

**Role of mitochondrial processes in the development and aging of organism.
Aging and cancer**

Chemical abstracts. 1979 v. 91 N 25 91:208561v. Role of mitochondrial processes in the development and aging of organism. Aging and cancer. Lobachev A. N. (Inst. Biol. Fiz. Pushchino, USSR). Deposited Doc. 1978, VINITI 2172-78, 48 pp. (Russ). Avail. VINITI.

**(Mitochondrial theory of development, aging and carcinogenesis. Part I
Formaldehyde theory of carcinogenesis)**

НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
АН СССР

ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

УДК 577.7+616-006.04

N 2172 78 Ян.

А.Н. Лобачев

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В РАЗВИТИИ
И СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА. СТАРЕНИЕ И РАК

ПУЩИНО 1978

Исследования показывают, что быстро размножающиеся клетки потенциально бессмертны и что старческая деградация клеток наступает обычно после торможения их деления (Иост, 1975).

Известно, что скорость размножения клеток зависит от степени их дифференцировки. Это видно как из сравнения клеток различных тканей - высокодифференцированных (нервных) и мало-дифференцированных (определенного вида соединительных и др.), так и из ослабления способности к росту клеток той же ткани по мере повышения их степени дифференцировки в процессе развития.

На печени были установлены все основные особенности поведения тканей в процессе достижения видовых размеров (Комфорт, 1967). К ним относятся: 1) замедление видовой скорости роста; 2) сохранение способности к росту, выявляемой при частичном удалении органа; 3) увеличение ростовой инерции с возрастом.

2172-78

Таким образом, повышение степени дифференцировки клеток в процессе развития ведет к торможению их деления. В настоящее время это связывают с увеличением в хроматине гистонов (что будет обосновано ниже).

Учитывая хорошо известный факт частичной автономии митохондриогенеза от биосинтеза в клеточном ядре, можно предположить, что при снижении темпа деления клеток в них не происходит немедленного снижения скорости роста популяции митохондрий. Тогда, после деления клетки, в каждой новой клетке, к моменту её деления, количество митохондрий должно быть больше, чем в предыдущей, т.е. количество митохондрий в клет-

2178-78

как должно возрастать. Но это, в принципе, не может продолжаться бесконечно. Должен существовать предел, ограничивающий клеточное содержание митохондрий. Необходимость его существования видна из следующих соображений. Известно, что часть митохондриальных белков (белки внешней мембраны, цитохром С и др.) синтезируются на ядерном геноме (Beattie et al., 1967). Для непрерывного деления митохондрий и увеличения их популяции является необходимым непрерывное увеличение скорости синтеза этих белков, а следовательно, и непрерывное увеличение количества обеих матриц (ядерной и митохондриальной), на которых они синтезируются. В связи с тем, что количество митохондрий в клетке с заторможенным делением всё время увеличивается, а матрица, на которой синтезируется в ядре митохондриальный белок по-прежнему остается одна, то с какой бы разумно большой скоростью синтез белка на ней не происходил, всё равно рано или поздно возникнет дефицит ядерного митохондриального белка, который и затормозит митохондриогенез.

Особая роль в этом отношении принадлежит, по-видимому, цитохрому С. Известно, что под действием тироксина, стимулирующего деление митохондрий, содержание цитохрома С в расчете на 1 мг митохондриального белка увеличивается, после чего митохондрии перестраиваются, приобретая более удлиненную форму, и делятся (Ленинджер, 1966; Рудин, Уилки, 1970; Bahr et al., 1962; Halдар et al., 1966). По мере увеличения митохондрий в клетках с заторможенным делением митохондриальная концентрация этого цитохрома (как и других белков, синтезируемых в ядре), начиная с некоторого момента, станет убы-

вать. Таким образом, необходимость торможения деления митохондрий в неделящихся клетках очевидна.

2172-78

Существующие в литературе экспериментальные данные согласуются с приведенными выше рассуждениями. В период жизни до 3-х месячного возраста в клетках печени крыс происходит усиленный митохондриогенез. Так, по данным Минитца (Minitz et al., 1967), количество митохондриального белка на 1 г сырого веса печени в первый день жизни составляет 70 мг, у 2-4 дневных крыс - 116, а у взрослых - 189 мг. Россе и Или (Rosse, Ely, 1954) показали, что в период между 1 и 3 месяцами жизни крысы, количество митохондрий на одно ядро удваивается. Усиленный синтез митохондрий в этот период отмечен также в других работах (Vergonet et al., 1970; Dawkins, 1966). После полового созревания крыс (3 месяца с возрастом нарастает торможение деления митохондрий (Сато, Таучи, 1972; Новикова, 1969). В этот период количество митохондриального белка в клетках длительное время не изменяется. Уменьшение митохондриального белка, свидетельствующее о деградации митохондрий, удалось обнаружить только у крыс в период глубокого старения - 29,5 - 31,5 месяца (Kment et al., 1966). Таким образом, начиная с 3-х месячного возраста, в печени крыс интенсивность митохондриогенеза постепенно уменьшается и, по-видимому, это происходит вследствие того, что синтез митохондриальных белков в ядре достигает "потолка", т.е. скорость синтеза этих белков становится недостаточной для того, чтобы поддержать скорость митохондриогенеза на прежнем высоком уровне.

Известно, что митохондрии обладают аналогией с бактериями. Из митохондрий удалось выделить все существенные компоненты, участвующие в белковом синтезе, причем все эти компоненты оказались аналогичными бактериальным и отличными от тех, которые осуществляют синтез белка в цитоплазме у тех же эукариотов.

С другой стороны, замедление или прекращение размножения бактерий сопровождается деградацией в них ДНК (Белозерский, 1976).

В бактериях ДНК действует при синтезе специфических ферментов как самостоятельная единица, поскольку разрушение какой-либо части структуры ДНК (а не только относительное разрушение гена,) подавляет синтез определенного индивидуального фермента. Незначительный распад ДНК может значительно снижать способность бактерий синтезировать специфический фермент, в то же время не происходит сколько-нибудь заметного снижения интенсивности образования белка или РНК, то есть - отношение РНК/ДНК увеличивается (Гро, 1962).

На основании сходства между митохондриями и бактериями, между ними можно провести параллель. Тогда следует ожидать, что, начиная с 3-х месячного возраста, в митохондриях печени крыс будет происходить деградация ДНК, вследствие чего их функциональная активность должна ухудшаться.

Исследования ДНК митохондрий (мДНК в печени белых крыс в возрасте 1, 3, 12 и 24- месяца показали, что её тканевая концентрация значительно увеличивается от 1 месяца ($4,5 \pm 0,52$ мкг на 1 г ткани) к 3-м ($6,9 \pm 1,05$), а в последующие

2179-78

годы понижается до уровня одномесечных животных. Количество мДНК (в мкг), приходящееся на I мг белка митохондрий, возрастает от одномесечного возраста ($0,506 \pm 0,04$) к 3-х месячному, достигая в этом возрасте максимальных величин ($0,735 \pm 0,04$) и значительно снижается в последующие периоды онтогенеза (12 месяцев - $0,394 \pm 0,05$; 24 месяца - $0,316 \pm 0,03$). Таким образом, уровень ДНК в митохондриях одномесечных крыс более низкий, чем у молодых половозрелых животных, заметно превышает концентрацию ДНК у годовалых и особенно 2-х летних крыс. Расчет РНК/1 мкг ДНК показал, что наименьшее количество РНК/1 мкг ДНК у 3-х месячных крыс, несколько больше оно у одномесечных и почти в 2 раза увеличивается у старых (Новикова, Бондаренко, 1975).

2772-18
Существует мнение, что митохондрии, имеющие округлую форму, функционально не активны. В процессе старения многие митохондрии округляются и набухают (Стрелер, 1964; Саркисов, Втюрин, 1967). При этом увеличивается объем митохондрий, разжижается матрикс, происходит фрагментация и уменьшение крист. В конечном итоге внутренняя мембрана полностью деградирует и часть митохондрий превращается в пузырьки, ограниченные наружной мембраной. Эти изменения тем сильнее, чем выше степень дифференцировки клеток, то есть чем раньше затормозилось их деление. Они наиболее значительны в митохондриях нервных клеток мозга. Менее выражены в сердечной мышце - здесь большее число митохондрий сохраняет свою структуру интактной и меньше встречается митохондрий с полностью разрушенными кристами. Наименьшим дегенеративным изменениям

подвергаются митохондрии паренхиматозных клеток печени (Аксенов, 1976).

В связи с тем, что большая часть белков внутренней мембраны митохондрий синтезируется на митохондриальной ДНК дегенеративные старческие изменения этой мембраны, по-видимому, являются следствием деградации мДНК. Как следствие деградации мДНК следует рассматривать и то, что с возрастом падает интенсивность тканевого дыхания, снижается содержание АТФ. Вместе с тем происходит увеличение отношения P/O , усиливается гликолиз, повышается концентрация лактата.

21/11/78

Таким образом, на основе всего вышеизложенного можно сделать следующий вывод. В процессе развития организма усложняется его внутренняя организация. Это достигается путем повышения степени дифференцировки клеток, что приводит к торможению их деления и деления митохондрий. Функциональная активность заторможенных митохондрий вследствие деградации митохондриальной мДНК падает, что сопровождается понижением в клетках уровня АТФ. Это неминуемо должно привести клетки к гибели и организм к смерти. Но прежде чем это произойдет, клетки, по-видимому, могут некоторое время поддерживать жизнеспособность, приспосабливаясь к уменьшению содержания АТФ. С этой точки зрения старческие изменения частично следует рассматривать как изменения, возникающие в организме в результате его приспособления к уменьшению в клетках АТФ. Это в свою очередь означает, что усиление репрессии синтеза с возрастом должно быть закономерным, целесообразным и обуславливаться такими сдвигами в хроматине, которые должны коррелировать с изменением уровня АТФ.

В период раннего постнатального развития организма огромную роль играет гормон щитовидной железы - тироксин. По-видимому, тироксин является основной частью пускового механизма развития, так как, например, развитие головастиков в его отсутствие полностью прекращается. Головастики не превращаются в лягушек, хотя продолжают расти, достигая гигантских размеров. Избыток же тироксина напротив значительно ускоряет их развитие.

Тироксин способен разобщать процессы окисления и фосфорилирования. 2,4 - динитрофенол и некоторые другие вещества, являющиеся активными разобщающими агентами и способные имитировать действие тироксина на основной обмен, вместе с тем не могут заменить его влияние на развитие (Штрауб, 1963). С другой стороны, известно, что тироксин стимулирует митохондриогенез. Это, очевидно, должно способствовать увеличению количества митохондрий в клетках и, следовательно, увеличению уровня АТФ в них. То, что в клетках различных тканей организма на раннем этапе постнатального онтогенеза происходит увеличение уровня АТФ, а в более поздний его период содержание АТФ снижается, можно видеть из данных, которые приведены в книге А.Н.Разумовича (1972).

Представляется интересным сравнить интенсивный митохондриогенез в клетках молодого развивающегося организма (у крыс в период до 3-х месячного возраста) с динамикой митохондриального развития быстро растущих клеток. Так опыты Лака с радиоактивной меткой (Luck, 1963) на одиночных *Neurospora crassa* показали, что по мере удвоения массы клеток происходило удвоение массы митохондрий. То есть количество митохондрий в каждой

2172-78

из дочерних клеток на определенном этапе их развития остается таким же, каким оно было на этом же этапе в материнской клетке.

Итак, процесс развития можно представить следующим образом. Повышение уровня АТФ вследствие увеличения числа митохондрий в клетках ведет к некоторым изменениям в ДНП, повышающим степень дифференцировки клеток и тормозящих их деление (вследствие увеличения гистонов в хроматине). Вместе с этим происходит торможение деления митохондрий, сопровождающееся деградацией в них мДНК. Это ведет к тому, что уровень АТФ, достигнув максимума к моменту полового созревания, затем постепенно начинает падать.

Структурные изменения хроматина в период пост-
натального онтогенеза

Мысль о том, что гистоны репрессируют генетическую информацию ДНК, впервые была высказана Стедманами (Stedman, Stedman, 1950). Регуляция генетической активности может осуществляться путем химической модификации гистонов, например, посредством комплексообразования между гистонами и кислыми белками, которые снимают в этом случае репрессирующее действие гистонов и выполняют таким образом функцию дерепрессоров ДНК. Исследования показали, что гистоны являются неспецифическими репрессорами ДНК, в то время как кислые белки выполняют функцию специфических дерепрессоров (Paul, 1971). В этой связи представляются интересными данные, демонстрирующие изменения отношений суммарные гистоны / ДНК, негистоновые белки (в подавляющем большинстве кислые) / ДНК, происходящие в про-

2172-98

цессе постнатального онтогенеза в ядре и хроматине (рис.1) (Клименко, 1975). Из рисунка видно, что усиление репрессии

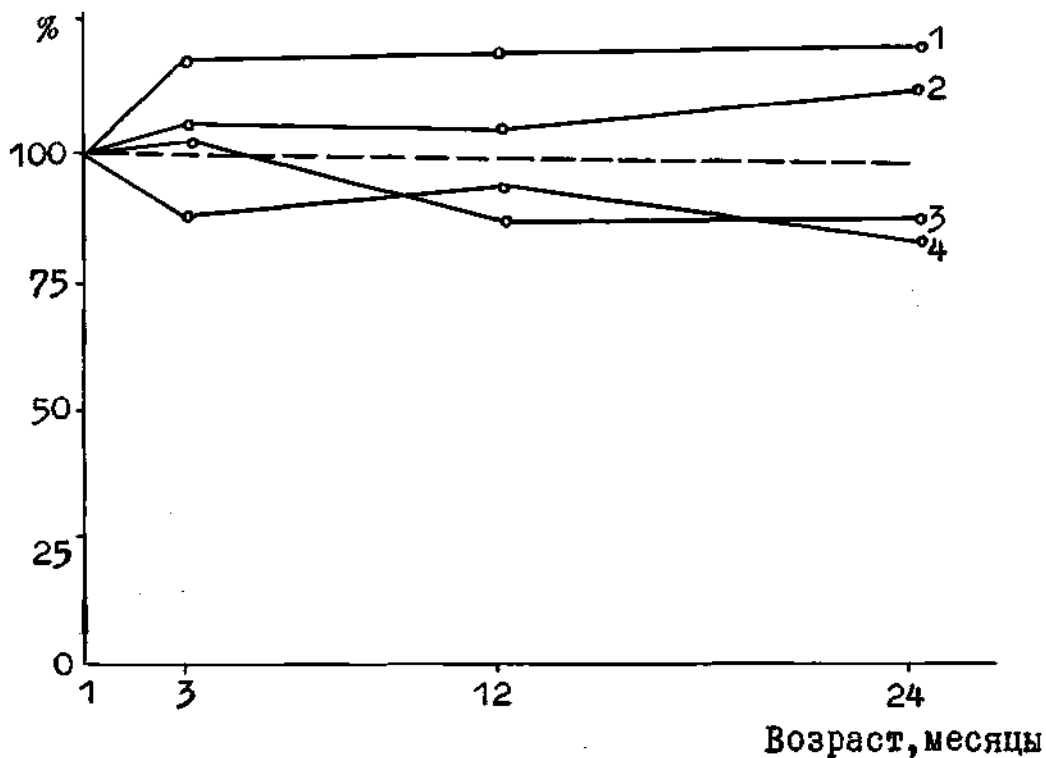


Рис.1, Соотношения - гистоны/ДНК, негистоновые белки/ДНК в печени белых крыс разного возраста (%):

- 1 - суммарные гистоны/ДНК (ядро);
- 2 - суммарные гистоны/ДНК (хроматин);
- 3 - негистоновые белки/ДНК (хроматин);
- 4 - негистоновые белки/ДНК (ядро)

синтеза, начиная с 3-х месячного возраста (у крыс), происходит вначале за счет уменьшения содержания кислых белков в хроматине, а затем, начиная с 12 месячного возраста, вследствие увеличения содержания гистонов. В возрасте 12 месяцев,

по-видимому, должно осуществляться каким-то образом переключение механизма приспособления с одного типа на другой.

Негистоновые белки в РНК - полимеразной системе *in vitro* не вызывают ни усиления, ни подавления синтеза РНК, но они могут противодействовать подавлению транскрипции *in vitro* гистонами. Причем степень стимуляции синтеза РНК зависит от содержания в фосфорилированных негистоновых белках фосфатных групп. Т.Ю.Ван и М.Камияма (1972) установили, что активированная РНК относительно длиннее и кодирует более длинные полипептиды. На этом основании они высказывают мысль, что, возможно, активация негистоновых белков связана исключительно с действием содержащихся в них фосфопротеидов. Фосфопротеидный участок взаимодействует с гистонами, находящимися ближе всего к неблокированному участку ДНК. Это и приводит к образованию более длинных транскрибируемых РНК.

Шильц и Секерис (Schiltz, Sekeris, 1969) установили, что ядерные белки включают метку из $\gamma = P32$ АТФ. Гистоны метились незначительно, большая часть изотопа включалась в кислые белки.

Подробный обзор по фосфорилированию негистоновых хроматиновых белков и их роли в регулировании генетического аппарата клетки был дан Г.С.Стейном и др. (Stein et al., 1974). В этом обзоре упоминаются следующие факты. Более 90% связанных ядерным белком фосфатов ассоциировано с негистоновыми хромосомными белками. Эти фосфаты присутствуют в основном как фосфорилированная аминокислота фосфосерин, которая содержится в этих белках в значительных количествах (5 из каждых 100).

Серин и треонин белка фосфорилируются в киназной реакции, утилизирующей конечные фосфатные группы различных нуклеозид и дезокси-нуклеозид трифосфатов. Самый активный фосфатный донор - АТФ. В отдельной ферментативной реакции фосфатные группы удаляются из белка и реализуются в форму неорганического фосфата. В качестве доказательства того, что фосфорилирование негистоновых хромосомных белков вовлечено в генную активацию, в обзоре приведен ряд примеров, в которых активирование хроматина для синтеза РНК ассоциировалось с увеличением скорости фосфорилирования негистоновых хромосомных белков. Удаление некоторых фосфатных групп, связанных с негистоновыми хромосомными белками уменьшает их стимулирующий эффект на синтез РНК (Shea, Kleinsmith, 1973).

2172-78

Существует представление, что отрицательно заряженные фосфатные группы на негистоновых хромосомных белках могут взаимодействовать с положительно заряженными гистонами, таким образом удаляя ингибирующие гистоны из ДНК - гистонного комплекса, это делает ДНК активной матрицей для синтеза РНК (Kleinsmith et al., 1966; Kaplavitz et al., 1971).

Эти данные дают основание считать, что закономерное, определяющееся интенсивностью митохондриогенеза, изменение в процессе постнатального онтогенеза уровня АТФ в клетках организма должно играть важную роль в реализации генетической программы его развития и старения. Поэтому очевидно, что любой фактор, замедляющий или ускоряющий изменение уровня АТФ, например тироксин, соответствующим образом будет воздействовать и на скорость постнатального развития.

С помощью электрофореза в ПААГ гистоны можно разделить на ряд фракций. Зоны электрофореграммы I, 2-3, 4, 5, 6-7 соответствуют следующим фракциям гистонов соответственно F2a1, F2a2, F2b, F3 и F1, каждая из которых так же состоит из нескольких субфракций. Анализ аминокислотного состава гистоновых фракций показал, что F1-лизинобогатая фракция. Все F2-умеренно богатые лизином фракции и F3-аргинин богатая. Гистоны стабилизируют ДНК, повышая её температуру плавления (Боннер, 1967). Причем по способности стабилизировать ДНК их можно расположить в ряд F1, F2b, F2a, F3. Фракция F3 не стабилизирует ДНК. Вместе с тем богатые аргинином гистоны в большей мере ингибируют синтез РНК и белков, чем гистоны богатые лизином (Олфри и др., 1963). Мур и Пол (More, Paul, 1973) отмечают, что более значительная стимуляция матричной активности хроматина в условиях проведенного ими эксперимента наблюдается при удалении F2 и F3 чем F1.

Исследования взаимодействия полилизина с ДНК (Leng et al., 1966; Shapiro et al., 1969) показали, что реакция стехиометрическая (I лизин связывает I пару оснований), кооперативная, с ДНК гетерогенная (предпочитает связываться с АТ-богатыми участками при различных условиях), зависит от концентрации полилизина. Данные этой, а так же другой работы (Lecs et al., 1968) дали основание авторам сделать заключение, что нарушение вторичной структуры ДНК стимулирует её оккупацию полилизином в этом месте, что в согласии с другой работой (Семин и др., 1973. Авторы полагают (Shapiro et al., 1969), что в определенных условиях это может служить инициатором

2178-78

связывания АТ богатых мест ДНК F1-гистонами (АТ пары, как известно, менее стабильны, чем CG).

В постнатальном периоде онтогенеза организма эукариотов возрастных изменений в спектре гистоновых белков обнаружить не удается. Однако соотношение ряда фракций в суммарных гистонах ядер заметно изменяется. Уменьшается относительное содержание F2a1, субфракции F2a2 (зона 3) и F3. Увеличивается субфракция F2a2 (зона 2), F2b и F1 (Клименко, 1974; Клименко, 1975).

Хан показал, что температура плавления ДНК, выделенной у старых животных, выше таковой у молодых. Причем, в данных исследованиях обнаружено, что возрастные различия в температуре плавления ДНК действительно обусловлены увеличением в процессе онтогенеза количества гистонов на единицу ДНК (Von Nahn, 1965). К старческим изменениям хроматина помимо увеличения суммарных гистонов, отраженного на рис.1, следует также добавить усиление связи аргининовых гистонов с ДНК (Баснец, 1975) и увеличение в ДНК числа деспирализованных участков.

Установлено, что под влиянием пролиферативного стимула повышается способность ДНП связывать основной краситель акридиновый оранжевый и падает устойчивость к тепловой денатурации. Гормон роста, который стимулирует рост теплокровных и вместе с тем влияет на их развитие, действует, по-видимому, аналогичным образом, в отсутствие гормона роста ткани характеризуются некоторым недоразвитием. Гольдберг и Этли (Goldberg, Atchley, 1966) показали, что гормон роста взаимодействует с ДНК и вызывает изменение профиля кривой плавления, что свидетель-

21/11/78

стствует об ослаблении поперечных связей в определенных участках молекулы. По Гейдушечку (Geiduschek, 1962) в молекуле ДНК существуют "ядра", стабилизирующие двойную спираль. Гольдберг и Этли считают, что гормон роста активирует гены, вызывая разделение комплементарных цепей в специфических сегментах ДНК перед транскрипцией. Ослабление поперечных связей в ДНК и разъединение комплементарных цепей должно влиять на развитие путем изменения сродства гистонов к ДНК. Действительно, как уже было отмечено, дестабилизация ДНК может служить инициатором оккупации её лизинобогатыми гистонами, стабилизирующими её. Этот процесс, конечно же, будет зависеть от концентрации F1 гистонов в ядре. Имеются данные, свидетельствующие о том, что повышение стабильности ДНК в процессе развития и повышения инерции клеток к росту является результатом, прежде всего, увеличения в хроматине содержания фракции F1 (Гинейтис и др., 1970). Однако увеличение F1 не преследует только единственную цель - стабилизировать ДНК, избирательность связывания этих гистонов с ДНК (преимущественно с АТ участками), по-видимому, дает им возможность оказывать в какой-то мере влияние и на дифференцировку клеток.

Как уже отмечалось выше, начиная с 12 месячного возраста, в клетках печени крыс происходят изменения в механизме приспособления клеток. Дальнейшая репрессия активности генома осуществляется не за счет отсоединения кислых белков, а за счет увеличения содержания гистонов в хроматине (рис.1). Такое увеличение не может быть вызвано действием непосредственно самих АТФ на хроматин, но должно происходить в строгом

Р.17А-18

соответствии со снижением в клетках уровня АТФ. Фактор, способный выполнить в указанный период такую приспособительную функцию, должен, как это следует из предыдущих рассуждений, удовлетворять следующим требованиям:

- а) он должен иметь постоянный источник в клетке и быть, таким образом, обычным продуктом её метаболизма;
- б) его содержание в клетке должно увеличиваться по мере снижения в ней уровня АТФ;
- в) увеличение в результате его действия сродства гистонов к ДНК означает, что он должен взаимодействовать и с ДНК, и с гистонами;
- г) он должен усиливать связь аргининовых гистонов с ДНК.

Можно показать, что всем этим требованиям хорошо удовлетворяет формальдегид. Формальдегид имеет простое строение и обладает специфическим действием на ДНК и белки, которое в настоящее время уже достаточно изучено. Благодаря своей специфичности формальдегид вот уже в течение многих лет с успехом используется для исследования структуры хроматина и по праву считается "зондом" ДНК. Исследования показали, что существует несколько различных источников формальдегида в организме. Он появляется на одном из путей катаболизма метанола, образуется в результате деалкилирования алкалоидов (таких, например, как морфин, кодеин, этилморфин и др.) и некоторых других фармакологических веществ, в которых имеются метильные группы, связанные с азотом. Но основным и постоянным источником формальдегида в организме является 5,10 -метилтен-ТГФК.

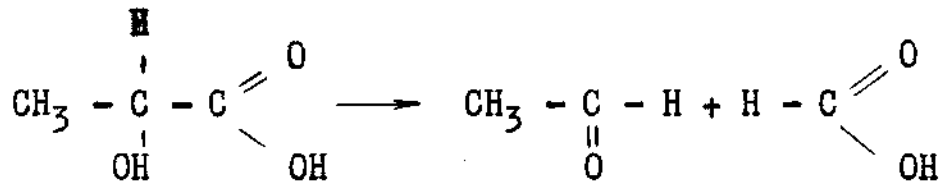
217A-78

2172-78

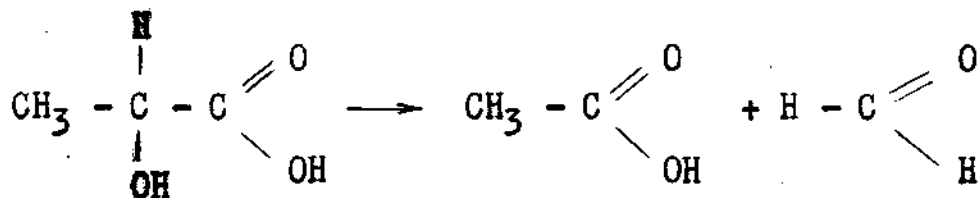
Утилизация формальдегида происходит путем окисления его в муравьиную кислоту. Реакция катализируется НАД-зависимым ферментом - формальдегиддегидрогеназой, локализованной в митохондриях. В свою очередь муравьиная кислота окисляется до CO_2 и H_2O . Эта реакция также протекает в митохондриях и катализируется НАД-зависимым ферментом - формиатдегидрогеназой. Условия утилизации формальдегида митохондриями печени крыс были детально изучены в работе Цинти и др. (Cinti et al., 1976). Было показано, что торможение окисления формальдегида сукцинатом, ингибиторами дыхания (ротенон, антимицин А) и при анаэробинозе происходит вследствие увеличения во всех этих случаях внутримитохондриального отношения $[\text{НАДН}]/[\text{НАД}^+]$. Экзогенный НАД^+ увеличивает скорость окисления формальдегида в 2 раза. После истощения экзогенного НАД^+ митохондрии не обладают активностью формальдегиддегидрогеназы. Из этих данных следует, что любое нарушение дыхания, если только оно не связано с ингибированием сукцинатдегидрогеназы, снижает активность формальдегиддегидрогеназы и способствует накоплению в клетках формальдегида. Ингибирование же сукцинатдегидрогеназы (например, малонатом) напротив способствует скорейшей его утилизации.

В 1970 г. Вич и др. (Veech et al., 1970) в своей работе показали, что существует равновесная связь между цитоплазматическими адениннуклеотидной и НАД-нуклеотидной системами и что падение в клетках отношения $[\text{АТФ}]/[\text{АДФ}]$ $[\text{ФН}]$ сопровождается последующим падением в них цитоплазматического $[\text{НАД}^+]/[\text{НАДН}]$ или, что тоже самое, увеличением отношения $[\text{Лактата}]/[\text{Пируват}]$.

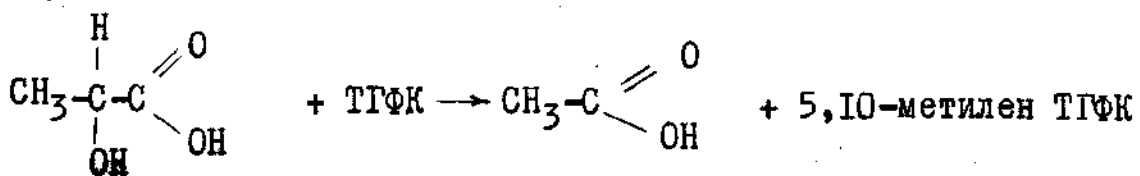
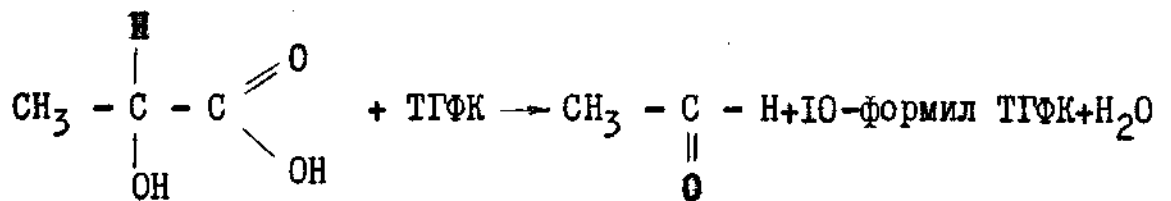
Следовательно, понижение уровня АТФ в клетках должно сопровождаться снижением содержания внемитохондриального НАД⁺ всё более нарастающим усилением гликолиза и накоплением в клетках лактата. Лактат же, как известно из органической химии, может легко разлагаться на муравьиную кислоту и ацетальдегид.



В клетках организма более вероятной, однако, представляется реакция разложения лактата на формальдегид и ацетат:



При наличии соответствующих ферментативных систем эти реакции могут протекать с образованием 5,10-метилена ТГФК и 10-формил ТГФК



21/12-78

Возможность существования какой-либо из этих реакций в организме следует рассматривать как рабочую гипотезу. Однако, если эта гипотеза верна, то накопление лактата в клетках может сопровождаться увеличением в них содержания формальдегида. В медленно растущих клетках взрослого и тем более старого организма способствовать этому должно также низкое потребление одноуглеродных производных ТГФК на синтез ДНК. В быстро растущих же клетках лактат, в этом случае, мог бы играть важную роль своеобразного топлива, питающего пул Су-производных ТГФК и поддерживающего, таким образом, быстрый рост. Причем и в быстро растущих клетках возможно накопление свободного формальдегида, если баланс производства и потребления С1-производных ТГФК нарушен, т.е. имеет место патологическое увеличение пула 5,10-метилен-ТГФК.

С возрастом отмечено достоверное увеличение уровня лактата в миокарде и печени (в миокарде с $7,2 \pm 2,1$ до $14,5 \pm 2,7$ мг % $p=0,05$; в печени с $8,7 \pm 0,59$ до $22,6 \pm 5,0$ мг % $p=0,01$). В головном мозге наблюдается тенденция к увеличению лактата у старых животных ($8,05 \pm 4,4$ мг % у молодых и $8,92 \pm 3,1$ % мг у старых $p > 0,01$). Активность ЛДГ у старых животных достоверно повышается во всех трех тканях: в мозге с $50,4 \pm 0,9$ до $107,8 \pm 2,9$ мкм/г сырой ткани, $p=0,001$; в миокарде с $40,4 \pm 1,2$ до $105,5 \pm 3,0$ мкм/г сырой ткани, $p=0,001$, в печени с $39,8 \pm 1,4$ до $102,1 \pm 6,5$ мкм/г сырой ткани, $p=0,001$ (Аксенов, 1976). Из этих данных отчетливо выявляется обратная зависимость между увеличением содержания лактата и степенью дифференцировки клеток. Это и понятно. Если, согласно нашему предположению, лактат должен

0172-78

способствовать посредством формальдегида увеличению гистонов в хроматине и усилению репрессии синтеза белков, то, очевидно, что такого типа приспособление к падению уровня АТФ в высоко-специализированных клетках мало приемлемо, так как в них и так подавляющая часть генома репрессирована. Поэтому, если такие старческие изменения, которые связаны с ухудшением активности митохондрий вследствие торможения их деления, раньше всего и сильнее всего будут наблюдаться в высокодифференцированных клетках (например, увеличение количества липофусциновых гранул - их количество растет по мере старения в нервных клетках и в меньшей степени в клетках миокарда), то такое старческое изменение, как, например, снижение гранул гликогена (в клетках печени и сердца (Аксенов, 1976), которое связано с накоплением лактата, ингибирующего глюконеогенез (Cohen, Simpson, 1975), в них будут менее выражены, чем в малодифференцированных клетках. Известно, что при гиперфункции органа и в ишемической ткани обнаруживается ряд признаков преждевременной старости. В обоих этих случаях клетки ткани характеризуются повышенным содержанием лактата. Недавние исследования показали, что при введении лактата в артерию анестезированной собаки и увеличении его концентрации в клетках миокарда в 2 раза по сравнению с нормой в них наблюдаются ультраструктурные изменения, сходные с теми, которые обнаруживаются в клетках ишемической ткани: набухают митохондрии, происходит дезорганизация их внутренних мембран, наблюдается расслабление миофибрилл, истощение внутриклеточного гликогена (Armiger et al., 1975). Эти ультраструктурные изменения яв-

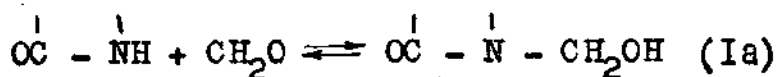
2172-78

ляются и признаками старения ткани.

Действие формальдегида на хроматин

В 1954 году Френкель-Конрад (Frenkel-Conrat, 1954) впервые открыл реакцию взаимодействия формальдегида с нуклеиновыми кислотами. Эта реакция оказалась специфичной для аминогрупп пуриновых и пиримидиновых оснований.

Подробный обзор химии формальдегида был сделан Фельдманом (Feldman, 1973). Он дал следующую схему взаимодействия формальдегида с азотистыми основаниями



где:

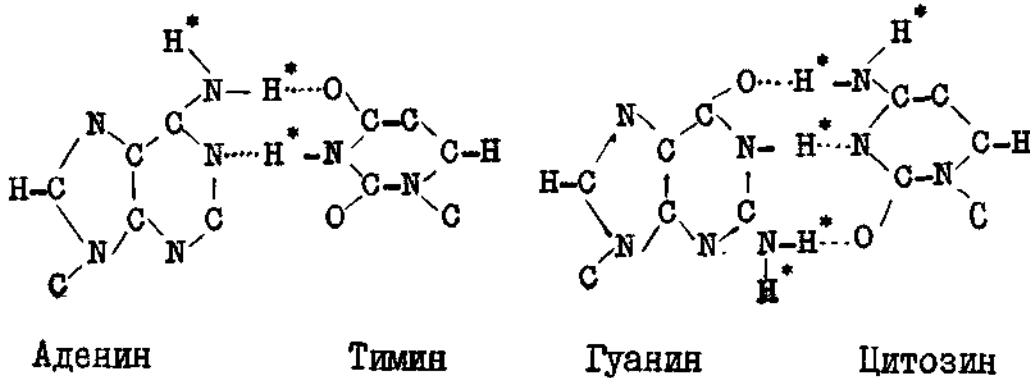
(Ia) - протекает с CO-NH группами пуриновых и пиримидиновых гетероциклов ($\overset{3}{\text{N}} - \overset{4}{\text{C}}\text{O}$ - в пиримидиновых; $\overset{1}{\text{N}} - \overset{6}{\text{C}}\text{O}$ - в пуриновых)

(Ib) - для экзоциклических аминогрупп.

(2) - включает только аминокпурины.

Например, для нормальных Уотсон-Криковских пар оснований места возможного действия формальдегида будут следующие (обозначены звездочками):

2/78-78



Кинетика реакций формальдегида с экзоциклическими амино- и эндоциклическими иминогруппами не так давно была детально исследована (McGhee, von Hippel, 1975). Было установлено, что при одинаковых экспериментальных условиях скорости реакций с иминогруппами на несколько порядков больше, чем соответствующие скорости с экзоциклическими аминогруппами. Кроме того, оказалось, что в отличие от реакций формальдегида с аминогруппами скорости его реакций с иминогруппами зависят от основности иминного азота. Причем эта зависимость обратная - чем ниже основность, тем выше скорость реакции.

Формальдегид может реагировать с нативной 2-х спиральной ДНК только в том случае, если он взаимодействует с аминогруппами. Тем не менее из-за существования внутри структуры основания стерического препятствия, метил-группы аденина и цитозина "предпочитает" находиться в той изомерной позиции, которая неизбежно разрывает нормальную Уотсон-Криковскую водородную связь (McGhee, von Hippel, 1975). В случае имино-

2172-78

групп, которые лежат в центре нормальных Уотсон-Криковских пар оснований, реакция с формальдегидом может иметь место только после того как водородные связи будут разорваны, то есть только после того как спираль раскрутится или разорвется. Это вытекает из механизма реакции, согласно которому замещению атома азота метилол группой должен предшествовать этап депротонизации, и который отражает факт зависимости скорости реакции формальдегида с иминогруппой от её основности (Teneks, 1964).

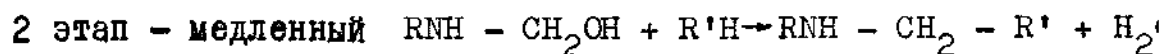
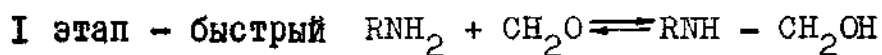
В 1968 году советскими учеными был предложен кинетический метод определения концентрации дефектов вторичной структуры ДНК, который был основан на анализе кинетических кривых деспирализации ДНК под действием формальдегида (Трифонов и др., 1968). Вместе с тем, ими была изложена теория взаимодействия формальдегида с ДНК, которая в дальнейшем нашла экспериментальное и теоретическое подтверждение (Трифонов и др., 1969; Банников, Трифонов, 1969; Chau, 1976). Согласно этой теории взаимодействие ДНК с формальдегидом включает 2 процесса: 1) инициирование зародышей деспирализации (дефектов), 2) рост зародышей деспирализации, т.е. расплетение спиральных участков с концов в результате реакции азотистых оснований с формальдегидом.

Оба эти процесса зависят от скоростей как прямой, так и обратной реакции и от концентрации формальдегида (с увеличением которой равновесие, очевидно, будет смещаться в сторону прямой реакции). На основании этого можно сделать заключение, что характер взаимодействия формальдегида с ДНК определяется

87-2412

концентрацией формальдегида, основностью иминогрупп оснований ДНК (т.к. от неё фактически зависит скорость роста зародышей деспирализации) и состоянием самой ДНК (наличием или отсутствием дефектов вторичной структуры).

Важное значение для воздействия формальдегида на хроматин имеет его реакция с белками. По Фельдману (Feldman, 1973) взаимодействие формальдегида с белками происходит по следующей схеме (при условиях близких к физиологическим):



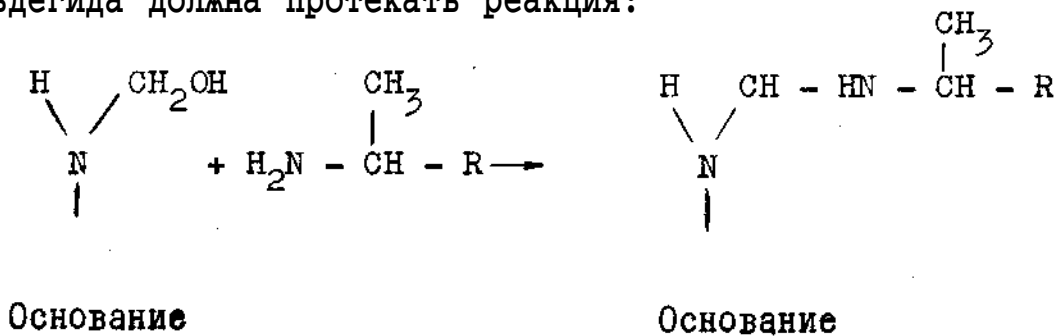
При больших концентрациях формальдегида могут образовываться диметилпроизводные.

2172-78
Таким образом видно, что на втором этапе взаимодействия формальдегида с белками образуются метиленовые мостики, которые и являются, по-видимому, причиной формальдегидной фиксации белков. Они же могут быть причиной старения макромолекул, в частности коллагена.

Образование гистон - ДНК перекрестных связей под действием формальдегида было изучено Брутлагом и др. (Brutlag et al., 1969). Их заключение было такое: нуклеопротеины обработанного формальдегидом хроматина связываются с ДНК с помощью метиленовых мостиков, а также связываются друг с другом. Количество таких перекрестно связанных белков тем больше, чем больше концентрация формальдегида. Такой фиксации более всего подвержены аргининбогатые гистоны и не подвержены лизинбогатые. Об увеличении количества связанных с ДНК гистонов под действием формальдегида докладывали так же Уилкинс

Р.К. и др. (Wilkins et al., 1976). С этим согласуются недавние работы и других авторов (Carlson et al., 1975; Polasow et al., 1976). Чувствительность к формальдегидной фиксации аргининбогатых гистонов и нечувствительность лизинбогатых можно легко объяснить, исходя из следующих соображений. Известно, что в гистонах фракции F1 и F2a -концевая группа представлена ацетилом, в фракции F3-аланином, а в гистонах фракции F2b-пролином. Имеются многочисленные данные о вовлечении NH₂-конца полипептидной цепи регуляторных белков в специфическое взаимодействие с ДНК, что, вероятно, справедливо и для гистонов (Adler et al., 1972; Platt et al., 1972; Platt et al., 1973; Mulletz-Hill et al., 1968). Тогда N-концевая группа должна иметь важное значение в их присоединении к ДНК. Под приведенную схему образования метиленовых мостиков, очевидно, попадают конечная группа - NH₂аланина в гистонах F3 и группа -NH пролина гистонов F2b, тогда как инертная -CH₃ группа ацетильного N-конца гистонов F1 и F2a образовать такого мостика не может.

Таким образом, в случае гистонов F3 под действием формальдегида должна протекать реакция:



При действии формальдегида на ДНК наблюдается также второй эффект. Оказывается он способен индуцировать перемещение лизинбогатых гистонов с CG богатых мест ДНК на AT богатые (Polasow et al., 1976). Теоретически и экспериментально было показано, что под действием формальдегида в первую очередь происходит деспирализация AT богатых участков ДНК (Симонов и др., 1967; Frenkel-Conrat, 1954; Inman, Bertani, 1969; Vologodskii et al., 1975). Это, вероятно, и обуславливает перемещение F1 гистонов на AT богатые участки.

Перемещение гистона F1 из CG областей на AT может носить регулирующий характер и согласно сделанному нами предположению выполнять приспособительную роль в процессе старения. Можно ожидать, что при таких перемещениях будет усиливаться репрессия синтеза специфических белков и дерепрессироваться синтез лишь самых необходимых для жизнедеятельности клетки соединений.

Взаимодействие формальдегида с азотистыми основаниями, находящимися в составе денатурированных участков, делает невозможным ренатурацию этих участков. Вследствие этого в ДНК формируются стабильные изменения вторичной структуры. Появление денатурированных участков в результате непосредственного взаимодействия формальдегида с нативными областями ДНК, как уже отмечалось выше, мало вероятно. Гораздо более вероятно появление денатурированных участков за счет тепловых флуктуаций, в результате действия каких-либо повреждающих агентов, или по каким-либо другим причинам. Очевидно, что вероятность возникновения и фиксации формальдегидом таких участков

2112-78

будет наиболее велика у интенсивно делящихся клеток, так как в таких клетках ДНК наиболее нестабильна.

Таким образом, из данного обзора можно сделать заключение, что такие старческие изменения хроматина как увеличение содержания гистонов, усиление связи аргининовых гистонов, увеличение степени деспирализации ДНК, могут быть объяснены действием на хроматин формальдегида.

На основе всего вышеизложенного можно дать следующую интерпретацию процессам, отображенным на рисунке I.

В период до 3-х месячного возраста увеличение уровня АТФ в клетке способствует усилению сродства кислых белков к гистонам (3). Кислые белки, дерепрессируя геном, увеличивают общий синтез гистонов (1). Увеличение концентрации гистонов в ядре способствует насыщению ими хроматина (2). Это ведет к некоторой репрессии генома (вероятно также к частичной репрессии синтеза кислых белков (4)) и к усилению стабилизации ДНК. Далее вследствие снижения функциональной активности митохондрий происходит падение уровня АТФ. Клетки приспосабливаются к недостатку энергии вначале отсоединением кислых белков, а затем (когда соответствующих фракций кислых белков, по-видимому, больше нет) присоединением гистонов. В возрасте где-то около 12 месяцев (у крыс) должно происходить переключение механизма приспособления с одного типа на другой. Наиболее простой способ такого переключения можно, например, представить в виде усиления выделения гипофизом "гормона смерти", существование которого впервые было установлено на крысах у Денклой и который мешает клеткам организма использовать

2/72-18

тироксин (Denkal, 1974, 1975). Это должно привести к снижению окислительных процессов в клетках за счет уменьшения разобщенности митохондрий и, следовательно, к некоторому накоплению в них формальдегида. Уровень АТФ при этом больших изменений претерпевать не будет, поскольку вследствие снижения скорости синтеза митохондриальных белков вместе с уменьшением разобщенности митохондрий будет происходить и уменьшение количества дыхательных ансамблей. Денкла считает, что "гормон смерти" начинает выделяться гипофизом уже с наступлением половой зрелости, и что именно он определяет старение организма. Согласно предложенной здесь гипотезе, предназначение этого гормона представляется иным. Снижение потребления клетками тироксина в половозрелом возрасте необходимо для того, чтобы предотвратить усугубление тироксином дефицита синтезируемых на ядерном геноме митохондриальных белков. Действительно, тироксин усиливает синтез митохондриальных белков как в цитоплазме, так и в митохондриях. Поэтому по мере увеличения в клетке количества митохондрий положительное приращение отношения митохондриальных белков, синтезированных в цитоплазме, к митохондриальным белкам, синтезированным в митохондриях, под действием тироксина, будет уменьшаться и с определенного момента станет отрицательным. Уменьшение митохондриальной плотности, синтезированных в цитоплазме белков, согласно сделанным ранее рассуждениям, должно ускорять ослабление функций митохондрий. Этому "стремится" воспрепятствовать Денкловский гипофизарный гормон. Кроме того, как уже отмечалось, он может способствовать также приспособлению клеток к падению в них уровня АТФ.

87-2712

Таким образом, старение - результат снижения функциональной активности митохондрий в клетках, тогда как старческие изменения частично происходят вследствие приспособления клеток к уменьшению энергии. С этой точки зрения процессы, вызывающие такие изменения (увеличение содержания формальдегида, насыщение хроматина гистонами), носят положительный характер, так как благодаря им клетки более длительное время сохраняют возможность жить. Поэтому ослабление этих процессов, например усиление утилизации формальдегида под действием какого-нибудь разобщителя, без устранения главной причины старения - снижения функциональной активности митохондрий, хотя возможно и будет иметь внешний омолаживающий эффект, но в целом должно приводить к более быстрому истощению организма и его смерти.

Например, при недостатке тироксина возникают признаки преждевременной старости, повышается восприимчивость к инфекциям, что говорит о пониженном иммунитете. При лечении таких больных тироксином, у них исчезают морщины, пропадает седина, волосы приобретают свой прежний естественный цвет, восстанавливается нормальная сопротивляемость болезням.

Удаляя гипофиз и вводя тироксин, Денкла сумел восстановить у старых крыс некоторые утраченные с возрастом функции иммунологической и сердечно-сосудистой систем. Восстановились также некоторые ферментативные процессы.

Как уже отмечалось, гипофиз, с точки зрения выдвинутой гипотезы, осуществляет приспособительную функцию на уровне всего организма. А в подтверждение сделанному выше предположению надо добавить, что хотя гипофизэктомия уменьшает ин-

87-2718

тенсивность некоторых специфических возрастных процессов, вместе с тем она укорачивает длительность жизни животного (Дильман, 1974).

Старение и рак

Варбург впервые постулировал, что нарушение биоэнергетики является первичной причиной злокачественного перерождения. В основу этого вывода легли его наблюдения, что опухолевым тканям присущ характерный тип обмена, заключающийся в усиленном гликолизе и относительно недостаточном дыхании (Warburg, 1926).

В связи с тем, что с возрастом происходит деградация митохондриальной ДНК и вследствие этого в энергетике клеток происходят нарушения, сближающие её с энергетикой раковых клеток, надо думать, что именно это и является главной причиной повышения вероятности раковых заболеваний при старении. У человека, начиная с 40 лет частота раковых заболеваний возрастает в геометрической прогрессии (Оберлинг, 1960). Старые крысы большей частью умирают от опухолевых болезней. Введение старым крысам гормона роста увеличивает частоту раковых заболеваний (Комфорт, 1967).

Гормон роста в онкологическом отношении привлекает особое внимание. В работе Перпаоли и др. (Pierpaoli, Sorokin, 1972) суммированы данные о прямом канцерогенном действии гормона роста, автор считает, что он может иметь отношение к развитию опухолей во всех органах, для которых специфично быстрое обновление эпителия, в частности, опухолей молочной железы, желудка, кишечника, бронхов и др. По мере старения

12-27-10

отмечено снижение общей продукции гормонов роста (Дильман, 1974).

2172-78

Понижение в стареющих клетках уровня АТФ в результате снижения функций митохондрий, согласно моей гипотезе, должно производить генетически запрограммированные и незапрограммированные (т.е. просто в результате смещения биохимического равновесия) изменения в метаболизме клеток противоположные тем, которые происходят в период повышения их специализации. Разумеется это касается только обратимых процессов. Поэтому в старых клетках, не способных быстро делиться из-за сильно стабилизированной гистонами ДНК, метаболизм в какой-то степени приблизится к метаболизму молодых быстро делящихся клеток. Так, например лактат, накапливающийся в старых клетках в больших количествах, способствует накоплению в них аспартата (Briggs, Freedland, 1976), необходимого для синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, и служит источником ацетата (и, вероятно, так же с1-производных ТГФК). Ацетат в свою очередь приводит к увеличению скорости пентозофосфатного пути (Flatt, Ball, 1966), который поставляет D-рибозо-5-фосфат для синтеза пуринов. Кстати, очень интенсивным образованием ацетата из лактата и пирувата характеризуются опухолевые ткани (Elliot, Greig, 1937; Nepp et al., 1966).

Таким образом, в стареющих клетках в результате снижения уровня АТФ потенциальная возможность быстрого роста возрастает. Если по тем или иным причинам, вызывающим дестабилизацию ДНК, старая клетка начинает вдруг быстро делиться, в ней вследствие уменьшения содержания митохондрий ещё сильнее

произойдет понижение уровня АТФ. Очевидно, что именно снижением уровня АТФ можно объяснить, опираясь на выдвинутую здесь гипотезу развития и старения организма, тот факт, что при раке и в экспериментальных опухолях появляются изоферменты, сходные с эмбриональными, и дерепрессируются гены, контролирующие синтез эмбриональных белков (Criss, 1971; Weinhouse, 1971; Farron et al., 1972). Вероятно, для того, чтобы старая клетка стала раковой необходимо, чтобы она приобрела быстрый рост и сохраняла его благодаря слабой стабилизации ДНК передаваемой по наследству.

Какова же во всем этом роль формальдегида?

Как мы уже видели, формальдегид может вызывать частичную дестабилизацию интактной ДНК, взаимодействуя с аминогруппами азотистых оснований и разрывая при этом водородные связи. Однако вместе с этим происходит и увеличение содержания гистонов в хроматине, что, во-первых, частично репрессирует синтез белков, приспособляя клетку к падению энергии, во-вторых, стабилизирует ДНК, затрудняя её репликацию. Таким образом, по мере накопления формальдегида сохраняется баланс стабилизирующих и дестабилизирующих ДНК сил. При этом секреция гормона роста в рамках общей для всего организма программы приспособления, вероятно, преднамеренно уменьшается, чтобы не нарушался этот баланс. Добавление гормона роста облегчает деление клеток, открывая таким образом иминогруппы азотистых оснований ДНК для атаки формальдегидом. Реакция формальдегида с этими группами, как уже отмечалось, очень быстрая, зависит от основности этих групп и приводит к формальдегидному фиксации деспирализации соответствующих участков ДНК.

81-2172

При определенной скорости реакции (то есть основности иминогрупп) и достаточно большой концентрации формальдегида эффект его действия на ДНК может быть таким большим, что деспирализация обширных участков ДНК после её репликации будет происходить раньше, чем гистоны успеют связаться с ДНК в количестве, достаточном для соответствующей её стабилизации, поэтому рост клеток будет ускоряться. В этом отношении интересен следующий факт. Исследования показали, что существует четкая корреляция между основностью N_1 атомов аналогов пуринов и их противоопухолевой активностью. Чем выше основность N_1 (т.е. чем меньше скорость реакции с формальдегидом), тем выше противоопухолевая активность аналога (Пюльманы, 1965). Так как аналоги пуринов могут замещать их в ДНК, то скорость их взаимодействия с формальдегидом, видимо, в значительной степени будет определять стабильность ДНК.

2172-78

Перерождение нормальной клетки в раковую должно зависеть не только от содержания формальдегида в ней, но и от состояния её ДНК. Вместо гормона роста дестабилизация ДНК может производиться и каким-либо другим агентом. Канцерогенные же вещества должны, как минимум, обладать двумя действиями на клетку. Во-первых, способствовать накоплению в ней формальдегида, а во-вторых, дестабилизировать её ДНК.

Таким образом, из предположения о высоком содержании формальдегида как об одном из основных факторов роста раковых клеток следует, что повышение скорости его утилизации должно приводить к излечиванию раковых опухолей. Для этого, как уже отмечалось, на клетки надо воздействовать либо разобшителем,

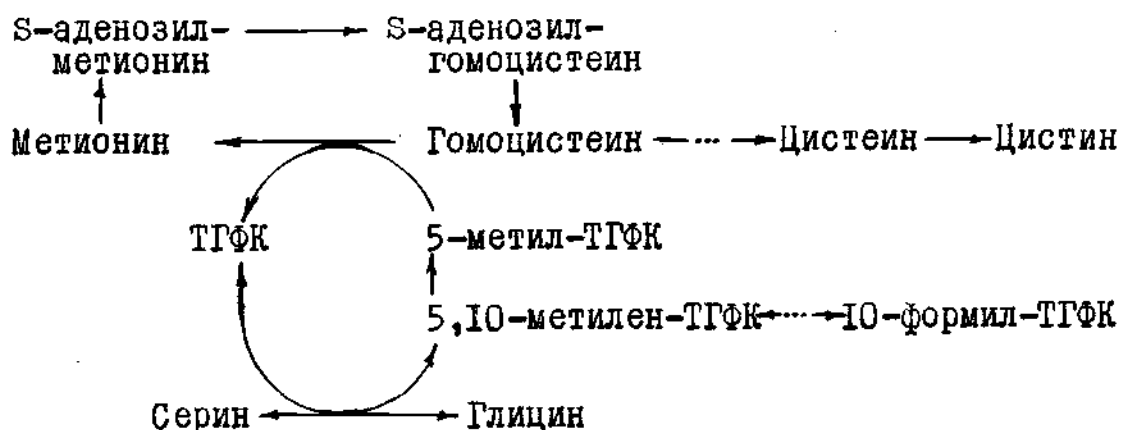
либо ингибитором сукцинатдегидрогеназы. Так как применение и того и другого в больших количествах может оказаться токсичным также для нормальных клеток организма, то наиболее эффективным, очевидно, будет действие смеси, состоящей из небольшого количества ингибитора сукцинатдегидрогеназы и разобчителя.

Выше уже отмечалось, что для увеличения продукции формальдегида необходимо увеличение 5,10-метилен-ТГФК, которая может спонтанно разлагаться на формальдегид и ТГФК, хотя в отсутствие акцептора HCHO константа равновесия не отдает предпочтения диссоциации. Затем свободный формальдегид неэнзиматически реагирует с каким-либо акцептором. Имеется большая доля вероятности, что наиболее активным акцептором формальдегида в опухолевых клетках является глицин (что будет далее обосновано).

Недавно было показано, что в лейкоцитах величина пула 5,10-метилен-ТГФК и соответственно продукция формальдегида коррелирует со степенью пролиферации. Продукция формальдегида относительно более активна в нормальных лимфоцитах, чем в нормальных гранулоцитах, но еще больше в лимфоцитах хронической лимфоцитарной лейкемии. В гранулоцитах хронической миелоцитарной лейкемии продукция формальдегида также повышена, но в меньшей степени, чем в лимфоцитах хронической лимфоцитарной лейкемии (Thorndike, Beck, 1977).

В регулировании размера пула 5,10-метилен-ТГФК важное значение имеют реакции обмена метионина, серина и глицина

84-8118



Синтез метионина в организме может осуществляться путем переноса метильной группы от бетаина или 5-метил-ТГФК до гомоцистеина, в последнем случае реакция катализируется ферментом 5-метил-ТГФ-гомоцистеинметилтрансферазой, активность которого зависит от содержания витамина В12 (кобаламина). В этой реакции высвобождается активная форма фолиевой кислоты - ТГФК. Последняя включается в активацию и перенос одноуглеродных соединений, одним из основных источников которых является серин. Энзиматический перенос оксиметильной группы серина на ТГФК приводит к образованию глицина и 5,10-метилен-ТГФК, которая при участии метилен-ТГФ-редуктазы восстанавливается до 5-метил-ТГФК.

Установлено, что недостаточность витамина В12 и фолиевой кислоты ведет к понижению уровней ТГФК, 5,10-метилен-ТГФК и 10-формил-ТГФК и соответственно к снижению активностей трех ферментов - формиминотрансферазы, тимидилатсинтетазы и формилтрансферазы, вследствие этого нарушается обмен гистидина (усиливается моченая экскреция N-формиминоглутаминовой кислоты) и снижается синтез пуринов и пиримидинов. Добавление метионина устраняет все эти нарушения в обмене, что хорошо

2172-78

объясняется с помощью гипотезы, получившей название "метильной ловушки". С уменьшением тканевой концентрации метионина уменьшается и концентрация S-аденозилметионина (S-AM) (Lombardini, Talalay, 1971), ингибирующего на генетическом уровне метилен-ТГФ-редуктазу (Kutzbach, Stokstad, 1967, 1971). При дефиците кобаламина происходит снижение скорости синтеза метионина, поэтому концентрация метионина, а следовательно, и S-AM в ткани уменьшается, что повышает активность метилен-ТГФ-редуктазы. Это приводит к тому, что большая часть всего количества ТГФК будет поймана как 5-метил-ТГФК, что снизит фонд свободной ТГФК, необходимой для метаболизма N-формиминоглутамата, и фонд одноуглеродных производных ТГФК, участвующих в синтезе ДНК (5,10-метилен-ТГФК, 10-формил-ТГФК).

Опухолевые ткани характеризуются низким содержанием метионина и гораздо большим по сравнению с нормальными тканями содержанием цистеина и цистина (Jensen, 1959; Rapkine, 1937), что свидетельствует о низкой скорости реметилирования гомоцистеина до метионина. Причиной этому может быть либо низкая активность B12-метилтрансферазы, либо низкая активность метилен-ТГФ-редуктазы. Возможен и третий вариант - одновременное снижение активностей обоих ферментов. Первый случай невероятен в опухолевых клетках, поскольку он исключает интенсивный синтез ДНК, который тем не менее в них наблюдается (Weber, Lea, 1965). Во втором случае за счет снижения фонда 5-метил-ТГФК количество ТГФК, 5,10-метилен-ТГФК и 10-формил-ТГФК увеличивается, что должно способствовать быстрому синтезу ДНК. К тому же снижение содержания 5-метил-ТГФК, которая

2172-78

ингибирует серию гидроксиметилтрансферазу (Schirch, Ropp, 1967), катализирующую превращение серина в глицин, ведет, во-первых, к усилению образования глицина, необходимого для синтеза пуринов, а во-вторых, к увеличению пула 5,10-метилен-ТГФК за счет снижения уровня ТГФК. Это должно привести к уменьшению активности формиминотрансферазы и увеличению активности тимидилатсинтетазы, что и происходит в опухолях (Sneider et al., 1969; Green, 1970; Poirier et al., 1972; Buehring et al., 1972). При низкой скорости окисления формальдегида он будет в значительных количествах взаимодействовать с глицином. Установлено, что скорость модификации нуклеотидов монопроизводными глицина, образованными в реакции глицина с НСНО , примерно на 2 порядка выше скорости модификации нуклеотидов формальдегидом и что при значениях рН и температуре, близких к физиологическим, взаимодействие НСНО с ДНК в присутствии глицина сопровождается образованием в молекулах ДНК разрывов (Siomin et al., 1973; Семин и др., 1974).

При одновременном снижении активностей 5-метилен-ТГФ-редуктазы и В_{12} -метилтрансферазы степень злокачественности клеток будет варьировать в зависимости от концентрации 5-метил-ТГФК и метионина. Многие работы свидетельствуют о существовании биохимического и биологического антагонизма между метильными донорами (метионином, холином и др.) и гепатокарциногенами (Farber, 1963; Nawberne, 1965; Miller, Miller, 1965). В свете предложенной здесь гипотезы объяснить этот антагонизм можно следующим образом. Исследования показали, что поставки крысам таких карциногенов, как 2-ацетиламинофлуорен, диэтил-

84-1112

нитрозамин, в меньшей степени ДАБ, низкая рибофлавиновая диета и диета, дефицитная по метильным донорам, уменьшают печеночные активности метилен-ТГФ-дегидрогеназы и формилазы - ферментов, катализирующих окисление 5,10-метилен-ТГФК в 10-формил-ТГФК и образование из последней формата и ТГФК (Poirier et al., 1972). Кроме того, дефицит метионина снижает скорость окисления формата в CO_2 (Krebs et al., 1976). Поэтому недостаток рибофлавинов или метильных доноров, а последнее, кстати, может быть результатом ингибирования карциногеном метилен-ТГФ-редуктазы, при интенсивном синтезе 5,10-метилен-ТГФК должен приводить к усилению продукции формальдегида. И, наоборот, их добавка, в разной степени в зависимости от механизма действия карциногенов, должна понижать карциногенную активность. Так, например, если метионин не усиливает в достаточно большой степени в присутствии того или иного карциногена метаболизм 5,10-метилен-ТГФК через 10-формил-ТГФК в формат и далее в CO_2 , то карциногенная активность такого агента должна возрастать при добавлении В12, так как это приводит к увеличению содержания 5,10-метилен-ТГФК и глицина вследствие снижения фонда 5-метил-ТГФК и повышения уровня S-AM. Добавка метионина не будет иметь в этом случае значительного противоопухолевого эффекта. Если же метионин хорошо конкурирует с карциногеном и вносит в окисление 5,10-метилен-ТГФК вклад более существенный, чем в увеличение её пула вследствие повышения уровня S-AM, то его добавка должна снижать карциногенную активность агента, а витамин В12 в меньшей степени будет её усиливать (или же не будет на неё влиять). Так, например,

диета метильных доноров уменьшает карциногенные активности таких агентов, как диметилгидразин, афлатоксин, этионин и диэтилнитрозамин. С другой стороны, витамин В12 ускоряет карциногенные активности 2-ацетиламинофлуорена, N,N-диметил-4-аминазобензена, диэтилнитрозамина, метилхолантрена и 7,12-диметилбензантрацена (Buehring et al., 1976). Теперь можно дать более расширенное определение тому, как должно действовать химическое вещество, чтобы, с точки зрения "формальдегидной" гипотезы возникновения злокачественных опухолей, обладать карциногенной активностью. Оно должно снижать скорость окисления формальдегида, дестабилизировать ДНК и так изменять относительные активности 5,10-метилен-ТГФ-редуктазы, 5,10-метилен-ТГФ-дегидрогеназы и серин гидроксиметилтрансферазы (отчасти, вероятно, посредством индуцирования дефицита рибофлавинов или метильных доноров), чтобы происходило увеличение пула 5,10-метилен-ТГФК и усиливалась продукция формальдегида. Сделанные выше рассуждения дают основания считать, что наиболее активными карциногенами должны быть вещества, ингибирующие 5,10-метилен-ТГФ-редуктазу. Поскольку они обладают одинаковым с S-AM действием, то надо думать, что *in vivo* они образуют продукты метаболизма типа S-KM или S-MK (где K-карциноген). Иными словами, эти вещества должны обладать сходством либо с аденозином и атаковать метионин (известно, например, что метионин атакуется *in vivo* ароматическими аминами и аминазо красителями (Miller, Miller, 1953. 1969), либо с метионином и связывать аденозин, в последнем случае метионин, должен более успешно конкурировать с карциногеном.

2172-78

Типичным представителем карциногенов второго типа является этионин (этиловый гомолог метионина), индуцирующий у крыс гепатолиз. Он конкурирует с метионином во многих энзиматических реакциях. Одним из главных продуктов его метаболизма является S-аденозилэтионин (S-АЭ), который образуется из этионин сульфоксида. Вследствие слабой способности организма ацетилировать этионин сульфоксид, S-АЭ накапливается в клетках в значительных количествах. Метионин уменьшает (и даже предотвращает) карциногенный эффект этионина. При добавлении в этиониновую диету 0,3-0,9% DL-метионина, происходит конкурентное ингибирование образования S-АЭ (его содержание уменьшается на 30%) и ацетилирование этионин сульфоксида становится значительно выше. Одновременно в клетках увеличивается содержание S-АМ и S-аденозилгомоцистеина (Brada et al., 1976). Добавка метионина повышает так же уровень АТФ, который существенно снижается в клетках вследствие ингибирования этионин митохондриальных процессов окисления и окислительного фосфорилирования (Stekol et al., 1960). Если учесть, что при этом снижение содержания S-АЭ в клетках незначительное, а сумма S-АЭ + S-АМ S-АЭ без добавки метионина, то можно сделать заключение, что противоопухолевый эффект метионина, по-видимому, в большей степени определяется усилением в результате его действия окислительного процесса, чем ингибированием S-АЭ или активированием 5,10-метилтен-ТГФ-редуктазы. Важной частью карциногенного действия этионина должно быть и этилирование S-АЭ макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) (Farber, 1970), которое согласно сделанному выше

81-2117
2172-18

предположению должно облегчать доступность ДНК для формальдегидной атаки.

Литература

- Аксенов И.Е. 1976. В сб.: Демографические, физиологические и биологические аспекты старения. Минск, "Наука и техника", 39-45.
- Банников Ю.А., Трифонов Э.Н. 1969. Структура и гинетические ф-ии биополимеров. 2-я конф. РВО ИАЗ им. И.В.Курчатова, М., 324.
- Баснец Л.М. 1975. В кн.: Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития. Киев, "Наукова думка", 171-176.
- Белозерский А.Н. 1976. В кн.: Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. М., "Наука", 81-97.
- Боннер Д. 1976. Молекулярная биология развития. М., "Мир", 116.
- Ван Т.Ю., Камияма М. 1972. В кн.: Клеточное ядро. Морфология, физиология и биохимия. М., "Наука", 61-72.
- Гинейтис А.А., Виноградова И.А., Новинские Г.Г., Воробьев В.И. 1970. Цитология, XII, 2, 201.
- Гро Ф. 1962. В кн.: Нуклеиновые кислоты. М., 361.
- Дильман В.М. 1974. Эндокринологическая онкология. Л., "Медицина", 117, 353.

2172-78

- Иост Х. 1975. В кн.: Физиология клетки. М., "Мир", 845.
- Клименко А.И. 1974. Биохимия, 39, I, 56.
- Клименко А.И. 1975. В кн.: Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития. Киев, "Наукова думка", 98-119.
- Комфорт А. 1967. Биология старения. М., "Мир", 242.
- Ленинджер А. 1966. Митохондрия. М., "Мир", 299.
- Малинина А.В., Косаганов Ю.Н., Лазуркин Ю.С. 1976. Молекулярная биология, 10, вып.6, 1349.
- Новикова Н.М. 1969. II Всесоюзный биохим. съезд. Тез.секц. сооб. I секция. Эволюция и сравнительная биохимия.
- Новикова Н.М., Бондаренко Ю.В. 1975. В кн.: Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития. Киев, "Наукова думка", 148-153.
- Обеолинг Ш. 1960. В кн.: Основы геронтологии. М., "Медгиз", 82.
- Олфри В., Митто В., Мирский А. 1963. В кн.: Генетический аппарат клетки и некоторые аспекты онтогенеза. М., "Наука", 53.
- Пюльман Б., Пюльман А. 1965. Квантовая биохимия. М., "Мир", 199.
- Разумович А.Н. 1972. Биоэнергетические процессы и старение организма. Минск, 138-141.
- Рудин Д., Уилки Д. 1970. Биогенез митохондрий. М., "Мир", 64-65.
- Саркисов Д.С., Втюрин Б.В. 1967. В кн.: Электронная микроскопия деструктивных и регенеративных процессов. М., "Медицина".

2172-78

- Сато Т., Таучи Х. 1972. В кн.: IX Международный конгресс геронтологов. Киев, "Наукова думка".
- Семи́н Ю.А., Симонов В.В., Поверенный А.М. 1973. Докл. АН СССР, 208, 95.
- Семи́н Ю.А., Коломыйцев Е.Н., Поверенный А.М. 1974. Молек. биол., 8, 2, 276-285.
- Симонов В.В., Рябченко Н.И., Поверенный А.М. 1967. Молек. биол., 1, 2, 297.
- Стрелер В. 1964. Время, клетки и старение. М., "Мир", 1964.
- Трифонов Э.Н., Шифрановская Н.Н., Франк-Каменецкий М.Д., Лазуркин Ю.С. 1968. Молек. биол., 2, 6, 887-896.
- Трифонов Э.Н., Франк-Каменецкий М.Д., Лазуркин Ю.С. 1969. II конференция РБО ИАЭ им. И.В.Курчатова 3-6 июня 1969 г. М., 306.
- Штрауб Ф.В. 1963. Биохимия. Будапешт, 383.
- Adamiker D. 1968. Quantitative Biol. of Metabolism. Berlin.-N.Y.
- Adler K., Beyreuther K., Panning E., Geisler N., Cronnebern B., Klemm A., Mülle-Hill B., Pfahb M., Schmitz A. 1972. Nature, 237, 322.
- Armiger L.C., Seelye R.N., Elswijk J.G., Carnell V.M., Benson P.C., Gavin J.B., Herdson P.B. 1975. Lab. Invest., 33, 5, 502-508.
- Bahr G.F., Zeitler E. 1962. J. Cell. Biol., 15, 489.
- Beattie P.S., Basford R.E., Koritz S.B. 1967. J. Biol. Chem., 242, 3366.

2172-78

- Brada Z., Bulba S., Altman N.H. 1976. *Cancer Res.*, 36, 5, 1573-1579.
- Briggs S., Freedland R.A. 1976. *Biochem.J.*, 160, 205-209.
- Brutlag D., Schlhuber C., Bonner J. 1969. *Biochemistri*, 8, 3214.
- Buehring L.A., Poirier L.A., Stokstad E.L.R. 1976. *Cancer Res.*, 36, 8, 2775-2779.
- Carlson R.D., Olins A.L., Olins D.E. 1975. *Biochemistri*, 14, 3122,
- Chanet R., Izard C., Maustacchi E. 1975. *Mutat. Res.*, 33, 2-3, 179-186.
- Chay T.R. 1976. *FEBS Letters*, 64, 2, 274-277.
- Cinti D.L., Keyes S.R., Lemelin M.A., Denk H., Schenkman J.B, 1976. *J.Biol.Chem.*, 251, 6, 1571-1577.
- Cohen R.D., Simpson R. 1975. *Anesthesiology*, 43, 661-673.
- Criss W.E. 1971. *Cancer Res.*, 31, 1523.
- Dawkins M.J.R. 1966. *Brit.Med.Bull.*, 22, 1.
- Denckla W.D. 1974. *J.Clin.Invest.*, 53, 2, 572-581.
- Denckla W.D. 1975. *Fed.Proc*, 34, 1, 96.
- Elliot K.A.C., Greig M.E. 1937. *Biochem.J.*, 31, 1021-1032.
- Farber E. 1963. *Advan.Cancer.Res.*, 7, 383-474.
- Farber E. 1970. *Metabolic Alterations in Cancer.*, J.Schultz (ed.), pp.314-334. Amsterdam: North-Holland Publishing Co.
- Farron F., Hsu H.H.T., Knox W.E. 1972. *Cancer Res.*, 32, 302.
- Feldman M.Ja. 1973. *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.*, 13, 1.
- Flatt J.P., Ball E.G. 1966. *J.Biol.Chem.*, 241, 2862.

2172-48

- Frenkel-Conrat H. 1954. *Biochem.Biophys.Acta*, 15, 307.
- Geiduschek E.P. 1962. *J.Mol.Biol.*, 4
- Goldberg M., Atchley W, 1966. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 55,
- Green M. 1970. *Ann.Rev.Biochem.*, 39, 701-756.
- Haldar D., Freeman K., Work T.S. 1966. *Nature*, 211, 9.
- Hepp G., Prusse E., Weiss H,, Wieland D. 1966. *Biochem.Z.*,
344, 87-102.
- Inman R., Bertani G.J. 1969. *J.Mol.Biol.*, 44, 533
- Jeneks W.P. 1964. *Prog.Phys.Org.Chem.*, 2, 63.
- Jensen E.V. 1959. *Science*, 130, 1319.
- Kaplawitz P.B., Platz R.D., Kleinsmith L.J. 1971. *Biophys.*
Acta, 229, 739.
- Kleinsmith L.J., Allfrey V.G., Mirsky A.E. 1966. *Proc.Nat.*
- Acad.Sci.USA, 55, 1182.
- Kment et al. 1966. *Alternforschung*, 19, 3-4.
- Krebs H.A., Hems R., Tyler B. 1976. *Biochem.J.*, 158, 341-353.
- Kutzbach., Stokstad. 1967. *Biochim.Biophys.Acta*, 139, 217-220.
- Kutzbach., Stokstad. 1971. *Methods Enzymol.*, 18B, 793-798.
- Lombardini J.B., Talalay P. 1971. *Adv.Enzyme Regul.*, 9,
349-384.
- Lecs C.W., von Hippel P.H. 1968. *Biochemistry*, 7, 2480.
- Leng M., Felsenfeld G. 1966. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.*, 56, 4,
1325.
- Luck O.J.L. 1963. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 49, 233.
- McGhee I.D., von Hippel P.H. 1975. *Biochemistry*, 14,
1281-1303.
- Miller JiA., Miller E.C. 1953. *Advan. Cancer Res.*, 1,
339-396. ; 1956, *Advan cancer Res.*, 1, 339-396.

2172-78

- Miller J.A., Miller E.C. 1969. *Progr.Exptl.Tumor.Res.*, 11, 273-301. .
- Minitz H.A. et al. 1967. *Cell.Biol.*, 34, 2.
- More I.A.R., Paul J. 1973. *Exp.Cell.Res.*, 76, 79.
- Mullez-Hill B., Crapo L., Gilbert W. 1968. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*, 59, 1259.
- Newberne P.M. 1965. In: G.N.Wogan (ed.), *Mycotoxins in Foodstuffs*, pp.187-208. Cambridge: MIT Press.
- Paul J. 1971. In: *Intrinsic and Extrinsic Factors in Eary Mammalian Development*. *Adv. Biosciense*, 6.
- Pierpaoli W.S., Sorkin E. 1972. *Experientia*, 28, 336.
- Poirier M.C., Poirier L.A., Lepage R. 1972. *Cancer Res.*, 32, 6, 1104-1107.
- Platt T., Weber K., Ganem D., Miller H.J. 1972. *Proc.Nat.Acad. Sci. USA*, 69, 897.
- Platt T., Files I.G., Weber K. 1937. *J. Biol. Chem.*, 248, 110.
- Polacow I., Cabasao L., Li H.I. 1976. *Biochemistry*, 15, 21, 4559-4565.
- Rapkine L. 1937. *J.Chim.Phys.*, 34, 416.
- Rosse M.H., Ely I.O. 1954. *J.Franklen Inst.*, 258, 63.
- Schiltz E., Sekeris C.E. 1969. *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.*, 350, 317.
- Schirch L., Ropp M. 1967. *Biochemistry*, 6, 253-257.
- Shapiro J.T., Leng M., Felsenfeld G. 1969. *Biochemistry*, 88, 3219.
- Shea M., Kleinsmith L.J. 1973* *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 50, 473.

81-2412

- Siomin Yu.A., Siminov V.V., Poverenny A.M. 1973. Biochim. Biophys. Acta, 331, 27.
- Sneider T.W., Potter V.R., Morris H.P. 1969. Cancer Res., 29, 40-54.
- Stedman E., Stedman E. 1950, Nature, 166.
- Stein G.S., Spelsberg T.C., Kleinamith L.J. 1974. Science, 183, 4127, 817-823.
- Stekol J.A., Mody U., Bedrak E., Keller S., Perry J. 1960. Federation Proc, 19, 37.
- Thorndike J., Beck W.S. 1977. Cancer Res., 37, 4, 1125-1132.
- Veech R.L., Raijman L., Krebs H.A. 1970. Biochem.J., 117, 499-503.
- Vergonet J., Homines F.A., Molennar I.A. 1970. J.Biol.Neonate, 5-6.
- Vologodskii A.V., Frank-Kamenetskii M.D. 1975. Theor.Biol., 55, 1,153-166.
- Von Bahn H.P. 1965. ~~Experientia~~, 21, 2, 90.
- Warburg O. 1926. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, Springer Verlag. - 1962. Angewandt auf Krebs, Photosynthese, und Wirkungsweise der Röntgenstrahlen. Stuttgart, G.Thime Verlag.
- Weber G., Lea M.A. 1965. Advanc Enzymol., 4, 115.
- Weinhouse S. 1971. Cancer Res., 31, 1166.
- Wilkins R.J., Macleod H.D. 1976. Mutat. Res., 36, 1, 11-16.

2172-78

48.

Печатается в соответствии с решением Ученого
совета Института биологической физики АН СССР
от 22 февраля 1978 года

21+2-78

В печать 12-V-78

Тир. 1 экз

Цена 2р. 07 коп.

Зак. 33001

Производственно-издательский комбинат ВИНТИ

Люберцы, Октябрьский пр., 403