

А. А. СИМОНЯН

АКТИВНОСТЬ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ  
РАЗНЫХ ОРГАНОВ ЦЫПЛЕНКА И ЕЕ ИЗМЕНЕНИЯ  
ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕРМООБРАБОТКИ

Ферменты проявляют различную термоустойчивость. Растительные ферменты более термоустойчивы, чем животные [1]. Известно, что почти все ферменты при температуре 80° полностью интактивируются, за исключением рибонуклеазы, трипсина и лизоцима, выдерживающие даже длительное кипячение [2—4].

Имеются работы по тканевым гомогенатам, показывающие, что фосфомоноэстеразы разных органов того же животного обладают разной термостабильностью [5, 6]. Этим доказывается их специфичность в разных органах, почему и представляет интерес выяснение вопроса органной специфичности ферментов субклеточных частиц.

С этой целью в данной работе мы определяли активность аденозинтрифосфатазы (АТФ-аза) в митохондриях разных органов (мышц, печени, целостного мозга, а также больших полушарий головного мозга и мозжечка) цыпленка и изучали влияние термообработки на активность фермента.

**Методика.** Опыты ставились на 15—30-дневных цыплятах породы белый леггорн. Цыплят обезглавливали, быстро извлекали нужную ткань и помещали ее в стакан, находившийся на льду. Измельчение ткани производилось также на льду заранее охлажденными ножницами. А затем гомогенизировали ее в гомогенизаторе Поттера тефленовым пестиком [7], с помощью которого достигалось достаточно полное разрушение клетки. При этом внутриклеточные частицы (митохондрии и в меньшей степени ядра) не разрушаются. Время гомогенизации для печени и мозга—20 секунд, для мышц—60. Ядра и обломки клеток удаляли из гомогената центрифугированием (при температуре 0—4°) в течение 10 мин. при 600—700 g. Из полученного центрифугата осаждали митохондрии при центрифугировании 20000 g в течение 10 мин. Затем митохондрии промывали средой выделения (СВ) и осаждали центрифугированием в течение 10 мин. при 20000 g. Конечный осадок митохондрий суспендировали в СВ (1 : 1) и помещали в соответствующую инкубационную смесь.

Для выделения митохондрий печени и мозга средой выделения служил раствор сахарозы—0,25 M (рН 7,4), а для мышц—0,1 M KCl, 0,05 M Грис и 0,001 M MgCl<sub>2</sub> (рН 7,4).

Термообработку митохондрий производили при температуре 37°, 45°, 50°, 60° и 70° в течение 10 мин.

Определение АТФ-азной активности митохондрий производили одновременно с окислительным фосфорилированием. Инкубационная смесь состояла из 1,6 мл СВ, 0,2 мл суспензии митохондрий в среде выделения (около 2 мг белка) и 0,2 мл раствора АТФ (20 мг АТФ в 1 мл) рН 7,4. Активность АТФ-азы устанавливалась по количеству неорганического фосфора, отщепившегося от АТФ в течение 30 мин. при 26°С (пересчет на 1 г свежей ткани). Неорганический фосфор определяли в фильтрате по методу Лоури-Лопеза [8] с частичной модификацией В. П. Скулачева [9]. Количество Р выражалось в микроатомах.

**Результаты и обсуждение.** Полученные результаты показывают, что высокой АТФ-азной активностью обладают митохондрии мышц цыплят (33,5 мк атом Р на 1 г свежей ткани, рис. 1).

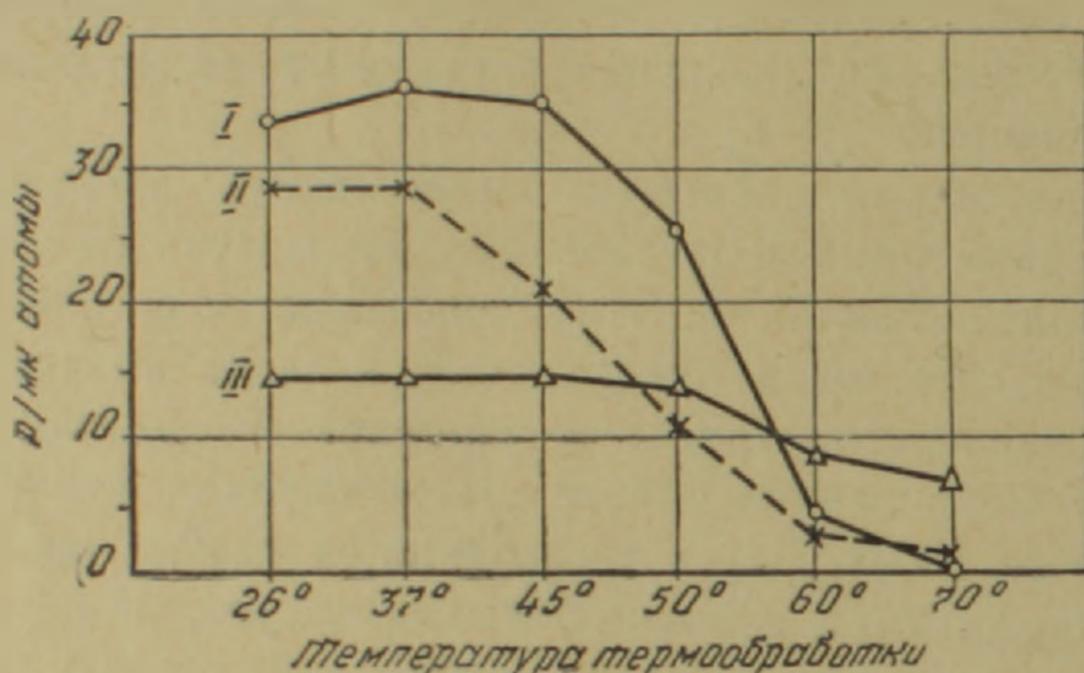


Рис. 1. Активность АТФ-азы в митохондриях мышц, мозга и печени цыпленка и ее изменение под влиянием термообработки. I—мышцы, II—мозг, III—печень.

Активность фермента в мозговой ткани составляла 28,7 мк атома Р, печени—14,4 и заметно выше в митохондриях больших полушарий головного мозга (35,7 мк атома Р). Наоборот, активность фермента в митохондриях мозжечка по сравнению с его активностью в больших полушариях ниже почти в два с половиной раза.

В литературе имеются данные, подтверждающие, что АТФ-аза митохондрий мышц более активна при температуре 26° [10]. В наших же опытах активность фермента повышалась по сравнению с контрольными данными (инкубация при 26°) при температуре 37° на 2,4 мк атома Р. При 45° активность АТФ-азы мышц не изменялась, при 50° понижалась (25,5 мк атома Р), а при 60° достигала 4,4 мк атома Р на 1 г свежей ткани. После термообработки при 70° активность фермента полностью угнеталась и белок денатурировался.

По сравнению с контролем, после термообработки при 37° АТФ-азная активность митохондрий мозга оставалась без изменений, при 45° понижалась (21,0 мк атома Р), при 60° доходила до 2,85 мк атома Р, при 70° фермент почти полностью денатурировался.

Ферментативная активность митохондрий печени после обработки при 37—50° не изменяется, затем с повышением до 60° отмечается ее некоторое понижение (9,0 мк атома Р), а при 70° доходит до 7,0 мк ато-

ма. Как явствует из результатов проведенных исследований, АТФ-аза печени проявляет большую термостабильность нежели это отмечается в мозговой и мышечной тканях.

Активность митохондрий больших полушарий головного мозга при 26—45° почти одинакова (34,6—33,5 мк атома Р). При 50° активность фермента падает, при 60° доходит до 1,0 мк атома Р, а при 70° активность фермента полностью угнетается (рис. 2).

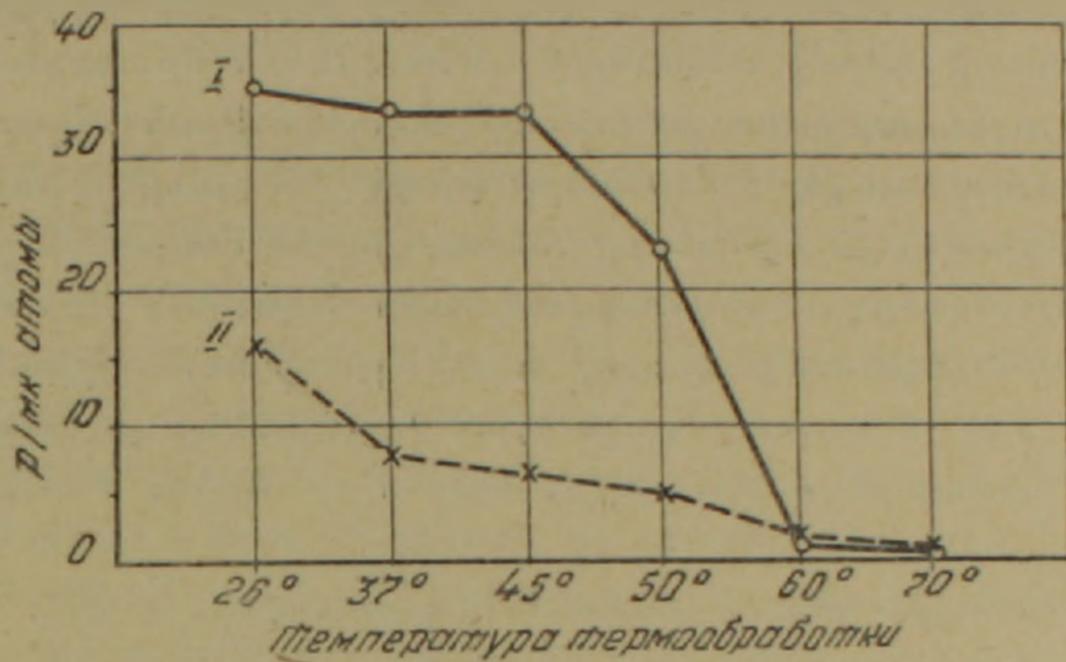


Рис. 2. Активность АТФ-азы в митохондриях большого полушария головного мозга и мозжечка цыпленка и изменение ее под влиянием термообработки.

Активность АТФ-азы митохондрий мозжечка после термообработки при 37° по сравнению с контролем снижается в два раза. Одновременно с повышением температуры активность падает и при 60° доходит до 1,5 мк атома Р.

### В ы в о д ы

Результаты проведенных исследований показывают, что высокой АТФ-азной активностью обладают митохондрии мышечной и мозговой ткани цыпленка, меньшей — печени. По сравнению с мозжечком активность АТФ-азы митохондрий больших полушарий головного мозга выше в два раза.

Активность АТФ-азы митохондрий мозга, печени и мышц после термообработки при 37—45° почти не изменяется, начиная с 50° понижается, при 60° значительно падает, а при 70° почти полностью угнетается. По сравнению с другими тканями, АТФ-аза митохондрий печени более термоустойчива.

## Ա. Ա. ՄԻՄՈՆՅԱՆ

## ԱԴԵՆՈՉԻՆՏՐԻՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՎԻ ՃՏԻ ՕՐԳԱՆՆԵՐԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱՆԵՐՈՒՄ ԵՎ ԹԵՐՄՈՄԵՇԱԿՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆՐԱ ՎՐԱ

## Ա մ փ ո փ ո լ մ

Այս աշխատության մեջ մենք որոշել ենք ադենոզինտրիֆոսֆատազայի ակտիվությունը հավի ճտերի տարբեր հյուսվածքների միտոքոնդրիաներում և թերմոմշակման ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա: Հյուսվածքի հոմոգենիզացիան կատարվել է Պոտտերի տիպի հոմոգենիզատորով: Բջջի կորիզները և ցիտոպլազմայի կտորները անջատվել են 600—700 ց ցենտրիֆուգացման միջոցով: Ստացված վերնստվածքային հեղուկում միտոքոնդրիաները նստեցվել են 20000 ց-ի տակ: Լյարդի և ուղեղի միտոքոնդրիաների անջատման միջավայրը եղել է սախարոզայի 0,25 մոլյարանոց լուծույթը (pH 7,4), իսկ մկանների համար՝ 0,1 մոլ. KCl, 0,05 մոլ. Տրիս, 0,001 մոլ. MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4):

Միտոքոնդրիաների թերմոմշակումը կատարվել է 37, 45, 50, 60 և 70°-ում, 10 րոպե տևողությամբ:

Փորձերի արդյունքները ցույց են տալիս, որ ադենոզինտրիֆոսֆատազային բարձր ակտիվությամբ օժտված են հավի ձտի մկանային հյուսվածքի (33,5 միկրոատոմ P 1 գ թարմ հյուսվածքին) և ուղեղի (28,7 միկրոատոմ P) միտոքոնդրիաները, պակաս՝ լյարդի (14,4 միկրոատոմ P): Ուղեղի մեծ կիսագնդերի միտոքոնդրիաների ադենոզինտրիֆոսֆատազայի ակտիվությունը ավելի քան երկու անգամ բարձր է ուղեղիկի համեմատությամբ:

Ուղեղի, լյարդի և մկանային հյուսվածքների միտոքոնդրիաների ադենոզինտրիֆոսֆատազայի ակտիվությունը 37—45°-ում կատարված թերմոմշակումից հետո ընթանում է հավասարաչափ, սկսած 50°-ից այն իջնում է, 60°-ում խիստ ընկճվում և 70°-ում ֆերմենտը գրեթե դենատուրացվում է: Մյուս հյուսվածքների համեմատությամբ լյարդի միտոքոնդրիաների ադենոզինտրիֆոսֆատազան ավելի ջերմադիմացկուն է:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Militzer W., Barns L. Arch. Biochem. Biophys., 52, 66, 1954.
2. Путнам Ф. Денатурация белков. Белки, под редакцией Г. Нейрата и К. Бейли, М., 2, 603, 1956.
3. Нортроп Д., Кунитц М. и Херриотт Р. Кристаллические ферменты, М., 1950.
4. Нейландс Д. и Штуттф П. Очерки по химии ферментов. М., 1958.
5. Адунц Г. Т. Вопросы биохимии, том II, стр. 129, Ереван, 1961.
6. Адунц Г. Т. Биохимическая конференция прибалтийских республик и Белоруссии. Тез. докладов, Тарту, 1960.
7. Potter V. R., a. Elvehjem C. A. J. Biol. Chem., 114, 2, 495—504, 1936.
8. Lowry H. O., Lopez J. A. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
9. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, М., 1962.
10. Краткая химическая энциклопедия, т. I, стр. 31, 1961.