

U prigodi 45. obljetnice otkrića Lizosomi i fenomen lizosomotropizma

On the Occasion of the 45th Anniversary of the Discovery Lysosomes and the Phenomenon of Lysosomotropism

Olga Carević

10 000 Zagreb, Palmotićevo 7

Sažetak U 1955. Christian de Duve i njegovi suradnici u Belgiji nazvali su imenom lizosomi skupinu citoplazmatskih tvorbi koje su obavijene lipoproteinskom membranom, a sadrže enzime kisele hidrolaze. Biokemijski i citokemijski studij je pokazao da su lizosomi nazočni u animalnim i biljnim eukariotskim stanicama. S druge strane, eritrociti i prokariotske stanice kao što su bakterije, mikoplazme i modrozelenne alge ne sadrže lizosome. Poslije je ustanovljeno da su lizosomi uključeni u dinamiku lizosomskog sustava koji se sastoji od različitih citoplazmatskih tvorbi kao što su primarni i sekundarni lizosomi, postlizosomi, endosomi i autofagosomi. Te se tvorbe međusobno spajaju, a u nekim situacijama i sa staničnom membranom. Lizosomski sustav sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima poput razgradnje endogenih i egzogenih makromolekula (proteina, lipida, polisaharida i nukleinskih kiselina) i citoplazmatskih tvorbi (mitohondrija, peroksisoma, Golgijeva kompleksa i dr.), regresije tkiva (žlijezda dojke nakon laktacije), regulacije hormonske sekrecije primjerice proinzulina u inzulin i dr. S druge strane, lizosomski je sustav uključen u niz patoloških procesa: upala, obrambeni mehanizam stanice (protiv bakterija i virusa), različite intoksikacije, alergijske reakcije, stresne reakcije, ishemija, nasljedne lizosomske bolesti (mukopolisaharidoze, sfingolipidoze, fukozidoze i dr.), oštećenje genetskog materijala koje dovodi do malignih transformacija itd. Pojam lizosomotropizma uveo je de Duve 1972. a označava supstancije koje stanica preuzima u lizosomski sustav neovisno o njihovoj kemijskoj naravi i mehanizmu ulaska.

Ključne riječi: lizosomi, djelovanje u fiziološkim i patološkim procesima, lizosomotropizam i lijekovi

Summary In 1955, Christian de Duve and other scientists working with him in Belgium gave the name lysosomes to a group of cytoplasmic particles surrounded by lipoprotein membranes and containing a variety of acid hydrolases. Biochemical and cytochemical studies have shown lysosomes to be present in animal and plant eucariotic cells. On the other hand, mammalian mature red cells and procaryotes such as bacteria, mycoplasma and blue-green algae do not contain lysosomes. Later it was established that function of lysosomes is involved in the dynamics of the lysosomal system which is composed of variety of cytoplasmic structures: primary lysosomes, secondary lysosomes, post-lysosomes, endosomes and autophagosomes. These organelles are capable of fusing with one another, or under certain circumstances with cell membrane. Lysosomal system participates in many physiological processes: degradation of the endogenous and exogenous macromolecules (proteins, lipids, polysaccharides and nucleic acids) and cytoplasmic structures (mitochondria, peroxisomes, Golgi complex etc.), regression of tissues (mammary glands after lactation ceases), regulation of hormone secretion such as proinsulin to insulin. On the other hand, the lysosomal system is involved in a number of pathological situations: inflammation, various intoxications, defense mechanisms (against bacteria and viruses), allergic reactions, various stress reactions, ischemia, inborn lysosomal diseases, such as mucopolysaccharidosis, sphingolipidosis, fucosidosis, alterations of genetic material leading to malignant transformations. The term lysosomotropism introduced by de Duve in 1972, designates all substances that are taken up selectively into lysosomes, irrespective of their nature or mechanisms of uptake.

Key words: lysosomes, participation in physiological and pathological processes, lysosomotropism and drugs

Lizosomi su stanične tvorbe veličine 0,4 - 0,8 µm u promjeru. Struktura lizosoma ograničena je lipoproteinskom membranom. Osnovna značajka lizosoma je nazočnost kiselih hidrolaza, enzima koji razgrađuju esterske, peptidne i glikozidne vezove u makromolekulama. Te se tvorbe nalaze u eukariotskim stanicama životinjskog podrijetla, tj. u stanicama koje imaju jezgre. I biljne stanice

sadrže tvorbe koje su morfološki i funkcionalno slične lizosomima, a nazvane su sferosomi.

Lizosome su otkrili Christian de Duve i njegovi suradnici na Medicinskom fakultetu u Louvainu (Belgija 1955) (1), kada su razdvajali homogenat jetre štakora u frakcije s pomoću ultracentrifuge (slika 1). Tom su prilikom ustanovili da su u frakciji koja se taloži nakon mitohondrija,

a prije mikrosoma, nazočne tvorbe s kiselim hidrolazama optimalnog djelovanja između 3 i 5 pH.

Na slici 1. prikazana je elektronskomikroskopska snimka lizosoma izoliranih iz homogenata jetre štakora s pomoću gradijenta gustoće.

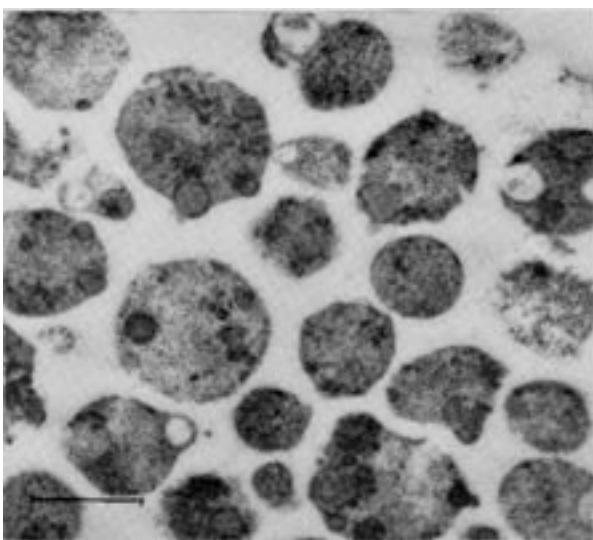
Lizosomi u fiziološkim procesima

Lizosomi djeluju unutar lizosomskog sustava koji čini niz funkcionalno povezanih tvorbi različita podrijetla i sadržaja. Mehanizmom stapanja membrana lizosomi se međusobno spajaju stvarajući pri tome različite nove strukture. Pri mehanizmu stapanja sadržaj lizosoma ne dolazi u doticaj sa sadržajem citoplazme. Funkcija lizosomskog sustava obuhvaća razgradnju endogenih i egzogenih makromolekula, uklanjanje tvorbi koje su izvršile svoju funkciju u stanici, prijetvor hormona iz inaktivnog u aktivni oblik (proinzulin u inzulin i dr.), izmjenu proteina ugrađenih u membrane, regresiju tkiva (smanjenje mliječne žlijezde nakon laktacije, involuciju uterusa nakon poroda) i druge fiziološke procese.

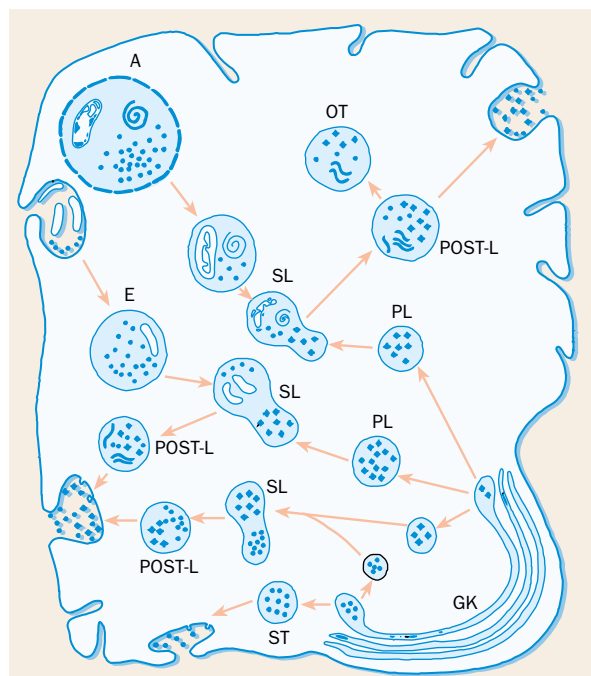
Na slici 2. prikazana je predodžba o ulozi lizosoma u procesima: endocitoze, autofagocitoze i egzocitoze koji imaju važnu ulogu u stanici (2).

Endocitoza uključuje tri procesa: **fagocitozu**, **makropinocitozu** i **mikropinocitozu**. **Fagocitozom** stanica preuzima čestice promjera oko 1 μm (bakterije, dijelove obamrlog tkiva i dr.). Na tim se mjestima stanična membrana uvija u citoplazmu i odvaja u obliku lizosomske tvorbe: **fagosom**. **Makropinocitozom** i **mikropinocitozom** stanica preuzima tekućinu s otopljenim malim molekulama stvarajući **makropinosome** (0,3 - 2 μm), odnosno **mikropinosome** (70 nm).

U nastavku tih procesa bitnu ulogu ima **Golgijev kompleks** jer se kisele hidrolaze, sintetizirane na



Slika 1. Lizosomi izolirani i snimljeni u Laboratoire de Chimie Physiologique, Université de Louvain, Belgija (Paul Baudhuin i Olga Carević, 1971. (neobjavljena snimka) \times 36500.



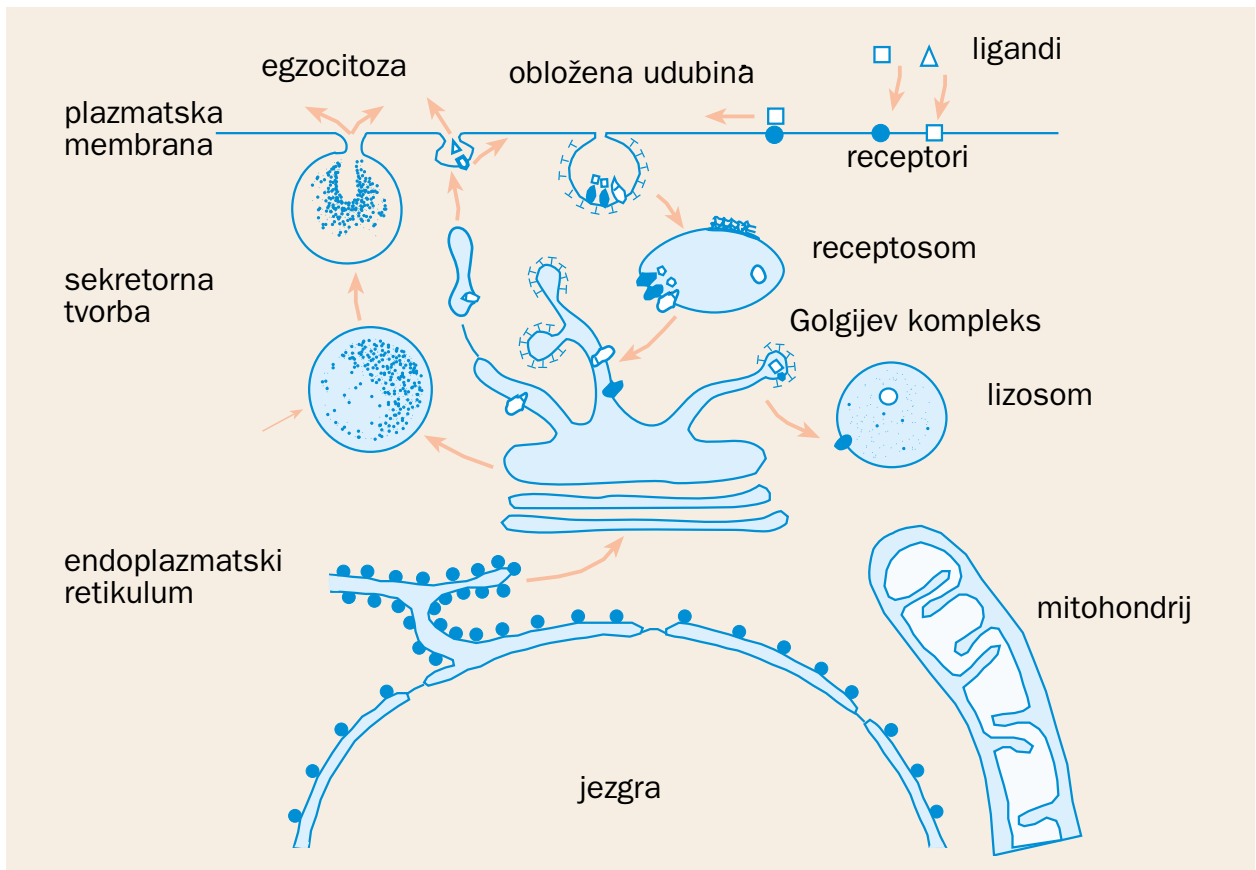
Slika 2. Predodžba o funkciji lizosomskog sustava u animalnoj stanici. A=autofagosom, E=endosom, PL=primarni lizosom, SL=sekundarni lizosom, Post L=postlizosom, OT=ostatno tijelo, GK=Golgijev kompleks, ST=sekretorna tvorba.

endoplazmatskom retikulumu, nakupljaju u krajevima njegove strukture, a potom odvajaju u obliku lizosomske tvorbe: **primarni lizosomi**.

Endosomi se spajaju s primarnim lizosomima stvarajući sekundarne lizosome u kojima se endocitirani sadržaj razgrađuje s pomoću kiselih hidrolaza. Male molekule oslobođene u tim reakcijama prodiru kroz lizosomske membrane u citoplazmu i ulaze u niz biokemijskih procesa, dok sekundarni lizosom prelazi u postlizosomski oblik. Ta se tvorba može spojiti sa staničnom membranom i prenijeti sadržaj egzocitozom u izvanstanični prostor. Osim toga, postlizosomi se mogu zadržati i u citoplazmi u obliku ostatnih tijela koja s vremenom gube membranu, pa se njihov sadržaj uključuje u metaboličke procese u stanici. Valja spomenuti da se egzocitozom prenose i neki proteini, poput hormona iz sekrecijskih tvorbi u izvanstanični prostor.

Autofagocitozom lizosomi preuzimaju iz citoplazme makromolekule (glikogen, lipide, mukopolisaharide i dr.) te strukture koje su izvršile svoju funkciju (mitohondrije, peroksisome i dr.). Oko tih makromolekula ili tvorbi sintetizira se membrana i izdvaja ih iz citoplazme u obliku lizosomske strukture: autofagosoma. Kao i u procesu endocitoze autofagosomi se spajaju s primarnim lizosomima, a zatim slijedi stvaranje sekundarnih lizosoma i razgradnja autofagocitiranog sadržaja.

Osim navedenih procesa, posebno je važna uloga lizosoma u receptorskoj endocitozi koja je shematski prikazana na slici 3.



Slika 3. Receptorska endocitoza

Receptorskom endocitozom stanica preuzima izvanstanični sadržaj s pomoću receptora ugrađenih u staničnu membranu. Tako se proteini plazme, peptidni hormoni, transferin, faktor rasta, lipoprotein niske gustoće i druge tvari vežu na odgovarajuće receptore stvarajući kompleks: receptor-ligand. Ti se kompleksi nakupljaju u membranskim udubinama ("coated pits") koje su obložene proteinom klatrinom, a potom odvajaju s dijelom membrane kao **receptosomi**. Oni se mogu međusobno spajati u veće tvorbe ili s endosomima u obliku tubulovezikule. S pomoću ATP-aze koja unosi H^+ u te strukture receptori se izdvajaju i prodiru natrag do stanične membrane i nastavljaju svoju funkciju u prijenosnom mehanizmu. S druge strane, tubulovezikularna tvorba koja se spaja s primarnim lizosomima stvara sekundarne lizosome u kojima se razgrađuje ligand.

Receptorska endocitoza je veoma opsežan proces koji se događa u brojnim stanicama, a posebice ima važnu ulogu u prijenosnom mehanizmu hormona (3).

Lizosomi u patološkim procesima

U nastavku svojih istraživanja Christian de Duve i njegovi suradnici pojasnili su i nastanak nekih metaboličkih bolesti i patoloških stanja za koja su ustanovili da su uzročno povezana s poremetnjama u funkciji lizosomskog sustava (4, 5).

Pokazalo se da različite metaboličke bolesti nastaju zbog nakupljanja makromolekula u lizosomskom sustavu nekih organa i tkiva kojemu nedostaju lizosomske hidrolaze odgovorne za njihovu razgradnju. Te su bolesti nazvane lizosomske bolesti a obuhvaćaju: sfilipidoze, mukopolisaharidoze, glikogenoze, fukozidoze, manozidoze, Tay-Sachsovu bolest i dr. Makromolekule koje se sintetiziraju u citoplazmi autofagocitozom dospijevaju u lizosomski sustav. Zbog urođenog nedostatka odgovarajućeg lizosomskog enzima te se makromolekule nakupljaju u sekundarnim lizosomima. To dovodi do poremetnji u osmotskoj ravnoteži između lizosomskih tvorbi i citoplazme što rezultira slijedom patoloških procesa kao što su: pucanje lizosomskih membrana, nekontrolirani izlazak kiselih hidrolaza u citoplazmu, razgradnju citoplazmatskih uklopina, a moguća je i smrt stanice zbog autolize. U takvim uvjetima dolazi do teškog oštećenja odgovarajućeg organa ili tkiva (6, 7).

Tako se primjerice pokazalo da se u Alzheimerovoj bolesti, amiloidozi, beta-amiloid nakuplja u lizosomskom sustavu stanica mozga, srca, jetre i nekih drugih organa (8). Budući da u lizosomskom sustavu nisu nazočni enzimi odgovorni za razgradnju takve polimerne molekule, koji sudjeluju u njihovoj razgradnji, broj se lizosoma s nakupljenim beta-amiloidom sve više povećava i time potiskuje ostale stanične strukture. To može rezultirati značajnom poremetnjom u metaboličkim procesima stanice. Dakako, valja spomenuti i

to da postoje i drugi patološki procesi genetske naravi kao i stvaranje slobodnih radikala koji sudjeluju u nastanku i razvoju Alzheimerove bolesti (9).

U liječenju lizosomskih bolesti pokušala se primijeniti takozvana lizosomotropna terapija, tj. usmjeravanje odgovarajućeg lijeka u lizosomski sustav ciljane stanice, s pomoću nosilaca biološke ili biokemijske naravi (10, 11). Lizosomotropna terapija obuhvaća pripremu lizosomotropnog kompleksa u kojem je farmakološki aktivna tvar vezana nekovalentnom vezom s nosiocem kao što su: liposomi, proteini i neke druge makromolekule. Endocitozom lizosomotropni kompleks dopijeva u lizosomski sustav u kojem se nosilac razgrađuje odgovarajućim kiselim hidrolazama, a farmakološki aktivna tvar se oslobađa iz kompleksa i ostvaruje predviđeni učinak.

Razvojem genetičkih istraživanja pronađene su znatno bolje i učinkovitije metode liječenja različitih tipova lizosomskih i metaboličkih bolesti.

Lizosomotropizam

Poznato je da brojne farmakološki aktivne, toksične i kancerogene tvari mogu dospjeti u lizosomski sustav neovisno o kemijskoj naravi i mehanizmu ulaska. Te su tvari nazvane lizosomotropne tvari, a opisani fenomen lizosomotropizam (12-15). Spoznaja o lizosomotropizmu nametnula je dva pitanja: (1) mehanizam ulaska lizosomotropnih tvari u lizosomski sustav i (2) njihova reakcija s membranama i sadržajem lizosomskih tvorbi.

Brojna su istraživanja pokazala da se većina lizosomotropnih tvari veže s proteinima plazme u krvnom serumu stvarajući kompleks koji endocitozom dopijeva u lizosomski sustav. Kisele proteaze razgrađuju proteine plazme i oslobađaju te tvari iz kompleksa. Osim toga spojevi bazične naravi prelaze iz citoplazme (pH oko 7) u lizosome (pH 3-5) procesom protonacije na osnovi razlike u koncentraciji vodikovih iona između ta dva stanična prostora.

Lizosomotropne tvari mogu utjecati na aktivnost kiselih hidrolaza ili na propusnost lizosomskih membrana. Osim toga, te se tvari mogu metabolizirati u više ili manje aktivne spojeve, pa čak i u toksične metabolite.

S druge strane, promjene koje se zbivaju u aktivnosti lizosomskih enzima izravno utječu na ravnotežu između sinteze i razgradnje u stanici, jer se najveći dio kataboličkih procesa zbiva u lizosomskom sustavu.

Od izuzetne je važnosti mehanizam kojim lizosomotropne tvari utječu na propusnost lizosomskih membrana.

Neke tvari povećavaju njihovu propusnost ili čak labiliziraju lizosomske membrane i na taj način omogućuju izlazak kiselih hidrolaza u citoplazmu, a time i njihov štetni učinak na citoplazmatske uklopine i strukture zbog hidrolitske razgradnje. Tako primjerice lizosomski enzimi mogu metabolizirati citoplazmatske sastojke u spojeve s antigenim svojstvima koji potiču autoimunosti odgovor (16, 17).

U tom bi se kontekstu mogao spomenuti i prije obavljeni Allisonov rad o mehanizmu djelovanja lizosomske dezoksiribonukleaze (18). Naime, nakon labilizacije lizosomskih membrana u citoplazmu se oslobađa i kiselina dezoksiribonukleaza koja može potom prodrijeti u jezgru i uzrokovati kromosomske lomove kakvi su zamijećeni i u malignih tumora koji brzo rastu. Poznato je da se kromosomski lomovi i druge aberacije stvorene na taj način teško repariraju i da mogu rezultirati somatskim mutacijama i malignim transformacijama. Svaki nekontrolirani izlazak lizosomskih enzima u citoplazmu može bitno oštetiti stanicu i dovesti do autolize.

Proučavanjem funkcije lizosomskog sustava u patološkim uvjetima nađeno je da lizosomi imaju bitnu ulogu u nastanku anoksije, ishemijske, alergijske, nekroze, reumatskih, radijacijskih i tumorskih bolesti (19).

Osim toga, postoje podaci da mnoge toksične i kancerogene tvari u mehanizam štetnog djelovanja uključuju i labilizaciju lizosomskih membrana, kao što su: klorirani i fosfori insekticidi, tetraklorogljik, TCDD (2,3,7,8-tetraklordibenzo-p-dioksin), bakterijski toksini, azbest i niz drugih (20-24).

S druge pak strane, eritromicin, eritromicilamin, eritromicinoksim, azitromicin (Sumamed), diklofenak natrij (Voltaren), d-penicilamin (Metalcaptase), natrijev tiomalat, natrijev tiomalat zlata, antihistaminici, E i C - vitamini, kortikosteroidi i dr. sprječavaju labilizaciju lizosomskih membrana u patološkim procesima u stanici (25-32).

Pri tome je važno naglasiti da azitromicin ima znatno učinkovitije djelovanje na propusnost lizosomskih membrana i stabilnost funkcije lizosomskog sustava u usporedbi s navedenim farmakološki aktivnim supstancijama (rad u pripremi za tisak).

Zaključci

Sumirajući rezultate dobivene u studiju lizosomskog sustava tijekom fizioloških i patoloških procesa u stanici, posebice fenomena lizosomotropizma, moglo bi se zaključiti da otkriće lizosoma znači važan doprinos suvremenim medicinskim znanostima.

Literatura

1. De DUVE C, PRESSMAN BC, GIANETTO R. i dr. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissues. *Biochem J* 1955; 60: 604-17.
2. WILLINGHAM MC, PAKISTAN E. Endocytosis and exocytosis. *Inter Rev Cytol* 1984; 92: 51-92.
3. SAHAGIAN GG, NOVIKOFF PhM. Lysosomes U: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB, Schachter DA i Shafritz ur. *The Liver: Biology and Pathobiology*, Ltd New York: Raven Press, 1994.
4. HERS HG, de DUVE C. Inborn lysosomal diseases. *Gastroenterology* 1965; 48: 625-32.
5. TROUET A, DEPRez-CAMPENEERE D, de DUVE C. Chemotherapy through lysosomes with DNA-daunorubicin complex. *Nature New Biol* 1972; 239: 110-2.
6. WALKLEY SU. Cellular pathology of lysosomal storage disorders. *Brain Pathology* 1998; 8: 175-93.
7. JOLLY RD, WALKLEY. Lysosomal storage disease of animals - an essay in comparative pathology. *Veterinary Pathology* 1997; 34: 527-48.
8. CATALDO AM, HAMILTON DJ, NIXON RA. Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. *Brain Research* 1990; 640: 68-80.
9. BIRD TD, LEVY-LAHAD E, POORKAJ P i dr. Wide range in age of onset for chromosome 1-related familial Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996; 40: 932-6.
10. TROUET A, DEPRez-CAMPENEERE D, BAURAIN R, HUYBRECHTS M, ZENEBERGH A. Deoxyribonucleic acid as carrier of antitumor drugs U: Gregoriadis G ur. *Drug carriers in biology and medicine*. Acad Press London, New York, San Francisco 1979.
11. TROUET A, DEPRez-CAMPENEERE D. Daunorubicin, a review of experimental and clinical data. *Cancer Chemother Pharmacol* 1979; 2: 77-9.
12. GREGORIADIS G. Liposomes for drugs and vaccines. *Trends in Biotechnology* 1985; 9: 235-41.
13. De DUVE C, De BARSY T, POOLE B, TROUKET A, TULKENS P, van HOOFF F. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol* 1974; 23: 231-49.
14. CAREVIĆ O. Lizosomotropizam i njegovo značenje u suvremenoj medicini. *Saopćenja* 1977; 20: 3-17.
15. DAVIS SG, LYERLA TA. The effect of lysosomotropic amines on beige mouse cells. *Exp Cell Research* 1977; 237: 242-5.
16. SCHWARTZ LB, AUSTEN KF, WASSERMANN SI. Immunologic release of β -glucuronidase from purified rat seronal mast cells. *J Immunol* 1979; 44: 1445-50.
17. BAGGIOLINI S, SCHNEIDER J. Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated macrophages. *J Exp Med* 1978; 148: 435-50.
18. ALLISON AC. Lysosomes and cancer U: Lysosomes in Biology and Pathology (ur. DINGLE JT, FELL HB) 1969; North Holland Publ Co, Amsterdam and London.
19. De DUVE CH, WATTIAUX R. Function of lysosomes. *Ann Rev Physiol* 1966; 28: 435-92.
20. CAREVIĆ O. The effects of gamma-hexachlorocyclohexane on rat liver lysosomes. *Biochem Pharmacol* 1977; 26: 1377-81.
21. CAREVIĆ M, CAREVIĆ O. The effects of benzo(a)pyrene on rat liver lysosomes. *Toxicology Letters* 1982; 10: 41-9.
22. CAREVIĆ O. In vitro citotoksični učinci krisotil-azbesta i benzo(a)pirena na humane polimorfonuklearne leukocite. *Bilten HAZU* 1990; 3: 19-20.
23. CAREVIĆ M, CAREVIĆ O. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine. *Arch Hig rada toksikol* 1994; 45: 161-6.
24. CAREVIĆ O. The effects of benzo(a)pyrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine upon mammalian cell viability. *Traffic* 1998; 3: 101-5.
25. CAREVIĆ O, PRPIĆ V, ŠVERKO V. Correlation between erythromycin and acid phosphatase in mouse liver. *Biochem Biophys Acta* 1975; 381: 269-77.
26. CAREVIĆ O, ŠVERKO V, BORANIĆ M, PRPIĆ V. Effect of ftorafur on acid phosphatase activity in the liver of mice with transplanted lymphatic leukemia. *Experientia* 1974; 30: 241-2.
27. ŠVERKO V, CAREVIĆ O. The uptake of erythromycinoxime and erythromycilamine by mice liver lysosomes. *Jug Physiol et Pharmacol Acta* 1977; 13: 205-12.
28. CAREVIĆ O. The effect of D-Penicillamine on the release of acid hydrolases from rat liver lysosomes induced by gamma-hexachlorocyclohexane. *Biochem Pharmacol* 1979; 3: 203-9.
29. CAREVIĆ M, CAREVIĆ O. The effects of diclofenac sodium upon extracellular release of lysosomal enzymes in the synovial fluid of rats with adjuvant-induced arthritis. *JAZU* 1982; 402: 245-52.
30. CAREVIĆ O. The effects of D-penicillamine, diclofenac sodium, gold sodium thiomalate upon selective release of lysosomal enzymes from human polymorphonuclear leucocytes. *Agents and Actions* 1985; 16: 407-10.
31. CAREVIĆ O. Effects of sodium thiomalate on immune-complex induced release of lysosomal enzymes from human polymorphonuclear leucocytes. *Immunopharmacology* 1986; 11: 7-11.
32. CAREVIĆ O, DJOKIĆ S. Comparative studies on the effects of erythromycin A and azythromycin upon extracellular release of lysosomal enzymes in inflammatory processes. *Agents and Actions* 1988; 25: 124-31.