

Действительный член АМН СССР А. А. ПОКРОВСКИЙ, Л. П. КРЫСТЕВ,
В. А. ТУТЕЛЬЯН, Ж. К. БОЯДЖИЕВА, Л. В. КРАВЧЕНКО

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИЛИЗОСОМАЛЬНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ

Исследование ферментной организации лизосом — субклеточных структур, ответственных за процессы внутриклеточного пищеварения, является одним из наиболее важных направлений в расшифровке механизма их функционирования. В настоящее время в лизосомах обнаружено более 50 гидролитических ферментов, однако их внутрилизосомальная организация изучена мало (¹⁻³). Несмотря на то что кислая фосфатаза является первым из лизосомальных ферментов, для которого был разработан электронно-микроскопический метод выявления активности и опубликованы многочисленные работы, посвященные изучению ее локализации в различных тканях и клетках, вопрос о ее внутрилизосомальной организации нельзя считать окончательно решенным (^{2, 4-6}).

В наших предыдущих исследованиях с помощью биохимических и электрофоретических методов были получены первые доказательства специфической локализации отдельных молекулярных форм кислой фосфатазы в мембранах и матриксе лизосом (⁷).

Целью настоящей работы явилась попытка изучения тонкой ультраструктурной локализации и поведения кислой фосфатазы в лизосомальных мембранах в ходе функционирования этих органелл (в процессе трансформации первичных лизосом во вторичные) в печени крыс с помощью электронно-микроскопических методов.

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар весом около 250 г. Животные содержались на полноценном общевиварном рационе. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. За 12 час. до забоя крыс лишали пищи.

Животных забивали декапитацией, печень извлекали, участок правой доли брали для морфологических исследований, остальную часть тщательно промывали в охлажденном физиологическом растворе и измельчали путем продавливания через перфорированную металлическую пластинку с диаметром отверстий 1 мм. Гомогенаты печени приготавливали по принятому в лаборатории методу, используя в качестве суспендирующей среды 0,25 *M* раствор сахарозы, содержащий 0,001 *M* ЭДТА (⁸). Фракционирование гомогенатов проводили с помощью дифференциального центрифугирования по методу Де Дюва и др. (⁹), а дальнейшее разделение лизосом на субфракции — с помощью равновесного центрифугирования в липейном градиенте плотности сахарозы по методу Покровского и др. (¹⁰).

Для электронно-микроскопического исследования кусочки печени и полученные осадки «легкой» и «тяжелой» субфракций лизосом фиксировали в 3% растворе глутаральдегида, промывали в какодилатном буфере (рН 7,2) и дофиксировали в OsO₄ (¹¹). Дегидратацию проводили в возрастающем спиртовом ряду, после чего материал заливали в эпон. Выявление активности кислой фосфатазы осуществляли с помощью реакции Гомори (¹²) по методу Хольта (^{4, 13}). Часть ультратонких срезов дополнительно контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Исследования проводили в электронных микроскопах Hitachi-11 и JEM-100.

При исследовании ультраструктурной локализации активности кислой фосфатазы в первичных лизосомах как в ткани *in situ*, так и в «легкой» субфракции лизосом обращает на себя внимание то, что продукты реакции на кислую фосфатазу локализуются как в матриксе лизосом, так и в мембранах (рис. 1). При этом продукты ферментативной реакции определялись либо в виде отдельных зерен (рис. 1а), либо в виде сплошных полей (рис. 1б, в). В отдельных случаях активность кислой фосфатазы выявлялась преимущественно в мембранах лизосом (рис. 1г).

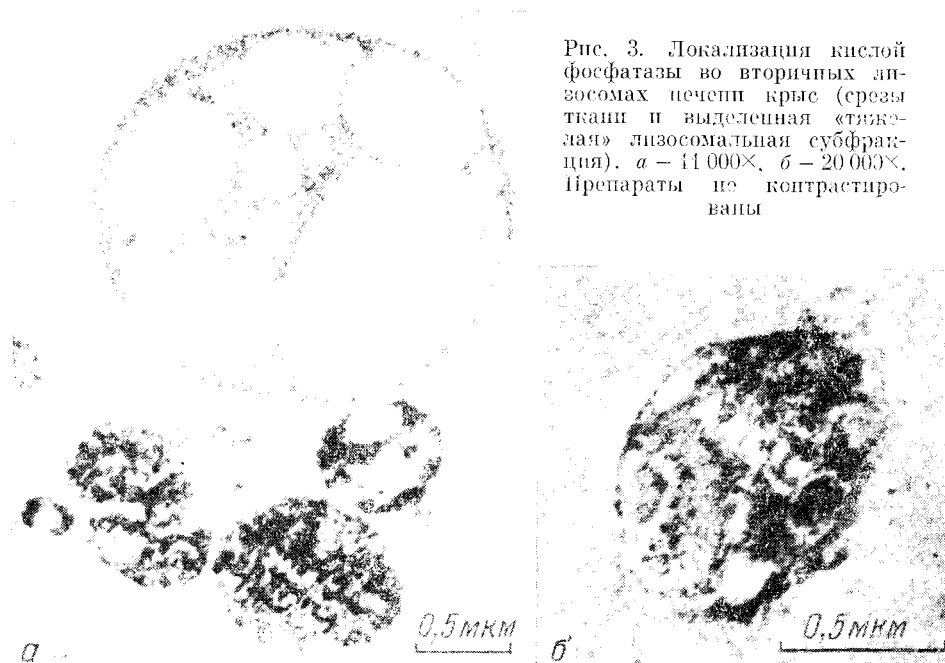


Рис. 3. Локализация кислой фосфатазы во вторичных лизосомах печени крысы (срезы ткани и выделенная «тяжелая» лизосомальная субфракция). а — 11 000 \times , б — 20 000 \times . Препараты не контрастированы

На рис. 2 зафиксирован момент слияния лизосом. Начальный этап этого процесса характеризуется контактом двух мембран (рис. 2а), более поздняя стадия — слиянием мембран и объединением матрикса (рис. 2б). Мы имели возможность многократно наблюдать, что в момент контакта мембран лизосом происходит выраженная активация мембраносвязанного компонента кислой фосфатазы (рис. 2в). Создается впечатление, что это усиление активности характерно для реакции взаимодействия лизосомальных мембран и что активация мембраносвязанной кислой фосфатазы является необходимым или часто сопровождающим процесс аутофагии моментом.

Дополнительные данные, указывающие на возможное участие лизосомальных мембран в процессе образования вторичных лизосом, представлены на рис. 3. При исследовании ультраструктурной локализации активности кислой фосфатазы во вторичных лизосомах как в ткани *in situ*, так и в

Рис. 1. Локализация кислой фосфатазы в первичных лизосомах печени крысы (срезы ткани и выделенная «легкая» лизосомальная субфракция). а — 20 000 \times , б, в — 30 000 \times , г — 10 000 \times . а, б, в — препараты не контрастированы; г — контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца

Рис. 2. Этапы слияния лизосом (реакция на кислую фосфатазу). а — контакт мембран лизосом, 20 000 \times ; б — слияние мембран лизосом и объединение матрикса, 11 000 \times ; в — активация мембраносвязанной кислой фосфатазы в момент контакта мембран лизосом, 20 000 \times . Препараты не контрастированы

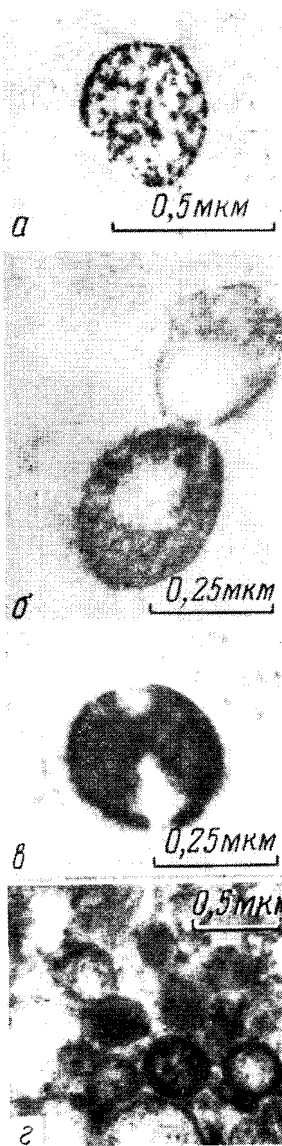


Рис. 1

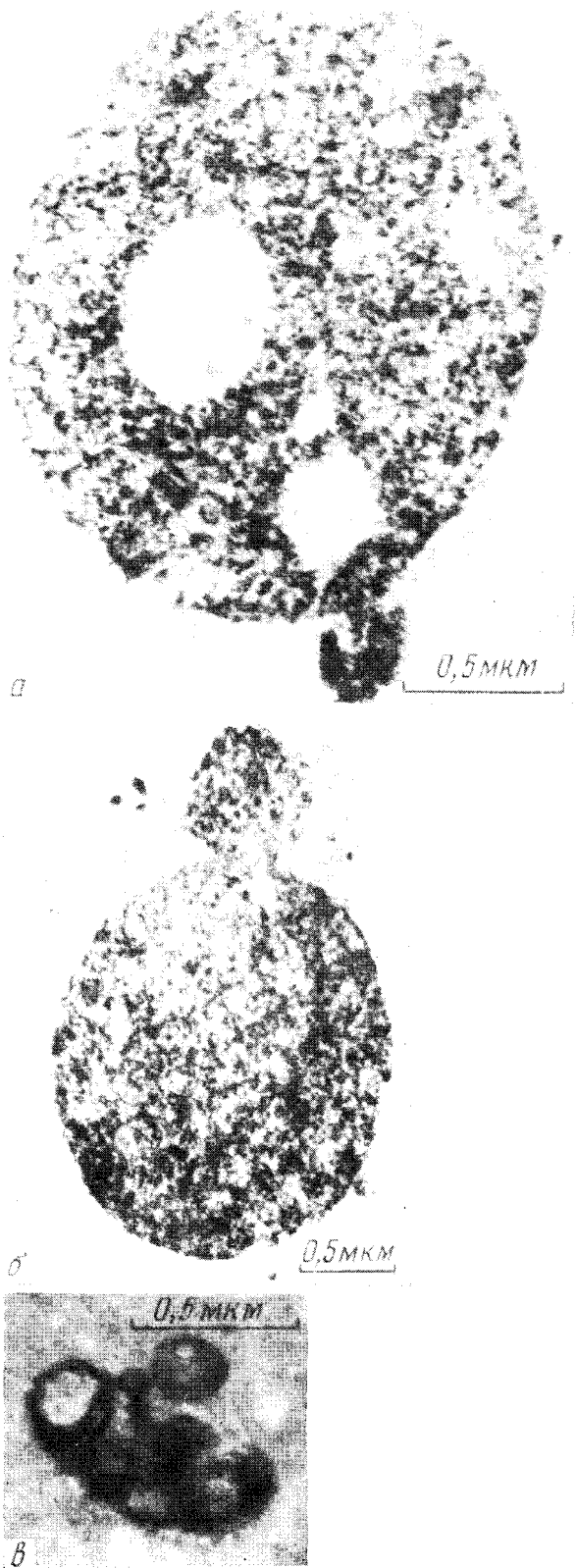


Рис. 2

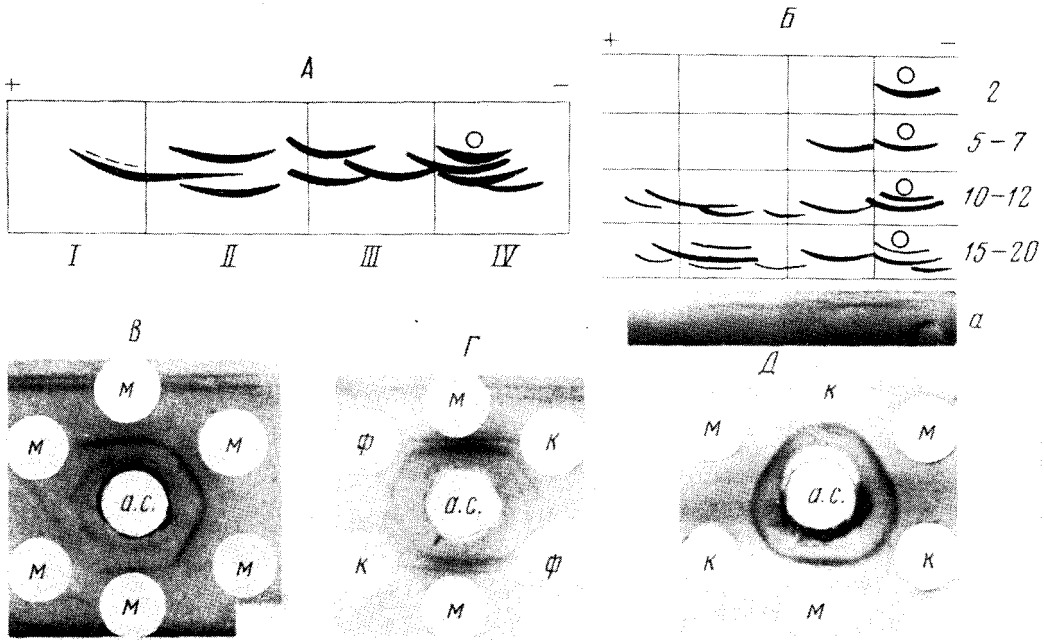


Рис. 1. А — иммуноэлектрофорез 6% экстракта мозга взрослой крысы: I — зона преальбуминов, II — альбуминов, III — α, β -глобулинов, IV — γ -глобулинов. Б — формирование общего антигенного спектра в культуре ткани эпителии амниона; цифры справа — сроки культивирования в днях; а — фотография. В — определение титра антисыворотки (а.с. — антисыворотка, м — экстракт мозга в убывающих концентрациях). Г — сравнение антигенов целого мозга и культуры нервной ткани (а.с. — антисыворотка, м — экстракт мозга, к — экстракт к.т., ϕ — физиологический раствор). Д — идентификация мозгоспецифического антигена S-100 в к.т. (м — 2% экстракт мозга, к — экстракт культуры ткани)

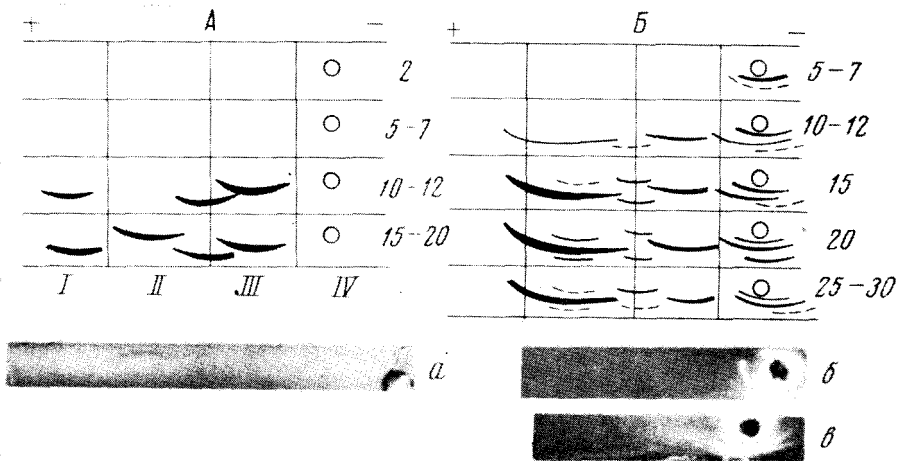


Рис. 2. А — становление мозгоспецифического антигенного спектра в к.т.; а — 15–20 дней в культуре; Б — результаты иммуноавтордиографии; б — иммуноавтордиограф к.т. 5–7-дневного срока культивирования, в — 10–12-дневного срока. С¹²⁵-гидролизат. Обозначения те же, что и на рис. 1

«тяжелой» субфракции лизосом обнаружено, что кислая фосфатаза локализуется как в матриксе, между отдельными включениями, так и в самой мембране аутофагической вакуоли (цитосегресомы) (рис. 3а). На более поздних этапах (в цитосомах) продукты реакции на кислую фосфатазу были рассеяны по всему лизосомальному матриксу и продолжали выявляться в мембранах (рис. 3б). В конечной стадии (остаточные тельца) активность кислой фосфатазы в матриксе практически отсутствовала, в то время как в мембранах выявлялись отдельные активные участки.

Таким образом, полученные данные указывают на локализацию активности кислой фосфатазы в матриксе и в мембранах лизосом. Результаты этих исследований коррелируют с данными биохимического изучения внутрилизосомальной локализации изоферментов кислой фосфатазы, показавшими специфичность распределения отдельных изоформ кислой фосфатазы между мембранами и матриксом лизосом (⁷).

Важно подчеркнуть, что выраженная активность кислой фосфатазы определяется в мембранах на всех стадиях развития лизосомального аппарата: от вновь образованных первичных лизосом до остаточных телец. Особого внимания заслуживает факт обнаружения активности кислой фосфатазы в мембранах цитосегреса, что является, по-видимому, достаточно убедительным доказательством участия мембран первичных лизосом (со структурированной в них кислой фосфатазой) в образовании мембран вторичных лизосом.

Что касается функционального значения обнаруженного систематического распределения активности кислой фосфатазы между мембранами и матриксом лизосом, то в настоящее время ответ на этот вопрос может быть лишь гипотетическим. Мы предполагаем, что мембраносвязанные ферменты лизосом участвуют в экстрализосомальном гидролитическом расщеплении биополимеров, в частности фрагментов субклеточных мембран (мембран фагосом, аутофагических вакуолей и др.), что, по-видимому, является необходимым условием для образования вторичных лизосом.

Институт питания
Академии медицинских наук СССР
Москва

Центр гигиены
Медицинской академии НРБ
София

Поступило
6 IX 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ *C. de Duve, R. Wattiaux, Ann. Rev. Physiol.*, v. 28, 435 (1966). ² *А. А. Покровский, В. А. Тугельян, Усп. совр. биол.*, т. 68, 318 (1969). ³ *A. J. Barret, In: Lysosomes a Laboratory Handbook, Amsterdam — London, 1972, p. 46.* ⁴ *S. J. Holt, R. M. Hicks, In: The Interpretation of Ultrastructure, London, 1962, p. 193.* ⁵ *F. Beck, J. B. Lloyd, C. A. Squier, In: Lysosomes a Laboratory Handbook, Amsterdam — London, 1972, p. 200.* ⁶ *Л. П. Крсьев, Лизозомы: структура, функция и патология, София, 1972.* ⁷ *А. А. Покровский, М. Я. Николаева и др., ДАН*, т. 213, 469 (1973). ⁸ *А. А. Покровский, Л. В. Кравченко, В. А. Тугельян, Биохимия*, т. 36, 690 (1971). ⁹ *C. de Duve, B. Pressman et al., Biochem. J.*, v. 60, 604 (1955). ¹⁰ *А. А. Покровский, Л. В. Кравченко и др., ДАН*, т. 205, 1483 (1972). ¹¹ *M. J. Karnovsky, J. Cell Biol.*, v. 27, 137A (1965). ¹² *G. Gomory, J. Cell. and Comp. Physiol.*, v. 17, 71 (1941). ¹³ *S. J. Holt, Exp. Cell. Res. Suppl.*, v. 7, 1 (1959).