

Действительный член АМН СССР А. А. ПОКРОВСКИЙ

О ФЕРМЕНТНЫХ МЕХАНИЗМАХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЛИЗОСОМ

Несмотря на интенсивные исследования лизосом, проводимые с момента их открытия де Дювом (¹), установившие определяющую роль этих субклеточных структур в процессах внутриклеточного пищеварения и защиты организма от многих вредоносных факторов, биохимические механизмы, лежащие в основе их функционирования, до настоящего времени недостаточно выяснены и остаются предметом построения гипотез и научных спекуляций (²⁻⁴).

Полученные в нашей лаборатории данные о ферментной организации лизосом: обнаружение специализированных встроенных в лизосомальные мембраны изозимов, установление методами ферментного и электронно-микроскопического анализа явления их выраженной активации во время формирования вторичных лизосом (^{3, 5-7}), выявление значительных различий в ферментных характеристиках первичных и вторичных лизосом (^{8, 9}), равно как и детальное изучение энергообеспечения протонного насоса в окислительных клетках (¹⁰⁻¹²) позволили нам предпринять попытку новой трактовки некоторых сторон функционирования лизосом.

При обсуждении функциональной роли ферментного комплекса лизосом необходимо принять во внимание некоторые важные отличия этих субклеточных структур от других мембранных образований клетки. Обычно субклеточные мембраны (митохондрий, эндоплазматического ретикулума и т. п.) являются не только средством разделения жидких фаз клеточного содержимого, но и структурирования ферментных белков. В результате мембраны являются главными компонентами организации метаболических процессов, которые несколько условно принято подразделять на процессы энергетического, белкового и других видов обмена. В отличие от перечисленных субклеточных органелл, лизосомы в стадии покоя могут рассматриваться лишь как хранилища резервных количеств гидролаз, необходимых для расщепления ненужных клетке биополимеров, что нередко связано с ликвидацией аварийных состояний. Иными словами, лизосомы, выполняющие чрезвычайно важные функции в организме, стоят несколько в стороне от магистральных, непрерывно текущих процессов энергетического и других видов обмена, во всяком случае в их анаболической части. Они включаются в метаболический поток лишь при необходимости переваривания пищевых веществ или в особых, требующих их участия случаях, обычно связанных с защитой клетки и освобождением ее от посторонних или утративших свое значение биополимеров, для чего необходимо резкое локальное усиление катаболических процессов (^{3, 4, 13}).

Мы позволяем высказать предположение, что обнаруженная нами детерминированность молекулярных форм изоферментов, встроенных в лизосомальные мембраны, равно как и определенная упорядоченность их распределения, может служить структурной основой механизма распознавания природы подлежащих расщеплению материалов, и что мембраносвязанные ферменты лизосом необходимы для осуществления первичного контакта с субстратами, соответствующими их специфичности и инициирования начала экстрализосомального гидролитического расщепления атакуемых биополимеров.

Высказанные соображения были представлены в виде схемы *, согласно которой встроенные в мембраны изозимы рассматриваются как своеобразные, обладающие высокой специфичностью распознавания ферментные рецепторы, которые проявляют свою активность главным образом в случае аварийных состояний, связанных с локальным возрастанием концентрации водородных ионов. Процесс превращения лизосом разделен на фазы: первая из них характеризует состояние покоя, при этом первичные лизосомы выполняют функции ферментных депо клетки и многочисленные потен-

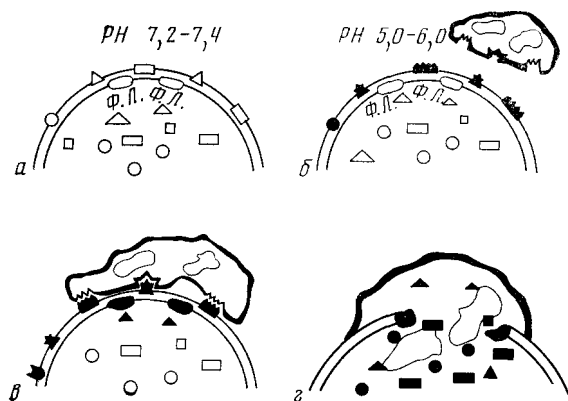


Рис. 1. Схема процесса образования вторичных лизосом. а — фаза покоя (неактивные формы ферментов обозначены контурированными фигурами); б — фаза активации (активные формы ферментов обозначены зачерченными фигурами); в — фаза распознавания; г — фаза локального расплавления мембран и переваривания биополимеров. ф.л. — фосфолипазы

циально высокоактивные кислые гидролазы как бы зачехлены мембранами лизосом. В силу слабо щелочной реакции клеточного содержимого локализованные в их матриксе кислые гидролазы (вероятно, в виде гликопротеидных комплексов) и их изозимы, встроенные в лизосомальные мембраны, практически лишены активности (рис. 1а).

При локальном падении рН, в фазе активации, в силу ионизации и конформации ферментных глобул (можно допустить воздействие и других активирующих факторов), в первую очередь обретают активность мембранные изозимы (рис. 1б). При этом изозимы выполняют роль достаточно чувствительных и обладающих специфической способностью реагировать с определенными субстратами индикаторов аварийного изменения рН, являющегося почти универсальным признаком клеточной патологии.

В следующей фазе распознавания происходит специфическое взаимодействие мембранных изозимов с объектами атаки (рис. 1в): чужеродными материалами, гетеро- и ауто-фагосомами, их частичное расщепление и иницирование цепи реакций, приводящих к следующей фазе локального расплавления мембран (рис. 1г), слияния первичной лизосомы с фагосомой, т. е. образования вторичных лизосом. Предполагается, что роль ферментов, раскрывающих лизосомальную мембрану, выполняют фосфолипазы, мембранная локализация которых может считаться доказанной (14). Последняя стадия включает тотальную активацию ферментов лизосомального матрикса, а затем полное или частичное переваривание чужеродных веществ.

Очевидно, что в предложенной схеме остается неясным механизм закисления содержимого гетеро- и ауто-фагосомных вакуолей или понижения рН во вторичных лизосомах. При обсуждении этого явления невозможно обойти вопрос об источнике энергии. В связи с этим мы, как и ряд других авторов (3, 4, 14) предприняли попытку поиска в составе лизосомальных мембран специфических АТФаз, которые при взаимодействии с АТФ могли бы способствовать освобождению необходимой для поддержания градиента рН энергии. К сожалению, эти работы не дали положительных результатов.

* Доклад на III Всесоюзном биохимическом съезде (октябрь 1974, Рига). Доклад на секции медицинской биохимии Московского отделения Всесоюзного биохимического общества АН СССР 25 V 75 г.

Присутствие АТФаз в достаточно очищенных мембранах лизосом обнаружено не было. В то же время было показано, что процессы лизосомального переваривания *in vitro* могут быть достоверно ускорены путем введения в систему АТФ (²).

Для приближения к проблеме генерации протонов в лизосомах, постулируя, что природа для реализации близких биохимических процессов часто использует уже выработанные в процессе эволюции ферментные механизмы, мы попытались изучить некоторые стороны ферментного обеспечения протопового насоса в специализированных для этой цели оксинтных клетках слизистой желудка. Систематические исследования этого процесса, проводимые в экспериментах с изолированной слизистой в специально сконструированном аппарате, с применением субстратного и ингибиторного анализа, равно как и электронномикроскопических исследований, не оставляют сомнений в том, что ответственными за энергетическое обеспечение транспорта водорода в оксинтных клетках являются митохондрии (¹⁰⁻¹²). Данные биохимического анализа подтверждены электронномикроскопическими исследованиями работы оксинтных клеток *in situ* (рис. 2). При рассмотрении структурных особенностей оксинтных клеток слизистой желудка лягушек, находящихся в покое, в них присутствуют лишь редкие вакуоли (рис. 2а). Если же на этом фоне в питающую жидкость ввести *L*-метионин, то наряду с резкой стимуляцией выделения соляной кислоты, усилением интенсивности потребления кислорода и волной увеличения концентрации восстановленных пиридиннуклеотидов (¹¹), через несколько минут (фаза перехода от состояния покоя к усиленному функционированию) наблюдается резкое обогащение оксинтных клеток вакуолями. Важно подчеркнуть, что практически каждая из этих вакуолей в этот период оказывается связанной с отдельной митохондрией (рис. 2б). Создается впечатление, что митохондрии в буквальном смысле слова участвуют в образовании вакуолей, т. е. выполняют функции водородного насоса.

Итак, мы предполагаем, что по аналогии с оксинтными клетками при локальном закислении реакции в аутофагосомах и вторичных лизосомах роль поставщиков энергии принимают на себя митохондрии.

При обсуждении же механизма генерации протонов в гетерофагосомах во внимание должны быть приняты некоторые особенности участия плазматических мембран в процессах эндоцитоза и их участия в формировании вторичных лизосом. Известно, что различные формы эндоцитоза инициируются появлением во внеклеточном пространстве чужеродных веществ (рис. 3). Процесс эндоцитоза начинается с сорбции фагоцитируемого вещества на плазматической мембране. Вместе с сорбцией этого вещества

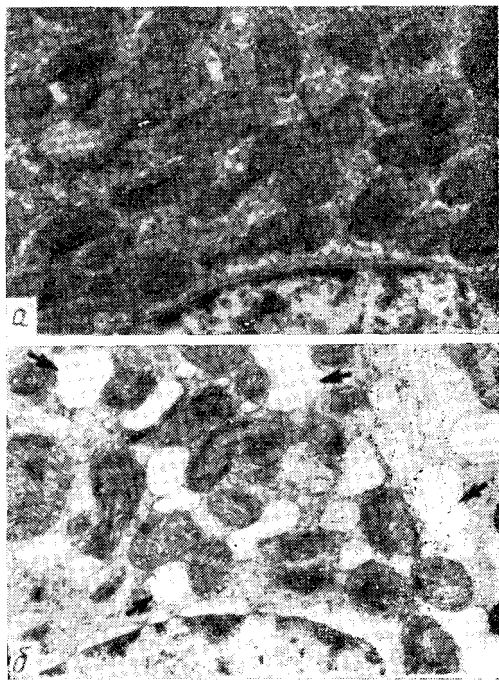


Рис. 2. Оксинтная клетка слизистой желудка лягушки в состоянии покоя (а) и активной секреции (б), стимулированной *L*-метионином 12 000 $\times$. Стрелками обозначены вновь образованные вакуоли

возникает инвагинация плазматической мембраны, а затем отшнуровывание гетерофагической вакуоли. При этом следует обратить внимание на одну, имеющую первостепенное значение деталь в структуре гетерофагической вакуоли: плазматическая мембрана как бы вывернута наизнанку. В результате внешняя сторона образующей лизосому плазматической мембраны обращена внутрь вакуоли, а ее внутренняя сторона, обозначен-

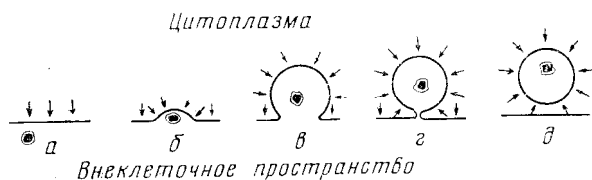


Рис. 3. Схема образования гетерофагосомы. а — интактная плазматическая мембрана; б — адгезия чужеродного материала на наружной поверхности плазматической мембраны; в — инвагинация плазматической мембраны; г — отшнуровывание образующейся гетерофагосомы; д — вновь образованная гетерофагосома в цитоплазме клетки

ная на рисунке стрелками, для фагосомы становится внешней. Если постулировать асимметрические свойства плазматической мембраны, в частности, ее преимущественную способность к протонному транспорту из цитозола во внеклеточное пространство, то благодаря вывороту мембран водородный транспорт в образующейся гетерофагосоме должен быть обращен внутрь вакуоли.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные могут быть привлечены для объяснения наиболее трудных сторон современной концепции лизосом.

Институт питания
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
18 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. De Duve, B. Pressman et al., Biochem. J., v. 60, 604 (1955).
- ² J. L. Mego, In: Lysosomes in Biology and Pathology, v. 3, Amsterdam — London, 1973, p. 138.
- ³ А. А. Покровский, Роль биохимии в развитии науки о питании. М., «Наука», 1974.
- ⁴ А. А. Покровский, В. А. Тутельян, Усп. совр. биол., т. 68, 318 (1969).
- ⁵ А. А. Покровский, М. Я. Николаева и др., ДАН, т. 213, 469 (1973).
- ⁶ А. А. Покровский, Л. П. Крыстев и др., ДАН, т. 219, 1235 (1974); ДАН, т. 222, 713 (1975).
- ⁷ А. А. Покровский, В. А. Тутельян, Л. В. Кравченко, Биохимия, т. 40, № 3, 545 (1975).
- ⁸ А. А. Покровский, Л. В. Кравченко и др., ДАН, т. 213, 469 (1973).
- ⁹ А. А. Покровский, Л. П. Крыстев и др., Цитология, т. 17, 954 (1975).
- ¹⁰ А. А. Покровский, М. М. Ганнаров, Л. Г. Левин, Физиол. журн. СССР, т. 59, 1567 (1973).
- ¹¹ А. А. Pokrovsky, L. G. Levin, M. M. Gannarov, Intern. J. Vit. Nutr. Res., v. 43, 233 (1973).
- ¹² А. А. Покровский, М. М. Ганнаров и др., Цитология, т. 17, 175 (1975).
- ¹³ А. А. Pokrovsky, L. V. Kravchenko, V. A. Tutelyan, Biochem. Pharmacol., v. 21, 2489 (1972).
- ¹⁴ A. I. Barret, In: Lysosomes a Laboratory Handbook, Amsterdam — London, 1972, p. 46.