

Б. С. КАСАВИНА, П. В. СЕРГЕЕВ, Н. Б. ЧЕСНОКОВА
ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ТКАНЕЙ ГЛАЗА
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИДРОКОРТИЗОНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 13 IX 1971)

Изменение свойств мембранных структур клетки, в частности мембран лизосом, является одним из возможных механизмов внутриклеточного действия глюкокортикоидов. Лишь в последнее время стали появляться единичные работы, в которых показано наличие лизосомальных ферментов в тканях глаза (¹⁻⁴).

Целью настоящей работы было изучение клеточного механизма действия гидрокортизона на активность лизосомальных ферментов цилиарного тела, камерной влаги и стекловидного тела. Действие гидрокортизона на лизосомальные ферменты тканей глаза до сих пор не изучалось, хотя известна роль кортикостероидов в патологии органа зрения (^{5, 6}).

Определяли активность кислых гидролаз: кислой фосфатазы и ферментов углеводного обмена: β -глюкозидазы, β -галактозидазы и гиалуронидазы. Опыты проводили на 80 кроликах-самцах породы шиншилла весом 2—2,5 кг. Однократное внутрибрюшинное введение гидрокортизона в дозе 5 мг/кг не дало достоверных изменений активности ферментов через 1 час и 4 часа после введения гормона. Поэтому в опытах гидрокортизон вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг. Активность ферментов контрольной группы животных сравнивали с активностью ферментов у животных, забитых через 30 мин., 1, 4, 12 и 24 часа после введения гормона. Определяли активность кислой фосфатазы (⁷), гиалуронидазы (⁸), β -глюкозидазы (⁹), β -галактозидазы (¹⁰). Активность ферментов рассчитывали в микромолях в минуту на 1 г белка. Для каждой ткани были подобраны оптимальные условия определения активности ферментов (концентрация гомогената, время инкубации, количество тритона X-100 и др.). Глаза энуклеировали и ткани выделяли на холоду. Определяли общую, свободную и связанную активность ферментов. Свободную активность отражающую степень доступности ферментов для субстратов, определяли в свежеприготовленном гомогенате тканей при инкубации проб в течение 30 мин. Общую активность исследовали в гомогенатах в условиях полного разрушения субклеточных структур после добавления в инкубационную среду детергента тритона X-100. Общая активность представляет собой сумму свободной и связанной активности, которая до разрушения субклеточных частиц детергентом не проявлялась. Связанную активность рассчитывали как разность между общей и свободной активностью.

При определении свободной и общей активности гиалуронидазы было обнаружено, что тритон даже в очень низких концентрациях ингибирует этот фермент. Известно, что некоторые поверхностноактивные вещества влияют на активность гиалуронидазы (¹¹); тритон X-100, видимо, относится к таким веществам. Замораживание и оттаивание гомогенатов с целью разрушения субклеточных частиц не дало положительных результатов. В связи с этим проводили определение активности гиалуронидазы при инкубации проб в течение 2 час.

Результаты исследования показали, что в цилиарном теле через 1 час после введения гидрокортизона происходит уменьшение свободной, всту-

пающей в контакт с субстратом фракции кислой фосфатазы и увеличение связанной, функционально латентной фракции (рис. 1а). Эти изменения свидетельствуют о том, что под влиянием гидрокортизона связь кислой фосфатазы с мембраной стала более прочной, что привело к уменьшению контакта фермента с субстратом.

Введение гидрокортизона вызывает сходные изменения активностей β -глюкозидазы и β -галактозидазы в цилиарном теле (рис. 1б, в). В течение первого часа после внутрибрюшинного введения гидрокортизона происходит уменьшение доли свободной активности этих ферментов, а через 4 часа

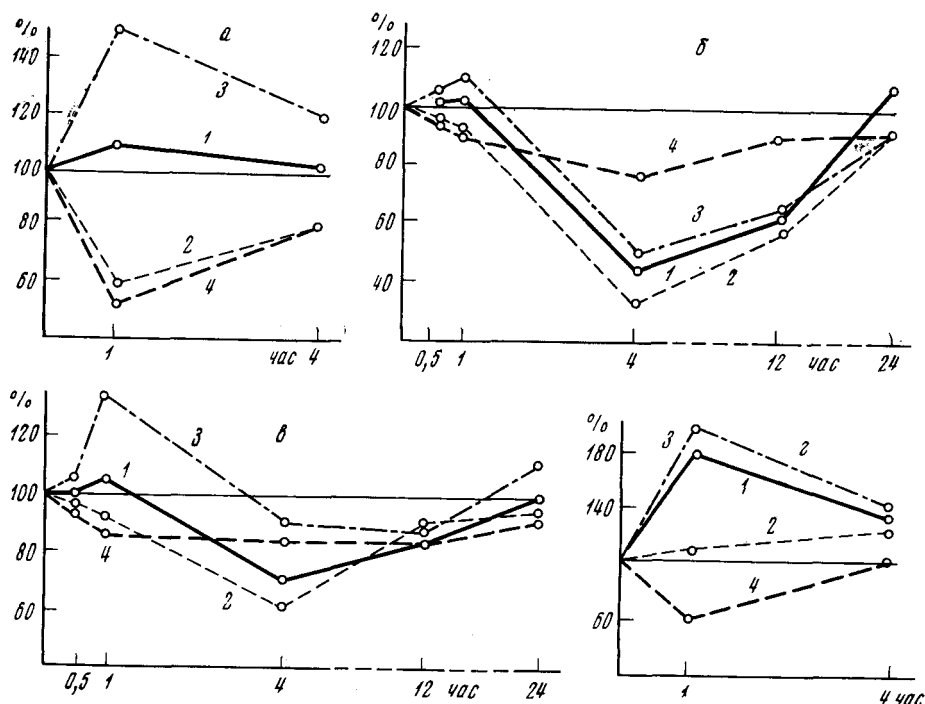


Рис. 1. Влияние гидрокортизона на активность лизосомальных ферментов: а, г — кислой фосфатазы, б — β -глюкозидазы, в — β -галактозидазы. а — в — в цилиарном теле, г — в стекловидном теле. Условные обозначения активности ферментов: 1 — общая, 2 — свободная, 3 — связанная, 4 — свободная в процентах к общей. Каждая точка — среднее из 6—7 определений

наблюдается резкое уменьшение общей активности. Таким образом, снижение активности β -глюкозидазы и β -галактозидазы в цилиарном теле осуществляется двумя путями: более быстрым увеличением доли связанной (функционально латентной) фракции этих ферментов и более медленным уменьшением их общей активности. В цилиарном теле происходит уменьшение активности гиалуронидазы уже через 30 мин. после введения гидрокортизона. Через 1 час активность фермента составляет 68,9% от нормы, через 4 часа 25,8%, к 12 час. снова повышается и через сутки достигает нормального уровня.

Во влаге, так же как и в стекловидном теле, применяемыми методами не удалось обнаружить активности β -глюкозидазы и β -галактозидазы. При введении гидрокортизона во влагу не происходит заметного изменения активности кислой фосфатазы. Так же как и в цилиарном теле, во влаге под влиянием гидрокортизона наблюдается уменьшение активности гиалуронидазы, которое имеет место уже через 30 мин. после введения гормона. Через 1 час активность гиалуронидазы во влаге составляет 70,8% от нормы, а через 4 часа 11,9%. Через 12 час. после введения гармона значение

активности гиалуронидазы повышается и к 24 час. достигает значения нормы.

В стекловидном теле под влиянием гидрокортизона происходит значительное увеличение общей активности и процента связанной активности кислой фосфатазы (рис. 12), что означает увеличение связи этого фермента с мембраной лизосом. Поэтому, несмотря на значительное увеличение общей активности фермента, степень контакта фермента с субстратом не изменилась. В стекловидном теле интактных животных используемыми методами не удалось обнаружить активности гиалуронидазы. Через 30 мин.

Таблица 1

Активность лизосомальных ферментов тканей глаза
через 1 час после введения гидрокортизона *

Фермент	Активность фермента	Активность, $\mu\text{мол/мин}$ на 1 г белка		Р	
		контрольные животные	животные, забитые через 1 час после введения гормона		
		абсолютные значения			% к контролю
Цилиарное тело					
Кислая фосфатаза	Общая	$11,6 \pm 0,25$ (100)	$12,4 \pm 0,29$ (100)	109,4	$<0,5$
	Свободная	$5,7 \pm 0,26$ (50,7)	$3,2 \pm 0,22$ (26,0)	56,6	$<0,001$
	Связанная	$5,9 \pm 0,26$ (49,3)	$9,2 \pm 0,16$ (74,0)	149,2	$<0,001$
β -Глюкозидаза	Общая	$1,14 \pm 0,021$ (100)	$1,18 \pm 0,034$ (100)	103,1	$<0,5$
	Свободная	$0,39 \pm 0,009$ (34,2)	$0,36 \pm 0,011$ (30,2)	91,3	$<0,05$
	Связанная	$0,75 \pm 0,015$ (65,8)	$0,82 \pm 0,014$ (69,8)	108,8	$<0,05$
β -Галактозидаза	Общая	$1,42 \pm 0,027$ (100)	$1,50 \pm 0,031$ (100)	105,5	$<0,5$
	Свободная	$1,01 \pm 0,016$ (71,4)	$0,95 \pm 0,019$ (63,4)	93,8	$<0,05$
	Связанная	$0,31 \pm 0,008$ (28,6)	$0,55 \pm 0,018$ (33,6)	134,9	$<0,02$
Гиалуронидаза		$19,57 \pm 1,03$	$13,6 \pm 0,72$	68,9	$<0,05$
Камерная влага					
Гиалуронидаза		$285,00 \pm 11,7$	$201,9 \pm 11,0$	70,8	$<0,01$
Стекловидное тело					
Кислая фосфатаза	Общая	$46,1 \pm 0,23$ (100)	$82,2 \pm 0,32$ (100)	178,4	$<0,001$
	Свободная	$9,4 \pm 0,056$ (20,3)	$9,9 \pm 0,056$ (12,1)	105,9	$<0,5$
	Связанная	$36,7 \pm 0,22$ (79,7)	$72,3 \pm 0,34$ (89,9)	196,9	$<0,001$
Гиалуронидаза		0	$201,9 \pm 13,1$		$<0,001$

* В скобках даны значения в процентах.

после введения гидрокортизона в стекловидном теле выявляется гиалуронидазная активность. Через 1 час и 4 часа активность гиалуронидазы находится приблизительно на одном уровне. К 12 час. после введения гормона происходит уменьшение активности фермента, а через сутки гиалуронидазу, как и в норме, определить не удавалось.

Таким образом, гидрокортизон при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг действует как стабилизирующий агент на мембраны лизосом цилиарного тела и стекловидного тела. Этот эффект проявляется через 1 час после введения гормона (см. табл. 1). Иными словами, под влиянием гидрокортизона мембраны лизосом этих тканей начинают более прочно удерживать ферменты и тем самым препятствуют контакту ферментов с субстратами. Через 4 часа после введения гидрокортизона отмечается нормализация соотношения свободной и связанной фракций кислой фосфатазы цилиарного тела и стекловидного тела, а увеличение доли связанной формы β -глюкозидазы и β -галактозидазы цилиарного тела наблюдается более про-

должительное время. Следовательно, имеется разная продолжительность воздействия гидрокортизона на изучаемые ферменты.

Известно стабилизирующее действие гидрокортизона на лизосомы (¹², ¹³). Противовоспалительное и противоаллергическое действие гидрокортизона на ткани глаза можно объяснить стабилизирующим действием этого гормона на мембраны лизосом, как это показано на других объектах (¹⁴, ¹⁵). Кроме стабилизации мембран лизосом, гидрокортизон оказывает влияние на общую активность ферментов тканей глаза. Его влияние сказывается в уменьшении общей активности кислых гидролаз углеводного обмена (β -глюкозидазы, β -галактозидазы и гиалуронидазы) цилиарного тела и в увеличении кислой фосфатазы и гиалуронидазы стекловидного тела. Наблюдаемое уменьшение активности гиалуронидазы согласуется с представлением о том, что гидрокортизон подавляет активность этого фермента (¹⁶), и предположением (¹⁷), что кортикостероиды в тканях глаза действуют на систему гиалуронидаза — гиалуроновая кислота.

В нормальном стекловидном теле гиалуронидаза не обнаружена. Ее субстрат — гиалуроновая кислота находится в этой ткани в большой концентрации, и, поскольку гиалуроновая кислота и гиалуронидаза представляют единую систему, следует предположить возможность присутствия в стекловидном теле гиалуронидазы. В наших опытах появление гиалуронидазы в стекловидном теле обнаружено лишь после воздействия гидрокортизона. Наличие гиалуронидазы показано также при глаукоме (¹⁸). Появление фермента можно объяснить либо активацией гиалуронидазы стекловидного тела, либо поступлением ее из других тканей.

Таким образом, гидрокортизон вызывает значительные биохимические сдвиги исследованных ферментных систем тканей глаза. Поэтому изучение клеточного механизма действия гидрокортизона может иметь большое значение для понимания его терапевтического воздействия на глаз и интимных механизмов возникновения патологий органа зрения, связанных с нарушением гормонального баланса организма.

Московский научно-исследовательский
институт глазных болезней им. Г. Гельмгольца
2-й Московский государственный медицинский
институт им. Н. И. Пирогова

Поступило
16 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Freedman, B. Jacobson et al., *Exp. Eye Res.*, **7**, 113 (1968). ² J. François, R. Wainstein, *Ophthalmologica* (Basel), **157**, 231 (1969). ³ E. Berman, *Invest. Ophthalmol.*, **10**, 64 (1971). ⁴ A. Swanson, *Exp. Eye Res.*, **5**, 145 (1966). ⁵ А. Е. Шевалев, *Офтальмол. журн.*, **1**, 39 (1963). ⁶ M. Armaly, *Invest. Ophthalmol.*, **4**, 487 (1965). ⁷ A. Bodansky, *J. Biol. Chem.*, **101**, 93 (1933). ⁸ Z. Dishe, *J. Biol. Chem.*, **167**, 187 (1947). ⁹ V. Patel, A. Tappel, *Biochem. et biophys. acta*, **191**, 86 (1969). ¹⁰ V. Patel, A. Tappel, *Biochem. et biophys. acta*, **191**, 653 (1969). ¹¹ Н. П. Елимов, Соккари Адель Эль, *Тр. Ленингр. хим.-фарм. инст.*, в. 27, **7** (1969). ¹² G. Weissman, *Federat. Proc.*, **23**, 1038 (1964). ¹³ G. Weissman, In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, **1**, Ch. 10, 1969. ¹⁴ Ch. De Duve, In: *Injury, Inflammation and Immunity*, Baltimore, 1964, p. 283. ¹⁵ Ch. De Duve, *Proc. Inst. Med. Chicago*, **26**, 73 (1966). ¹⁶ C. Asboe-Hansen, *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, **25**, 1136 (1966). ¹⁷ J. François, *Bull. Soc. belge d'ophthalm.*, **106**, 190 (1966). ¹⁸ Р. В. Петросян, В кн.: *Очерки по сосудистой проницаемости*, 1965, стр. 165, 181.