

Н. В. ЕЛЬЦИНА и И. Ф. СЕЙЦ
ОБ ЭНДОГЕННОМ «АНТИПАСТЕРОВСКОМ» ФАКТОРЕ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 25 X 1949)

Многочисленными исследованиями для большинства тканей животных организмов было установлено наличие полного или почти полного пастеровского эффекта (п. э.), т. е. аэробного подавления гликолиза или брожения. Злокачественные новообразования и некоторые нормальные ткани (сетчатка) составляют в этом отношении исключение: они характеризуются наличием аэробного гликолиза, т. е. недостаточно выраженным п. э. Хотя до настоящего времени остаются совершенно неясными механизмы, лежащие в основе осуществления п. э., тем не менее в литературе встречаются многочисленные попытки использовать эти различия между нормальными и злокачественными тканями и при изучении патогенеза злокачественных новообразований и даже в химиотерапевтических целях (применение химических агентов, выключающих в опухолях гликолиз).

В самое последнее время стали известны способы исключения пастеровского эффекта различными экзогенными химическими агентами, как, например, динитрофенолом (ДНФ), азидом и т. д., без какого-либо подавления дыхания⁽²⁾. С другой стороны, в литературе имеются указания на возможность аналогичного нарушения пастеровского эффекта при механическом повреждении клеток и тканей и при снижении парциального давления кислорода⁽³⁾. Тот факт, что столь различные вмешательства приводят к одному и тому же результату — нарушению п. э., заставляет предполагать существование единого механизма, лежащего в основе указанного явления и обусловленного существованием во всех клетках специфического эндогенного антипастеровского фактора, находящегося в нормальных условиях в неактивном состоянии и освобождающегося при разнообразных воздействиях (нарушение клеточной структуры, анаэробиз, действие химических веществ). Эти соображения побудили нас предпринять поиски отделимого от клетки фактора, способного нарушать п. э. в клетках, обладающих выраженным аэробным типом обмена. Известно, что пекарские дрожжи и птичьи эритроциты в условиях хорошей аэрации интенсивно дышат и совершенно не бродят, т. е. обладают полноценным п. э. и могут, таким образом, служить удобным тест-объектом при исследовании указанного вопроса.

Нам удалось показать, что экстракты нормальных и злокачественных тканей действительно содержат фактор, снимающий п. э. на дрожжах и голубиных эритроцитах, не снижая при этом величины дыхания.

Исследуемые нами ткани гомогенизировались в физиологическом растворе, часть гомогената центрифугировалась и экстракт использовался в ряде опытов без дальнейшей обработки; другая часть экстракта гидролизировалась в 0,5 *N* щелочи или кислоте при 100° от 10 до 60 мин. и после нейтрализации и центрифугирования бралась для исследования. Таким

же способом готовились активные препараты из отдельных клеток (эритроциты, дрожжи). В пробы бралось количество экстракта, соответствовавшее 25—50 мг исходной сырой ткани. Действие этих тканевых препаратов изучалось в аппарате Варбурга на суспензии пекарских дрожжей или голубиных эритроцитов в присутствии глюкозы и фосфата. Результаты опытов сведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Пробы содержат: 11 мг дрожжей, 20 мг глюкозы (контроль) и добавки, как указано в таблице (расчет на всю пробу)

№ протокола	Состав проб	Время инкубации в мин.	Дыхание в мм ³ O ₂	Брожение в мм ³ CO ₂	№ протокола	Состав проб	Время инкубации в мин.	Дыхание в мм ³ O ₂	Брожение в мм ³ CO ₂
АПФ из тканей крысы					АПФ из рака грудной железы человека				
8	Контроль (без добавок)	30	220	0	33	Контроль	120	807	0
	АПФ (из плаценты)	30	242	107		АПФ	120	1152	334
	АПФ _Г » »	30	246	171		АПФ _Г	120	980	442
	KCN 5·10 ⁻³ M	30	—	282	АПФ из пекарских дрожжей				
12	Контроль	60	376	0	24	Контроль	120	818	0
	АПФ (из почек)	60	457	354		АПФ _Г	120	970	907
	АПФ _Г » »	60	493	400	АПФ из эритроцитов голубя				
	KCN 5·10 ⁻³ M	60	—	514	26	Контроль	120	826	0
20	Контроль	60	328	0		АПФ _Г	120	1142	824
	АПФ (из мышцы)	60	513	268	АПФ из тканей крысы				
38	АПФ _Г » »	60	382	338	38	Контроль	120	623	0
	Контроль	120	623	0		АПФ (из печени)	120	899	633
	АПФ (из печени)	120	899	633		АПФ _Г » »	120	715	1056
34	АПФ _Г » »	120	715	1056	34	Контроль	120	601	0
	Контроль	120	601	0		АПФ (из саркомы МОП)	120	817	341
	АПФ (из саркомы МОП)	120	817	341		АПФ _Г » » »	120	752	680

Обозначения: препараты антипастеровского фактора, полученного без гидролиза—АПФ; с помощью гидролиза—АПФ_Г.

Из приведенных данных видно, что в гомогенатах всех испытанных крысиных тканей (печень, почка, плацента, мышцы, различные злокачественные новообразования), а также в препаратах из отдельных клеток (эритроциты голубя, пекарские дрожжи) содержится активный эндогенный антипастеровский фактор (АПФ), нарушающий п. э. в дрожжах и эритроцитах. Возникающее аэробное брожение или гликолиз часто достигают уровня пробы с цианидом. Аналогичные результаты получены с сывороткой крови, мышинными нормальными и злокачественными тканями, а также с некоторыми морфологическими структурами клеток (фракция митохондрий, полученная по Клоду (⁴)). Следует особо подчеркнуть, что, наряду с описанным выше действием на п. э., препараты АПФ, подобно известным химическим агентам (ДНФ и др.), нарушают сопряженное фосфорилирование. В табл. 2 приведены опыты с ядерными эритроцитами голубя, где препараты АПФ, полученные из пекарских дрожжей и из крысиной саркомы, вызывали в эритроцитах, с одной стороны, интенсивный аэробный гликолиз, приближающийся по уровню к пробе с ДНФ, и с другой, резко тормозили дыхательное фосфорилирование. Это торможение фосфорилирования достигало в различных опытах 90—

97%. Вмешательство эндогенного антипастеровского фактора в фосфорный обмен и, в частности, в генерацию богатых энергией фосфорных соединений, заслуживает особого внимания.

Таблица 2

Расчеты даны на 1 мл клеток. Контрольная проба содержит эритроциты + 15 мг глюкозы

№ протокола	Состав пробы	Время инкубации в мин.	Дыхание в мм ³ O ₂	Гликолиз в мг молочной кислоты	Внедрение P ³² в кислоторастворимую органическую фракцию		Внедрение P ³² в нуклеотидную фракцию	
					число отсчетов в мин.	% к контролю	дезоксирибонуклеиновая к-та	рибонуклеиновая к-та

АПФ из пекарских дрожжей

1	Контроль	120	375	0,09	21523	100		
	ДНФ 4·10 ⁻⁴ М	120	451	0,63	0	0		
	АПФ _Г	120	471	0,62	972	4		
	KCN 5·10 ⁻³ М	120	—	0,90	0	0		

АПФ из саркомы М О П

2	Контроль	105	230	0,04	18 013	100	64	1536
	ДНФ 4·10 ⁻³ М	105	338	0,45	0	0	0	0
	АПФ _Г	105	221	0,43	1877	10	0	0

АПФ устойчив к температуре, выдерживает кислотный и щелочной гидролиз при 100°, многократное выпаривание и сохраняется при длительном аутолизе ткани. Гидролиз в 0,5 N щелочи или аутолиз тканевого гомогената не только не уменьшает, но, наоборот, увеличивает активность этого эндогенного АПФ (рис. 1, 2). Действие АПФ сохра-

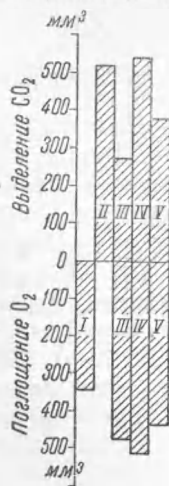


Рис. 1. Влияние кислотного и щелочного гидролизатов саркомы крысы на п. э. в дрожжах. Время инкубации 60 мин.; $t = 30^\circ$; газ — воздух. I — контроль (11 мг дрожжей + глюкоза), II — KCN (5·10⁻³ М), III — негидролизованный экстракт, IV — щелочной гидролизат, V — кислотный гидролизат

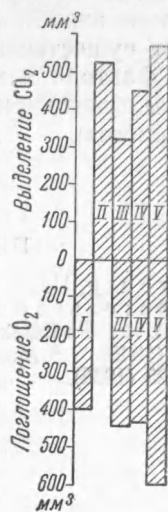


Рис. 2. Влияние аутолизатов печени крысы на п. э. в дрожжах. Время инкубации 60 мин., $t = 30^\circ$. I — контроль (11 мг дрожжей + глюкоза), II — KCN (5·10⁻³ М), III — аутолизат I (аутолиз 36 час., 0°), IV — аутолизат II (аутолиз 36 час., 37°), V — аутолизат III (аутолиз 108 час., 37°)

няется при тщательном удалении белка последовательной обработкой ткани трихлоруксусной кислотой и хлороформно-спиртовой смесью по Зевагу⁽⁵⁾. 6-часовой диализ в 4—5 раз уменьшает активность препарата АПФ. Эфир, хлороформ практически не экстрагируют фактора; некоторая активность обнаруживается в ацетоновом экстракте и заметная в спирте.

Свойства обнаруженного АПФ, особенно его термо- и кислотоустойчивость, диализуемость и сохранение активности препаратов после удаления белка, говорят о небелковой природе этого вещества. Известно, что из содержащихся в клетке веществ небелковой природы активностью в отношении п. э. обладают глутатион и цистеин. Однако щелочной гидролиз исключает возможность присутствия указанных веществ в препаратах АПФ.

Таким образом, во всех без исключения клетках и тканях обнаружен эндогенный антипастеровский фактор, природа которого пока неизвестна. По своему действию на живую клетку этот антипастеровский фактор показал большое сходство с известными экзогенными «пастеровскими ядами», выключая, наряду с п. э., и сопряженное фосфорилирование. Антипастеровский фактор не проявляет своего действия в неповрежденной клетке, повидимому, вследствие фиксации его на определенных клеточных структурах. Этот фактор, однако, частично освобождается при механическом разрушении клетки. Гидролиз в кислоте или щелочи, а также аутолиз ускоряют и усиливают процесс его высвобождения. Именно появлением активного АПФ при разрушении клеточной структуры можно было бы объяснить бесплодность многочисленных попыток наблюдать в бесструктурных системах п. э. Повидимому, п. э. и дезинтеграция клетки — явления, взаимно исключают друг друга. Появление аэробного гликолиза при повреждении, а также возникновение гликолиза при анаэробнозе может быть связано с обратимым высвобождением эндогенного антипастеровского фактора. Аэробный гликолиз злокачественных тканей также, вероятно, является лишь следствием процесса клеточной дезинтеграции.

Приведенный экспериментальный материал заставляет думать, что в регулировании аэробного и анаэробного обменов в тканях эндогенный АПФ играет существенную роль. Открываются пути для изучения природы этого фактора и механизма его действия.

Приносим благодарность В. А. Энгельгардту за предложение темы настоящей работы.

Поступило
22 X 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ O. Warburg, Ueber den Stoffwechsel der Tumoren, Berlin, 1926. ² М. Ф. Сейц и В. А. Энгельгардт, ДАН, 66, № 3 (1949). ³ H. Druckrey, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol., 180, 231 (1936). ⁴ A. Claude, Journ. Exp. Med., 84, No. 1, 51 (1946). ⁵ M. Sevag, D. Lackman and Y. Smolens, Journ. Biol. Chem., 124, 425 (1938).