

Б. С. КАСАВИНА, Т. В. УХИНА, Т. К. ДЕМИНА

ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ГЛИКОЗИДАЗЫ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КОРТИКОСТЕРОИДОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 II 1975)

Влияние кортикостероидов на проницаемость мембран клеточных структур⁽¹⁾, в частности лизосом, и изменение активности лизосомальных ферментов в тканях глаза⁽²⁾ является, возможно, одной из причин различных патологических состояний органа зрения. В последние годы в литературе стали появляться сообщения о лизосомальных ферментах в тканях глаза и о влиянии гормонов на их активность^(2-9, 12, 14). Однако механизм гормональной регуляции активности лизосомальных ферментов субклеточных фракций различных тканей глаза не изучен.

Целью настоящей работы явилось изучение внутриклеточного распределения активности гликозидаз в субклеточных фракциях склеры и роговицы при воздействии на ткани глаза кортикостероидов (гидрокортизона и дезоксикортикостеронацетата — ДОКСА).

Работа была проведена на 45 кроликах-самцах породы шиншилла. Исследовали общую, свободную и связанную активности β -галактозидазы и β -глюкозидазы, а также активность гиалуронидазы в гомогенатах и субклеточных фракциях (ядерной, митохондриальной, микросомальной и фракции цитозоля) склеры и роговицы. Опыты проводили *in vivo* и *in vitro*.

В опытах *in vivo* гормоны вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг веса, а в опытах *in vitro* — в инкубационную смесь в дозе 0,125 мг/мл.

Для получения гомогенатов и субклеточных фракций ткани гомогенизировали в 0,25 *M* сахарозе, приготовленной на трис-НСI-буфере с добавлением 0,001 *M* ЭДТА. Гомогенизацию проводили при помощи гомогенизатора типа Поттера с тефлоновым пестиком и микроизмельчителя тканей РТ-2. Гомогенат центрифугировали при 900 *g* в течение 15 мин. в центрифуге К-24. Осадок дважды промывали в сахарозе. Полученный осадок (ядерная фракция) регомогенизировали. Объединенные надосадочные фракции центрифугировали в той же центрифуге при 6000 *g* в течение 25 мин. Промытый осадок (фракция митохондрий) ресуспендировали в сахарозе. Объединенные надосадочные фракции центрифугировали при 105 000 *g* в течение одного часа в центрифуге VAK-601. Надосадочную жидкость осторожно отбирали (фракция цитозоля), а промытый осадок (микросомальная фракция) ресуспендировали в сахарозе. Все перечисленные операции проводили при 4°. Методы определения активности ферментов описаны в предыдущей работе⁽⁹⁾.

Влияние гормонов на активность гликозидаз склеры и роговицы нормальных глаз кролика исследовали через 1, 4 и 24 часа после гормонального воздействия. Оказалось, что уже через 1 час после внутривенного введения гормона наблюдаются значительные изменения активности всех исследуемых ферментов. Эти сдвиги лишь незначительно увеличиваются через 4 часа и активность ферментов приходит к первоначальному уровню через 24 часа. Исходя из этого, активность гликозидаз в субклеточных фракциях определяли через 1 час после гормонального воздействия.

В табл. 1 приведены данные по изучению активности исследуемых ферментов в гомогенатах склеры и роговицы. Оказалось, что общая и сво-

Таблица 1

Активность лизосомальных гликозидаз в склере и роговице в норме и при воздействии кортикостероидов (мкмол/мин на 1 г белка)

Фермент	Контроль	Гидрокортизон	ДОКСА
Склера			
β -Галактозидаза общая	2,4 \pm 0,03	1,3 \pm 0,01	1,19 \pm 0,005
β -Глюкозидаза общая	0,98 \pm 0,01	0,47 \pm 0,001	0,6 \pm 0,01
свободная	0,3 \pm 0,005	0,29 \pm 0,001	0,25 \pm 0,09
связанная	0,65 \pm 0,04	0,12 \pm 0,001	0,34 \pm 0,001
свободная/общая, %	31	56,3	42
Гиалуронидаза	11,7 \pm 0,1	26,8 \pm 1,5	20,13 \pm 10,5
Роговица			
β -Галактозидаза общая	0,79 \pm 0,09	0,42 \pm 0,1	0,36 \pm 0,001
свободная	0,72 \pm 0,01	0,3 \pm 0,1	0,34 \pm 0,01
связанная	0,07 \pm 0,001	0,15 \pm 0,1	0,03 \pm 0,001
свободная/общая, %	90	71,4	94
β -Глюкозидаза общая	0,68 \pm 0,01	0,32 \pm 0,1	0,36 \pm 0,001
свободная	0,4 \pm 0,05	0,14 \pm 0,001	0,22 \pm 0,001
связанная	0,29 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	0,12 \pm 0,002
свободная/общая, %	59	45	61
Гиалуронидаза	38,2 \pm 9,4	16,2 \pm 0,8	16,16 \pm 0,12

Примечание. В таблице даны средние из результатов 6—8 опытов.

Таблица 2

Распределение лизосомальных гликозидаз в субклеточных фракциях роговицы и склеры в норме и при воздействии кортикостероидов (в % от активности фермента в гомогенате)

Фракции	Роговица			Склера		
	β -галактозидаза	β -глюкозидаза	гиалуронидаза	β -галактозидаза	β -глюкозидаза	гиалуронидаза
Контроль						
Ядерная	5,1	8,9	6,0	5,0	4,1	2,3
Митохондриальная	53,2	61,7	61,6	54,1	54,1	58,5
Микросомальная	26,6	20,6	25,1	25,0	26,5	25,7
Цитозоль	15,2	10,3	9,2	16,7	15,3	13,2
Гидрокортизон						
Ядерная	9,5	9,4	4,0	6,2	6,3	17,9
Митохондриальная	45,9	56,2	63,6	53,9	51,1	41,8
Микросомальная	28,6	21,9	32,1	26,8	21,2	13,8
Цитозоль	11,9	9,4	7,4	23,1	19,2	41,7
ДОКСА						
Ядерная	8,3	11,1	20,9	6,7	4,1	35,3
Митохондриальная	52,9	55,6	48,8	46,7	58,8	33,8
Микросомальная	19,4	19,4	17,9	27,5	30,0	17,7
Цитозоль	22,2	19,4	11,7	20,4	15,0	13,9

бодная активность β -галактозидазы склеры имеют однозначную величину, поэтому в таблице приводятся значения только общей активности фермента. Это может свидетельствовать либо о нахождении всего фермента в свободном, не связанном с мембранами состоянии, либо о том, что в склере находится изоформа β -галактозидазы, связанная активностью которой не определяется данным методом. Из литературы известно, что этот фермент имеет, по одним данным, 2 изоформы ⁽¹⁰⁾, а по другим — 4 изоформы ⁽¹¹⁾. Как видно из табл. 2, в которой приведены данные о распределении ферментов в субклеточных фракциях исследуемых тканей глаза, основная часть (53—62%) активности гликозидаз в норме сосредоточена в митохондриальной фракции, где сосаждается, как известно, большая часть клеточных лизосом; около 25% активности ферментов находится во фракции микросом. Полученные нами данные по субклеточному распределению активностей этих ферментов в склере и роговице весьма близки к распределению их в цилиарном теле ⁽¹²⁾.

Из табл. 2 видно, что выход исследуемых ферментов в цитозоль различен, что показано и для цилиарного тела ⁽¹²⁾. Этот факт свидетельствует о разной прочности связи данных ферментов с мембранами лизосом. Введение гидрокортизона (табл. 1, 2) вызывает в роговице снижение общей активности всех исследуемых гликозидаз, уменьшение выхода ферментов в цитозоль и уменьшение процента свободной активности от общей β -галактозидазы и β -глюкозидазы, т. е. увеличение латентной, связанной с мембранами, формы этих ферментов. Все это свидетельствует о стабилизирующем действии гидрокортизона на мембраны лизосом роговицы и о повышении прочности связи ферментов с мембранами, препятствующей фермент-субстратному контакту. В склере, в отличие от роговицы, активность гиалуронидазы в гомогенате и ядерной фракции увеличивается (табл. 1, 2), возрастает выход гиалуронидазы и β -галактозидазы в цитозоль. Увеличение выхода гиалуронидазы в цитозоль можно объяснить либо проникновением фермента из сыворотки крови, как в случае действия гидрокортизона на цилиарное тело ⁽¹⁴⁾, либо особым влиянием этого гормона на мембраны склеры. Известно, что ДОКСА на лизосомальную мембрану действует противоположно гидрокортизону. Действительно, в гомогенате склеры и роговицы ДОКСА, как и гидрокортизон, снижает активность всех исследуемых ферментов, кроме гиалуронидазы склеры (табл. 1). Однако ДОКСА вызывает не уменьшение выхода ферментов в цитозоль и увеличение латентной формы, а, наоборот, увеличение активности ферментов в цитозоле, уменьшение в митохондриальной и микросомальной фракциях и некоторое увеличение процента свободной активности от общей как в склере, так и в роговице. Это свидетельствует о лабилизирующем действии ДОКСА на мембраны лизосом склеры и роговицы. Однако действие ДОКСА на активность гиалуронидазы как в гомогенате, так и в субклеточных фракциях склеры сходно с влиянием гидрокортизона, что подтверждает наше представление об отличительной особенности склеры. Проведенные опыты *in vitro* в основном подтвердили данные, полученные в опытах *in vivo*.

В результате проведенного исследования установлено, что большая часть активности всех изученных гликозидаз находится в митохондриальной фракции склеры и роговицы, где сосаждается основная часть лизосом этих тканей, что подтверждает лизосомальную природу данных ферментов. Выявлено сходство и различие между склерой и роговицей во влиянии кортикостероидов на гидролитические ферменты лизосом этих тканей. Сравнивая полученные нами данные с известными в литературе о влиянии гидрокортизона на другие ткани глаза в отношении исследованных нами ферментов ^(13, 14), можно высказать предположение об особом влиянии этого гормона на склеру и об особой чувствительности склеры к гормональному воздействию. По-видимому, механизм изменения активности гликозидаз лизосом в субклеточных фракциях склеры и роговицы под действием кортикостероидов заключается в нарушении нормальной проницаемости

мембран лизосом и изменении прочности связи с ними этих ферментов, что препятствует или, наоборот, способствует фермент-субстратному взаимодействию. Исследование гормональной регуляции активности ферментов субклеточных фракций тканей глаза, по-видимому, может явиться моделью для изучения действия различных фармакологических веществ с целью нормализации нарушенного состояния мембран при различных патологиях органа зрения.

Московский научно-исследовательский
институт глазных болезней
им. Гельмгольца

Поступило
30 I 1975

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ П. В. Сергеев, Р. Д. Сейфула, А. И. Майский, Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов, М., 1971. ² В. С. Касавина, Н. В. Чеснокова, *Exp. Eye Res.*, v. 16, 227 (1973). ³ M. Freedman, B. Jacobson, *Exp. Eye Res.*, v. 7, 143 (1968). ⁴ E. Berman, *Invest. Ophthalmol.*, v. 10, 64 (1971). ⁵ А. Б. Мелик-Мусьян, *Изв. Акад. наук АрмССР*, т. 13, 6, 59 (1960). ⁶ J. François, R. Wainstein, *Ophthalmologica*, v. 157, 231 (1969). ⁷ В. С. Касавина, В. М. Дронова, Н. И. Кислякова, *ДАН*, т. 218, № 1, 230 (1974). ⁸ В. С. Касавина, В. М. Дронова. 3-й Всесоюзн. биохим. съезд, Рига, т. 4, 1974, стр. 251. ⁹ В. С. Касавина, П. В. Сергеев, Н. Б. Чеснокова, *ДАН*, т. 204, 1479 (1972). ¹⁰ A. G. W. Nordem, J. S. O'Brien, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 159, 1, 383 (1973). ¹¹ G. Y. Wiederschain, A. A. Prokopenkov, *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 158, 2, 539 (1973). ¹² В. С. Касавина, Н. Б. Чеснокова, *ДАН*, т. 209, № 4, 984 (1973). ¹³ Н. Б. Чеснокова, Лизосомальные ферменты тканей глаза и влияние кортикостероидов на их активность, Канд. дисс., 1973. ¹⁴ В. С. Касавина, Н. Б. Чеснокова, *Вестн. офтальмол.*, № 6, 37 (1973).