

УДК 577.15./152+576.311

БИОХИМИЯ

Действительный член АМН СССР А. А. ПОКРОВСКИЙ,  
Л. В. КРАВЧЕНКО, В. А. ТУТЕЛЬЯН, П. П. ДОРОНИН

### ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЛИЗОСОМ

Лизосомам в настоящее время отводят большую роль в жизнедеятельности клетки, в частности, считают, что они осуществляют функции внутреклеточной пищеварительной системы (¹, ²). В отличие от других клеточных органелл, лизосомы характеризуются выраженной морфологической гетерогенностью, которая является следствием их активного функционирования (³-⁵). В то же время вопрос о том, являются ли лизосомы одного и того же органа однотипными с точки зрения энзиматической конституции, до сих пор не получил ни положительного, ни отрицательного ответа.

Наша предыдущие исследования показали определенную вариабильность ферментных спектров лизосом в зависимости от функционального состояния организма (⁶-⁸). В частности, при полном голодании крыс или в условиях белковой недостаточности наблюдалось избирательное и неоднозначное изменение активности отдельных ферментов лизосом печени (⁶, ⁷). Целью настоящей работы была попытка разделения лизосом печени крыс по плотности и исследование их ферментных спектров.

Исследование проводили на крысах-самцах линии Бистар весом около 250 г. Животные содержались на полноценном общеварварном рационе, рекомендованном Институтом питания Академии наук медицинских наук СССР. За 12 час. до забоя животных лишали пищи. Крыс забивали декапитацией, печень извлекали, тщательно промывали охлажденным физиологическим раствором, измельчали путем продавливания через перфорированную металлическую пластинку с диаметром отверстий 1 мм и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера — Эльвейема с тefлоновым пестиком (зазор 0,21 мм) в течение 90 сек. при 1200 об/мин. В качестве супспенцирующей среды использовали 0,25 M раствор сахарозы (pН 7,4), содержащий 1 mM ЭДТА.

Начальный этап фракционирования проводили по методу де Дюва и др. (⁹). Фракцию частиц осаждаемых между 33 000 g·мин. и 250 000 g·мин (лизосомальная фракция), дважды промывали в 0,25 M раствора сахарозы и полученный осадок ресуспендировали в 0,66 M растворе сахарозы. Копечная супспензия содержала в 1 м:1 частицы из 2 г сырой ткани печени.

Дальнейшее разделение лизосомальной фракции проводили с помощью равновесного центрифугирования в линейном градиенте плотности сахарозы (0,66 — 2,0 M), приготовленным по методу Сало и Коунса (¹⁰) для пробирок объемом 5 мл. Супспензию наслаживали на градиент из расчета 0,24 г сырой ткани печени на 1 мл конечного раствора и центрифугировали (препартивная ультрацентрифуга, модель УЦП-3, СКБ БФА, Москва; бакет-ротор 3 × 5 мл) в течение 120 мин. при 100 000 g. После центрифугирования содержимое пробирок вытесняли 2,2 M раствором сахарозы с помощью перистальтического микронасоса по методу Лейтона и др. (¹¹) и пробы объемом 220 мл собирали на фракционном коллекторе (21 фракция). Оставшийся осадок ресуспендировали в 0,5 мл 0,25 M раствора сахарозы.

В гомогенатах, исходной лизосомальной супспензии и полученных фракциях после предварительной обработки нейонным детергентом тритоном X-100 (конечная концентрация 0,1%) определяли активность 7 лизосо-

мальных ферментов: кислой ДНКазы (КФ 3.1.4.5), кислой РНКазы (КФ 2.7.7.16),  $\beta$ -глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31),  $\beta$ -галактозидазы (КФ 3.2.1.23),  $\beta$ -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21),  $\beta$ -ацетилглюкозаминидазы (КФ 3.2.1.30) и арилсульфатаз А и В (КФ 3.1.6.1), а также содержание белка.

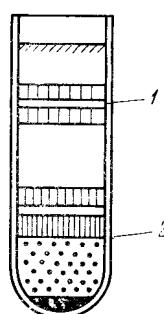


Рис. 1. Схема распределения субклеточных структур в непрерывном градиенте плотности сахарозы. 1 — «легкие» лизосомы,  $\rho = 1,13$ ; 2 — «тяжелые» лизосомы,  $\rho = 1,24$

гировали в течение 30 мин. при 100 000  $g$ . Полученные осадки фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида в течение 1 часа, промывали фосфатным буфером (рН 7,4) и дофиксировали в 1% растворе  $\text{OsO}_4$ . Дегидратацию проводили в возрастающем ацетоновом ряду, после чего материал заливали в дуркулан. Ультратонкие срезы дополнительно контрастировали уранилацетатом и исследовали в электронном микроскопе ЛЕМ-7А.

Характер распределения субклеточных структур в линейном градиенте плотности сахарозы представлены на рис. 1.

При исследовании активности лизосомальных ферментов в полученных после центрифугирования фракциях (рис. 2) прежде всего обращает внимание выраженная неравномерность их распределения в градиенте плотности сахарозы. При этом почти для каждого фермента можно выделить два пика активности — с максимумом в 4—8-й и 16—20-й фракциях, что соответствует средней плавучей плотности  $\rho = 1,13$  и  $\rho = 1,24$ .

Наиболее интересным фактом, по-видимому, является обнаруженная в этих экспериментах значительная энзиматическая гетерогенность двух указанных типов лизосом. Действительно, «легкая» лизосомальная фракция ( $\rho = 1,13$ ) по сравнению с «тяжелой» ( $\rho = 1,24$ ) характеризуется значительно более высокой удельной активностью кислой ДНКазы (61,2  $\mu\text{моль}/\text{мин}$  на 1 г белка, против 31,9), кислой РНКазы (87,2 против 30,2) и  $\beta$ -галактозидазы (6,41 против 3,51). Активность  $\beta$ -глюкуронидазы, наоборот, в 2 раза выше в «тяжелой» лизосомальной фракции (39,8 против 17,4), а активность  $\beta$ -ацетилглюкозаминидазы и арилсульфатаз А и В распределена более равномерно между обеими фракциями лизосом (соответственно 52,5 и 47,4 — для «легкой» фракции и 65,2 и 50,2 — для «тяжелой»). Особого интереса заслуживает факт практически полного отсутствия  $\beta$ -глюкозидазной активности в «легкой» лизосомальной фракции, в то время как удельная активность этого фермента в «тяжелой» фракции достигает 7,79  $\mu\text{моль}/\text{мин}$  на 1 г белка.

Энзиматический контроль показал высокую степень чистоты обеих лизосомальных фракций. Как видно из табл. 1, в «легкой» фракции лизосом обнаружена лишь следовая активность цитохромоксидазы и глюкозо-6-фосфатазы, а в «тяжелой» фракции — менее 1% исходной активности этих маркерных ферментов. Наиболее высокий уровень активности глюкозо-6-

Для контроля степени чистоты полученных фракций определяли активность маркерных ферментов митохондрий — цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1.) и микросомглюкозо-6-фосфатазы (КФ 3.1.3.9).

Активность ферментов и содержание белка определяли спектрофотометрическими микрометодами, основанными на применении ультрамикросистемы биохимического анализа, разработанной А. А. Покровским и сотрудниками (12, 13).

Активность ферментов выражали в микромолях субстрата, превращенного в 1 мин. на 1 г белка фракции.

Для контроля линейности градиента во фракциях определяли концентрацию сахарозы, используя для этого рефрактометрический метод.

Для электронномикроскопического исследования отдельные фракции (1—3; 4—8; 10—14; 15—20 и осадок) суммировали, разводили 0,25 M раствором сахарозы до объема 5 мл и центрифутируя в течение 30 мин. при 100 000  $g$ . Полученные осадки фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида в течение 1 часа, промывали фосфатным буфером (рН 7,4) и дофиксировали в 1% растворе  $\text{OsO}_4$ . Дегидратацию проводили в возрастающем ацетоновом ряду, после чего материал заливали в дуркулан. Ультратонкие срезы дополнительно контрастировали уранилацетатом и исследовали в электронном микроскопе ЛЕМ-7А.

Характер распределения субклеточных структур в линейном градиенте плотности сахарозы представлены на рис. 1.

При исследовании активности лизосомальных ферментов в полученных после центрифугирования фракциях (рис. 2) прежде всего обращает внимание выраженная неравномерность их распределения в градиенте плотности сахарозы. При этом почти для каждого фермента можно выделить два пика активности — с максимумом в 4—8-й и 16—20-й фракциях, что соответствует средней плавучей плотности  $\rho = 1,13$  и  $\rho = 1,24$ .

Наиболее интересным фактом, по-видимому, является обнаруженная в этих экспериментах значительная энзиматическая гетерогенность двух указанных типов лизосом. Действительно, «легкая» лизосомальная фракция ( $\rho = 1,13$ ) по сравнению с «тяжелой» ( $\rho = 1,24$ ) характеризуется значительно более высокой удельной активностью кислой ДНКазы (61,2  $\mu\text{моль}/\text{мин}$  на 1 г белка, против 31,9), кислой РНКазы (87,2 против 30,2) и  $\beta$ -галактозидазы (6,41 против 3,51). Активность  $\beta$ -глюкуронидазы, наоборот, в 2 раза выше в «тяжелой» лизосомальной фракции (39,8 против 17,4), а активность  $\beta$ -ацетилглюкозаминидазы и арилсульфатаз А и В распределена более равномерно между обеими фракциями лизосом (соответственно 52,5 и 47,4 — для «легкой» фракции и 65,2 и 50,2 — для «тяжелой»). Особого интереса заслуживает факт практически полного отсутствия  $\beta$ -глюкозидазной активности в «легкой» лизосомальной фракции, в то время как удельная активность этого фермента в «тяжелой» фракции достигает 7,79  $\mu\text{моль}/\text{мин}$  на 1 г белка.

Энзиматический контроль показал высокую степень чистоты обеих лизосомальных фракций. Как видно из табл. 1, в «легкой» фракции лизосом обнаружена лишь следовая активность цитохромоксидазы и глюкозо-6-фосфатазы, а в «тяжелой» фракции — менее 1% исходной активности этих маркерных ферментов. Наиболее высокий уровень активности глюкозо-6-

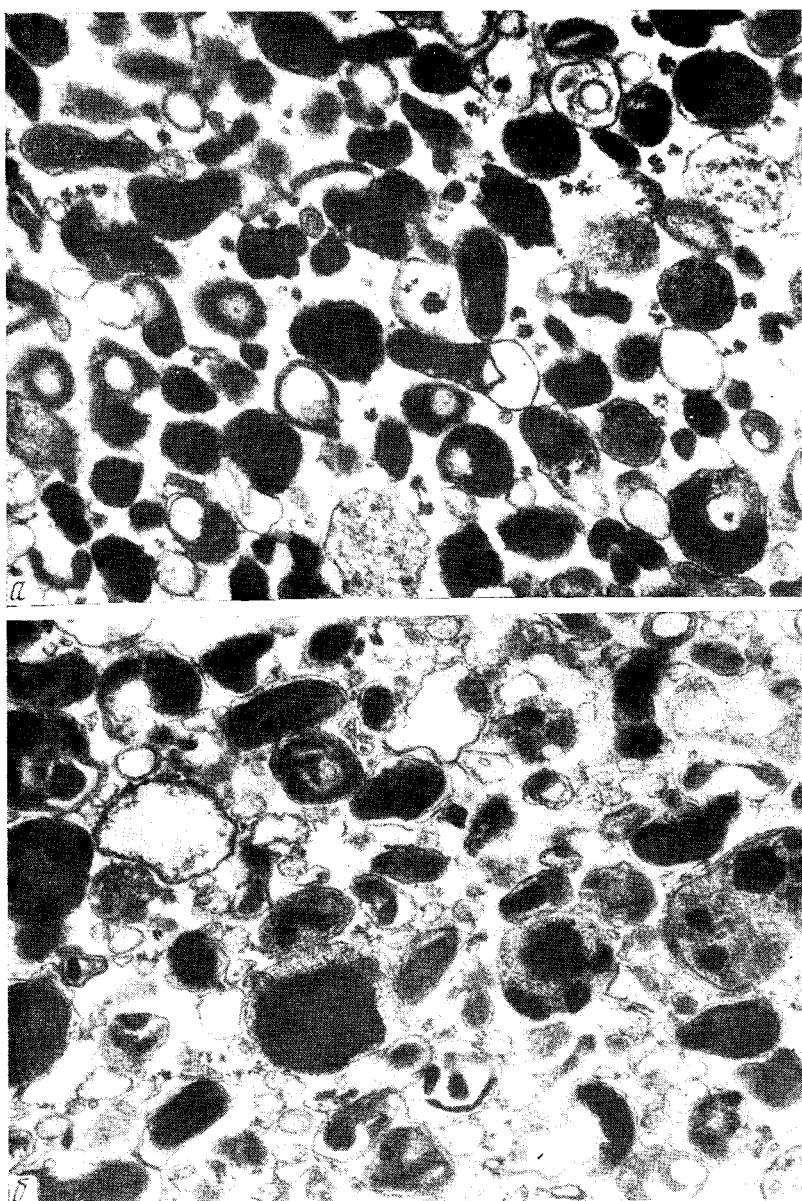


Рис. 3. «Легкая» (а) и «тяжелая» (б) фракции лизосом печени крыс.  
41 000 ×

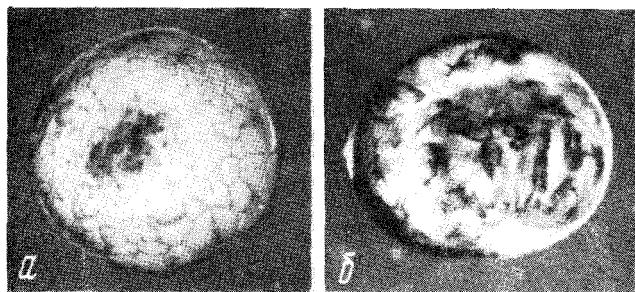


Рис. 1. Оперированные яйцеклетки севрюги, дробящиеся после оплодотворения. *а* — типично, *б* — атипично

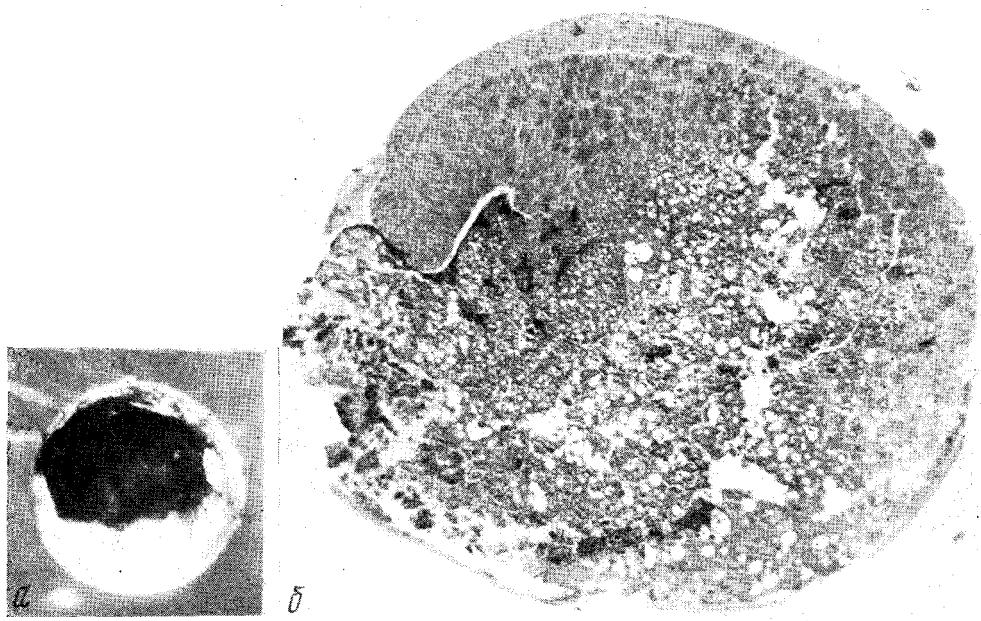


Рис. 2. Оперированный зародыш, стадия средней гаструлы. *а* — общий вид, *б* — гистологический срез, видна губа бластопора

фосфатазы определялся в 10 — 14-й фракциях, связанных с частицами, занимающими в градиенте плотности промежуточное положение между «легкими» и «тяжелыми» лизосомами. Обнаружение некоторой активности как гидролитических лизосомальных ферментов, так и цитохромоксидазы и глюкозо-6-фосфатазы в первых трех фракциях связано, по-видимому, с солюбилизированными ферментами, вышедшими из структур, поврежденных в процессе разделения.

Таким образом, в процессе равновесного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы удалось разделить лизосомы печени крыс на две

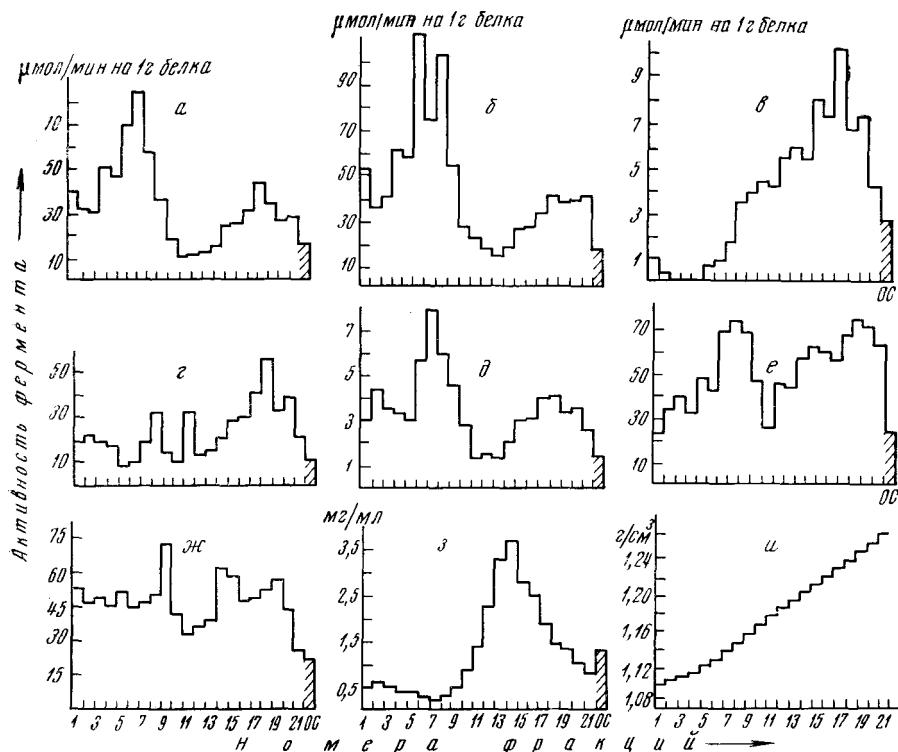


Рис. 2. Распределение активности лизосомальных ферментов и белка в непрерывном градиенте плотности сахарозы. *а* — кислая ДНКаза, *б* — кислая РНКаза, *в* —  $\beta$ -глюкозидаза, *г* —  $\beta$ -глюкуронидаза, *д* —  $\beta$ -галактозидаза, *е* —  $\beta$ -ацетилглюкозаминидаза, *ж* — арилсульфатазы А и В, *з* — белок, *и* — градиент плотности сахарозы; *ос* — осадок

фракции — «легкую» ( $\rho = 1,13$ ) и «тяжелую» ( $\rho = 1,24$ ). В результате детального исследования ферментных спектров полученных лизосомальных фракций была выявлена их определенная энзиматическая гетерогенность: один тип лизосом, обладающий меньшей плавучей плотностью (1,13), отличался высокой активностью обеих нуклеаз,  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -ацетилглюкозаминидазы, арилсульфатаз А и В и полным отсутствием  $\beta$ -глюкозидазной активности; другой тип лизосом, с большей плавучей плотностью (1,24), характеризовался высокой активностью  $\beta$ -глюкозидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы,  $\beta$ -ацетилглюкозаминидазы и арилсульфатаз А и В.

Электронномикроскопическое исследование 4 — 8-й и 16 — 20-й фракций подтвердило, что они представляют собой высоко очищенные лизосомы (рис. 3). «Легкая» фракция ( $\rho = 1,13$ ) состояла из однородных осмифильных структур круглой или овальной формы, окруженных единичной мембраной, диаметром 0,4—0,6  $\mu$ . Внутреннее содержимое — гомогенное и почти сливается с наружной мембраной.

Таблица 1

Энзиматическая характеристика степени чистоты  
выделенных лизосомальных фракций (средние для 5 опытов)

Фракции	Белок		Кислая РНКаза		Цитохромоксидаза		Глюкозо-6-фосфатаза	
	мг	% *	μ мол/мин на 1 г белка	% *	μ мол/мин на 1 г белка	% *	μ мол/мин на 1 г белка	% *
А. Гомогенат	284,40	100,00	2,9	100,00	123,0	100,00	58,5	100,00
Б. Исходная фракция лизосом	8,88	3,11	22,8	23,4	144,0	3,65	18,1	0,98
В. «Легкая» фракция лизосом, $\rho = 1,43$	0,29	0,10	87,2	1,8	20,5	0,02	0,5	0,01
Г. «Тяжелая» фракция лизосом, $\rho = 1,24$	1,61	0,57	30,2	6,0	116,8	0,49	53,3	0,52
Б/А	—	—	7,9	—	1,2	—	0,3	—
В/А	—	—	30,4	—	0,17	—	0,008	—
Г/А	—	—	10,5	—	0,94	—	0,91	—

\* Отношение общей активности фермента во фракции к общей активности фермента в гомогенате.

«Тяжелая» фракция ( $\rho = 1,24$ ) была более гетерогенной; диаметр частиц колебался от 0,4 до 1,5  $\mu$ , внутреннее содержимое состояло из различных по плотности участков, а переход от внутренних структур к наружной мембране был более резко выраженным. Обнаружена незначительная примесь микросом, представленных в основном участками гладкого эндоплазматического ретикулума.

10—14 фракции состояли из мембран гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, что согласуется с данными энзиматического анализа. В первых 3 фракциях выявлено лишь незначительное количество структурных элементов: отдельные, частично поврежденные, лизосомы, мембранны шероховатого эндоплазматического ретикулума. Осадок содержал обрывки митохондрий, лизосомы, главным образом вторичные, большое количество гликогена и кристаллоиды неясной природы.

Таким образом, найденные нами различия в седиментационных свойствах лизосом получили определенные доказательства и при электронномикроскопическом исследовании. Основываясь на морфологической характеристике обоих типов лизосом, можно предположить, что «легкая» фракция лизосом представлена преимущественно первичными лизосомами, а «тяжелая» фракция — вторичными лизосомами, участвующими уже в процессе внутриклеточного переваривания экзогенного и эндогенного материала.

Институт питания  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
25 I 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> C. de Duve, R. Wattiaux, Ann. Rev. Physiol., **28**, 435 (1966). <sup>2</sup> A. A. Покровский, В. А. Тутельян, Усп. совр. биол., **68**, 318 (1969). <sup>3</sup> E. Essner, A. B. Novikoff, J. Biophys. and Biochem. Cytol., **9**, 773 (1961). <sup>4</sup> W. Straus, J. Histochem. Cytochem., **15**, 375 (1967). <sup>5</sup> C. de Duve, Acta cient. venez., Caracas, **22**, Suppl., 55 (1971). <sup>6</sup> A. A. Покровский, Г. К. Пятницкая, В кн. Значение лизосом в физиологических и патологических процессах, М., 1968, стр. 30. <sup>7</sup> A. A. Покровский, В. А. Тутельян, Биохимия, **33**, 809 (1968). <sup>8</sup> A. A. Покровский, Л. В. Кравченко, В. А. Тутельян, ДАН, **192**, 1170 (1970). <sup>9</sup> C. de Duve, B. Pressman et al., Biochem. J., **60**, 604 (1955). <sup>10</sup> T. Salo, D. M. Kouns, Anal. Biochem., **13**, 74 (1965). <sup>11</sup> F. Leighton, B. Roole et al., J. Cell Biol., **37**, 482 (1968). <sup>12</sup> A. A. Покровский, В кн.: Химические основы процессов жизнедеятельности, М., 1962, стр. 311. <sup>13</sup> A. A. Покровский, Л. В. Кравченко, В. А. Тутельян, Биохимия, **36**, 690 (1971).