EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. XV KOIDE
BIOLOOGILINE SEERIA. 1966, Nr. 2

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ XV
СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ. 1966, № 2

https://doi.org/10.3176/biol.1966.2.14

Р. БИРК

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ЭНЕРГЕТИКИ ОПУХОЛЕЙ И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К АЛКИЛИРУЮЩИМ АГЕНТАМ*

Изучение действия алкилирующих агентов позволяет предположить, что одной из причин их противоопухолевого действия является нарушение энергетики раковой клетки (Белоусова, 1963; Горожанская, 1960; Кречетова, 1960; Романова, 1963). Поэтому исследование энергетики опухолей и нормальных тканей, обладающих неодинаковой чувствительностью к алкилирующим агентам, представляет большой интерес.

Энергия, используемая раковыми и нормальными клетками животных, образуется в результате двух процессов — дыхания и гликолиза, которые протекают в клетке взаимозависимо и конкурируют между собой за акцептор фосфата и неорганический фосфат (Рэккер, Ву, 1962). В настоящей работе сделана попытка определить потенциальные энергетические мощности, т. е. интенсивность гликолиза и дыхания в избытке субстрата и кофакторов, а также при отсутствии взаимной конкуренции. В данном случае такое определение целесообразно, так как определяются и запасные энергетические мощности, которые не функционируют в обычных условиях, но могут компенсировать повреждение энергетических систем алкилирующими агентами. Кроме того, были определены некоторые функциональные характеристики митохондрий, изолированных из опухолей и нормальных тканей с различной чувствительностью к алкилирующим агентам.

Из двух изученных нормальных тканей печень была нечувствительной к алкилирующим агентам, а селезенка — чувствительной. Из пяти перевиваемых опухолей весьма чувствительными к алкилирующим агентам оказались крысиные саркомы 45 и Иенсена, саркома М-1 обладает средней чувствительностью, а солидные мышиные опухоли Эрлиха и саркома 180 малочувствительны (Ларионов, 1962).

Методика

Определение интенсивности гликолиза. Фракцию гомогената, содержащую гиалоплазму с микросомами (фракция S_2) и соответствующую 16 *мг* сырой ткани, инкубировали при 26°C в течение 30 *мин* в аппарате Варбурга. Газовая фаза — воздух. Инкубационной средой служила среда, предложенная Ле Пажем (Le Page, 1950). Состав инкубационной среды (в *мкмолях* на 1 *мл* среды): KH_2PO_4 — 4,2, $KHCO_3$ — 25, никотинамида — 20, АТФ — 1, пирувата калия — 6, NaF — 10 и $MgCl_2$ — 7; pH среды — 7,4. Количество — 2 *мл*. Субстратами гликолиза служили 13 *мкмолей* глюкозы

* Работа выполнена в Институте экспериментальной и клинической онкологии Академии медицинских наук СССР.

или 5 *мкмолей* фруктозо-1,6-дифосфата. Инкубацию прекращали путем добавления к среде ТХУ до конечной концентрации 5%. Образование молочной кислоты определяли с помощью *п*-оксидифенила (Barker, Summerson, 1941).

Определение интенсивности дыхания. Митохондрии выделяли по методу Шнейдера и Хогебума (Schneider, Hogeboom, 1950) в среде, содержащей сахарозу (0,27М), версен (0,01М), трис-буфер (0,05М; pH 7,4) и 1% сывороточного альбумина. При определении митохондриального белка в тканях и опухолях полнота гомогенизации проверялась под микроскопом. Белок определяли по Гоа (Goa, 1953) после экстрагирования липидов раствором спирта с эфиром (3 : 1).

Для определения интенсивности дыхания свежевыделенные митохондрии суспензировали в 0,27М сахарозе с 0,01М версеном и 0,05М трис-буфером (pH 7,4); суспензию использовали непосредственно после выделения. Интенсивность дыхания определяли полярографическим методом по изменению концентрации кислорода в инкубационной среде (Островский, Гельман, 1962). Состав инкубационной среды (в *мкмолях*) : KCl — 84, $MgCl_2$ — 6, NaF — 12, Na_2HPO_4 — 13, KH_2PO_4 — 3; pH 7,4 (Chance, Williams, 1955). Объем среды в полярографической ячейке — 1 *мл*, количество митохондриального белка — окого 1 *мг*. Субстратами дыхания служили пируват и малат калия в концентрации 15 *мкмолей*.

Коэффициент фосфорилирования вычисляли как отношение добавленного АДФ (в микромолях) к количеству стимулированного им поглощения кислорода (в микроатомах). Эта величина (АДФ/О) соответствует коэффициенту фосфорилирования P/O (Chance, Williams, 1955). Чистоту препарата АДФ проверяли методом хроматографии на бумаге (Венкстерн, Баев, 1957).

Результаты опытов

Интенсивность гликолиза. Интенсивность гликолиза определялась в клеточной фракции S_2 двумя субстратами — глюкозой или фруктозо-1,6-дифосфатом. В случае использования фруктозо-1,6-дифосфата устранялась зависимость интенсивности гликолиза от фосфорилирования глюкозы, т. е. и от влияния АТФ-азной активности в экстрактах тканей и от гексокиназной реакции (гексокиназа является единственным гликолитическим ферментом, который находится в значительном количестве не только во фракции S_2, но и в митохондриях). Кроме того проверяли, не ограничивается ли скорость гликолиза недостатком НАД в инкубационной среде.

Результаты опытов приведены в табл. 1. Когда субстратом служит глюкоза, интенсивность гликолиза почти одинакова во всех изучаемых

Таблица 1

Интенсивность гликоза

(*мкмоль* лактата на 1 *г* сырой ткани в час)

Ткань	$M \pm m$			
	Глюкоза 13 *мкмолей*	Глюкоза 13 *мкмолей* + НАД 0,2 *мкмоля*	Фруктозо-1,6-дифосфат 5 *мкмолей*	Фруктозо-1,6-дифосфат 5 *мкмолей* + НАД 0,2 *мкмоля*
Печень	76±5 (7)*	84±7 (4)	125±7 (7)	130±13 (4)
Селезенка	69±4 (5)	76±8 (3)	80±5 (5)	106±14 (3)
Саркома Иенсена	76±6 (5)	90±6 (3)	105±8 (7)	106±4 (3)
Саркома 45	87±5 (5)	98±4 (2)	104±6 (5)	108±4 (4)
Саркома М-1	74±3 (7)	77±3 (3)	87±5 (7)	94±8 (3)
Саркома 180	71±9 (7)	72±3 (3)	74±4 (5)	88±7 (3)
Опухоль Эрлиха	79±11 (5)	82±9 (3)	98±7 (6)	107±9 (3)

* В скобках указано число опытов.

тканях независимо от характера ткани (нормальная или опухолевая) и от чувствительности к алкилирующим агентам. Добавление НАД повышает интенсивность гликолиза до 20% во фракции S_2 печени, селезенки, саркоме Иенсена и саркоме 45.

При использовании фруктозо-1,6-дифосфата во всех исследуемых тканях и опухолях отмечалось некоторое повышение интенсивности гликолиза. Наиболее заметно это в случае печени и селезенки, где повышение интенсивности гликолиза равно соответственно 55 и 40%. Во фракции S_2 опухолей интенсивность гликолиза повышалась на 10—30%. С фруктозо-1,6-дифосфатом интенсивность гликолиза в гиалоплазме печени даже несколько выше, чем в опухолях, что согласуется с данными Ле Пажа (Le Page, Schneider, 1948). По-видимому, все клетки хорошо снабжены гликолитическими ферментами.

Из литературы известно, что срезы печени почти не подвергаются гликолизу в аэробных условиях. Это может быть обусловлено либо подавлением гликолиза дыхательной системой, которая в печеночных клетках имеет особенно большую мощность (Рэккер, Ву, 1962), либо гормональным подавлением гексокиназной реакции в интактных клетках (Le Page, 1950; Aisenberg, 1961). По мнению Х. Буша, низкая интенсивность гликолиза в срезах печени только кажущаяся, так как в действительности происходит быстрое превращение образовавшегося лактата в другие соединения, в частности в глютаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и аланин, в то время как в опухолях указанные реакции протекают медленно (Busch и др., 1960; Busch, 1962).

Интенсивность дыхания и особенности функции митохондрий

В табл. 2 приведены данные об интенсивности дыхания изолированных митохондрий в присутствии акцептора фосфата (АДФ) и без него, отношение их (величина дыхательного контроля) и коэффициенты фосфорилирования (АДФ/О). Изолированные опухолевые митохондрии по интенсивности дыхания в расчете на 1 *мг* митохондриального белка существенно не отличаются от митохондрий нормальных тканей. Это, как и ранние исследования А. Айзенберга (Aisenberg, 1961) и др., свидетельствует о сходстве энергетики митохондрий опухолевых и нормальных тканей. Однако общий объем дыхательной системы (интенсивность дыхания в расчете на 1 *г* сырой ткани) в печеночных клетках значительно выше (в 3—9 раз), чем в селезенке и опухолях, что обусловлено, главным образом, большим содержанием митохондриального белка в печени. Печеночные митохондрии имеют также большую величину дыхательного контроля и коэффициент фосфорилирования.

Привлекает внимание и обстоятельство, что у митохондрий селезенки и чувствительных опухолей (саркомы 45, Иенсена и М-1) коэффициенты фосфорилирования несколько ниже. По-видимому, причина разной чувствительности нормальных тканей и опухолей к алкилирующим агентам скрывается в разной стабильности митохондриальных структур. Как известно, окислительное фосфорилирование представляет собой функцию митохондриальных мембран и, вероятно, более низкие коэффициенты фосфорилирования митохондрий селезенки и чувствительных опухолей обусловлены повреждением фосфорилирования в митохондриальных мембранах при выделении митохондрий.

Это подтверждается также данными, полученными при изучении изменений дыхания и его сопряженности с фосфорилированием в тече-

Таблица 2

Дыхание и окислительное фосфорилирование

Ткань	$M \pm m$						
	Содержание митохондриального белка, *мг/г* сырой ткани	Дыхание				Дыхательный контроль	АДФ/О
		микроатомов O_2 на 1 *мг* митохондриального белка в 1 *сек*		микроатомов O_2 на 1 *г* ткани в 1 *час**			
		— АДФ	+ АДФ	— АДФ	+ АДФ		
Печень	44±3 (3)**	0,23±0,05 (6)	0,68±0,10 (6)	36,4±8,3	107,7±21,5	4,1±1,0 (5)	2,58±0,18 (4)
Селезенка	15±2 (3)	0,27±0,05 (5)	0,62±0,13 (5)	14,6±3,3	33,5±8,3	2,6±0,6 (5)	1,63±0,07 (5)
Саркома Иенсена	11±2 (3)	0,20±0,03 (5)	0,66±0,15 (5)	7,9±1,5	26,1±7,6	3,4±0,8 (5)	1,95±0,11 (5)
Саркома 45	8±1 (3)	0,24±0,08 (4)	0,42±0,04 (4)	6,9±2,5	12,1±1,9	2,2±0,5 (4)	1,71±0,27 (4)
Саркома М-1	7±1 (3)	0,25±0,06 (4)	0,72±0,08 (4)	6,3±1,8	18,1±3,3	3,6±1,2 (4)	1,38±0,12 (4)
Саркома 180	10±1 (3)	0,16±0,02 (5)	0,47±0,06 (5)	5,8±0,9	16,9±2,7	3,3±0,9 (5)	2,22±0,21 (5)
Опухоль Эрлиха	8±1 (3)	0,15±0,03 (4)	0,37±0,07 (4)	4,3±1,2	10,7±2,4	2,7±0,7 (4)	2,39±0,05 (4)

* Расчет по данным содержания митохондриального белка в ткани.
** В скобках указано число опытов.

ние инкубации и старения (выдерживание при 0°) митохондрий (Бирк, 1966). На рис. 1 и 2 изображены некоторые характерные полярографические кривые из серии таких опытов. На оси ординат обозначено изменение содержания кислорода в инкубационной среде, на оси абсцисс — длительность инкубации в минутах. Стрелками над кривыми показаны добавления митохондрий и АДФ. Цифрами обозначены интенсивность дыхания в микроатомах кислорода на 1 *мг* митохондриального белка в 1 *сек*.

Митохондрии малочувствительных к алкилирующим агентам опухолей (саркома 180, опухоль Эрлиха) характеризуются более прочной сопряженностью дыхания с фосфорилированием, чем митохондрии чувствительных к алкилирующим агентам опухолей (саркомы 45 и Иенсена). У митохондрий сарком 45 и Иенсена (см. рис. 1) величина АДФ/О резко снижается уже после 5—10-минутной инкубации или после 45—60-минутного выдерживания при 0°. В то же время митохондрии малочувствительных опухолей (саркома 180, опухоль Эрлиха; см. рис. 2) имеют высокие величины АДФ/О и после инкубации в течение 20 *мин* и сохраняют более высокие коэффициенты фосфорилирования при 0°.

На рисунках изображены также данные об изменении величины дыхательного контроля, которые характеризуют степень повышения интенсивности дыхания при функциональной нагрузке митохондрий (присутствие АДФ). При инкубации и старении наблюдалось понижение величины дыхательного контроля как у митохондрий чувствительных, так и малочувствительных опухолей. При этом достоверной зависимости между чувствительностью опухолей и скоростью изменения дыхательного контроля найти не удалось.

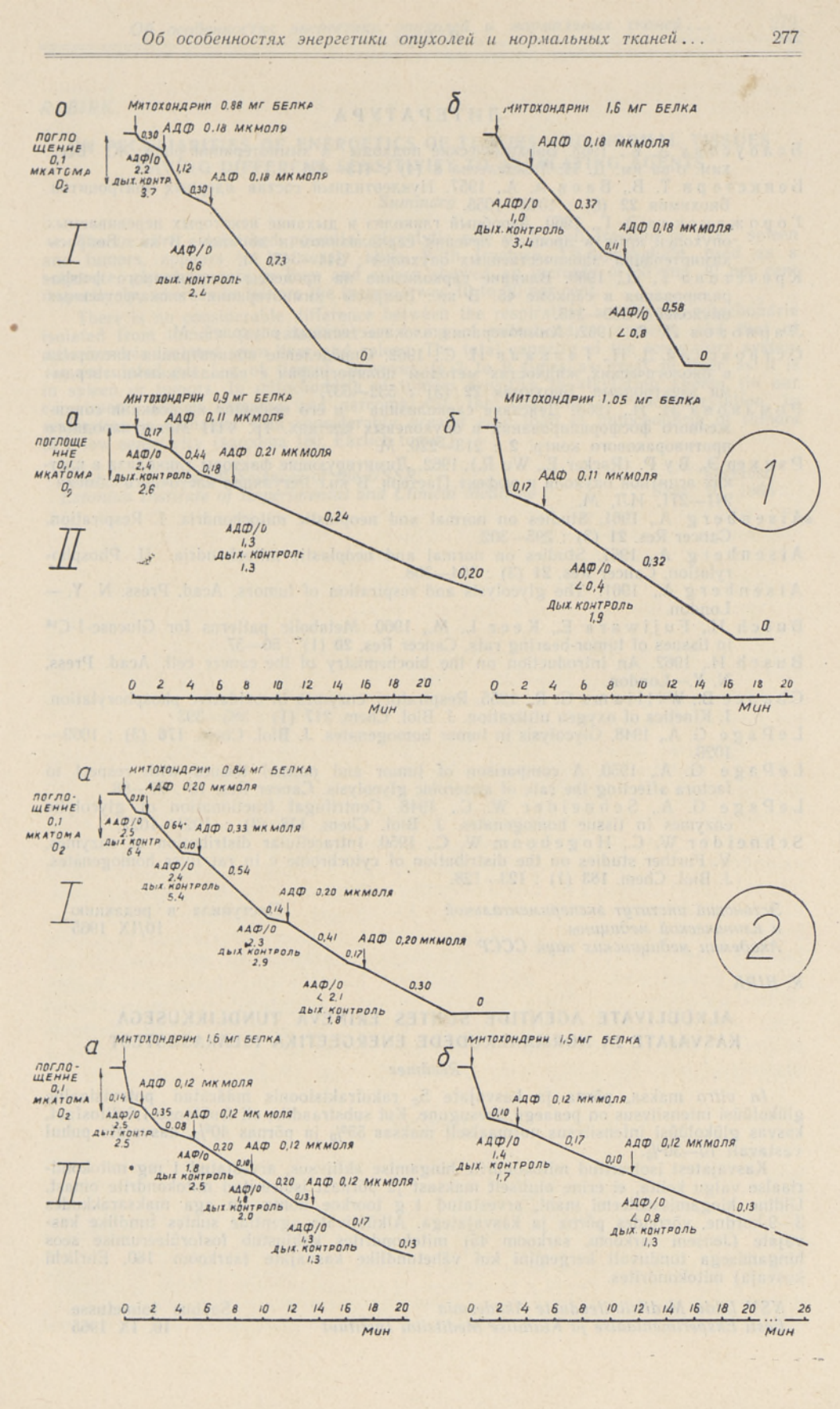
Заключение

Потенциальные интенсивности гликолиза, определенные *in vitro* во фракции S_2 печени, селезенки и опухолей, почти одинаковы. При использовании в качестве субстрата для гликолиза фруктозо-1,6-дифосфата интенсивность гликолиза повышается у печени на 55%, у селезенки на 40% и у опухолей на 10—30%.

Изолированные опухолевые митохондрии по интенсивности дыхания в расчете на 1 *мг* митохондриального белка существенно не отличаются от митохондрий печени и селезенки. Однако общий объем дыхательной системы (в расчете на 1 *г* сырой ткани) в печеночных клетках в 3—9 раз выше, чем в клетках селезенки и опухолей. Митохондрии малочувствительных опухолей (саркома 180, опухоль Эрлиха) в сравнении с митохондриями чувствительных к алкилирующим агентам опухолей (саркомы 45 и Иенсена) характеризуются более прочной сопряженностью дыхания с фосфорилированием.

Рис. 1. Характерные полярографические кривые при определении дыхания митохондрий опухолей, чувствительных к алкилирующим агентам. I. Саркома Иенсена: *а* — непосредственно после выделения митохондрий; *б* — после выдерживания митохондрий в течение 45 *мин* при 0°. II. Саркома 45: *а* — непосредственно после выделения митохондрий; *б* — после выдерживания митохондрий в течение 60 *мин* при 0°.

Рис. 2. Характерные полярографические кривые при определении дыхания митохондрий малочувствительных опухолей. I. Саркома 180: *а* — непосредственно после выделения митохондрий. II. Опухоль Эрлиха; *а* — непосредственно после выделения митохондрий; *б* — после выдерживания митохондрий в течение 60 *мин* при 0°.


1
а
Митохондрии 0,88 мг белка
АДФ 0,18 мкмоля
Поглощение 0,1 мкатома O_2
0,30
АДФ/О 2,2 дых. контр. 3,7
1,12
АДФ 0,18 мкмоля
0,30
АДФ/О 0,6 дых. контроль 2,4
0,73
0
I
б
Митохондрии 1,6 мг белка
АДФ 0,18 мкмоля
АДФ/О 1,0 дых. контроль 3,4
0,37
АДФ 0,18 мкмоля
0,11
АДФ/О < 0,8
0,58
0
а
Митохондрии 0,9 мг белка
АДФ 0,11 мкмоля
Поглощение 0,1 мкатома O_2
0,17
АДФ/О 2,4 дых. контроль 2,6
0,44
АДФ 0,21 мкмоля
0,18
АДФ/О 1,3 дых. контроль 1,3
0,24
0,20
II
б
Митохондрии 1,05 мг белка
АДФ 0,11 мкмоля
0,17
АДФ/О < 0,4 Дых контроль 1,9
0,32
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Мин
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Мин
2
а
Митохондрии 0,84 мг белка
АДФ 0,20 мкмоля
Поглощение 0,1 мкатома O_2
0,18
АДФ/О 2,5 дых контр 6,4
0,64
АДФ 0,33 мкмоля
0,10
АДФ/О 2,4 дых. контроль 5,4
0,54
АДФ 0,20 мкмоля
0,14
АДФ/О 2,3 дых. контроль 2,9
0,41
АДФ 0,20 мкмоля
0,17
АДФ/О < 2,1 дых. контроль 1,8
0,30
0
I
а
Митохондрии 1,6 мг белка
АДФ 0,12 мкмоля
Поглощение 0,1 мкатома O_2
0,14
АДФ/О 2,5 дых. контр. 2,5
0,35
АДФ 0,12 мкмоля
0,08
АДФ/О 1,8 дых. контроль 2,5
0,20
АДФ 0,12 мкмоля
0,10
АДФ/О 1,8 дых. контроль 2,0
0,20
АДФ 0,12 мкмоля
0,13
АДФ/О 1,3 дых. контроль 1,3
0,17
0,13
II
б
Митохондрии 1,5 мг белка
АДФ 0,12 мкмоля
0,10
АДФ/О 1,4 дых. контроль 1,7
0,17
АДФ 0,12 мкмоля
0,10
АДФ/О < 0,8 дых. контроль 1,3
0,13
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Мин
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 ... 26
Мин

ЛИТЕРАТУРА

Белоусова А. К., 1963. Биохимические подходы к химиотерапии рака. Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева 8 (4) : 413—424.
Бенкстерн Т. В., Баев А. А., 1957. Нуклеотидный состав ядерных эритроцитов. Биохимия 22 (6) : 1043—1055.
Горожанская Э. Г., 1960. Аэробный гликолиз и дыхание некоторых перевиваемых опухолей крыс в процессе лечения сарколизином и допаном. В кн.: Вопросы химиотерапии злокачественных опухолей : 344—347. М.
Кречетова Г. Д., 1960. Влияние сарколизина на процессы сопряженного фосфорилирования в саркоме 45. В кн.: Вопросы химиотерапии злокачественных опухолей : 339—343.
Ларионов Л. Ф., 1962. Химиотерапия злокачественных опухолей. М.
Островский Д. Н., Гельман И. С., 1962. Определение концентрации кислорода в биологических жидкостях методом полярографии с неподвижными твердыми электродами. Биохимия 22 (3) : 532—537.
Романова И. Н., 1963. Действие сарколизина и его пектидов на реакции сопряженного фосфорилирования в опухолевых клетках. Тр. VIII Международного противоракового конгр. 2 : 213—220. М.
Рэккер Э., Ву Р. (Racker E., Wu R.), 1962. Лимитирующие факторы гликолиза в клетках асцитной опухоли и эффект Пастера. В кн.: Регуляция клеточного обмена : 241—271. ИЛ, М.
Aisenberg A., 1961. Studies on normal and neoplastic mitochondria. I. Respiration. Cancer Res. 21 (3) : 295—302.
Aisenberg A., 1961. Studies on normal and neoplastic mitochondria. II. Phosphorylation. Cancer Res. 21 (3) : 304—308.
Aisenberg A., 1961. The glycolysis and respiration of tumors. Acad. Press. N. Y. — London.
Busch H., Fujiwara E., Keer L. M., 1960. Metabolic patterns for Glucose-1-C^{14} in tissues of tumor-bearing rats. Cancer Res. 20 (1) : 50—57.
Busch H., 1962. An introduction on the biochemistry of the cancer cell. Acad. Press. N. Y.—London.
Chance B., Williams G. R., 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. J. Biol. Chem. 217 (1) : 383—393.
LePage G. A., 1948. Glycolysis in tumor homogenates. J. Biol. Chem. 176 (3) : 1009—1020.
LePage G. A., 1950. A comparison of tumor and normal tissues with respect to factora affecting the rate of anaerobic glycolysis. Cancer Res. 18 : 77—88.
LePage G. A., Schneider W. C., 1948. Centrifugal fractionation of glycolytic enzymes in tissue homogenates. J. Biol. Chem. 176 (3) : 1021—1027.
Schneider W. C., Hogeboom W. C., 1950. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. J. Biol. Chem. 183 (1) : 123—128.

Эстонский институт экспериментальной и клинической медицины Академии медицинских наук СССР

Поступила в редакцию 10/IX 1965

R. BIRK

ALKÜÜLIVATE AGENTIDE SUHTES ERINEVA TUNDLIKKUSEGA KASVAJATE JA NORMAALKUDEDE ENERGEETIKA ISEÄRASUSTEST

Resümee

In vitro maksa, põrna ja kasvajate S_2 rakufraktsioonis määratud potentsiaalne glükolüüsi intensiivsus on peaaegu ühesugune. Kui substraadiks oli fruktooso-1,6-difosfaat, kasvas glükolüüsi intensiivsus normaalselt maksas 55% ja põrnas 40%, kasvajate puhul vastavalt 10—30%.

Kasvajatest isoleeritud mitokondrite hingamise aktiivsus, arvestatud 1 mg mitokondriaalse valgu kohta, ei erine oluliselt maksast ja põrnast isoleeritud mitokondrite omast. Üldine hingamissüsteemi maht, arvestatud 1 g toorkoe kohta, on aga maksarakkudes 3—9-kordne, võrreldes põrna ja kasvajatega. Alküülivate agentide suhtes tundlike kasvajate (Jenseni sarkoom, sarkoom 45) mitokondrites kahjustub fosforüleerumise seos hingamisega tunduvalt kergemini kui vähetundlike kasvajate (sarkoom 180, Ehrlichi kasvaja) mitokondrites.

NSV Liidu Meditsiiniteaduste Akadeemia Eesti Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituut

Saabus toimetusse 10. IX 1965

R. BIRK

ON PECULIARITIES OF ENERGETICS OF TUMORS AND NORMAL TISSUES HAVING DIFFERENT SENSITIVITY TO ALKYLATING AGENTS

Summary

The *in vitro* established potential glycolytic rate in S_2 cell fraction of liver, spleen and tumors, appears to be nearly alike. With fructose 1,6-diphosphate used as a substrate, glycolytic rate in liver and spleen showed an increase of 55 and 40 per cent respectively, whereas in tumors the increase was 10 to 30 per cent.

There is no considerable difference between the respiratory activity of mitochondria isolated from tumors (as calculated on 1 mg of mitochondrial protein) and that of mitochondria isolated from liver and spleen. The total capacity of the respiratory system (as calculated per 1 g of tissue), however, is 3 to 9 times as great in liver as it is in spleen or tumors. In mitochondria of tumors sensitive to alkylating agents (in our experiment, Jensen sarcoma and sarcoma 45), the coupling of phosphorylation to respiration is damaged with considerably greater ease than in mitochondria of tumors of a low sensitivity (sarcoma 180, Ehrlich tumor).

Academy of Medical Sciences of the USSR,
Estonian Institute of Experimental and Clinical Medicine

Received
Sept. 10, 1965