

УДК 617.7 : 612.015.1

БИОХИМИЯ

Б. С. КАСАВИНА, Н. Б. ЧЕСНОВА

## ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ГИДРОЛАЗЫ ТКАНЕЙ ГЛАЗА

(Представлено академиком А. И. Опариным 27 X 1972)

Многие деструктивные тканевые процессы связаны с изменением в локализации и активности лизосомальных гидролиз (<sup>1, 2</sup>). Лизосомы выявлены в большинстве тканей позвоночных. Тем не менее, существуют лишь единичные работы по изучению лизосом тканей глаза и их роли в патологии органа зрения, причем большинство этих работ относятся к хрусталику и сетчатке. Так, показано наличие лизосом в эпителии хрусталика и выдвинута гипотеза об участии этих частиц в развитии катаракты (<sup>3, 4</sup>); обнаружено изменение активности лизосомальных ферментов при наследственной дегенерации сетчатки (<sup>5, 6</sup>).

Цилиарное тело, его секрет — камерная влага, а также стекловидное тело играют значительную роль в обмене тканей глаза и его нормальном функционировании. Исследование кислых гидролаз этих тканей может послужить основой для изучения патологических состояний органа зрения, а также механизма фармакологических воздействий.

В настоящей работе исследовали активность гидролитических ферментов: кислой фосфатазы,  $\beta$ -глюкозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, гиалуронидазы и кислых ДНКазы, РНКазы — в цилиарном теле, камерной влаге и стекловидном теле. Изучали распределение кислых гидролаз в субклеточных фракциях цилиарного тела.

Работа проведена на 60 кроликах-самцах породы шиншилла весом 2—2,5 кг. Методы определения активности ферментов и фракционирования цилиарного тела описаны в предыдущих работах (<sup>7-8</sup>). В гомогенатах тканей определяли свободную и общую активность ферментов. Свободную активность исследовали в свежеприготовленном гомогенате тканей при инкубации проб в течение 30 мин., а общую активность и активность ферментов в субклеточных фракциях цилиарного тела — в условиях полного разрушения субклеточных структур после добавления в инкубационную среду детергента тритона X-100. Активность гиалуронидазы определяли после инкубации проб в течение 2 час.

В табл. 1 представлены результаты определения активности кислых гидролаз в цилиарном теле, камерной влаге и стекловидном теле. Кислая фосфатаза, ДНКазы и РНКазы были выявлены во всех трех тканях; активность  $\beta$ -глюкозидазы и  $\beta$ -галактозидазы используемыми методами удалось обнаружить лишь в цилиарном теле, а гиалуронидазы — в цилиарном теле и камерной влаге. Таким образом, в стекловидном теле гликозидазную активность нам выявить не удалось.

При добавлении в инкубационную среду детергента тритона X-100, вызывающего выход ферментов из лизосом в цитоплазму, происходило увеличение активности исследуемых ферментов не только в тканях, но и в камерной влаге. Этот факт говорит о возможности проникновения в камерную влагу мембранных структур, обладающих ферментативной активностью.

При сравнении активности ферментов оказалось, что в стекловидном теле и камерной влаге, по сравнению с цилиарным телом, большая актив-

Таблица 1

## Кислые гидролазы тканей глаза

| Фермент                | Активность, $\mu$ мол/мин на 1 г белка |                  |                   |
|------------------------|----------------------------------------|------------------|-------------------|
|                        | цилиарное тело                         | камерная влага   | стекловидное тело |
| Кислая фосфатаза       |                                        |                  |                   |
| Свободная              | $5,7 \pm 0,26$                         | $11,3 \pm 0,63$  | $9,4 \pm 0,06$    |
| Общая                  | $11,6 \pm 0,25$                        | $73,0 \pm 1,8$   | $46,1 \pm 0,23$   |
| % свободной от общей   | 50,7                                   | 15,2             | 20,3              |
| ДНКаза                 |                                        |                  |                   |
| Свободная              | $3,6 \pm 0,21$                         | $19,9 \pm 0,72$  | $32,4 \pm 1,1$    |
| Общая                  | $4,9 \pm 0,29$                         | $65,2 \pm 2,3$   | $53,4 \pm 2,5$    |
| % свободной от общей   | 72,4                                   | 32,8             | 60,8              |
| РНКаза                 |                                        |                  |                   |
| Свободная              | $1,9 \pm 0,07$                         | $22,6 \pm 1,2$   | $16,1 \pm 1,1$    |
| Общая                  | $3,2 \pm 0,11$                         | $51,5 \pm 2,7$   | $66,5 \pm 2,9$    |
| % свободной от общей   | 60,5                                   | 44,0             | 26,8              |
| $\beta$ -Глюкозидаза   |                                        |                  |                   |
| Свободная              | $0,39 \pm 0,009$                       | 0                | 0                 |
| Общая                  | $1,14 \pm 0,021$                       | 0                | 0                 |
| % свободной от общей   | 34,2                                   | —                | —                 |
| $\beta$ -Галактозидаза |                                        |                  |                   |
| Свободная              | $1,01 \pm 0,016$                       | 0                | 0                 |
| Общая                  | $1,42 \pm 0,027$                       | 0                | 0                 |
| % свободной от общей   | 71,4                                   | —                | —                 |
| Гиалуронидаза          |                                        |                  |                   |
| Общая                  | $19,57 \pm 1,03$                       | $285,0 \pm 11,7$ | 0                 |

Таблица 2

## Распределение кислых гидролаз в субклеточных фракциях цилиарного тела (% от суммарной активности)

| Фракция          | Кислая фосфатаза | $\beta$ -Глюкозидаза | $\beta$ -Галактозидаза | Гиалуронидаза | ДНКаза | РНКаза |
|------------------|------------------|----------------------|------------------------|---------------|--------|--------|
| Ядерная          | 2,9              | 3,4                  | 3,9                    | 2,1           | 3,2    | 3,4    |
| Митохондриальная | 53,3             | 60,8                 | 67,0                   | 57,2          | 58,7   | 56,9   |
| Микросомальная   | 34,9             | 29,0                 | 18,3                   | 32,7          | 25,0   | 28,0   |
| Супернатант      | 8,8              | 6,8                  | 10,8                   | 8,0           | 13,1   | 11,7   |

ность приходится на 1 г белка гомогената, что связано с отсутствием структурных белков в камерной влаге и с относительно низким их количеством в стекловидном теле. Общая активность кислых нуклеаз в камерной влаге и стекловидном теле приблизительно одинаковая, а общая активность кислой фосфатазы в камерной влаге гораздо выше, чем в стекловидном теле, что, по-видимому, связано с участием этого фермента в процессе секреции камерной влаги.

При изучении распределения ферментов в субклеточных фракциях цилиарного тела было показано (табл. 2), что больше половины исследуемых кислых гидролаз сосредоточено в митохондриальной фракции, а около трети — в микросомальной. Наблюдается разная степень выхода ферментов в супернатант, что говорит о различной прочности связи ферментов с мембраной лизосом цилиарного тела. Так,  $\beta$ -глюкозидаза оказалась ферментом, наиболее прочно связанным с мембранными структурами, а ДНКаза — наименее.

Электронная микроскопия митохондриальной фракции цилиарного тела (рис. 1а) показала, что в ней содержатся лизосомы, различающиеся по электронной плотности, размером от 0,5 до 2,0  $\mu$ . Таким образом, в этой фракции присутствуют вторичные лизосомы, функциональная ак-

тивность которых выражена в разной степени. Лизосомы микросомальной фракции (рис. 16) размером около  $0,2\mu$  сходны с описываемыми в литературе первичными лизосомами (рис. 1 см. вклейку к стр. 957).

Специальных сообщений о лизосомах цилиарного тела в литературе мы не встречали. Известно, что двухслойный эпителий цилиарного тела, секретирующий камерную жидкость, эмбрионально является продолжением нейтроэпителиальных слоев сетчатки. Проведенное в настоящей работе фракционирование гомогената цилиарного тела с электронномикроскопическим контролем показало, что по седиментационным характеристикам, а также морфологически и ферментативно лизосомы цилиарного тела сходны с лизосомами других тканей.

Несмотря на то что кислые гидролазы найдены в различных тканях, их присутствие в секретах желез мало изучено. Камерная влага служит питательной средой для бессосудистых тканей глаза, в нее поступают продукты их метаболизма. Камерная влага обладает также бактерицидными свойствами. Из указанных функций влаги следует необходимость присутствия в этой внутриглазной жидкости гидролитических ферментов. И действительно, несмотря на очень незначительное содержание белка в этой прозрачной жидкости, активность гидролитических ферментов в ней довольно высокая. Оказалось, что активность гидролаз частично связана с мембранными структурами, которые могут поступать во влагу из секретирующего ее цилиарного тела либо из омываемых влагой тканей. Поступление ферментов в камерную жидкость находится под гормональным контролем <sup>(8)</sup>. Секреция лизосомальных гидролаз сравнительно хорошо изучена *in vitro*, но очень мало известно о секреции этих ферментов *in vivo* <sup>(9)</sup>. Кислые гидролазы камерной влаги являются хорошим объектом для исследования внеклеточной роли лизосом, и изучение факторов, контролирующих секрецию лизосомальных гидролаз, может дать новую информацию о различных физиологических и патологических процессах.

Несмотря на то что химический состав стекловидного тела хорошо изучен, мало известно о метаболизме этой ткани и о происхождении и обмене его макромолекул. Лишь в последние годы стали признавать в стекловидном теле наличие ограниченной ферментативной активности, необходимой для контроля концентрации макромолекул. Однако сравнительно недавно было показано, что в протоплазме гиалоцитов, основного вида клеток стекловидного тела, имеются лизосомы <sup>(10)</sup>, что подтвердило предположение о том, что гиалоциты стекловидного тела обладают фагоцитарной активностью <sup>(11)</sup>. Присутствие кислой фосфатазы было также обнаружено в фибробластах этой ткани <sup>(12)</sup>. В настоящей работе показано присутствие в стекловидном теле кислой фосфатазы, а также ДНКазы и РНКазы, что еще раз подтверждает наличие в стекловидном теле фагоцитарной активности. В этой ткани мы не обнаружили гликозидазной активности. Возможно, что в стекловидном теле в нормальных условиях гликозидазы малоактивны. Это обосновано тем, что гиалуроновая кислота — основной гликозамингликан стекловидного тела — должна находиться в высокополимерном состоянии. Большие молекулы гликозамингликанов оказывают стабилизирующее действие на коллагеновую сеть стекловидного тела, и любой фактор, уменьшающий размер молекул гликозамингликанов, может повлиять на стабильность геля и вызвать разжижение стекловидного тела. Кроме того, от размера молекул гликозамингликанов зависит состояние барьера сетчатки — стекловидное тело <sup>(13)</sup>.

Гидролитические ферменты цилиарного тела, камерной влаги и стекловидного тела чувствительны к действию кортикостероидов <sup>(14)</sup>. Весьма вероятно, что многие деструктивные процессы в тканях глаза связаны с нарушением регуляции функции лизосом. Поэтому представляется важным изучение действия различных повреждающих глаз факторов, а также фармакологических агентов на гидролитические ферменты тканей гла-

за (ультрафиолетовое излучение, ультразвук, гипоксическое состояние, гипер- и гиповитаминозы, действие гормонов и многие другие).

Выражаем благодарность Я. Л. Караганову за выполнение электронных микрофотографий.

Московский научно-исследовательский  
институт глазных болезней им. Гельмгольца

Поступило  
26 X 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> G. Weissmann, In: A Symposium on the Interaction of Drugs and Subcellular Components in Animal Cells, 1968, p. 203. <sup>2</sup> R. von Nilius, Wien, Zs. Med. ihre Grenzgeb., 51, 572 (1970). <sup>3</sup> A. A. Swanson, Exp. Eye Res., 5, 145 (1966). <sup>4</sup> A. A. Swanson, Joe Jeter, K. W. Raley, Exp. Eye Res., 6, 35 (1967). <sup>5</sup> E. M. Burden, H. W. Reading, C. M. Yates, Exp. Eye Res., 11, 140 (1971). <sup>6</sup> E. M. Burden, C. M. Yates et al., Exp. Eye Res., 12, 159 (1971). <sup>7</sup> Б. С. Касавина, П. В. Сергеев, Н. Б. Чеснокова, ДАН, 204, 1479 (1972). <sup>8</sup> Б. С. Касавина, П. В. Сергеев, Н. Б. Чеснокова, Бюлл. эксп. биол., 9, 47 (1972). <sup>9</sup> J. T. Dingle, In: Lysosomex in Biology and Pathology, 2, ch. 14, 421 (1969). <sup>10</sup> M. I. Freeman, B. Jacobson et al., Exp. Eye Res., 7, 113 (1968). <sup>11</sup> E. A. Balazs, L. Z. Toth et al., Exp. Eye Res., 3, 57 (1964). <sup>12</sup> J. François, R. Wainstein, Ophthalmologica, 157, 231 (1969). <sup>13</sup> E. A. Balazs, In: The Amino Sugars, 2A, 401 (1965). <sup>14</sup> B. S. Kasavina, N. B. Chesnokova, Abstr. Commun. Meet. Federat. Europ. Biochem. Soc., 8, 892 (1972).