów i hormonów, a dzięki proteolizie kontrolują też sekrecję komórek gruczołów dokrewnych (17).

Liczne badania wykazały znamienny wpływ hormonów na zachowanie się aktywności enzymów lizosomowych, co tylko potwierdza kluczową rolę układu lizosomowego w reakcjach adaptacyjnych organizmu (5, 11, 13). W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji na temat wpływu egzogenego glukagonu na aktywność hydrolaz układu lizosomowego.

Celem badań było określenie zmian aktywności modelowo wybranych enzymów lizosomowych – β -glucuronidazy, N-acetylo- β -glukozaminidazy, katepsyny D i katepsyny L w wątrobie i nerkach myszy podanych iniekcji farmakologicznych dawek glukagonu.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 24 dojrzałych płciowo samcach myszy linii Swiss, o średniej masie ciała 18,2-20,3 g, w wieku 8 tygodni. Zwierzęta pochodziły z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Myszy żywiono mieszanką o standardowej – 16% zawartości białka, której skład opracowano w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie k/Warszawy. Zapewniono im również stały dostęp do wody.

Myszy podzielono na grupę doświadczalną i kontrolną. Myszy grupy doświadczalnej przez sześć dni, dwukrotnie w ciągu dnia (8:00 i 18:00) otrzymywały w iniekcji do otrzewnowej glukagon w dawce 15 μ g/kg masy ciała. Myszy grupy kontrolnej poddawane były iniekcji 0,9% roztworu NaCl w objętości 250 μ l. Po 12 godzinach od ostatniej iniekcji myszy uśmiercano i natychmiast pobierano fragmenty wątroby i nerek. Wątrobę perfundowano schłodzonym do temperatury 277,15 K roztworem 0,9% NaCl i podobnie jak skrawki nerek zawieszano w 100 mM buforze fosforanowym o wartości pH 7,0 schłodzonym do 277,15 K, w stosunku 500 mg tkanki/5 ml buforu. Całość homogenizowano w homogenizatorze z tłokiem teflono-

wym przy 200 obrotach/minutę. Uzyskane homogenaty poddawano wirowaniu różnicowemu zgodnie z metodą (3).

W przygotowanych supernatantach oznaczono aktywność modelowych hydrolaz lizosomowych, tj. β -glukuronidazy (β -GlcUr, EC 3.2.1.31) i N-acetylo- β -glukozaminidazy (NAG, EC 3.2.1.30) zgodnie z metodą podaną przez (2) oraz aktywność katepsyny D (Cath. D, EC 3.4.23.5) i katepsyny L (Cath. L, EC 3.4.22.15) według (16).

Aktywność β -glukuronidazy i N-acetylo- β -glukozaminidazy oznaczano, stosując syntetyczne substraty p-nitrofenylowe ((4-nitrophenyl- β -D-glucuronide) i (4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide)). Aktywność proteolityczną katepsyny D oznaczano przy zastosowaniu 2% azokazeiny rozpuszczonej w 6 M moczniku, jako substratu, prowadząc 15 minutową preinkubację badanej próby z pepstatyną o końcowym stężeniu 0,5 μ mol/litr. Aktywność katepsyny L oznaczano analogicznie, preinkubując badaną próbę z substratem benzylo-feniloalanylo-feniloalanylo-dwuazometanem (Z-Fe-Fe-DAM) o końcowym stężeniu 5 μ mol/litr. W uzyskanych supernatantach lizosomowych oznaczano też poziom białka całkowitego zgodnie z metodą (15). Zastosowane substraty pochodziły z firmy Serva Feinbiochemica GmbH&Co., Heidelberg, Germany. Statystyczne określenie istotności wpływu glutationu na aktywność badanych enzymów lizosomowych wykonano, stosując analizę statystyczną wg testu istotności t-Studenta-Fischera, korzystając z programów SAS/STAT (1999-2001, User's Guide, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) oraz Origin (wersja 5.0, Microcal Software Inc. Northampton, USA).

Eksperyment został zatwierdzony przez Komisję Etyczną do Badań nad Zwierzętami działającą przy Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębku.

Wyniki i omówienie

Do cech lizosomów należy odnieść niezwykłą szybkość ich reakcji na działanie czynników hormonalnych. Po zadziałaniu na organizm czynników obciążających, lizosomy reagują bardzo szybko albo zwiększeniem ich ilości, albo uwalnianiem zawartych w nich hydrolaz do płynów biologicznych (6, 19, 32). Do dzisiaj w lizosomach zlokalizowano blisko 100 różnego rodzaju białek enzymatycznych, obejmujących obok lipaz, glikozydazy oraz znaczną ilość proteaz. Enzymy te katalizują hydrolizę białek ustroju, które występują najczęściej w postaci lipo- i glikoprotein.

Z danych zawartych w tabeli 1 widać, że, w wątrobie wpływ iniekcji glukagonu okazał się istotny w odniesieniu do reaktywności β -glukuronidazy i katepsyny L. Stwierdzono wysoce istotne statystycznie obniżenie aktywności β -glukuronidazy w wątrobie (do 53% wartości kontrolnych, z 0,51 do 0,27 nmol/mg białka/godz.), które może wskazywać na obniżenie tempa jej biosyntezy lub spowolnienie degradacji β -D-glukuronidów w hepatocytach (22). Zmiany aktywności β -glukuronidazy obserwuje się w wielu stanach patologicznych,

głównie w schorzeniach wątroby oraz w chorobach nowotworowych (27).

Wiadomo, że β -glukuronidaza jest egzoglikozydazą działającą wyłącznie na wiązania β -glikozydowe glukuronidów (1, 10) i hydrolizującą naturalne i syntetyczne β -D-glukuronidy na kwas glukuronowy i aglikon. Niedobór lub niska aktywność β -glukuronidazy oraz innych glikozydaz degradujących glikozaminoglikany może stać się przyczyną mukopolisacharydoz lub mukolipidoz, zaliczanych do grupy schorzeń spichrzeniowych (9). β -glukuronidazie przypisuje się istotną rolę, m.in. w uwalnianiu hormonów steroidowych i innych biologicznie czynnych aglikonów z ich glukuronidów, udział w degradacji kwaśnych mukopolisacharydów i dostarczanie glukuronianu do syntezy kwasu askorbinowego (24, 25). Z uwagi na biologicznie ważne funkcje, oznaczanie aktywności β -glukuronidazy odgrywa też istotną rolę w diagnostyce klinicznej (21).

Podawanie glukagonu wywołało również statystycznie istotne zmniejszenie aktywności katepsyny L w wątrobie (do 83%, z 0,073 do 0,058 nmol/mg białka/godz.) w porównaniu z aktywnościami w grupie kontrolnej. Takie zachowanie świadczyć może o destabilizacji błon lizosomowych i uwalnianiu hydrolaz lizosomowych do innych frakcji cytoplazmy i przyspieszaniu w ten sposób procesów autodegradacyjnych w komórkach. W wątrobie badanych osobników nie wykazano potwierdzonych statystycznie zmian aktywności N-acetylo- β -glukozaminidazy i katepsyny D.

W nerkach (tab. 1) iniekcje glukagonu okazały się istotne w odniesieniu do reaktywności wszystkich badanych enzymów. Aktywność β -glukuronidazy zmniejszyła się istotnie (do 79%, z 0,431 do 0,346 nmol/mg białka/godz.), a N-acetylo- β -glukozaminidazy (do 40%, z 8,20 do 3,28 nmol/mg białka/godz.). N-acety-

Tab. 1. Aktywność β -glukuronidazy, N-acetylo- β -glukozaminidazy, katepsyny D i katepsyny L (w nmol/mg białka/godz.) w wątrobie i nerkach myszy po iniekcjach glukagonu

Enzym	Kontrola (NaCl)	Glukagon	%	F
Wątroba				
β -glukuronidaza	0,51 \pm 0,033	0,271 \pm 0,081	53	***
N-acetylo- β -glukozaminidaza	1,83 \pm 0,290	1,61 \pm 0,341	88	NS
Katepsyna D	0,056 \pm 0,013	0,043 \pm 0,001	86	NS
Katepsyna L	0,073 \pm 0,002	0,058 \pm 0,012	83	*
Nerka				
β -glukuronidaza	0,431 \pm 0,102	0,346 \pm 0,08	79	*
N-acetylo- β -glukozaminidaza	8,20 \pm 0,937	3,28 \pm 0,284	40	***
Katepsyna D	0,066 \pm 0,021	0,074 \pm 0,005	117	*
Katepsyna L	0,094 \pm 0,002	0,110 \pm 0,001	122	*

Objaśnienia: procentowe zmiany aktywności β -GlcUr, NAG, Cath. D i Cath. L wobec przyjętych za 100% wartości aktywności myszy kontrolnych; *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; NS – wynik nieistotny statystycznie

lo- β -glukozaminidaza jest hydrolazą należącą do grupy glikozydaz lizosomowych, hydrolizującą końcowe reszty β -N-acetylo-glukozaminidowe w naturalnych oligosacharydach (24, 28). Stwierdzono, że iniekcja glukagonu może stymulować fosforylację i uszkodzenie cytochromu P₄₅₀ w mikrosomach hepatocytów (12, 23).

Katepsyna D jest heterogenną proteazą, dającą szereg izoenzymów różniących się nieznacznie punktem izoelektrycznym. Podawanie egzogenego glukagonu wywołało znamienny wzrost aktywności katepsyny D (do 117%, z 0,066 do 0,074 nmol/mg białka/godz.) oraz katepsyny L (do 120%, z 0,094 do 0,110 nmol/mg białka/godz.) w nerce badanych myszy, wobec wartości aktywności w grupie kontrolnej. Zwiększenie aktywności obu katepsyn w nerce po iniekcjach glukagonu wskazywać może na nasilenie proteolizy, której zadaniem jest m.in. dostarczanie substratów dla różnych rodzajów białek. Przyczyną wzrostu aktywności obu badanych katepsyn może być też wzmożona resorpcja aminokwasów uwalnianych z mięśni. (4) wykazali, że podwyższona koncentracja glukagonu z jednoczesnym obniżeniem stężenia insuliny we krwi powoduje uwalnianie z komórek mięśniowych znacznych ilości aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach.

Iniekcje egzogenego glukagonu okazały się istotne w odniesieniu do reaktywności β -glukuronidazy i katepsyny L w wątrobie oraz wszystkich badanych enzymów w nerkach, co wskazuje na wysokie możliwości adaptacyjne lizosomów jako układu skupiającego w swym wnętrzu enzymy degradacyjne.

Piśmiennictwo

1. *Abou-Haila A., Fouquet J. P., Tulsiani D. R.*: Characterization and immunolocalization of beta-D-glucosidase in mouse testicular germ cells and spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 1999, 25, 48-60.
2. *Barrett A. J.*: Lysosomal enzymes. [w:] *Lysosomes. A Laboratory Handbook* (Dingle J. T.), North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1972, 46-135.
3. *Beaufay H.*: Methods for isolation of lysosomes, [w:] *Lysosomes. A Laboratory Handbook* (Dingle J. T.), North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1972, 1-30.
4. *Brosnan J. T., Man K. C., Hall D. E., Colbourne S. A., Brosnan M. E.*: Interorgan metabolism of amino acids in streptozotocin-diabetic ketoacidotic rats. *Am. J. Physiol.* 1983, 244, E151-E158.
5. *Cuervo A. M., Dice J. F.*: When lysosomes get old. *Exp. Geront.* 2000, 35, 119-131.
6. *Denda M., Tsuchiya T., Elias P. M., Feingold K. R.*: Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000, 278, R367-372.
7. *Edelman G. M., Crossin K. L.*: Cell adhesion molecules: implications for molecular histology. *Ann. Rev. Biochem.* 1991, 60, 155-190.
8. *Eskelinen E. L., Tanaka Y., Saftig P.*: At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 2003, 13, 137-145.
9. *Gao C., Sands M. S., Haskins M. E., Ponder K. P.*: Delivery of a retroviral vector expressing human beta-glucuronidase to the liver and spleen decreases lysosomal storage in mucopolysaccharidosis VII mice. *Mol. Ther.* 2000, 3, 233-244.
10. *Ghods A., Stein C., Derksen T., Yang G., Anderson R. D., Davidson B. L.*: Extensive beta-glucuronidase activity in murine central nervous system after adenovirus-mediated gene transfer to brain. *Hum. Gene Ther.* 1998, 16, 2331-2340.
11. *Gromakova I. A., Kovalenko O. A.*: Lysosomal proteolysis: effects of aging and insulin. *Biochemistry* 2003, 68, 772-775.
12. *Jansson I., Curti M., Epstein P. M., Peterson J. A., Schenkman J. B.*: Relationship between phosphorylation and cytochrome P₄₅₀ destruction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990, 283, 285-292.
13. *Jóźwik A., Śliwa-Jóźwik A., Fronczyk W., Kołtąj A.*: Aktywność enzymów lizosomowych u myszy pod wpływem selekcji na tempo wzrostu. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 348-350.
14. *Kankofer M., Wierciński J., Zerbe H.*: Activity of placental β -N-acetylglucosaminidase in cows with and without retained fetal membranes. *Reprod. Dom. Anim.* 2000, 35, 97-100.
15. *Kirschke H., Wiederanders B.*: Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Proteinasen. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg Wissenschaftl. Beitr. Halle/Salle 1984, 11-17.
16. *Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Ansorge S., Broghammer U.*: VII. Katepsine L und H: zwei neue Proteinasen aus Rattenleberlysosomen. *Acta Biol. Med. Germ.* 1976, 35, 285-299.
17. *Klionsky D. J., Emr S. D.*: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000, 290, 1717-1721.
18. *Kołątaj A., Śliwa-Jóźwik A., Jóźwik A.*: The lysosomal cell complex as a stress response indicator. *Anim. Sci. Papers Reports* 2001, 19, 177-192.
19. *Lloyd J. B.*: Lysosome membrane permeability: implications for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 30, 189-200.
20. *Morales C., Zhao Q., Lefrançois S.*: Biogenesis of lysosomes by endocytic flow of plasma membrane. *Biocell.* 1999, 23, 149-160.
21. *Nakano A., Marks D. L., Tietz P. S., Groen P. C., La Russo N. F.*: Quantitative importance of biliary excretion to the turnover of hepatic lysosomal enzymes. *Hepatology* 1995, 22, 262-266.
22. *Niemann R., Buddecke E.*: Substrate specificity and regulation of activity of rat liver β -D-glucuronidase. *Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem.* 1982, 363, 591-598.
23. *Oesch-Bartlomowicz B., Oesch F.*: Phosphorylation of cytochrome P-450 isoenzymes in intact hepatocytes and its importance for their function in metabolic process. *Arch. Toxicol.* 1990, 64, 257-261.
24. *Ohashi T., Yokoo T., Izuka S., Kobayashi H., Sly W. S., Eto Y.*: Reduction of lysosomal storage in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of normal and genetically modified macrophages. *Blood* 2000, 11, 3631-3633.
25. *Patil S., Kanase A.*: Cholesterol mediated changes in β -glucuronidase activities of rat theca interstitial cells and granulosa cells. *Indian J. Exp. Biol.* 1995, 33, 321-324.
26. *Qureshi S. A., Candelore M. R., Xie D., Yang X., Tota L. M., Ding V. D., Li Z., Bansal A., Miller C., Cohen S. M., Jiang G., Brady E., Saperstein R., Duffy J. L., Tata J. R., Chapman K. T., Moller D. E., Zhang B. B.*: Role of glucagon in the pathogenesis of diabetes: the status of the controversy. *Metabolism* 2001, 27, 1691-1709.
27. *Sahagian G. G., Novikoff P. M.*: Lysosomes, [w:] *Asias I. M., Boyer J. L., Fausto N., Jakoby W. B., Schachter D. A., Shafritz D. A.*: The Liver: Biology and Pathobiology. Raven Press, Ltd., NY 1994, 275-291.
28. *Senba M., Kaghige N., Miake F., Watanabe K.*: Purification and properties of three β -N-acetylglucosaminidases from *Lactobacillus casei* ATCC 27092. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62, 404-406.
29. *Sheeler P., Bianchi D. E.*: Cell Biology: Structure Biochemistry and Function. John Wiley & Sons, NY 1980.
30. *Witek B.*: Wpływ egzogenego glutationu zredukowanego, askorbinianu, retinolu oraz α -tokoferolu na aktywność enzymów układu lizosomowego komórek wątroby, nerki i mięśnia myszy żywionych zróżnicowaną dietą białkową. *Wyd. SGGW, Warszawa* 2003.
31. *Witek B., Kołątaj A.*: The effect of exogenous glucose on the activity of lysosomal enzymes in some organs of rabbits. *Arch. Tierz.* 2000, 43, 649-654.
32. *Witek B., Kołątaj A., Jeżewska G., Witkowski A.*: Effect of glucose, glutathione and ethanol on the activities of some lysosomal enzymes in quail. *Acta Biol. Cracov. Ser. Zool.* 2000, 42, 67-72.
33. *Witek B., Ochwanowska E., Kołątaj A., Ślewa A., Stanisławska I.*: Effect of melatonin administration on activities of some lysosomal enzymes in the mouse. *Neuroendocrinol. Lett.* 2001, 22, 181-185.

Adres autora: dr hab. Bożena Witek, prof. nadzw., ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce; e-mail: b.witek@pu.kielce.pl