

УДК 577.3:612.2

БИОХИМИЯ

А. А. Симонян, Г. А. Геворкян,
 Р. А. Степанян, Л. О. Восканян

Сравнительная характеристика активности некоторых ферментов в митохондриях сердца кур в онтогенезе

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 27/X 1975)

В предыдущей нашей работе (¹) мы изучали интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования в изолированных митохондриях сердца кур в различные периоды их онтогенетического развития. Полученные результаты свидетельствуют об усилении окислительно-восстановительных процессов, образовании и распаде промежуточных макроэргических соединений в ткани сердца развивающегося организма в конце эмбрионального и в раннем постэмбриональном периоде развития. В развитие этих исследований в настоящей работе мы изучили АТФазную (МКФ 3.6.1.3) активность в митохондриях сердца кур в онтогенезе. В связи с полученными нами результатами по окислительному фосфорилированию определенный интерес представляло также изучение становления активности отдельных ферментов дыхательной цепи в изолированных митохондриях сердца кур по мере их онтогенетического развития.

Опыты проводили на 15 и 20-дневных эмбрионах, 5-дневных цыплятах и взрослых курах. Возраст эмбрионов определяли по дням инкубации. Сердца эмбрионов соответствующего возраста промывали ледяным раствором 0,15 М КСI в течение 30 секунд. Ткань измельчали специальной давилкой, затем гомогенизировали 30—40 секунд в гомогенизаторе Поттера.

Митохондрии выделяли в растворе 0,44 М сахарозы—1 ммоль ЭДТА. Ядра выделяли при 2500 g, митохондрии—12000 g. Осадок митондрий суспензировали в 0,25 М растворе сахарозы—0,02 М трис-НСI буфере. Чистоту фракции и целостность митондрий контролировали электронной микроскопией.

Активность АТФазы в митохондриях определяли по нарастанию неорганического фосфата (НФ) в следующей инкубационной смеси (2 мл): 1,6 мл 0,25 М сахарозы—0,02 М трис-НСI буфера, 0,2 мл суспензии митондрий (соответствующей примерно 2—3 мг белка) и 4 мл АТФ, растворенного в 0,2 мл 0,25 М сахарозы, рН 7,4, время инкубации

30 минут, температура—26°C. Для выявления активности различных АТФаз катионы добавляли в ммольях в конечной концентрации: Na⁺—100, K⁺—120, Mg⁺⁺—10, Ca⁺⁺—20, ДНФ (2,4-динитрофенол) применяли в количестве 0,0005 М.

Активность цитохромоксидазы (МКФ 1.9.3.1) и сукцинатдегидрогеназы (МКФ 1.3.99.1) определяли манометрическим методом при 26° (2,3). В качестве субстрата окисления при определении цитохромоксидазы применяли аскорбиновую кислоту, при определении сукцинатдегидрогеназы—сукцинат.

Для определения активности цитохромоксидазы в сосудики вводили реактивы в следующих количествах (в мл): 0,25 М сахарозы—0,02 М трис-НCl буфера—0,95, цитохром с—0,25, аскорбиновая кислота 0,119 М—0,3 и суспензия митохондрий—0,5, соответствующая 2—4 мг белка.

Активность сукцинатдегидрогеназы определяли в следующей инкубационной смеси (в мл): 0,25 М сахарозы—0,02 М трис-НCl буфера—0,55 (рН 7,4), сукцината 0,5 М—0,3, цитохрома с (4.10⁻¹ М)—0,25, AlCl₃ 0,007 М—0,2, CaCl₂ 0,007 М—0,2 и суспензия митохондриальной фракции—0,5.

Активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы выражалась величиной прироста потребления кислорода митохондриями после добавления субстрата. Результаты опытов выражали в QO₂—мкл/мг белка/час. Белок определяли по Лоури и сотр. (4).

Результаты исследований, приведенные в табл. 1, показывают, что по ходу развития куриного эмбриона, начиная с 15-го дня инкубации, общая активность АТФазы повышается. Нарастание активности фермента у 20-дневных эмбрионов, по сравнению с 15-дневными, составляет 46, а после вылупления у 5-дневных цыплят—175%. Дальнейшего увеличения активности фермента у половозрелых кур, по сравнению с 5-дневными, не обнаруживается.

Таблица 1
АТФазная активность в митохондриях сердца кур в онтогенезе
Р в мкатамах/мг белка/30 мин М±m

Условия опыта	Эмбрионы		5-дневные цыплята	Взрослые куры
	15-дневные	20-дневные		
Контроль	1.43±0.09 (6)	2.10±0.48 (5)	3.95±0.20 (6)	3.89±0.16 (8)
Na ⁺⁺ +K ⁺	1.23±0.13 (6)	1.57±0.17 (6)	2.48±0.25 (8)	1.39±0.09 (8)
Mg ⁺⁺	3.21±0.20 (6)	3.57±0.56 (8)	7.22±0.57 (8)	5.33±0.41 (8)
ДНФ	4.04±0.39 (6)	5.30±0.56 (6)	5.01±1.29 (8)	5.97±0.39 (8)
Ca ⁺⁺	3.66±0.32 (6)	3.72±0.64 (6)	6.41±0.44 (8)	4.94±0.32 (8)

В скобках количество опытов.

Активность $\text{Na}^+ + \text{K}^+$, Mg^{++} и Ca^{++} зависимых АТФаз также повышается по ходу развития куриного эмбриона, достигая своего максимума у 5-дневных цыплят. Однако у взрослых особей по сравнению с 5-дневными цыплятами активность фермента в присутствии этих катионов достоверно снижается.

Сопоставляя полученные данные можно заметить, что в митохондриях сердца кур в различные дни эмбрионального и постэмбрионального развития по сравнению с общей и $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -зависимой АТФазой, активность фермента намного выше в присутствии катионов Mg , Ca , а также ДНФ.

Полученные данные, касающиеся становления и развития АТФазы митохондрий сердца по ходу развития куриного эмбриона полностью согласуются с нашими предыдущими данными (¹), свидетельствующими об усилении образования и распада промежуточных макроэргических соединений в ткани сердца цыпленка в конце эмбрионального и раннем постэмбриональном периодах.

Цитохромоксидазная активность высокая на 15-ый день эмбрионального развития (табл. 2), в митохондриях 20-дневных эмбрионов активность фермента понижается, достигая своего минимума у 5-дневных цыплят. По сравнению с эмбриональным и постэмбриональными периодами, у кур цитохромоксидазная активность высокая.

Таблица 2

Активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в митохондриях сердца кур в онтогенезе. О в мкл/мг белка/час, $\bar{M} \pm m$

Условия опыта	Эмбрионы		5-дневные цыплята	Взрослые куры
	15-дневные	20-дневные		
Эндогенное дыхание	5,58 (4)	4,61 (4)	3,98 (4)	3,65 (4)
Цитохромоксидаза	55,76 $\pm$ 0,40 (8)	43,55 $\pm$ 0,28 (12)	36,49 $\pm$ 0,14 (8)	64,13 $\pm$ 0,56 (9)
Сукцинатдегидрогеназа	81,62 $\pm$ 0,26 (8)	88,57 $\pm$ 1,28 (8)	116,69 $\pm$ 0,24 (8)	180,98 $\pm$ 0,65 (9)

Активность сукцинатдегидрогеназы в митохондриях сердца повышается по мере развития эмбриона. Дальнейшее активирование фермента наблюдается у 5-дневных цыплят и половозрелых кур.

Таким образом, полученные данные демонстрируют неодинаковую динамику активности цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы по мере развития куриного эмбриона. Выявленная нами динамика активности сукцинатдегидрогеназы в митохондриях сердца полностью соответствует становлению этого фермента в митохондриях тканей мозга и печени куриного эмбриона по ходу его развития (⁵). Однако изменение активности цитохромоксидазы в сердечной мышце несколько отличается от фермента митохондрий мозга и печени.

Институт биохимии Академии наук Армянской ССР

Մի Բանի Ֆերմենտների ակտիվության համեմատական բնութագրությունը հավի սրտի միտոքոնդրիաներում օնտոգենեզում

Ուսումնասիրվել է ԱՏՖազայի, ցիտոքրոմօքսիդազայի, սուկցինատ-դեհիդրոգենազայի ակտիվությունը հավի օնտոգենեզի տարբեր փուլերում: Ցույց է տվել, որ ընդհանուր ԱՏՖազայի ակտիվությունը հավի սաղմի զարգացման 15-րդ օրից սկսած աճում է, հասնելով իր առավելագույն չափերին 5 օրական ճտերի մոտ (3,95 մկատոմ/մգ սպիտակուցին): Ֆերմենտի ակտիվությունը հասուն հավերի սրտամկանում 5 օրական ճտերի համեմատությամբ չի աճում (3,89 մկատոմ/մգ սպիտակուցին): Na^+ + K^+ , Mg^{++} Ca^{++} — խթանվող ԱՏՖազաների ակտիվությունը ճտի սաղմնային և հետսաղմնային զարգացման շրջանում նույնպես աճում է, սակայն հավերի մոտ 5 օրական ճտերի համեմատությամբ զգալիորեն իջնում է: Այդ պայմաններում ԴՆՖ-ով խթանվող ԱՏՖազայի ակտիվությունը մեծանում է:

Ցիտոքրոմօքսիդազայի ակտիվությունը բարձր է 15 օրական սաղմերի սրտի միտոքոնդրիաներում, հետագա օրերի ընթացքում ֆերմենտի ակտիվությունը որոշ չափով թուլանում է: Սուկցինատդեհիդրոգենազայի ակտիվությունը միտոքոնդրիաներում սաղմի զարգացմանը զուգընթաց աճում է: Բարձր ակտիվություն դիտվում է նաև 5 օրական ճտերի և հասուն հավերի սրտամկանում:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. А. А. Симонян, Г. А. Геворкян, Р. А. Степнян, Л. О. Восканян, «Биол. журн. Армении» т. 29, № 1 (1976).
 2. З. Д. Пугарева, Л. А. Четвериков, Биохимия, т. 15, № 6, 517 (1950).
 3. М. В. Савина, Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 1, № 2, 126 (1965).
 4. О. Н. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
 5. А. А. Симонян, С. Г. Мовсесян, ДАН АрмССР, т. 56, № 3, 178 (1973).