Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 6

*БИОХИМИЯ*

А. И. КОМКОВА и Б. П. УШАКОВ

# ТЕМПЕРАТУРНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ МЫШЦ ТРАВЯНОЙ И ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШЕК

*(Представлено академиком Е. Н. Павловским 1 IV 1955)*

Есть указания, что по температуре инактивации ферментов можно предсказать эффективность акклиматизации вида к новым температурным условиям ([1]). В основу метода определения теплоустойчивости видов по тепловой инактивации ферментов положено представление, согласно которому более теплолюбивые виды обладают более стойкими к нагреванию ферментами. Эта закономерность была впервые обнаружена в лаборатории Х. С. Коштоянца ([2, 3]) при исследовании трипсина двух видов трески из Баренцова и Черного морей и недавно подтверждена Т. И. Привольневым ([4]) на каталазе крови костистых рыб. Так как каталаза крови находится преимущественно в эритроцитах, то опыты Т. И. Привольнева указывают на приложимость этой закономерности и к некоторым внутриклеточным ферментативным системам.

Несмотря на бесспорный практический и теоретический интерес разбираемого вопроса, до сих пор остается неясным, относится ли сформулированное обобщение ко всем пойкилотермным животным или только к рыбам, приложимо ли оно к большинству ферментов или только к трипсину и каталазе. Чтобы ответить на поставленные вопросы, мы выполнили серию экспериментов, в которых сравнивалась теплоустойчивость аденозинтрифосфатной (АТФ-азной) активности мышц озерной и травяной лягушек (Rana ridibunda Pall. и R. temporaria L.).

По своим экологическим особенностям озерная лягушка по сравнению с травяной является более теплолюбивым видом ([5]) и, соответственно, ее распространение захватывает более южные районы Советского Союза ([6]). Эта особенность делает выбранные нами два вида лягушек очень удобными объектами для сравнительно-экологического исследования теплоустойчивости ферментов.

Травяные лягушки были пойманы в окрестностях Ленинграда, а озерные — возле станицы Ключевой Краснодарского края. Все опыты ставились в апреле на изолированных портняжных мышцах. Одна из парных мышц (контрольная) сохранялась в растворе Рингера при температуре 20—21°; опытная мышца опускалась в сосуд Дюара, наполненный нагретым раствором Рингера, температура которого поддерживалась с точностью $\pm 0{,}2°$; нагревание продолжалось 5 мин., и затем оба препарата замораживались в жидком кислороде.

Методика исследования АТФ-азной активности почти не отличалась от применявшейся в работе ([7]). Замороженная мышца взвешивалась, растиралась в охлажденной ступке с небольшим количеством воды до гомогенной массы, которая переносилась в охлажденный стаканчик и разводилась водой из расчета 100 мл на 1 г ткани. Эта суспензия служила в качестве ферментативного препарата.

Определение велось в двух параллельных пробах. В каждую пробу брали по 0,05 мл 0,04 *M* $CaCl_2$ и 0,04 *M* $MgCl_2$ (активаторы фермента); 0,3 мл гликоколового буфера с pH 9,3; 0,3 мл Na-АТФ, содержащего 3 мг АТФ *.

В контрольную пробу до инкубации добавлялось 0,6 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Затем во все пробы прибавлялось по 0,4 мл мышечной суспензии, и пробы инкубировались 10 мин. при 30°. После инкубации

Таблица 1

АТФ-азная активность мышц травяной лягушки в микрограммах фосфора на 1 мг ткани за 10 мин. инкубации при 30°

| №№ опытов | 20° | 38° | Разность в % | 20° | 40° | Разность в % | 20° | 42° | Разность в % | 20° | 44° | Разность в % | 20° | 46—50° | Разность в % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 9,2 | 17,0 | +80 | 6,6 | 2,3 | —65 | 7,0 | 0,8 | —89 | 4,5 | 0,2 | —96 | 5,6 | 0,9 | —84 |
| 2 | 11,9 | 11,4 | —5 | 15,0 | 3,0 | —80 | 3,3 | 0,0 | —100 | 6,2 | 0,0 | —100 | 3,5 | 0,5 | —85 |
| 3 | 8,2 | 16,3 | +100 | 5,5 | 1,5 | —72 | 4,8 | 0,0 | —100 | 6,5 | 2,8 | —57 | 13,5 | 2,2 | —84 |
| 4 | 8,9 | 10,6 | +20 | 8,3 | 1,3 | —84 | 11,4 | 0,4 | —97 | 11,8 | 0,0 | —100 | 3,8 | 0,5 | —87 |
| 5 | 4,4 | 6,9 | +56 | 2,9 | 0,7 | —85 | 10,4 | 2,8 | —73 | — | — | — | 3,3 | 0,3 | —91 |
| 6 | — | — | — | — | — | — | 5,8 | 1,4 | —76 | — | — | — | — | — | — |
| 7 | — | — | — | — | — | — | 13,7 | 1,2 | —92 | — | — | — | — | — | — |
| 8 | — | — | — | — | — | — | 15,0 | 1,2 | —94 | — | — | — | — | — | — |
| Средн. арифм. | — | — | +50 | — | — | —77 | — | — | —90 | — | — | —88 | — | — | —86 |

АТФ-аза инактивировалась 0,6 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Через 10 мин. пробы центрифугировали и в центрифугате по методу Фиске и Суббароу определяли неорганический фосфор. АТФ-азная активность вычислялась по разности неорганического фосфора в опытной и контрольной пробах и рассчитывалась в μг P на 1 мг мышцы.

Всего было поставлено 48 парных опытов, из них 30 на мышцах травяных лягушек и 18 — на мышцах озерных.

По данным П. М. Зубенко и сотр., АТФ-азная активность мышц, взятых от различных экземпляров одного вида лягушек, значительно варьирует, но между парными мышцами, выделенными из одного организма, различие не превышает ±14,0%. Специальные опыты, поставленные нами на правой и левой мышцах одной и той же лягушки, в общем подтвердили данные перечисленных авторов: в 3 опытах различие активности не превышало ±10%. Однако в одном опыте на вялой травяной лягушке различие активности АТФ-азы между двумя парными мышцами было равно 40%. Поэтому мы ставили минимум 5 повторных опытов в той зоне температур, с которой начинается отчетливая инактивация ферментов и которая представляла для нас наибольший интерес **.

В табл. 1 представлен материал, касающийся действия повышенных температур на ферментативную активность портняжных мышц травяных лягушек. Как видно из таблицы, после нагревания мышц при 38° в 4 опытах из 5 наблюдается резкое увеличение АТФ-азной активности мышц в

* Na-АТФ готовился из Ba-АТФ по методу, описанному в руководстве ([8]).

** Для грубого сравнения теплоустойчивости ферментов можно ограничиться 5 повторными исследованиями, так как выпадающие из ряда эксперименты встречаются довольно редко (см. таблицу) и одно отклонение из 5 опытов на 30—40% может изменить среднюю величину максимум на 10%, что для решения поставленной нами задачи не имеет существенного значения.

среднем в 1,5 раза. Интересно отметить, что портняжная мышца лягушки при этом не теряет возбудимости и способна отвечать на раздражения *. 5-минутное нагревание мышцы при 40° ведет к исчезновению возбудимости и снижает активность АТФ-азы в среднем на 77%. Полная инактивация фермента наблюдается, как правило, начиная с 42°. Величины, получаемые в этой области температур, лежат в пределах различий АТФ-азных свойств правой и левой конечности. Из этих опытов следует, что тепловая инактивация АТФ-азных свойств мышц травяной лягушки

Таблица 2

АТФ-азная активность мышц озерной лягушки в микрограммах фосфора на 1 мг ткани за 10 мин. инкубации при 30°

| №№ опытов | 20° | 44° | Разность в % | 20° | 46° | Разность в % | 20° | 48° | Разность в % | 20° | 50° | Разность в % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4,3 | 5,1 | +20 | 4,5 | 8,3 | +84 | 6,0 | 4,2 | —30 | 7,0 | 0,3 | — 96 |
| 2 | 4,9 | 6,7 | +36 | 6,7 | 6,5 | — 3 | 4,8 | 5,5 | +15 | 6,9 | 0,0 | —100 |
| 3 | — | — | — | 9,5 | 5,8 | —39 | 4,8 | 3,6 | —25 | 7,0 | 0,0 | —100 |
| 4 | — | — | — | 12,3 | 3,9 | —68 | 9,7 | 5,5 | —39 | 9,5 | 0,0 | —100 |
| 5 | — | — | — | 8,5 | 8,9 | + 5 | 14,4 | 9,7 | —34 | 6,5 | 0,7 | — 90 |
| Средн. арифм. . . | — | — | +28 | — | — | — 4 | — | — | —23 | — | — | — 97 |

начинается при температуре около 40°, а температура в 42° вызывает полную инактивацию фермента.

АТФ-азная активность мышечной ткани озерной лягушки из-за недостатка животных исследовалась нами менее подробно. Тем не менее, уже первые опыты показали, что аденозинтрифосфатаза мышцы озерной лягушки более устойчива к действию повышенных температур. Из 5 опытов с нагреванием мышц при 46° в 3 не наблюдалось снижения каталитической активности (табл. 2). Средняя же величина АТФ-азной активности опытной мышцы мало отличалась от контрольной, несмотря на то обстоятельство, что возбудимость мышц была потеряна. Отчетливая инактивация АТФ-азной активности наблюдалась лишь при 48°, но все же и в этом случае она снижалась меньше чем на 40%. Наконец, температура, равная 50°, вызывала полную инактивацию АТФ-азных свойств. Таким образом, в отличие от травяной лягушки, у озерной лягушки температурная инактивация АТФ-азной активности происходит в зоне более высоких температур.

В опытах М. Н. Любимовой и В. А. Энгельгардта (9) было впервые показано, что теплоустойчивость миозина зависит от количества АТФ и добавление последней резко повышает устойчивость фермента к нагреванию. Поскольку в наших опытах нагреванию подвергались мышцы до добавления субстрата, то возник вопрос, не обусловлено ли различие в термостабильности аденозинтрифосфатазы мышц обоих видов лягушек различным содержанием в них аденозинтрифосфорной кислоты.

Непосредственное определение лабильного фосфора АТФ в покоящихся портняжных мышцах травяной и озерной лягушек показало, что больших различий в содержании АТФ между ними не наблюдается. Содержание лабильного фосфора АТФ у мышц травяной лягушки в среднем оказалось равным 45 мг%, а у озерной 41 мг%. Эти данные позволяют считать, что обнаруженное различие в температурной инактивации объяс-

* Раздражение электрическим током производилось при помощи санного аппарата Дюбуа-Реймона, в первичную цепь которого были включены батареи (4,5 в).

няется свойствами самого фермента, а не зависит от количества содержащейся в мышцах АТФ.

Результат работы показывает, что зависимость теплоустойчивости ферментов от условий существования вида не ограничивается классом рыб, но является более широкой биологической закономерностью, распространяющейся также на амфибий и, по всей вероятности, общей для всех холоднокровных животных. Она охватывает как внутриклеточные, так и внеклеточные ферменты и доказывает адаптивное приспособление белкового субстрата пойкилотермных животных к температурным условиям существования видов.

Зоологический институт
Академии наук СССР и
Ленинградский государственный
университет им. А. А. Жданова

Поступило
20 III 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] С. В. Стрельцова, Изв. Всесоюзн. н.-и. инст. озерн. и речн. рыбн. хоз., **32**, 223 (1953). [2] Х. С. Коштоянц, П. А. Коржуев, Зоол. журн., **13**, 71 (1934). [3] П. А. Коржуев, Физиол. журн. СССР, **21**, 433 (1936). [4] Т. И. Привольнев, Изв. Всесоюзн. н.-и. инст. озерн. и речн. рыбн. хоз., **33**, 127 (1953). [5] А. Г. Банников, Зоол. журн., **22**, 340 (1943). [6] П. В. Терентьев, С. А. Чернов, Определитель пресмыкающихся и земноводных, М., 1949. [7] П. М. Зубенко, А. Д. Рева, Е. Т. Плахотишина, Биохимия, **15**, 79 (1950). [8] Н. П. Мешкова, С. Е. Северин, Практикум по биохимии животных, 1950. [9] М. Н. Любимова, В. А. Энгельгардт, Биохимия, **4**, 716 (1939).