

В. С. ШАПOT

ПАСТЕРОВСКИЙ ЭФФЕКТ И СТАБИЛИЗАЦИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ В ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ

(Представлено академиком А. И. Опариним 18 II 1949)

В работах В. А. Энгельгардта (1,2) было показано на ядерных голубиных эритроцитах, что подавление дыхания или полное его выключение влечет за собой быстрый прирост неорганического фосфата за счет распада аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Отсутствие прироста неорганического фосфата и примерное постоянство АТФ при нормальном дыхании клеток было истолковано как результат обращения, идущего непрерывно и в аэробных условиях дефосфорилирования АТФ благодаря ее ресинтезу, сопряженному с дыханием. Эта идея о сопряженности окислительных процессов с фосфорилированием и образованием макроэнергических фосфорных соединений подтверждена на разнообразных объектах и изолированных ферментных системах всем ходом современной биохимии.

Впоследствии В. А. Энгельгардтом и автором (3) было обнаружено, что чужеродные акцепторы водорода (хинон, метиленовая синь) в аэробных условиях, не снижая интенсивности дыхания ядерных эритроцитов, в то же время вызывают распад АТФ, т. е. такой же эффект, какой наблюдается в них при выключении дыхания. Это явление было названо тогда «аэробным задушением».

В дальнейшем оказалось, что испытанные химические агенты (хинон, метиленовая синь, а также нитрит (4)) вместе с тем обладают общим свойством — снимать пастеровский эффект в этих клетках, т. е. повышать фактически отсутствующий аэробный гликолиз до уровня анаэробного. Что здесь речь идет именно о снятии пастеровского эффекта, показали специальные опыты с нитритом*, в которых было выяснено, что усиление аэробного гликолиза не сопровождается какими бы то ни было нарушениями в каталитических системах дыхания (4).

Таким образом, возникает парадоксальное положение: в присутствии пастеровских ядов в ядерных эритроцитах на фоне нормального дыхания начинается интенсивный аэробный гликолиз и, несмотря на сосуществование обоих энергетических процессов, из которых одного дыхания бывает достаточно для поддержания в клетках постоянного уровня АТФ, наступает ее неотвратимый распад. Например, в одном из подобных опытов в присутствии нитрата из 184 мкг 7-мин. фосфата через 2 часа распалось 160 мкг на 1 мл эритроцитов, в то время как в нормальных эритроцитах содержание лабильной пирофосфатной фракции не изменилось**. Этот факт наводит на мысль, что стабилизация

* Химические агенты, снимающие пастеровский эффект, мы далее будем условно называть «пастеровскими ядами».

** Количество пирофосфатной фракции в ядерных эритроцитах близко отвечает, согласно энзиматическому анализу (3), истинному содержанию АТФ.

АТФ — процесс сложный и не исчерпывается участием дыхания, что обязательным здесь также должно являться нормальное осуществление пастеровского эффекта.

Это заключение могло бы получить дополнительное обоснование, если бы удалось вызвать снятие пастеровского эффекта принципиально отличным от химического — физическим воздействием и при этом также наблюдать распад АТФ. Оказалось, что можно подобрать условия, при которых повреждение структуры эритроцитов (гемолиз), не снижая дыхания, вызывает появление аэробного гликолиза, близкого к анаэробному (рис. 1). Эти условия состояли в быстром повторном замораживании и оттаивании кашицы ядерных эритроцитов в отсутствие жидкости. Вместе с тем оказалось, что в таких гемолизованных эритроцитах происходит быстрое дефосфорилирование АТФ (рис. 2).

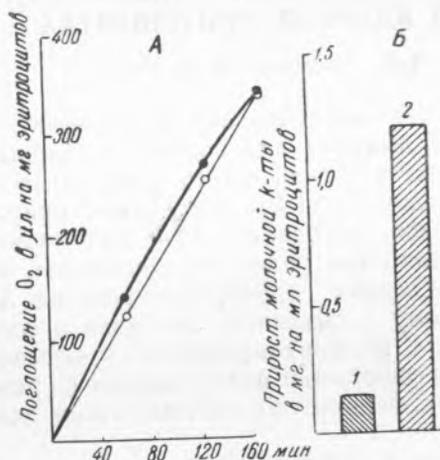


Рис. 1. Дыхание (А) и аэробный гликолиз (Б) в гемолизованных замораживанием эритроцитах

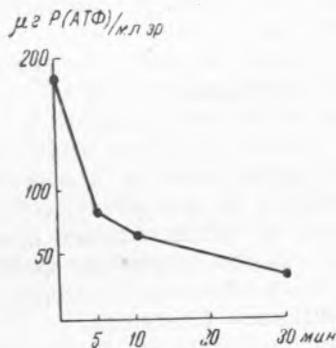


Рис. 2. Дефосфорилирование АТФ в гемолизованных замораживанием эритроцитах

Первопричиной этого дефосфорилирования следует считать именно снятие пастеровского эффекта, наступающее при гемолизе, а не само повреждение структуры, так как в человеческих эритроцитах, где уровень АТФ поддерживается гликолизом (а не аэробными механизмами), гемолиз не приводит к распаду АТФ в присутствии субстрата гликолиза.

В результате всех этих опытов мы считаем себя вправе утверждать, что любые воздействия, снимающие пастеровский эффект в ядерных эритроцитах, должны вызывать тем самым распад АТФ, и что поэтому пастеровский эффект должен быть intimately связан с фосфорным обменом. Таким образом, мы сталкиваемся здесь с новым — «фосфорным» пастеровским эффектом. Последний, наряду со сбережением и более эффективным использованием углеводов, обеспечивает также и сохранение определенного уровня макроэргических соединений в клетке.

В дальнейших опытах мы пытались установить, является ли связь между пастеровским эффектом и стабилизацией АТФ односторонней или двухсторонней (взаимной), т. е. существует ли между ними и обратная зависимость? Иными словами, можно ли в системе с распавшейся АТФ и утраченным пастеровским эффектом восстановить последний добавлением больших количеств АТФ? Для выяснения этого вопроса к гемолизованным замораживанием эритроцитам со снятым пастеровским эффектом добавлялся, наряду с глюкозой, и аденозинтрифосфат натрия, и в них измерялся аэробный и анаэробный гликолиз (табл. 1).

Табл. 1 показывает, что в присутствии АТФ уменьшения аэробного гликолиза не происходит, пастеровский эффект попрежнему остается

нарушенным. Этот факт противоречит известным данным Остерна (6), который наблюдал пастеровский эффект в растертой мышечной кашеце (лягушка) при условии добавления АТФ, которая в то же время стабилизирует дыхание.

Т а б л и ц а 1 *

№№ опы- тов	Мг молочной к-ты на мл эритроцитов за 4 часа		
	Нормальные эритроциты	Гемолизированные эритро- циты	
		без добавл. АТФ	с добавл. АТФ
1	0,13	0,97	0,85
2	0,16	1,11	1,11
3	0,14	0,39	0,98
4	0,12	0,92	0,90

* Суспензия эритроцитов 1:1 (в общем объеме 3 мл); фосфатный буфер рН=7,14; глюкоза—конечная концентрация 0,2 АТФ, соответств. 0,78 мг 7-мин. Р.

Мы повторили опыты Остерна на кашеце из мышц различных животных (лягушка, крыса, кролик), точно следуя указаниям его работы при приготовлении кашецы. Во всех случаях получен был однозначный отрицательный результат. Ни разу мы не наблюдали в мышечной кашеце, утратившей пастеровский эффект, замедления аэробного гликолиза при добавлении больших количеств АТФ по сравнению с контролем. Наоборот, всегда обнаруживалось как в аэробных, так и в анаэробных условиях усиление гликолиза в присутствии АТФ (см., например, рис. 3).

Таким образом, наши опыты не подтверждают данных Остерна, в работах которого нет ни одной цифры, относящейся к прямому измерению гликолиза по накоплению молочной кислоты и все заключения сделаны на основании величин коэффициента Мейргофа, который не может служить удовлетворительным критерием для суждений о наличии или интенсивности пастеровского эффекта (7).

Приведенные факты, следовательно, говорят против существования двухсторонней связи между пастеровским эффектом и стабилизацией АТФ в ядерных эритроцитах. Как же можно себе представить механизм установленной нами односторонней связи?

Несомненно чрезвычайно быстрый темп превращений адениловой системы, участвующей в непрерывном переносе фосфатных групп в окислительных и гликолитических процессах. Кажущаяся стабилизация АТФ в клетке (т. е. сохранение некоего высокого минимального уровня ее) должна являться результатом установления баланса между

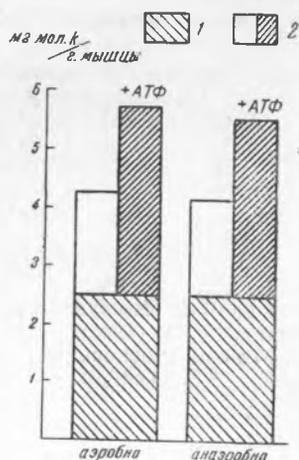


Рис. 3. Аэробный и анаэробный гликолиз в мышечной кашеце лягушки: 1—исходное количество молочной кислоты, 2—прирост молочной кислоты за 90 мин. при 25°С

противоположно направленными процессами дефосфорилирования (аденозинтрифосфатаза) и рефосфорилирования. Последний в таких аэробных клетках, как ядерные эритроциты, обеспечивается в основном (1, 2) окислительными реакциями (дыхание). Отсюда, при учете возможной роли пастеровского эффекта в стабилизации АТФ, следует очевидно, считаться с двумя возможностями: кислород через «пастеровскую систему» (4) тормозит не только определенные звенья ферментативного гликолитического комплекса, но также частично обратимо инактивирует аденозинтрифосфатазу, замедляя дефосфорилирование АТФ. Снятие пастеровского эффекта снимает и задержку в дефосфорилировании, сдвигая баланс в сторону распада АТФ. Действительно, в литературе есть указания (8), что инактивирование аденозинтрифосфатазы флуоридом увеличивает эффективность окислительного фосфорилирования в экстрактах сердечной мышцы. Вторая возможность заключается в том, что выключение пастеровского эффекта нарушает окислительное фосфорилирование, сопряженное с распадом АТФ. Мы в конечном итоге также сдвигаем баланс в сторону распада АТФ. Мы считаем первую возможность более вероятной, так как трудно допустить, что повреждение структуры (как в случае с гемолизатами ядерных эритроцитов) резко нарушает окислительное фосфорилирование, поскольку оно было обнаружено в гомогенатах тканей и даже в экстрактах. Кроме того, в некоторых опытах мы получили указания на чувствительность аденозинтрифосфатазы ядерных эритроцитов к кислороду.

Связь между пастеровским эффектом и стабилизацией АТФ трудно считать каким-то особым случаем, характерным лишь для ядерных эритроцитов. Можно полагать, что в той или иной степени она существует и в других клетках, но наиболее ярко выявляется в таких, где преобладает аэробный обмен с максимальным пастеровским эффектом. С этой точки зрения следует ожидать ее наличия, например, в клетках коры мозга.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР и
Ленинградский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
27 XII 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Энгельгардт, *Biochem. Z.*, **227**, 16 (1930). ² В. А. Энгельгардт, *ibid.*, **251**, 343 (1932). ³ В. А. Энгельгардт и В. С. Шапот, Тезисы сообщений на 15-м Междунар. физиол. конгрессе, 1935, стр. 471. ⁴ В. С. Шапот, *Биохимия*, **10**, 45 (1945). ⁵ А. А. Баев, *Биохимия*, **2**, 454 (1937). ⁶ P. Osterl и T. Mann, *Biochem. Z.*, **276**, 408 (1935). ⁷ В. С. Шапот, Диссертация, ЛГУ, 1947. ⁸ S. Ochoa, *J. Biol. Chem.*, **151**, 493 (1943).