

Przedział lizosomalny komórki ciekawym obiektem badań reakcji adaptacyjnych

Adam Kołataj

IGiHZ PAN w Jastrzębcu

Od czasu odkrycia De Duve'a (1959) wiadomo, że lizosomy występują w komórkach pod wieloma postaciami różniącymi się wielkością i strukturą wewnętrzną. Heterogenność morfologiczna populacji lizosomalnej w cytoplazmie jest odbiciem ich różnej aktywności w danym, odpowiednim stanie czynnościowym. Wyróżnić tu można lizosomy pierwotne, tzw. czyste lizosomy, i lizosomy wtórne (Novikoff i Yam, 1978). Wtórne powstają w dwojaki sposób, a mianowicie przez połączenie lizosomów pierwotnych z fagosomem zawierającym materiał przeznaczony do rozkładu katabolitycznego, a pobieranym z zewnątrz (heterofagia), lub przez połączenia z cytosegrosomami, tzn. z tymi rejonami komórek, które zostały wydzielone od reszty cytoplazmy przez otoczenie ich specyficzną błoną (autofagia). Wielkość i morfologia lizosomów wtórnych zależy od rodzaju, struktury i składu chemicznego materiału, który ulega trawieniu oraz od zaawansowania procesów litycznych.

Aktywność hydrolaz lizosomalnych zależy przede wszystkim od pH środowiska. Lizosomy to organelle komórkowe, charakteryzujące się najniższym pH, mieszczącym się w zakresie od 3,5 do 5,5, ułatwiającym działanie enzymów lizosomalnych. Kwaśne pH jest korzystne dla przebiegu reakcji katalizowanych przez lizosomalne hydrolazy. Wstępna hydroliza szeregu substratów białkowych zwiększa później podatność ich makromolekuł na dalszy rozkład enzymatyczny. Indywidualną cechą lizosomów jest latencja istniejących tam układów enzymatycznych, tzn. zjawisko utajonej aktywności enzymatycznej. Polega ona na „zamknięciu” enzymów w strukturze lizosomu tak, że ich aktywność ujawnia się w pełni dopiero po destrukcji tych organeli działaniem czynników fizycznych lub chemicznych.

Lizosomy przez długi czas uważano za wewnątrzkomórkowy układ trawienny, rozkładający materiał sfagocytowany lub pochłonięty na drodze pinocytozy (Ericsson, 1969). Obecnie wiadomo, że lizosomy pełnią szereg innych funkcji. Biorą udział w naturalnym obrocie metabolicznym, zapewniają komórkom gruczołowym rozkładanie ich wydzielin w przypadku ograniczonego na nią zapotrzebowania, mogą też te wydzieliny modyfikować i uczynniać dzięki kontrolowanej proteolizie (Bohley i wsp., 1978). Wiadomo również, że aparat lizosomalny jest naturalnym, dynamicznym systemem, biorącym udział we wczesnych reakcjach adaptacyjnych organizmu, uczestniczącym jednocześnie w utrzymaniu wewnętrznej homeostazy (Amenta i Brocker, 1980; Desjardins, 1995; Kołataj, 1993). Uszkodzenie lizosomów może spowodować

śmierć komórki, chociaż w warunkach fizjologicznych zachodzi proces ich kontrolowanej destabilizacji.

Układ lizosomalny stanowi swoiste zabezpieczenie komórki przed czynnikami stresotwórczymi (Cahill, 1970; Witek i Kołataj 2000a, 2000b; Witek i wsp., 2000), odpowiada też za likwidację zużytych organeli komórkowych i likwidację samej komórki po jej śmierci, np. na drodze apoptozy. W związku z tym już sam ich odkrywca – De Duve – nazwał lizosomy „woreczkami samobójczymi”. W przypadku nieprawidłowej gospodarki metabolitami, np. podczas głodzenia, przedział lizosomalny jako jeden z pierwszych reaguje włączeniem specyficznych mechanizmów obronnych (Glaumann, 1984; Witek i Kołataj, 1998).

Zaburzenia funkcji lizosomów są przyczyną wielu zaburzeń, np. gromadzenia nadmiernych ilości określonych substancji, które nie są metabolizowane ze względu na brak odpowiednich enzymów lizosomalnych związany z defektem genetycznym. Czynnikiem patogennym jest również wzrost aktywności niektórych hydrolaz lizosomalnych, np. arylosulfatazy B (Hers i Hue, 1983). Destabilizacja błon lizosomalnych jest czynnikiem patogennym w schorzeniach gośćcowych, a w chorobach nowotworowych aktywność enzymów lizosomalnych jest szczególnie wysoka w okresie tworzenia przerzutów (Allison, 1969).

Obecnie stwierdzono, że przestrzeń lizosomalna zawiera około 100 różnego rodzaju białek enzymatycznych, głównie hydrolaz, które biorą udział w degradacji białkowych, węglowodanowych i tłuszczowych struktur komórkowych, jak również proteoglikanów, a więc wszystkich typów substancji budujących komórkę. Barrett już w 1972 roku podał następujący wykaz sześciu ważniejszych grup enzymów lizosomalnych, a mianowicie: 1) hydrolazy karboksylowe tiolowe (lipazy, fosfolipazy, esterazy, tioesterazy); 2) hydrolazy działające na wiązania zawierające fosfor (kwaśna fosfataza, fosfataza fosfoproteidowa, fosfoamidaza, fosfataza fosfatydylowa, fosfolipaza C, rybonukleaza, dezoksyrybonukleaza II, kwaśna pirofosfataza, fosfodwuesteraza i egzonukleaza); 3) esterazy siarczanowe (arylosulfataza A i B); 4) glukozydazy (lizozym, hialuronidaza, neuraminidaza, β -glukuronidaza, N-acetylo- β -D-glukozaminidaza, β -glukozydaza); 5) peptydazy i amidazy (katepsyny A, B, D, E, kwaśna karboksypeptydaza, kolagenaza); 6) inne. Enzymy te pojawiają się już we wczesnych stadiach życia płodowego, a ich aktywność zmienia się wraz ze starzeniem się organizmu (Barrett, 1984; Kołataj i wsp., 2001a, 2001b; Wu, 1977). Obecnie wiadomo, że układ lizosomalny jest istotnym elementem uczestniczącym w morfogenezie tkanek i narządów, a działanie jego określić można mianem fizjologicznej destrukcji (Dice i wsp., 1978).

Z danych uzyskanych na podstawie naszych własnych eksperymentów wynika, że przedział lizosomalny komórki ujawnić może wysoką reaktywność adaptacyjną w odpowiedzi na różne nasilające się czynniki otoczenia, naruszające dotychczasową homeostazę czynnościową. Dotyczy to np. reakcji adaptacyjnych w stresie przenoszenia królików (z klatki do klatki na fermie) i w stresie transportowym u świń. W odniesieniu do pierwszego cyklu badań okazało się, że wątroba, nerki i mięśnie królików zmieniają aktywność swych enzymów lizosomalnych w obu kierunkach – podwyższenia i obniżenia, w zależności od rodzaju enzymu, wpływając zdecydowanie na labilność błon lizosomalnych w komórkach tych organów (Witek i wsp., 1994). Podobnie było u świń po 5-godzinnym transporcie samochodowym na przestrzeni 150 km.

U tych ostatnich aktywność w wątrobie powiększyła się w odniesieniu do NAGL (N-acetyl-beta-glukozaminidaza), AP (kwaśna fosfataza), AAP (alanylo-aminopeptydaza), EL (lyzosomalna esteraza) i katepsyny D; w nerkach do AP, AAP, EL, a w mięśniach tylko do BGRD (beta-glukuronidaza) – Witek i wsp., 1996a.

Pod wpływem różnie wysokich dawek alkoholu (10% i 20%) ujawniły się u myszy wyraźnie statystycznie potwierdzone różnice w zmianach aktywności β -galaktozydazy (BGAL), β -glukuronidazy (BGRD), N-acetyl- β -glukozaminidazy (NAGL), alaninowej i leucynowej aminopeptydazy, esterazy (EL) i lipazy lizosomalnej (LL), w zależności od rodzaju badanego organu (wątroba, nerki, mięśnie i mózgowie), czasu reakcji, jak i rodzaju enzymu (Witek i Kołataj, 1999).

Selekcja prowadzona u myszy przez 12 pokoleń na podwyższenie stopnia przyswajania i wykorzystania paszy zwiększyła aktywność BGAL (beta-galaktozydaza), BGRD, NAGL, AP, katepsyny D, LL i EL w mięśniach, wątrobie, nerkach i śledzionie tych zwierząt (Witek i wsp., 1999). Podobne wyniki związane z selekcją prowadzoną u myszy na zwiększenie tempa wzrostu ciała uzyskali Józwick i wsp. (2001).

Obserwacje Lankoff i Kołataja (2000a, 2000b) nad reakcją enzymów lizosomalnych w hepatocytach myszy poddanych iniekcjom trucizn wytwarzanych przez sinice podczas tzw. zakwitów w zbiornikach wód słodkich, a mianowicie mikrocystyny YR i nodularyny wykazały, że nodularyna aktywuje aktywność BGRD, AGLD (α -glukozydazy), EL i NAGL w zależności od wielkości dawki i czasu jej działania, a mikrocystyna YR indukuje biosyntezę glukozydaz i ujawnia ich destrukcyjny wpływ na strukturę błon lizosomalnych i błon endoretikulum cytoplazmatycznego.

Z badań Kołataja i wsp. (1996) nad stresem wymuszonego marszu w kieracie, unieruchomienia i kaniulizacji żyłnej u świń wynika, że po owym 30-minutowym marszu z szybkością 5 km/godz. enzymy BGAL, BGRD i NAGL u świń pozabawionych genu halotanowego (HAL⁻) ujawniły zmniejszenie swej aktywności, a AP, katepsyna D i L zwiększyły ją wyraźnie. Enzymy te miały jednak wyższą aktywność w grupie zwierząt bez genu (HAL⁻) w porównaniu z grupą zwierząt HAL⁺. Po 12 godzinach od kaniulizacji, aktywności enzymów BGAL, BGRD, NAGL i AP u świń z genotypem halotanowym były wyższe niż po 21 dniach od tego zabiegu, podczas gdy katepsyny D i L ujawniły odwrotne reakcje.

W innych eksperymentach (Witek i wsp., 1995) zaobserwowano, że 44-, 96- i 144-godzinne głodzenie królików ujawniło w zasadzie zmniejszenie się w ich krwi poziomu glukozy oraz pewną obniżkę aktywności obserwowanych tam enzymów lizosomalnych – AP, BGRD i BGLU (beta-glukozydaza). Iniekcja glutationu zredukowanego (GSH) oraz głodzenie, połączone z iniekcją glutationu GSH, powiększyły aktywność NAGL w wątrobie, bardziej wyraźnie u myszy selekcyjowanych na szybsze tempo wzrostu (Witek i Kołataj, 1998).

W efekcie wprowadzenia królikom na drodze iniekcji dożyłnej ponad 200 000 jednostek retinolu podwyższyła się w surowicy ich krwi aktywność enzymów AP, BGAL, BGLU i LL po 72 godzinach od iniekcji oraz NAGL po 168 godzinach, podczas gdy w leukocytach tylko BGAL i NAGL po 72 godzinach. Po iniekcji hydrokortyzonu (25 mg/kg masy ciała) aktywność wszystkich badanych enzymów podniosła się w surowicy krwi już po 24-48 godzinach, podobnie zdarzyło się to w leukocytach (Schmidt i wsp. 1992).

Podczas badań nad zatruciem owiec solami rtęci (40 mg Hg/kg masy ciała dziennie, w formie HgCl₂, przez 28 dni) zaobserwowano w plazmie ich krwi zwiększenie aktywności BGAL, BGLU i AAP, zmniejszyła się natomiast aktywność BGRD, NAGL, AP, EL i LL. Aktywność AP, NAGL i EL zwiększyła się także w limfocytach tych zwierząt (Witek i wsp., 1996b). Również vinblastyna i adrenalina zwiększyła tempo degradacji białek w mysich hepatocytach, gdyż od jej iniekcji u myszy doświadczalnych wzrosła, już po 4 godzinach, aktywność katepsyny D i L, KF, BGRD i BGAL (Król i wsp., 1994, 1997a, 1997b).

Obserwacje nad aktywnością wspomnianych enzymów lizosomalnych były prowadzone również u królików, dotyczyły jej zmienności podczas rozwoju ontogenetycznego (Banasik i wsp., 2001; Kołataj i wsp., 2001). Jak wiadomo, podczas rozwoju postnatalnego procesy katabolizmu w strukturach wewnątrzkomórkowych przebiegają z różną szybkością, wykazując etapy wzrostu i obniżenia swego tempa (Barrett, 1984). Aktywność poszczególnych enzymów degradacyjnych okazała się więc różna, również podczas naszych obserwacji. Należy dodać, że prawie wszystkie procesy degradacyjne w komórce przebiegają pod kontrolą i przy współdziałaniu systemu endokrynologicznego, co potwierdziły badania także naszego zespołu (Schmidt i wsp., 1992).

Dalsze nasze badania (Kołataj i wsp., 1998; Sommer i wsp., 1999;), przeprowadzone nad wpływem egzogennej glukozy i glicerolu na aktywność degradacyjnych enzymów lizosomalnych w surowicy krwi młodych byków wykazały, że zmiany tej aktywności ujawniły się w różnym stopniu. Zależało to przede wszystkim od rodzaju enzymu, a następnie wielkości dawki i czasu oddziaływania wprowadzonych metabolitów. Sugerowałoby to istnienie różnego tempa przystosowawczego do wywołanych zakłóceń homeostazy, charakterystycznego dla danego rodzaju enzymu. Obecnie planowane są analogiczne obserwacje w odniesieniu do mięśni, watroby i nerek tych zwierząt.

Wpływ podawanych metabolitów z zewnątrz na dynamikę przedziału lizosomalnego komórek wątroby, nerek i mięśni był obserwowany także na zwierzętach modelowych (Józwick i wsp., 2000; Witek i Kołataj, 2000a, 2000b; Witek i wsp., 1999), a uzyskiwane wyniki mogą mieć duże znaczenie farmakologiczne w zakresie regulacji hydrolitycznych przemian degradacyjnych, np. podczas chorób, defektów genetycznych czy stanu stresu.

W ostatnich latach pojawiły się też dalsze obserwacje polskich autorów wskazujące na to, że proteoliza spełnia poważną rolę nie tylko w systemie procesów degradacyjnych, ale także w układach regulatorowych (Król 1996, 1998; Król i wsp., 1994, 1997a, 1997b). Dzięki temu odbywa się w przestrzeni lizosomalnej nie tylko rozkład katabolizny białek egzo- i endogennych, ale realizuje się swoiste modulowanie liczby i jakości makromolekuł poszczególnych enzymów i białek regulatorowych, usuwanie białek nie spełniających przewidzianych funkcji fizjologicznych, eliminacja białek nieprawidłowych oraz, o czym także już wspomniano, rozkład białek komórki w sytuacji głodu lub jej różnicowania.

Badania poznawcze biologicznych zdolności adaptacyjnych organizmu jako całości i jego komórek mogą znacznie wzbogacić naszą wiedzę o dynamicznych przemianach biochemicznych, zachodzących w obszarze lizosomalnym.

40 pozycji literatury do wglądu u Autora i w Redakcji