

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

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ В ЛИЗОСОМАХ

Исследование внутриклеточного распределения арилсульфатаз — ферментов, которые участвуют в деградации глюколипидов, показало, что часть из них, в частности арилсульфатазы А и В, локализованы во фракции лизосом (¹⁻⁴). Несколько позднее эти данные были подтверждены и цитохимическими методами (⁵). Несмотря на то, что арилсульфатазы А и В являются различными ферментными белками, вследствие близости их оптимума рН и субстратной специфичности, активность этих ферментов как биохимически, так и цитохимически обычно определяется одновременно при одних и тех же условиях — при рН 5,0 и при использовании в качестве субстрата *n*-нитрокатехолсульфата (^{3, 6, 7}). Многочисленные работы посвящены исследованию поведения лизосомальных арилсульфатаз в норме и при различных патологических состояниях (^{3, 6-9}). В то же время их внутрилизосомальная организация до настоящего времени окончательно не установлена. Ряд авторов считают арилсульфатазы ферментами лизосомального матрикса (^{7, 8}). Однако результаты исследования степени освобождения ферментов из выделенных лизосом под действием различных концентраций неионных детергентов позволяют предположить существование и мембраносвязанного компонента арилсульфатаз (¹⁰).

Целью настоящей работы является электронно-микроскопическое исследование внутрилизосомальной локализации арилсульфатазы.

Исследование проводили на крысах-самцах линии Вистар весом около 250 г. Животные содержались на полноценном общевиварном рационе. Пищу и воду крысы получали *ad libitum*. За 12 час. до забоя животных лишали пищи. Крыс забивали декапитацией, печень извлекали, участок правой доли брали для морфологических исследований, остальную часть тщательно промывали в охлажденном физиологическом растворе, измельчали и гомогенизировали в стандартных условиях, используя в качестве суспендирующей среды 0,25 *M* раствор сахарозы, содержащий 0,001 *M* ЭДТА (¹¹). Фракционирование гомогенатов проводили по методу Де Дюва и др. (¹²), а дальнейшее разделение лизосом на субфракции — с помощью равновесного центрифугирования в линейном градиенте плотности сахарозы по методу Покровского и др. (¹¹).

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 (¹³). Дегидратацию проводили в возрастающем спиртовом ряду, после чего материал заливали в эпон. Выявление активности арилсульфатазы осуществляли по методу Эриксона и Трампа (¹⁴), используя в качестве субстрата *n*-нитрокатехолсульфат («Sigma», США). Исследования проводили в электронных микроскопах Hitachi-11, JEM-7A и JEM-100.

Биохимически активность арилсульфатазы определяли с помощью спектрофотометрического микрометода (¹¹), разработанного на основе метода Роя (³), и выражали в микромолях субстрата, превращенного в 1 мин. на 1 г белка.

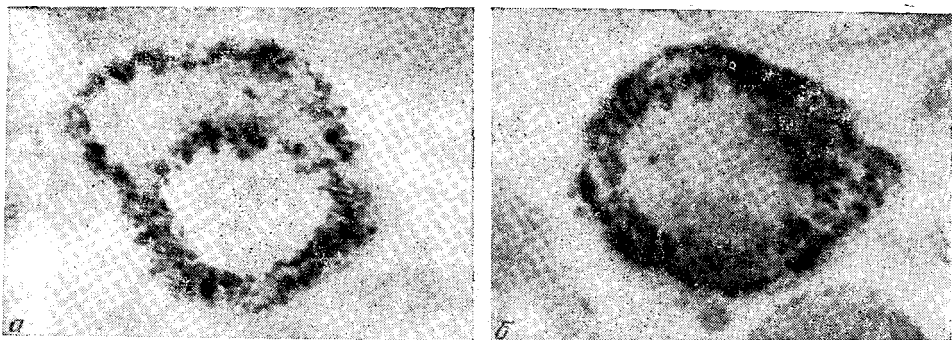


Рис. 2. Локализация арилсульфатазы во вторичных лизосомах печени крыс. *а* — фаза распознавания, слияния и конформации мембран, 40 000 $\times$; *б* — фаза активного переваривания, 40 000 $\times$. Препараты не контрастированы

Исследование активности арилсульфатазы в полученных после центрифугирования субфракциях показало, что фермент равномерно распределен между «легкой» ($\rho=1,13$) лизосомальной субфракцией, представленной преимущественно первичными лизосомами, и «тяжелой» ($\rho=1,24$) субфракцией, состоящей главным образом из вторичных лизосом (47,4 и 50,2 мкмол/мин на 1 г белка соответственно).

Результаты параллельных электронно-микроскопических исследований распределения арилсульфатаз в клетке позволяют утверждать, что, во-первых, вся активность арилсульфатаз А и В исключительно связана с лизосомами и, во-вторых, в лизосомах арилсульфатаза локализована как в матриксе, так и в мембранах. Высокая избирательность отложения продуктов ферментного расщепления специфического субстрата (*n*-нитрокатахолсульфата) особенно четко видна на рис. 1*а* («легкая» лизосомальная субфракция). На рисунке представлена группа первичных лизосом, причем продукты ферментной реакции, определяемые либо в виде отдельных зерен, либо в виде сплошных полей, локализованы как в матриксе, так и в мембранах лизосом.

Значительный интерес представляют рис. 1*б*, *в*, на которых хорошо видна стадия «отпочковывания» первичных лизосом от структур аппарата Гольджи. При этом рис. 1*б* позволяет видеть диффузное распределение фермента во вновь образованных лизосомах, а рис. 1*в*, на котором зафиксирована «отпочковывающаяся» лизосома, попавшая, по-видимому, под срез, — внутримембранную локализацию арилсульфатазы. Обращает на себя внимание, что мембраны аппарата Гольджи, участвующие в образовании лизосом, являются энзиматически сформированными (рис. 1*в*). (Рис. 1 см. вкл. к стр. 720).

На рис. 2 представлены вторичные лизосомы («тяжелая» лизосомальная субфракция). При этом на рис. 2*а* зафиксирована, по-видимому, более ранняя стадия образования вторичных лизосом — фаза распознавания, слияния и конформации мембран (по Покровскому), в то время как на рис. 2*б* — более поздняя стадия: слияние мембран уже произошло и идет процесс переваривания поглощенного материала. Обращает на себя внимание, что активность арилсульфатазы в этот период наиболее резко выявлялась в мембранах лизосом и по периферии матрикса. Во вторичных лизосомах аутофагического типа (аутофаголизосомах) наряду с продуктами ферментной реакции, расположенными диффузно, выявлялись отдельные элементы субклеточных мембранных структур, находящиеся на различных стадиях переваривания. В мембранах аутофаголизосом активность арилсульфатазы определялась лишь в небольших участках.

Таким образом, в результате проведенных исследований удалось выявить определенные закономерности во внутрилизосомальном распределении активности арилсульфатазы. Полученные данные позволяют сделать вывод о существовании в лизосомах арилсульфатазы, локализованной как в матриксе, так и связанной с мембраной. При этом в количественном отношении, по-видимому, значительно преобладает активность арилсульфатазы матрикса лизосом: исходя из биохимических данных ⁽¹¹⁾ — около 85% общей активности. В то же время факт постоянного обнаружения активности мембраносвязанного компонента арилсульфатазы на всех этапах развития лизосомального аппарата (от первичных лизосом и даже фрагментов мембран аппарата Гольджи, участвующих в образовании лизосом, и до остаточных телец) является дополнительным доказательством высказанного нами ранее предположения о сложной ферментной организации лизосомальных мембран ^(10, 15), энзиматическое формирование которых завершается, по-видимому, в аппарате Гольджи.

Институт питания
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
7 II 1975

Центр гигиены
медицинской академии НРБ
София

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. S. Dodgson, B. Spencer, J. Thomas, *Biochem. J.*, v. 59, 29 (1955). ² R. Viala, R. Gianetto, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, v. 33, 830 (1955). ³ A. B. Roy, *Adv. Enzymol.*, v. 22, 205 (1960). ⁴ E. Mehl, H. Jatzkewitz, *Biochim. et biophys. acta*, v. 151, 619 (1968).
- ⁵ V. K. Hopsu, A. Arstila, G. G. Glenner, *Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae (Helsinki)*, v. 43, 114 (1965). ⁶ S. Goldfischer, *J. Histochem. Cytochem.*, v. 13, 520 (1965). ⁷ A. J. Barrett, In: *Lysosomes, A Laboratory Handbook*, Amsterdam — London, 1972, p. 46. ⁸ F. H. Baccino, *Quad. Sclavo Diagn.*, v. 7, 907 (1971). ⁹ A. A. Pokrovsky, L. V. Kravchenko, V. A. Tutelyan, *Biochem Pharmacol.*, v. 21, 2489 (1972). ¹⁰ А. А. Покровский, В. А. Тутельян, Л. В. Кравченко, *Биохимия*, т. 40, № 3 (1975). ¹¹ А. А. Покровский, Л. В. Кравченко и др., *ДАН*, т. 205, 1483 (1972). ¹² C. de Duve, B. Pressman et al., *Biochem. J.*, v. 60, 604 (1955). ¹³ M. J. Karnovsky, *J. Cell Biol.*, v. 27, 137 A (1965). ¹⁴ J. L. E. Ericsson, B. F. Trump, *Histochemie*, v. 4, 470 (1965). ¹⁵ А. А. Покровский, М. Я. Николаева и др., *ДАН*, т. 213, 469 (1973).