

<https://doi.org/10.3176/biol.1969.2.03>

А. КАНГУР

О ВЛИЯНИИ КАТИОНОВ, pH И ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ ЭКСТРАКТОВ МЫШЦ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ ОЗЕРА ВЬРТСЪЯРВ

При биохимическом исследовании видовых и сезонных особенностей промысловых рыб озера Вьртсъярв нами были выявлены некоторые различия в динамике белков и азотистых экстрактивных веществ мышечной ткани (Кангур, 1966), а также в динамике Mg^{++} - и Ca^{++} -активируемой АТФ-азы гомогенатов и экстрактов мышц леща, окуня, судака и щуки по сезону (Кангур, 1968).

В последнее время в литературе появились данные о том, что АТФ-азная активность в мышечной ткани у различных видов животных зависит от присутствия и соотношения одно- и двухвалентных катионов (Mackie, 1966; Maruyama, Ishikawa-Katsuki, 1966; Nihei и др., 1966; Takahashi, 1962; Villafranca, Naumann, 1964), от pH (Kielley, 1961; Bokdawala, George, 1964; Buttкус, 1966 и др.) и от температуры (Licht, 1964; Maruyama, Ishikawa, 1965; Оганесян, Петросян, 1964; Виноградова, 1965; Заалишвили и др., 1966 и др.). В настоящей работе нами поставлена задача на базе этих данных более подробно исследовать влияние ионов кальция и магния, а также pH и температуры на АТФ-азу KCl-экстрактов мышц тех же четырех видов рыб озера Вьртсъярв.

Материал и методика

Объектами исследования служили лещ (20 особей), судак, окунь и щука (по 18 особей). Анализы проводились с июля по октябрь 1967 года. Согласно данным предыдущей работы (Кангур, 1968), экстракты мышц рыб, извлеченные 0,6M KCl, обладают более высокой АТФ-азной активностью, чем гомогенаты. Поэтому в данной работе использованы KCl-экстракты. Методики приготовления экстрактов и определения их АТФ-азной активности приведены ранее (Кангур, 1968).

При изучении температурной зависимости АТФ-азная активность экстрактов сиределялась при разной температуре: $0^{\circ} \dots 44^{\circ} C$. Для определения оптимума pH АТФ-азы экстрактов были использованы пять буферных растворов: 0,05M глицин-HCl-буфер для получения pH 2,2, 2,6, 3,0 и 3,4; 0,05M ацетатный буфер — pH 3,8, 4,2 и 4,6; 0,05M трис-малеатный буфер — pH 5,2, 5,6, 6,1 и 6,45; 0,05M трис-HCl-буфер — pH 7,0, 7,6, 8,2 и 8,8 и глицин-NaOH-буфер — pH 9,3, 9,75, 10,2 и 10,65. Одинаковая конечная концентрация ионов натрия (0,048M) во всех буферных растворах была достигнута добавлением соответствующих количеств 2M раствора хлористого натрия. При сравнительном определении влияния катионов на АТФ-азную активность экстрактов инкубационные смеси варьировались следующим образом: 0,5 мл экстракта и 0,2 мл H_2O (конечная концентрация ионов калия — 0,075M), 0,5 мл экстракта и 0,2 мл 0,2M $CaCl_2$ (0,010M), 0,5 мл экстракта и 0,2 мл 0,03M $MgCl_2$ (0,0015M).

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 приведена зависимость активности АТФ-азы экстрактов мышц от рН в присутствии в одном случае ионов кальция, в другом — ионов магния. Как явствует из этих данных, характер кривых зависит не столько от вида рыб, сколько от ионов, в присутствии которых определена активность. Для обоих катионов характерно одинаковое резкое повышение активности АТФ-азы в пределах рН 5—6 и столь же резкое падение ее при рН 9,3—10,2. В присутствии ионов магния у трех видов — леща, щуки и судака — кривые АТФ-азной активности имеют одну широкую оптимальную зону между рН 6,5 и 9,4. У судака обнаружен и другой тип кривых изменений АТФ-азной активности с более узким большим оптимумом при рН 6,7—7,8 и малым оптимумом при значениях рН 9,2—9,4. У окуня в присутствии ионов магния отмечено также два оптимума — большой при рН 6,5—7,7 и малый, более узкий, — при рН 9,3.

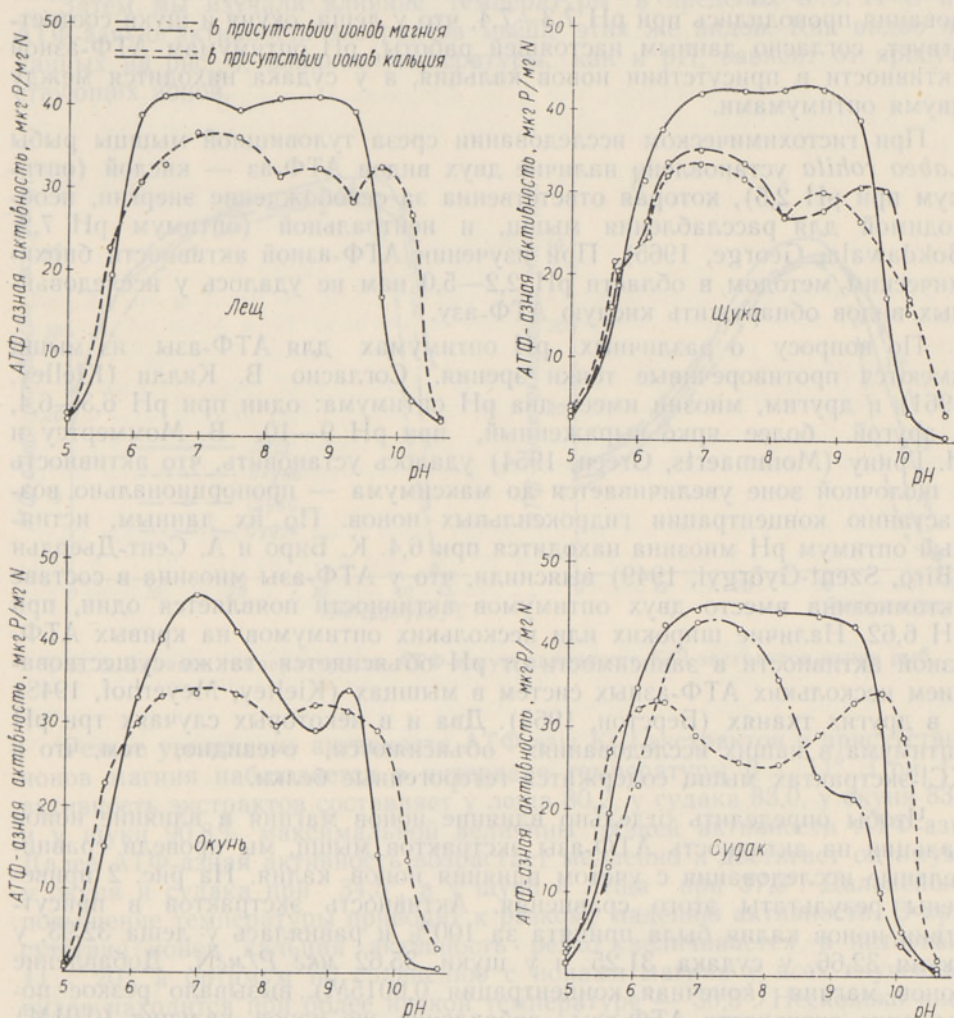


Рис. 1. Влияние рН на активность АТФ-азы КС1-экстрактов мышц рыб.

В присутствии ионов кальция АТФ-азная активность мышечных экстрактов у окуня, судака и щуки имеет два рН оптимума, у леща — три. У окуня оба оптимума плоские, один при рН 6,3—7,8, второй при рН 8,4—9,4. У судака оптимумы резче и находятся в более кислых (рН 5,9—6,75) и более щелочных (рН 9,2—9,95) средах, причем больший лежит не в нейтральной зоне, как у других изученных видов, а в более щелочной. Аналогичный характер кривой АТФ-азной активности с большим оптимумом в более щелочной зоне был получен на чистом миозине форели (*Salmo gairdneri*) (Buttkus, 1966).

Кривая зависимости АТФ-азной активности от рН экстрактов мышц леща имеет три оптимума — большой при рН 6,5—7,9, и два малых — при рН 8,4—8,8 и 9,7—9,8. У щуки можно различить два типа кривых. Большой оптимум одинаков для обеих при рН 6,4—7,7; малый у первого типа при рН 8,7—8,9, у второго — при рН 9,3—9,7.

Ранее нами было показано, что судак отличается от других видов наиболее низкой АТФ-азной активностью, особенно в присутствии ионов кальция (Кангур, 1968). Это объясняется, по-видимому, тем, что исследования проводились при рН 7,3—7,4, что у леща, окуня и щуки соответствует, согласно данным настоящей работы, рН оптимумам АТФ-азной активности в присутствии ионов кальция, а у судака находится между двумя оптимумами.

При гистохимическом исследовании среза туловищной мышцы рыбы *Labeo rohita* установлено наличие двух видов АТФ-аз — кислой (оптимум при рН 2,5), которая ответственна за освобождение энергии, необходимой для расслабления мышц, и нейтральной (оптимум рН 7,2; Bokdawala, George, 1965). При изучении АТФ-азной активности биохимическим методом в области рН 2,2—5,0 нам не удалось у исследованных видов обнаружить кислую АТФ-азу.

По вопросу о различных рН оптимумах для АТФ-азы из мышц имеются противоречивые точки зрения. Согласно В. Килли (Kielley, 1961) и другим, миозин имеет два рН оптимума: один при рН 6,3—6,4, а другой, более ярко выраженный, при рН 9—10. В. Моммертсу и И. Грину (Mommaerts, Green, 1954) удалось установить, что активность в щелочной зоне увеличивается до максимума — пропорционально возрастанию концентрации гидроксильных ионов. По их данным, истинный оптимум рН миозина находится при 6,4. К. Биро и А. Сент-Дьердьи (Biro, Szent-Györgyi, 1949) выяснили, что у АТФ-азы миозина в составе актомиозина вместо двух оптимумов активности появляется один, при рН 6,62. Наличие широких или нескольких оптимумов на кривых АТФ-азной активности в зависимости от рН объясняется также существованием нескольких АТФ-азных систем в мышцах (Kielley, Meyerhof, 1948) и в других тканях (Берстон, 1965). Два и в некоторых случаях три рН оптимума в наших исследованиях объясняются, очевидно, тем, что в КСl-экстрактах мышц содержатся гетерогенные белки.

Чтобы определить отдельно влияние ионов магния и влияние ионов кальция на активность АТФ-азы экстрактов мышц, мы провели сравнительные исследования с учетом влияния ионов калия. На рис. 2 приведены результаты этого сравнения. Активность экстрактов в присутствии ионов калия была принята за 100% и равнялась у леща 32,93, у окуня 32,66, у судака 31,25 и у щуки 35,62 $\mu\text{кг P}/\text{мгN}$. Добавление ионов магния (конечная концентрация 0,0015M) вызывало резкое повышение активности АТФ-азы, добавление же ионов кальция (0,01M) у окуня, судака и щуки подавляло активность (статистически досто-

Рис. 2. Сравнительное влияние ионов магния и кальция в присутствии ионов калия на АТФ-азную активность КСI-экстрактов мышц рыб.

верно лишь на экстрактах мышц щуки — $t=5,21$), а у леща незначительно повышалось. Таким образом, активирующее или ингибирующее влияние ионов кальция и магния имеет определенные видовые различия. Это подтверждают и данные литературы. Так, на КСI-экстрактах мышц мечехвоста (*Limulus polyphemus*), полученных и изученных в близких к нашим условиям, было показано, что в отличие от наших результатов ионы кальция активируют, а ионы магния ингибируют или не влияют на АТФ-азу (Villafranca, Naumann, 1964).

Затем мы изучали влияние температуры в пределах $0 \dots 44^\circ\text{C}$ на АТФ-азную активность экстрактов мышц этих же видов. Как видно из данных на рис. 3, влияние температуры, как и рН, зависит от присутствующих ионов.

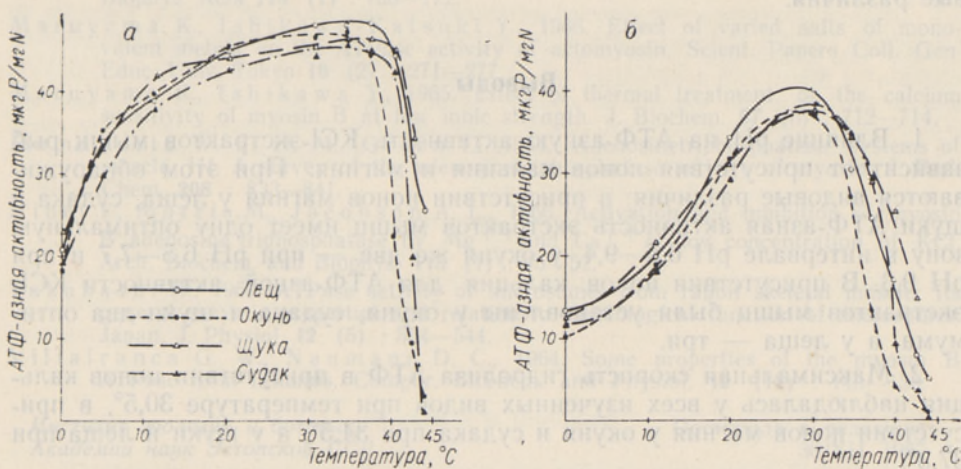


Рис. 3. Влияние температуры на АТФ-азную активность КСI-экстрактов мышц рыб.

Резкое увеличение активности АТФ-азы КСI-экстрактов в присутствии ионов магния наблюдается в интервале температуры $0 \dots 11^\circ$. При 11° активность экстрактов составляет у леща 80,2, у судака 83,0, у окуня 83,6 и у щуки 90,8% максимальной величины общей активности АТФ-азы. Далее АТФ-азная активность возрастает медленно и достигает оптимума у окуня и судака при $34,5^\circ$, а у щуки и леща при $37,3^\circ$. Дальнейшее повышение температуры приводит к резкому падению активности. В присутствии ионов кальция активность резко увеличивается в интервале $11 \dots 20^\circ$, а оптимум по сравнению с ионами магния у всех изученных видов находится при более низкой температуре — $30,5^\circ$. Несколько иная кривая, с резким подъемом при температурах $25 \dots 30^\circ$ и оптимумом при

35°, была получена на миозине В из мышц мечехвоста (Villafranca, Naumann, 1964).

Термоустойчивость ферментов оценивают по скорости инактивации их при повышении температуры выше оптимума. В этом отношении сравнительно выраженной неустойчивостью обладает АТФ-аза из мышц (Любимова, Энгельгардт, 1939; Licht, 1964 и др.). В наших исследованиях более термолabileй оказалась АТФ-аза из мышц окуня. Уже небольшое повышение температуры выше оптимума приводило к значительному падению активности, особенно в присутствии ионов кальция. В последнем случае активность составляла при 34,5°—73,4%, 37,3° — 36,65, 40,3° — 9,65, 42,6° — 4,44 и при 44,0° — 2,92% от максимальной величины. В присутствии ионов магния падение активности происходило медленнее и составляло соответственно — 100, 93,8, 46,9, 19,55 и 6,0% от максимальной активности. Наиболее низкой АТФ-азная активность оказалась у окуня и при 0°, составляя от максимальной под действием ионов кальция 27,55, под действием ионов магния — 36,75%. У более термостабильной щуки эти цифры составляли соответственно 32,35 и 49,1%. Кроме того, у щуки при повышении температуры выше оптимальной активность падала медленнее, чем у других изученных видов. Показатели изменения активности АТФ-азы экстрактов мышц леща и судака в зависимости от температуры занимают промежуточное положение. Исследования показали, что и по влиянию температуры на АТФ-азную активность экстрактов мышц рыб выявляются определенные видо-вые различия.

Выводы

1. Влияние рН на АТФ-азную активность КСI-экстрактов мышц рыб зависит от присутствия ионов кальция и магния. При этом обнаруживаются видовые различия: в присутствии ионов магния у леща, судака и щуки АТФ-азная активность экстрактов мышц имеет одну оптимальную зону в интервале рН 6,5—9,4, у окуня же две — при рН 6,5—7,7 и при рН 9,3. В присутствии ионов кальция для АТФ-азной активности КСI-экстрактов мышц были установлены у окуня, судака и щуки два оптимума, а у леща — три.

2. Максимальная скорость гидролиза АТФ в присутствии ионов кальция наблюдалась у всех изученных видов при температуре 30,5°, в присутствии ионов магния у окуня и судака при 34,5°, а у щуки и леща при 37,3°.

3. В присутствии ионов калия (0,075М) добавление ионов магния (0,0015М) приводит к резкому повышению АТФ-азной активности экстрактов мышц у всех изученных видов. Добавление ионов кальция (0,01М) незначительно увеличивает АТФ-азную активность только у леща, а у остальных видов подавляет ее.

ЛИТЕРАТУРА

- Берстон М., 1965. Гистохимия ферментов. М.
 Виноградова А. Н., 1965. Устойчивость к нагреванию актомиозина и миозина двух видов лягушек. Теплоустойчивость клеток животных (8) : 186—192.
 Заалишвили М. М., Гачечиладзе Н. А., Курдованидзе И. А., 1966. Влияние температуры на АТФ-азную активность миозина гладкой и поперечно-полосатой мышц. Сообщ. АН Груз. ССР 43 (2) : 383—387.

- Кангур А. К., 1966. О сезонной динамике белков, азотистых экстрактивных веществ и аденозинтрифосфатазная (АТФ-азная) активность мышц у некоторых видов рыб озера Вуртъярв (Эстонская ССР). Тез. докл. Всесоюз. сов. по экол. физиол. рыб. М. : 40—41.
- Кангур А. К., 1968. О сезонных и видовых особенностях аденозинтрифосфатазной активности мышечной ткани рыб. Изв. АН ЭССР. Биол. **17** (1) : 44—56.
- Любимова М. Н., Энгельгардт В. А., 1939. Аденозинтрифосфатаза и миозин. Биохимия **4** (6) : 716—736.
- Оганесян С. С., Петросян В. П., 1964. Изучение теплоустойчивости актомиозина скелетных мышц севанской форели. В кн.: Клетка и температура среды. М.—Л. : 233—235; 243—244.
- Biro K., Szent-Györgyi A., 1949. The effect of actin and physicochemical changes on the myosin ATP-ase system and on washed muscle. Acta Physiol. Acad. Scient. Hung. **11**, 1—19.
- Bokdawala F. D., George J. C., 1965. Acid and neutral ATPases in skeletal muscle. J. Animal Morphol. and Physiol. **12** (2) : 210—219.
- Buttkus H., 1966. Preparation and properties of trout myosin. J. Fish. Res. Board Canada **23** (4) : 563—573.
- Kielley W. W., 1961. Myosine ATPase. The enzymes, **5**, Academic Press, New York : 159—168.
- Kielley W. W., Meyerhof O., 1948. A new magnesium-activated adenosinetriphosphatase. J. Biol. Chem. **176** : 591—598.
- Licht P., 1964. The temperature dependence of myosin-adenosinetriphosphatase and alkaline phosphatase in lizards. Compar. Biochem. and Physiol. **12** (3) : 331—340.
- Mackie J. M., 1966. The effect of adenosine triphosphate, inorganic pyrophosphate and inorganic triphosphate on the stability of cod myosin. Biochim. et Biophys. Acta **115** (1) : 160—172.
- Maruyama K., Ishikawa-Katsuki Y., 1966. Effect of varied salts of monovalent metals on the ATPase activity of actomyosin. Scient. Papers Coll. Gen Educ. Univ. Tokyo **16** (2) : 271—277.
- Maruyama K., Ishikawa Y., 1965. Effect of thermal treatment on the calcium sensitivity of myosin B at low ionic strength. J. Biochem. **57** (5) : 712—714.
- Mommaerts W. F. H. M., Green L., 1954. Adenosinetriphosphatase systems of muscle. III. A survey of the adenosinetriphosphatase activity of myosin. J. Biol. Chem. **208** : 833—841.
- Nihei T., Morris M., Jacobson A. L., 1966. Activation and inhibition of myosin B adenosine triphosphatase by Mg^{++} and Ca^{++} at low concentration of KCl. Arch. Biochem. and Biophys. **113** (1) : 45—52.
- Takahashi H., 1962. ATPase activity of microsomes from rabbit skeletal muscle; its general enzymic properties and relation to physiological function of microsomes. Japan. J. Physiol. **12** (5) : 534—544.
- Villafranca G. W., Naumann D. C., 1964. Some properties of the myosin B ATPase from *Limulus*. Compar. Biochem. and Physiol. **12** (12) : 143—156.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
30/XII 1967

A. KANGUR

KATIOONIDE, pH JA TEMPERATUURI MÕJUST MÕNINGATE
VÕRTSJARVE KALALIHKIDE LIHASEEKSTRAKTIDE ADENOSIIN-
TRIFOSFATAASSELE AKTIIVSUSELE

Resümee

Uuriti ahvena, latika, haugi ja koha lihaskoe KCl-ekstraktide adenosiintrifosfataassele aktiivsust sõltuvalt pH-st ja temperatuurist kahevalentsete ioonide juuresolekul. Mg^{++} puhul täheldati haugi, koha ja latika adenosiintrifosfataassele aktiivsuse üht optimumi pH-kõveratel vahemikus 6,5—9,4, ahvenal — kahte: vahemikus 6,5—7,7 ja 9,3 juures. Ca^{++} juuresolekul muutub kõverate iseloom: kohal, haugil ja ahvenal täheldati kahte, latikal — kolme optimumi.

ATF-i hüdrolüüs toimus kõikidel uuritud liikidel maksimaalse kiirusega Ca^{++} juuresolekul $30,5^\circ$ juures, Mg^{++} juuresolekul ahvenal ja kohal $34,5^\circ$ juures ning haugil ja latikal $37,3^\circ$ juures. K^+ (75 mM) juuresolekul kutsus Mg^{++} (1,5 mM) järgnev lisamine esile lihaseekstraktide adenosüinofosfataasse aktiivsuse järsu tõusu kõikidel uuritud kala-liikidel. Ca^{++} (10 mM) lisamine tõstis adenosüinofosfataasset aktiivsust vaid latika lihaseekstraktidel, ülejäänud kolmel liigil aga alandas.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse
30. XII 1967

A. KANGUR

ON THE EFFECTS OF CATIONS, pH AND TEMPERATURE
ON THE ATPase ACTIVITY OF THE MUSCLE EXTRACTS OF
SOME FISH SPECIES IN LAKE VÖRTSJÄRV

Summary

The ATPase activity of the muscle KCl-extracts of four fish species — perch, bream, pike and pike-perch — was studied, as depending on the pH and temperature, in the presence of divalentions. In the presence of Mg^{++} one broad optimum of the ATPase activity of pike, pike-perch and bream was stated in the pH-curves in the intervals of 6.5—9.4, etc. Those of perch showed two broad optima in the pH-curves within the range of 6.5—7.7 and at pH 9.3. In the presence of Ca^{++} the character of the curves changes: the curves of pike-perch, pike and perch reveal two optima, and those of bream — three.

The ATP hydrolysis was effected at maximum speed in the presence of Ca^{++} in all the species studied, at $30,5^\circ\text{C}$, and in the presence of Mg^{++} — in perch and pike-perch — at $34,5^\circ$, and in pike and bream — at $37,3^\circ$. In the presence of K^+ (75 mM) a subsequent addition of Mg^{++} (1.5 mM) called forth an abrupt increase in the ATPase activity of muscle extracts of all the species studied. An addition of Ca^{++} (10 mM) increased the ATPase activity of the muscle extracts of bream only, whereas it had a decreasing effect on the ATPase activity of the muscle extracts of the remaining three species.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Zoology and Botany

Received
Dec. 30, 1967