

Р. В. ХЕСИН

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ОКСИДАЗЫ *d*-АМИНОКИСЛОТ  
В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС  
ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ БЕЛКА В ПИТАНИИ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 13 V 1950)

Работами ряда авторов, в первую очередь школы Капланского, было показано, что при недостаточном содержании белка в питании происходит нарушение ряда ферментных систем организма ((<sup>1</sup>, <sup>2</sup>) и др.). В большинстве случаев наблюдается частичная инактивация ферментов.

Костерлиц и др. (<sup>3-5</sup>) показали, что при недостаточности белка в диете наблюдается потеря цитоплазмы клеток, особенно заметная в печени. При этом приблизительно пропорционально убывают белки, фосфолипиды и рибонуклеиновая кислота, количество же клеток не уменьшается.

Рибонуклеиновая кислота и фосфолипиды сосредоточены в цитоплазме печени взрослых животных, в основном в цитоплазматических гранулах (<sup>6-8</sup>). С другой стороны, негранулированная фаза цитоплазмы содержит сравнительно высокую концентрацию белка. Поэтому пропорциональное изменение содержания фосфолипидов, рибонуклеиновой кислоты и белка при гипопроteinемии говорит о том, что теряются как неструктурированная фаза, так и структурные элементы цитоплазмы (цитоплазматические гранулы).

В течение, главным образом, последнего десятилетия было обнаружено, что большинство ферментов клетки связано с форменными элементами цитоплазмы — цитоплазматическими гранулами и пластидами, являющимися гомологами последних (<sup>7-13</sup>). Поэтому ослабление активности ряда ферментов при недостаточности белка в питании можно объяснить выпадением цитоплазматических гранул, в которых локализованы соответствующие апоферменты.

Миллер (<sup>14</sup>) на основании снижения активности некоторых ферментов при голодании и указанного выше пропорционального изменения веществ, входящих в состав цитоплазматических гранул, предположил, что потеря какой-либо одной части комплекса, составляющего цитоплазматическую гранулу, например белка, влечет за собой распад всего комплекса гранулы. Если это предположение правильно, то необходимо заключить, что при недостаточности белка в питании происходит уменьшение количества гранул, а сохранившиеся гранулы остаются неизменными.

Исследование этого явления имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение, так как в зависимости от его результата находится и вопрос о характере восстановительных процессов и о веществах, необходимых для быстрой регенерации нарушенных ферментных функций.

Настоящая работа имела целью выяснение непосредственного механизма потери ряда ферментативных активностей при недостаточности белка в питании: происходит ли при этом изменение ферментативных свойств цитоплазматических гранул или же только сокращение их количества без изменения свойств.

В качестве теста для характеристики ферментативных функций гранул была избрана *d*-аминоксидаза, так как, по данным Н. Березовской (<sup>1</sup>), активность ее резко снижается при недостаточности белка в питании. Методом «фракционного центрифугирования гомогенатов» Клод (<sup>9</sup>) показал, что *d*-аминоксидаза локализована в цитоплазме в больших гранулах — в митохондриях. Наша задача заключалась в сравнении *d*-аминоксидазной активности митохондрий клеток печени нормальных крыс и крыс, находившихся на малобелковой диете.

Митохондрии выделялись из клеток печени в основном по методам, описанным в (<sup>15</sup>, <sup>16</sup>). Микроскопический анализ показал, что препарат митохондрий содержит практически только большие гранулы, исходный гомогенат содержит отдельные ядра, гранулы цитоплазмы и немного целых клеток, а центрифугат после осаждения митохондрий сохраняет все же некоторое количество их.

Определение сукциндегидразной активности полученных нами препаратов митохондрий показало, что эти препараты вполне могут быть использованы для исследования ферментов, так как интенсивность их дыхания при прибавлении янтарнокислого натрия была достаточно высока.

Активность *d*-аминоксидазы определялась в аппарате Варбурга по разнице поглощения кислорода в сосудах с субстратом и без субстрата (среда — рингер-фосфат; рН 7,4; субстрат — *dl*-аланин *M*/10; *t* = 38°). Во всех приведенных ниже таблицах интенсивность окисления выражена в микролитрах О<sub>2</sub> в час на 1 мг азота препарата. Содержание азота в препарате определялось по методу Конвея. Для получения безбелкового экстракта печени гомогенат нагревался до 90° 10 мин. и белки осаждались центрифугированием.

В табл. 1 приведены данные по сравнительной активности *d*-аминоксидазы в цельном гомогенате, митохондриях и центрифугате, из которого удалена большая часть митохондрий.

Таблица 1

Препарат	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Опыт 4
Исходный гомогенат . . . . .	12,2	11,0	14,4	—
Митохондрии + солевой раствор	18,5	—	—	11,4
Митохондрии + безбелковый экстракт . . . . .	66,3	52,9	61,6	39,1
Центрифугат . . . . .	—0,9	—	—	+1,8

Из табл. 1 видно, что активность митохондрий, к которым добавлен безбелковый экстракт, значительно выше, чем при добавлении солевого раствора. Это обусловлено тем, что в безбелковом экстракте имеется кофермент *d*-аминоксидазы, теряемый при выделении и промывке митохондрий. Поэтому во всех дальнейших опытах активность митохондрий определялась при добавлении безбелкового экстракта из нормальной печени.

Активность митохондрий, как и следовало ожидать, в несколько раз выше, чем активность исходного гомогената, активность же центрифугата была близка к нулю. Это показывает, что апофермент *d*-аминоксидазы локализован в цитоплазме в митохондриях.

Для исследования изменения активности *d*-аминооксидазы митохондрий при недостаточности белка в питании использовались животные, находившиеся на малобелковой диете и потерявшие при этом не менее 20—25% исходного веса (содержание белка в крови падало до 5% и ниже). В каждом опыте для получения препаратов использовались по две нормальные и две «малобелковые» крысы. В каждом опыте производилось по два параллельных определения. Данные этих опытов приводятся в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Препарат	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
Гомогенат „нормальный“ . . . . .	14,4	9,3	8,7
Гомогенат „малобелковый“ . . . . .	4,2	3,1	1,8
Митохондрии „нормальные“ . . . . .	61,6	25,4	37,9
Митохондрии „малобелковые“ . . . . .	21,7	8,9	10,8

Таблица 3

Отношение активностей	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
„Нормальный“ гомогенат . . . . .	3,4	3,0	5,3
„Малобелковый“ гомогенат . . . . .			
„Нормальные“ митохондрии . . . . .	2,8	2,9	3,5
„Малобелковые“ митохондрии . . . . .			

Из приведенных данных могут быть сделаны следующие выводы. Снижение окисления *d*-аминокислот тканями животных при гипопротеемии объясняется почти целиком изменением строения и ферментативных свойств митохондрий, а не снижением концентрации митохондрий в цитоплазме клеток. Это видно из соотношения между активностями гомогенатов печени нормальных и «малобелковых» крыс и соответствующего соотношения активности митохондрий. Если принять во внимание, что все активности вычислены на 1 мг азота, то ясно, что активности исходных гомогенатов (и, следовательно, исходных тканей) почти точно пропорциональны активностям митохондрий.

Незначительные различия в падении активностей гомогенатов и митохондрий, которые видны из данных табл. 3, могут быть объяснены и некоторым снижением количества митохондрий в клетках «малобелковых» крыс (подразумевается понижение белкового материала митохондрий по отношению к общему белку клеток печени). Однако совершенно очевидно, что основную роль в изменении активности *d*-аминооксидазы при гипопротеемии играет изменение строения и ферментативных свойств митохондрий, а не изменение их количества.

Таким образом, строение цитоплазматических гранул может меняться в зависимости от физиологического состояния организма, влияя в свою очередь при этом на характер функций его тканей.

В заключение выражаю благодарность проф. С. Я. Капланскому за руководство при проведении данной работы.

# ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> С. Капланский, Н. Березовская и Ж. Шмерлинг, Биохимия, 10, 401 (1945).
- <sup>2</sup> Н. Березовская, Н. Болдырева и др., Тр. 7 Всесоюзн. съезда физиол., биохим. и фармакол., 461 (1947).
- <sup>3</sup> Н. W. Kosterlitz, Nature, 154, 207 (1944).
- <sup>4</sup> Н. W. Kosterlitz, Journ. Physiol., 106, 194 (1947).
- <sup>5</sup> Н. W. Kosterlitz and R. M. Campbell, Nutrit. Abstr. Rev., 15, 1 (1945).
- <sup>6</sup> R. R. Bensley, Sci., 96, 389 (1942).
- <sup>7</sup> J. Brachet, Symp. Quant. Biol., 12, 18 (1947).
- <sup>8</sup> J. Brachet, Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 207 (1947).
- <sup>9</sup> A. Claude, A. A. A. Sci., Res. Conf. on Cancer, 223 (1945).
- <sup>10</sup> Н. М. Сисакян и Е. Б. Куваева, ДАН, 62, 121 (1948).
- <sup>11</sup> Н. М. Сисакян и И. И. Филиппович, ДАН, 67, 517 (1949).
- <sup>12</sup> Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, ДАН, 67, 703 (1949).
- <sup>13</sup> Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, Биохимия, 14, 86 (1949).
- <sup>14</sup> L. L. Miller, Journ. Biol. Chem., 173, 113 (1948).
- <sup>15</sup> A. Claude, Journ. Exp. Med., 84, 61 (1946).
- <sup>16</sup> G. H. Hogeboom, W. C. Schneider and G. E. Pallade, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 65, 320 (1947).