

И. Ф. СЕЙЦ и член-корреспондент АН СССР В. А. ЭНГЕЛЬГАРТ

### ПАСТЕРОВСКИЙ ЭФФЕКТ И СОПРЯЖЕННОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Биологическая роль дыхания в существовании аэробного организма характеризуется двумя основными чертами. Во-первых, дыхание служит первичным источником энергии для осуществления всех функций клетки; во-вторых, оно прекращает расточительный аноксидативный распад углеводов — брожение или гликолиз. Энергия процессов дыхания используется клеткою не непосредственно, а косвенным путем: она трансформируется в энергию макроэргических фосфатных связей, и лишь последние, в форме аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), служат непосредственным источником энергии для клеточных функций. Дыхание, как поставщик энергии, и клеточная функция, за счет этой энергии осуществляемая, оказываются разделенными в химическом отношении и во времени друг от друга <sup>(1)</sup>. В основе указанной трансформации энергии лежит так называемое сопряженное фосфорилирование: дыхание сопровождается вовлечением минерального фосфата в органически связанную форму, и энергия окислительных процессов используется для того, чтобы перевести образовавшиеся связи на более высокий энергетический уровень, т. е. превращает их в связи макроэргического типа. Если прекращается генерирование макроэргических фосфатных связей, то клетка утрачивает источник движущей силы для своих функций, и последние не могут нормально осуществляться. Другая сторона биологической роли дыхания выражается в так называемом «пастеровском эффекте»: дыхание подавляет брожение. В основе этого эффекта лежит выключение определенных звеньев процесса брожения (ср. <sup>(2)</sup>), но детали механизма этого явления еще ожидают своего выяснения.

Указанные две стороны биологической роли дыхания всегда рассматривались как совершенно независимые, автономные одна от другой, и никогда не высказывалось мысли о существовании между ними какой-либо внутренней связи. Это, повидимому, ошибочно. Как будет видно из приводимого экспериментального материала, имеются основания считать, что между сопряженным с дыханием («дыхательным») фосфорилированием и осуществлением пастеровского эффекта существует определенная внутренняя связь. Здесь мы ограничиваемся изложением наблюдений, указывающих на наличие такого рода связи, вопрос же об ее внутренней природе затрагиваться не будет. О существовании указанной связи свидетельствует то обстоятельство, что обе стороны биологической функции дыхания могут быть выключены действием одних и тех же веществ. Оказывается, что вещества, выключающие одну из двух указанных функций дыхания, неизменно выключают и другую.

В последнее время стали известны яды, лишаящие дыхание способности обеспечивать выполнение клеткою ее нормальных физиологических функций (движение спермиев, регенеративный рост тканей, ассимиляция пищевых веществ, выработка адаптивных энзимов, и т. д.). Типичными

ядами этого рода являются азиды и  $\alpha$ -динитрофенол (ДНФ). При их действии дыхание клетки в количественном отношении практически сохраняется без изменений, но претерпевает глубокое качественное изменение: оно перестает служить движущей силой для разнообразных проявлений жизнедеятельности. Можно сказать, что дыхание начинает идти «на холостом ходу»: сохранив свою интенсивность, оно утрачивает свою биологическую эффективность. Поскольку использование энергии дыхания, как указывалось, осуществляется через выработку макроэргических фосфатных связей путем дыхательного фосфорилирования, естественно заключить, что наблюдаемый при действии ядов «холостой ход» дыхания является следствием нарушения сопряженного фосфорилирования. Однако прямыми опытами подобный эффект был показан лишь в очень небольшом числе случаев.

Известны также яды, лишаящие дыхание способности подавлять брожение, т. е. снимающие пастеровский эффект. Первым таким, ставшим известным «пастеровским ядом» был этилкарбиламин (ЭКА), т. е. этилизоциановый эфир <sup>(3)</sup>. Имелись указания на снятие пастеровского эффекта глутатионом, фенилгидразином и т. п. С другой стороны, имелись наблюдения, свидетельствовавшие о том, что в некоторых случаях дыхание утрачивает способность поддерживать нормальное содержание лабильных, макроэргических соединений в клетке. В опытах на ядерных эритроцитах было обнаружено, что в присутствии метиленовой сини, несмотря на продолжающееся в нормальном (или даже повышенном) темпе потребление кислорода, наступает быстрый распад АТФ, совершенно так же, как это происходит в условиях совершенно выключенного дыхания <sup>(4)</sup>. Это явление было обозначено как «аэробное удушье». Позднее было найдено, что при этом наступает и резкое возрастание потребления сахара, с образованием молочной кислоты и других продуктов распада, т. е. имеет место снятие пастеровского эффекта. По опытам В. С. Шапота <sup>(5)</sup>, аналогичные явления наблюдаются при обработке ядерных эритроцитов нитритом. Эти факты могли бы служить указанием на существование связи между пастеровским эффектом и сопряженным фосфорилированием (за счет которого при нормальном дыхании поддерживается постоянство содержания АТФ). Однако в свое время такого вывода из них не было сделано. Между тем, оказалось, что наблюдавшееся в указанных случаях двойственное действие ядов — снятие пастеровского эффекта и снятие сопряженного фосфорилирования — не случайно. Как видно из приводимых здесь опытов, это может рассматриваться в качестве проявления общей закономерности, указывающей на существование тесной внутренней связи между двумя сторонами биологической функции дыхания.

Опыты проводились на различных типах клеток, далеко различающихся по своей природе, — на ядерных эритроцитах птиц (голубь, гусь), на пекарских дрожжах, на клетках асцитической раковой опухоли\*.

В качестве ядов использовались: азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ), ДНФ, ЭКА (синтезирован нами по Готье <sup>(6)</sup> и очищен по Тода <sup>(7)</sup>, т. кип. 76—78°, уд. вес 0,75, что соответствует литературным данным), нитрит, мышьяковокислый натрий. Результаты опытов сведены в табл. 1 и могут быть подытожены следующим образом.

**Ядерные эритроциты.** Критерием наличия дыхательного фосфорилирования здесь служит сохранение постоянства количества АТФ. Выключение дыхания цианидом ведет к быстрому распаду АТФ. ДНФ, азид, нитрит (в соответствии с данными Шапота) в концентрациях, практически не влияющих на дыхание, вызывают такой же распад АТФ, как и выключение дыхания цианидом. При этом одновременно начинается и аэробный гликолиз того же порядка интенсивности,

\* Принесим благодарность Л. М. Шабаду за предоставление штамма опухоли и Н. В. Ельциной за культивирование ее на мышцах.

Таблица 1

(Все величины (кроме концентрации яда) в микромолях; для эритроцитов — на 1 мл клеток; для дрожжей и клеток раковой опухоли — на 1 г сырого веса. Брожение: прирост  $\text{CO}_2$ ; гликолиз: молочная кислота)

| Опыт   | Проба; вид яда и его концентрация в мол.                 | Срок инкубации в мин. | Дыхание в ммол. | Гликолиз в ммол. | Брожение в ммол. | Фосфор в ммол. |            |             |            |
|--|--|-----------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|------------|-------------|------------|
|  |  |                       |                 |                  |                  | АТФ (Р7 мин)   |            | Минеральный |            |
|  |  |                       |                 |                  |                  | найде-но       | изме-нение | найде-но    | изме-нение |
| <b>Я д е р н ы е э р и т р о ц и т ы</b>       |  |                       |                 |                  |                  |                |            |             |            |
| А  | Начальная . . . . .                                      | 0                     | —               | 0,6              | 10,3             | —              | 7,6        | —           | —          |
|  | Контроль (без яда) . . . . .                             | 180                   | 14,9            | 0,9              | 9,5              | -0,8           | 10,0       | + 2,4       | —          |
|  | ДНФ $2 \cdot 10^{-4}$ . . . . .                          | 180                   | 15,8            | 13,0             | 1,3              | -9,0           | 22,1       | +14,5       | —          |
|  | KCN $2 \cdot 10^{-3}$ . . . . .                          | 180                   | 3,1             | 15,0             | 0,9              | -9,4           | 23,0       | +15,4       | —          |
| Б  | Начальная . . . . .                                      | 0                     | —               | 0,0              | 6,8              | —              | 2,8        | —           | —          |
|  | Контроль . . . . .                                       | 120                   | 12,7            | 0,6              | 6,2              | -0,6           | 3,1        | + 0,3       | —          |
|  | $\text{NaN}_3$ $1,66 \cdot 10^{-2}$ . . . . .            | 120                   | 12,2            | 2,6              | 5,7              | -1,1           | 4,7        | + 1,9       | —          |
|  | $\text{NaN}_3$ $3,3 \cdot 10^{-3}$ . . . . .             | 120                   | 10,3            | 9,1              | 2,8              | -4,0           | 8,2        | + 5,4       | —          |
| В  | Начальная . . . . .                                      | 0                     | —               | 0,0              | 6,6              | —              | 2,9        | —           | —          |
|  | Контроль . . . . .                                       | 120                   | 12,3            | 0,5              | 6,0              | -0,6           | 3,0        | + 0,1       | —          |
|  | ЭКА $2 \cdot 10^{-2}$ . . . . .                          | 120                   | 11,5            | 2,2              | 5,8              | -0,8           | 4,1        | + 1,2       | —          |
|  | ЭКА $2,7 \cdot 10^{-2}$ . . . . .                        | 120                   | 8,7             | 6,8              | 5,7              | -0,9           | 6,4        | + 3,5       | —          |
| Г  | Начальная . . . . .                                      | 0                     | —               | —                | 7,3              | —              | 4,0        | —           | —          |
|  | Контроль . . . . .                                       | 90                    | 10,5            | —                | 7,8              | +0,5           | 4,1        | + 0,1       | —          |
|  | $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ $1,5 \cdot 10^{-2}$ . . . . . | 90                    | 10,0            | —                | 5,4              | -1,9           | 6,7        | + 2,7       | —          |
| Д  | Начальная . . . . .                                      | 0                     | —               | 0,4              | 7,5              | —              | 12,6       | —           | —          |
|  | Контроль . . . . .                                       | 240                   | 26,3            | 1,2              | 6,8              | -0,7           | 13,0       | + 0,4       | —          |
|  | $\text{NaNO}_2$ (предварит. обработка) . . . . .         | 240                   | 25,5            | 20,0             | 0,6              | -6,9           | 20,6       | + 8,0       | —          |
|  | ДНФ . . . . .  | 240                   | 31,3            | 20,8             | 0,4              | -7,1           | 21,1       | + 9,5       | —          |
| <b>П е к а р с к и е д р о ж ж и</b>           |  |                       |                 |                  |                  |                |            |             |            |
| А  | Контроль . . . . .                                       | 60                    | 1348            | —                | 0                | —              | —          | —           | -28,0      |
|  | ДНФ $2 \cdot 10^{-4}$ . . . . .                          | 60                    | 1528            | —                | 912              | —              | —          | —           | $\pm 0$    |
|  | KCN $2 \cdot 10^{-3}$ . . . . .                          | 60                    | 536             | —                | 984              | —              | —          | —           | - 2,8      |
| Б  | Контроль . . . . .                                       | 60                    | 2320            | —                | 0                | —              | —          | —           | -65,6      |
|  | $\text{NaN}_3$ $1,6 \cdot 10^{-4}$ . . . . .             | 60                    | 2048            | —                | 2860             | —              | —          | —           | -28,4      |
|  | ДНФ $2 \cdot 10^{-4}$ . . . . .                          | 60                    | —               | —                | 2732             | —              | —          | —           | $\pm 0$    |
| В  | Контроль . . . . .                                       | 60                    | 2732            | —                | 0                | —              | —          | —           | -64,0      |
|  | $\text{NaNO}_2$ $3,6 \cdot 10^{-3}$ . . . . .            | 60                    | 2628            | —                | 1960             | —              | —          | —           | -32,0      |
| Г  | Контроль . . . . .                                       | 60                    | 2088            | —                | 0                | —              | —          | —           | -44,0      |
|  | ЭКА $1 \cdot 10^{-2}$ . . . . .                          | 60                    | 1932            | —                | 340              | —              | —          | —           | -40,0      |
|  | ДНФ $2 \cdot 10^{-4}$ . . . . .                          | 60                    | —               | —                | 2052             | —              | —          | —           | $\pm 0$    |
| Д  | Контроль . . . . .                                       | 60                    | 2072            | —                | —                | —              | —          | —           | -41,2      |
|  | $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ $5 \cdot 10^{-4}$ . . . . .   | 60                    | 2000            | —                | —                | —              | —          | —           | -16,0      |
|  | $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ $1 \cdot 10^{-3}$ . . . . .   | 60                    | 1640            | —                | —                | —              | —          | —           | - 4,0      |
| <b>К л е т к и р а к о в о й о п у х о л и</b> |  |                       |                 |                  |                  |                |            |             |            |
| А  | Начальная . . . . .                                      | 0                     | —               | —                | 6,8              | —              | 27         | —           | —          |
|  | Контроль . . . . .                                       | 80                    | 60              | 117              | 7,0              | +0,2           | 28,3       | +1,3        | —          |
|  | ДНФ $2 \cdot 10^{-5}$ . . . . .                          | 80                    | 66              | 205              | 3,4              | -3,4           | 34,3       | +7,3        | —          |

как и при выключении дыхания. Влияние ЭКА на пастеровский эффект выражено слабо: аэробный гликолиз вызывают концентрации яда, существенно снижающие и дыхание; в небольшой степени возрастает и распад АТФ. Таким образом, на этих клетках ЭКА оказался слабым пастеровским ядом и в то же время он слабо влияет на дыхательное фосфорилирование. Мышьяк, не влияя на дыхание, нарушает окислительное фосфорилирование (вызывает распад АТФ).

Нарушение дыхательного фосфорилирования динитрофенолом в ядерных эритроцитах было показано и опытами с использованием радиоактивного фосфата. После 60 мин. инкубации в присутствии  $P^{32}$  фракция органического фосфата в трихлоруксусном фильтрате дала превышение над нулевой пробой на 898 отсчетов/мин.мл клеток, тогда как проба с ДНФ дала величину, практически не отличавшуюся от нулевой пробы (разница в 14 отсчетов/мин.мл клеток).

Пекарские дрожжи. Критерием дыхательного фосфорилирования здесь служила убыль минерального фосфата. ДНФ, азид и нитрит практически полностью снимают пастеровский эффект, при сохраненном дыхании возникает аэробное брожение, по интенсивности близкое к анаэробному (на цианиде). При этом убыль фосфора, сопровождающая нормальное дыхание, совершенно прекращается на ДНФ, сильно снижается на азиде и нитрите, свидетельствуя о выключении дыхательного фосфорилирования. ЭКА и здесь дает очень небольшое подавление пастеровского эффекта — аэробное брожение составляет всего около 15% от анаэробного; о плохо выраженном действии ЭКА на пастеровский эффект в дрожжах указывает и сам Варбург<sup>(3)</sup>. Мышьяк резко снижает дыхательное фосфорилирование при сохраненной интенсивности дыхания.

Клетки раковой опухоли. ДНФ, не снижая величины дыхания, резко повышает гликолиз и нарушает сопряженное фосфорилирование.

Выводы из приведенных опытов таковы: яды, выключающие сопряженное дыхательное фосфорилирование, оказались одновременно и мощными агентами, выключающими пастеровский эффект. Таким образом, выявлены новые «пастеровские яды», значительно превышающие по эффективности такой, считавшийся «классическим» яд, как этилкарбиламин. Этими ядами являются динитрофенол, азид, а также нитрит, который, помимо ранее обнаруженного действия на ядерных эритроцитах<sup>(5)</sup>, оказывает тот же эффект и на дрожжах, вызывая аэробное брожение и снимая дыхательное фосфорилирование. Мышьяк, снимающий, как давно известно, гликолитическое фосфорилирование, оказался обладающим сходным (хотя и не очень выраженным) действием в отношении фосфорилирования, сопряженного с дыханием. Можно ждать, что он будет влиять и на пастеровский эффект.

На основании приведенных данных мы вправе считать, что две стороны биологического действия дыхания — генерирование макроэргических фосфатных связей как предпосылка для обеспечения энергией клеточных функций и осуществление пастеровского эффекта — стоят в определенной зависимости между собою. Причину подобной взаимосвязи можно усматривать в наличии в обоих случаях определенных общих звеньев, через посредство которых эта связь осуществляется.

Институт экспериментальной медицины  
Академии медицинских наук СССР  
Ленинград

Поступило  
24 III 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. А. Энгельгардт, Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 182 (1945). <sup>2</sup> В. А. Энгельгардт, Усп. совр. биол., 17, 237 (1944). <sup>3</sup> O. Warburg, Biochem. Z., 172, 432 (1926). <sup>4</sup> В. А. Энгельгардт и В. С. Шапот, Тр. 15-го Международн. физиол. конгресса (Тезисы сообщений), стр. 86, 1935. <sup>5</sup> В. С. Шапот, Биохимия, 16, 45 (1945). <sup>6</sup> M. A. Gautier, Ann. chim. phys., 17, 103 (1869). <sup>7</sup> S. H. Toda, Biochem. Z., 172, 17 (1926).