

ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТКАНЕЙ ГИБЕРНИРУЮЩИХ И ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

© А. К. Гулевский, В. И. Грищенко, О. С. Терещенко, И. И. Щенявский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
электронный адрес: ivanou@rambler.ru

Известно, что в тканях и органах животных-гибернаторов в состоянии зимней спячки наблюдается значительное снижение пролиферативной активности (Виноградова, 1987; Гордон и др., 1987; Gulevsky et al., 1992). Исследование данного вопроса позволило установить присутствие в тканях и органах животных, находящихся в состоянии зимней спячки, регуляторных полипептидов, обладающих цитостатическим действием (Грищенко и др., 1991; Загнойко и др., 1991; Gulevsky et al., 1992). В частности, такой активностью обладает фракция 1—10 кДа из кишечника и мозга гибернирующих длиннохвостых сусликов *Citellus undulatus*. Анализ имеющихся данных позволил предположить, что цитостатическую активность могут проявлять и аналогичные фракции, полученные из тканей холодоадаптированных животных. В пользу такого предположения свидетельствовал, в частности, тот факт, что регуляторные полипептиды из органов и тканей гибернирующих животных проявляют цитостатическое действие в отношении клеток не только гетеротермных животных, но и пойкилотермных (Amorese et al., 1982; Колаева и др., 1984; Крамарова и др., 1984, 1987; Сухова и др., 1990), а это указывает на возможность присутствия соответствующих рецепторов в клетках животных, относящихся к эволюционно отдаленным видам, в том числе у гомойотермных животных. Исследование цитостатической активности фракции 1—10 кДа из мозга гибернирующих и холодоадаптированных животных в отношении опухолевых клеток, в мембранах которых сохраняется множество рецепторов к биологически активным веществам из нормальных тканей и органов, представляет особый интерес. Именно выяснение вопроса о цитостатической активности фракции 1—10 кДа из мозга гибернирующих сусликов и из мозга холодоадаптированных лошадей якутской породы в отношении опухолевых клеток асцитной карциномы Эрлиха, а также механизма ее действия и составило предмет настоящего исследования.

Принятые сокращения: АКЭ — асцитная карцинома Эрлиха, ОР — относительная радиоактивность.

Материал и методика

В экспериментах использовали фракции 1—10 кДа, полученные из тканей длиннохвостых сусликов *Citellus undulatus* и якутских лошадей. Сусликов отлавливали в августе в местах их обитания, после чего содержали в индивидуальных боксах, которые до наступления холодов не отапливались, а в зимний период в них поддерживали температуру 2—5° С. С начала октября количество корма животным постепенно уменьшали, а в конце октября кормить прекращали. С ноября суслики начинали переходить к зимней спячке, которая в декабре—январе у всех подопытных животных была наиболее стабильной. Продолжительность баута составляла 7—16 сут (в среднем 12 сут). Периоды между баутами продолжались от нескольких часов до 1 сут. Процесс выхода из состояния оцепенения длился не менее 1 с. Животных, предназначенных для получения исходного материала (головного мозга), декапитировали с помощью гильотины в середине баута. Температура тела животного составляла 2—4° С. В момент декапитации животные находились в

состоянии глубокого оцепенения, их метаболизм и физиологические процессы при этом были подавлены настолько, что животные не испытывали шока, и, следовательно, сопутствующего шоку у активных животных высвобождения гормонов и других факторов не происходило, что позволило забивать животных без использования наркотика. Получение фракции из мозга сусликов проводили по следующей схеме.

Мозг в количестве 237 г гомогенизировали в 1 л 1 М уксусной кислоты в присутствии ингибиторов протеолиза. Гомогенат центрифугировали, супернатант отделяли, осадок регомогенизировали в таком же объеме уксусной кислоты, прогревали 15 мин на кипящей водяной бане и повторно центрифугировали. Супернатанты объединяли и фильтровали через фильтры Amicon PM-10 и Amicon UM-2. После лиофилизации фракцию с мол. массой в диапазоне 1—10 кДа тестировали в предварительных экспериментах по способности вызвать падение температуры тела у мышей по методике Игнатъева и соавторов (1987). Материал для получения фракции мозга якутских лошадей брали зимой (в ноябре—феврале) и летом (в

июне) — для контроля. Лошади данной породы не являются лабораторными животными. Они разводятся на сельскохозяйственных предприятиях с целью получения мяса и шкур, поэтому ткани мозга получали на бойне, замораживали их в жидком азоте и гомогенизировали в ацетоне. Ацетоновый гомогенат ткани центрифугировали. Полученный супернатант подвергали последовательной ультрафильтрации через фильтры Халипор-4 (Эстония) и Amicon UM-2 X. В итоге получали 3 фракции: меньше 1 кДа, 1—10 кДа и свыше 10 кДа. Как показали предварительные эксперименты, биологической активностью обладали фракции с мол. массой 1—10 кДа, которые и использовали в дальнейшей работе. Авторы использованной нами методики выделения фракции 1—10 кДа из тканей гибернирующих животных (Amorese et al., 1982) проводили исследования, позволившие им сделать заключение о том, что активные вещества, содержащиеся в получаемом экстракте, имеют предположительно пептидную природу (Swan, Schatte, 1977). В частности, ими показано, что активный фактор быстро окислялся даже при 70° С, но полностью восстанавливал свою активность при обработке 2-меркаптоэтанолом. Также были показаны его чувствительность к протеазам и снижение активности этого фактора после алкилирования иодацетамидом, что подтверждает его пептидную природу. На завершающем этапе получения фракции нами были использованы ВЖХ и ацетонитрильные растворы на колонке С-18.

Клетки АКЭ выделяли из асцитного экссудата мышшей на 7-е сут после перевивания опухоли. Мышей с опухолью АКЭ усыпляли с помощью пентабарбиталового наркоза, декапировали, кожу живота отсепарировали, прокалывая брюшину с помощью шприца, промытого стерильным физиологическим раствором с гепарином. Через толстую иглу набирали асцит. Асцитную жидкость, извлеченную из брюшной полости, вносили в десятикратном объеме охлажденного Трис-солевого буфера (0.15 M NaCl и 10 mM Трис-НСl, рН 7.4) и центрифугировали при 3000—4000 g на холоде с удалением надосадка. Процедуру отмывания клеток повторяли дважды. Количество клеток АКЭ подсчитывали с помощью камеры Горяева. Жизнеспособность клеток, определяемая эозиновой пробой, составляла 92—99 %.

Включение ¹⁴С-лейцина в суммарные белки АКЭ исследовали, как описано ранее (Jonstone, 1974). Инкубацию проводили в следующих условиях. Клетки АКЭ суспендировали в растворе Кребс—Рингер—Трис: 145 mM NaCl, 15 mM KCl, 1.45 mM MgCl₂ и 10 mM Трис-НСl-буфер, рН 7.4, с таким расчетом чтобы конечный цитокрит составлял 5 %. К пробам добавляли 2 мКи/мл ¹⁴С-лейцина и инкубировали 5 мин при 37° С. Для отмывки не включившегося в белки ¹⁴С-лейцина пробы после окончания инкубации охлаждали, добавляли к ним 3 мл ТХУ и обрабатывали по методике, описанной в работе Кеппела (1970).

Пул ¹⁴С-лейцина исследовали по радиоактивности в этанольной фракции, как описано в работе Джонстона (Jonstone, 1974). Инкубацию проводили в тех же условиях, что и при исследовании включения ¹⁴С-лейцина в суммарные белки АКЭ. К пробам добавляли 2 мКи/мл ¹⁴С-лейцина и инкубировали 5 мин при 37° С. По окончании инкубации пробы немедленно охлаждали в ледяной бане при 2—4° С и трижды промывали холодным раствором Кребс—Рингер—Трис для удаления лейцина из межклеточного пространства. ¹⁴С-лейцин экстрагировали из клеток 95%-ным этанолом. Радиоактивность полу-

ченной фракции определяли на γ-счетчике LS-7800 в жидком сцинтилляторе на основе диоксана.

Включение ³Н-тимидина или ³Н-уридина в ДНК и соответственно в РНК клеток АКЭ оценивали по накоплению предшественника в кислотонерастворимой фракции клеток. Клетки АКЭ в Кребс—Рингер—Трис-буфере с коничным цитокритом 5 % после добавления ³Н-тимидина (2 мКи/мл) или ³Н-уридина (2 мКи/мл) инкубировали 5 мин при 37° С. Дальнейшая обработка материала на нитроцеллюлозных фильтрах описана в работе Кеппела (1970).

Пулы ³Н-тимидина и ³Н-уридина в клетках АКЭ исследовали по накоплению этих предшественников в кислоторастворимой фракции (Plagemann, Wohlhueter, 1980). Клетки суспендировали в Кребс—Рингер—Трис-буфере (145 mM NaCl, 15 mM KCl, 1.45 mM MgCl₂ и 10 mM Трис-НСl-буфер, рН 7.4), с таким расчетом чтобы конечный цитокрит составлял 5 % после добавления ³Н-тимидина (2 мКи/мл) или ³Н-уридина (2 мКи/мл), и инкубировали при 37° С 5 мин. Затем пробы охлаждали на ледяной бане (2—4° С) и трижды промывали холодным Кребс—Рингер—Трис-буфером для удаления ³Н-тимидина и ³Н-уридина из межклеточного пространства центрифугированием при 3000—4000 g. ³Н-тимидин и ³Н-уридин экстрагировали из клеток холодной 5%-ной ТХУ. Радиоактивность полученной фракции определяли на γ-счетчике LS-7800 в жидком сцинтилляторе на основе диоксана.

Достоверность различий средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов было исследовано влияние фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга гибернирующих сусликов и якутских лошадей на пролиферативные свойства клеток АКЭ, поскольку пролиферативный пул клеток опухолевой суспензии является параметром, определяющим скорость роста опухоли (Франкфурт, 1975). На рис. 1 представлены результаты влияния фракции полипептидов 1—10 кДа на общее количество клеток АКЭ в экссудате, полученном из мышшей на 7-е сут после перевивки. Видно, что опухоли возникли у всех привитых животных. Однако рост опухоли у мышшей, которым перевивали суспензию клеток, предварительно проинкубированных 30 мин при 5° С в растворе фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга якутских лошадей и из мозга гибернирующих сусликов, был существенно замедлен ($1.11 \pm 0.26 \cdot 10^8$ и $1.30 \pm 0.14 \cdot 10^8$ клеток АКЭ соответственно) по сравнению с контролем ($1.95 \pm 0.21 \cdot 10^8$ клеток АКЭ). После экспозиции опухолевого инокулята в течение 30 мин при 5° С в растворе альбумина достоверного замедления роста опухоли по сравнению с контролем не наблюдали ($1.89 \pm 0.24 \cdot 10^8$ клеток АКЭ), что подтверждает специфичность действия фракции полипептидов 1—10 кДа, выделенной из мозга якутских лошадей и сусликов *S. undulatus*. Следует также отметить, что ингибирующий эффект фракции полипептидов обратим (рис. 1). Если сравнивать развитие опухоли у мышшей, которым перевивали суспензию клеток АКЭ, предварительно проинкубированную 30 мин при 5° С в растворе фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга якутской лошади, а затем еще раз отмывать, хорошо видно, что раз-

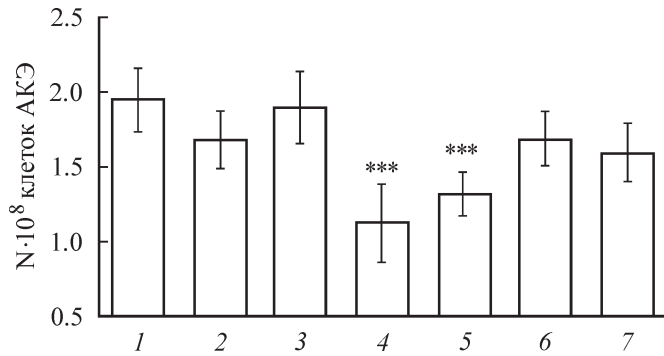


Рис. 1. Количество клеток АКЭ в брюшной полости мышей-опухоленосителей на 7-е сут ($\bar{x} \pm s_x$).

По горизонтали — условия эксперимента: 1 — прививки суспензии отмытых клеток АКЭ, которые были предварительно проинкубированы 30 мин при 5 °С без добавления фракции (контроль; $n = 10$); 2 — прививки суспензии отмытых клеток АКЭ, которые были предварительно проинкубированы 30 мин при 5 °С в растворе фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга якутских лошадей (1 мг/мл; $n = 6$); 3 — прививки суспензии отмытых клеток АКЭ, которые были предварительно проинкубированы 30 мин при 5 °С с альбумином (1 мг/мл; $n = 6$); 4 — прививки суспензии отмытых клеток АКЭ, которые были предварительно проинкубированы 30 мин при 5 °С в растворе фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга якутских лошадей (1 мг/мл; $n = 6$); 5 — прививки суспензии отмытых клеток АКЭ, которые были предварительно проинкубированы 30 мин при 5 °С в растворе фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга гибернирующих сусликов (1 мг/мл; $n = 6$); 6 — прививки суспензии отмытых клеток АКЭ, которые были предварительно проинкубированы 30 мин при 5 °С в растворе фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга якутских лошадей (1 мг/мл), а затем еще раз отмыты ($n = 6$); 7 — прививки суспензии отмытых клеток АКЭ мышам, которым за 3.5 ч до прививки ввели внутривнутрибрюшинно раствор фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга якутских лошадей в дозе 1 мг на 1 г массы животного ($n = 6$). По вертикали — общее количество клеток АКЭ в экссудате, полученном из мышей на 7-е сут после прививки. Достоверность отличий от контроля: одна звездочка — $P < 0.001$, две звездочки — $P < 0.01$, три звездочки — $P < 0.05$.

Fig. 1. The Ehrlich ascitic carcinoma (EAC) cell amount in the abdominal cavity of tumor carrying mice on the 7th day ($\bar{x} \pm s_x$).

X-axis — experimental conditions: 1 — passaging a suspension of washed EAC cells preliminary incubated at 5 °C for 30 min without the 1—10 kDa polypeptide fraction (control), $n = 10$; 2 — passaging a suspension of washed EAC cells preliminary incubated at 5 °C for 30 min without the fraction; then EAC cells were washed again, $n = 6$; 3 — passaging a suspension of washed EAC cell preliminary incubated with albumin (1 mg/ml) at 5 °C for 30 min, $n = 6$; 4 — passaging a suspension of washed EAC cells preliminary incubated in the solution of 1—10 kDa polypeptide fraction isolated from the Yakut horse brain (1 mg/ml) at 5 °C for 30 min, $n = 6$; 5 — passaging a suspension of washed EAC cells preliminary incubated in the solution of 1—10 kDa polypeptide fraction isolated from the hibernatin ground squirrel brain (1 mg/ml) at 5 °C for 30 min, $n = 6$; 6 — passaging a suspension of washed EAC cells preliminary incubated in the solution of 1—10 kDa polypeptide fraction isolated from the Yakut horse brain (1 mg/ml) at 5 °C for 30 min; then EAC were washed again, $n = 6$; 7 — passaging a suspension of washed EAC cells into mice, which were intra-abdominally injected with the solution of 1—10 kDa polypeptide fraction from the Yakut horse brain. The dose was 1 mg/g per body weight. The passaging was carried out 3.5 h after injection, $n = 6$. Y-axis — total amount of EAC cells in exudates extracted from mice on the 7th day after passing. Significant difference from the control: one asterisk — $P < 0.001$, two asterisks — $P < 0.01$, three asterisks — $P < 0.05$.

личия в развитии опухоли по сравнению с контролем практически нет. Интересно, что если сравнивать развитие асцитной опухоли у мышей, которым за 3.5 ч до прививки сделана внутривнутрибрюшинная инъекция раствора фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга якутских лошадей в дозе 1 мг на г массы тела ($1.57 \pm 0.20 \cdot 10^8$ клеток АКЭ), и развитие опухоли в контрольной группе мышей ($1.95 \pm 0.21 \cdot 10^8$ клеток АКЭ), можно отметить тенденцию замедления роста опухоли, хотя полученные результаты достоверно не различаются.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о снижении пролиферативной активности клеток АКЭ, подвергнутых воздействию фракции полипептидов 1—10 кДа из мозга якутских лошадей или из мозга гибернирующих сусликов. Из этого следует, что фракция полипептидов 1—10 кДа, выделенная из органов и тканей гибернирующих сусликов, обладает выраженной цитостатической активностью в отношении опухолевых клеток АКЭ.

Анализируя механизмы цитостатического действия фракции полипептидов 1—10 кДа из тканей зимоспящих и холодоадаптированных животных, естественно было предположить, что в конечном счете этот эффект реализуется на уровне генетического аппарата клеток АКЭ, поэтому мы считали целесообразным изучить влияние фракции полипептидов 1—10 кДа, выделенной из мозга гибернирующих и холодоадаптированных животных, на биосинтез нуклеиновых кислот и белков в клетках АКЭ.

Как видно из данных таблицы, добавление в инкубационную среду фракции 1—10 кДа из мозга сусликов, находящихся в состоянии зимней спячки, в концентрации 0.1 мг/мл достоверно подавляет включение меченых предшественников во вновь синтезируемые белки, ДНК и РНК клеток АКЭ. Особенно заметно ингибирующее влияние на включение меченых аминокислот в суммарные белки. Увеличение концентрации фракции 1—10 кДа из мозга сусликов в инкубационной среде до 1 мг/мл усиливает ингибирующее действие препарата, что более всего проявляется в отношении включения ³H-уридина в РНК клеток АКЭ. В целом из анализа представленных данных следует, что препарат из мозга гибернирующего суслика более интенсивно ингибирует включение предшественников в белки и РНК, чем в ДНК, клеток АКЭ.

В дальнейших экспериментах выяснилось, что в еще большей мере ингибирующей активностью обладает фракция 1—10 кДа, выделенная в зимний период из мозга холодоадаптированных животных — якутских лошадей.

Включение аминокислот, ³H-тимидина и ³H-уридина при добавлении в среду инкубации 0.1 мг/мл фракции 1—10 кДа из мозга якутских лошадей подавляется на 20, 20 и 33 % соответственно сильнее, чем при использовании в той же концентрации препарата из мозга гибернирующих сусликов, а при добавлении 1 мг/мл — сильнее на 28.5, 29.0 и 42.0 % соответственно.

Следующие серии экспериментов, представленные в таблице, были направлены на изучение специфичности ингибирующего действия фракции 1—10 кДа из мозга гибернирующих сусликов и якутских лошадей. В частности, нами было изучено влияние фракции 1—10 кДа из мозга якутских лошадей, выделенной в летний период, на включение меченых предшественников в белки и нуклеиновые кислоты клеток АКЭ. Из сравнения данных видно, что, хотя ингибирующее действие фракции сохраняется, активность препарата уменьшается (рис. 2). Еще одним доказательством специфичности ингибирующего влияния низкомолекулярных протеинов из мозга гибернирующего суслика и холодоадаптированной якутской лошади на включение меченых предшественников является отсутствие активности у альбумина, добавленного в среду инкубации в аналогичной концентрации.

Как следует из результатов, представленных в таблице, ингибирование включения ¹⁴C-аминокислот, ³H-тимидина и ³H-уридина в макромолекулы не связано с на-

Влияние фракций 1—10 кДа, выделенных из тканей гибернирующих и холодоадаптированных животных, на интенсивность включения меченых предшественников в суммарные белки, ДНК и РНК клеток АКЭ ($\bar{x} \pm s_x$)

Условия эксперимента (препарат, добавляемый в среду инкубации клеток АКЭ)	№	Включение ^{14}C -лейцина, имп/мин ($\times 10^3$)	Включение ^3H -тимидина, имп/мин ($\times 10^3$)	Включение ^3H -уридина, имп/мин ($\times 10^3$)
Контроль (без добавок), $n = 10$	1	53.31 \pm 5.48	29.40 \pm 3.00	17.53 \pm 1.55
	2	78.65 \pm 11.40	35.38 \pm 7.85	16.20 \pm 1.20
Фракция 1—10 кДа из мозга сусликов, 0.1 мг/мл, $n = 8$	1	21.30 \pm 2.77 ^б	23.80 \pm 1.80	11.40 \pm 0.80 ^б
	2	100.60 \pm 12.08	42.30 \pm 5.60	21.10 \pm 2.80
Фракция 1—10 кДа из мозга сусликов, 1.0 мг/мл, $n = 6$	1	15.80 \pm 1.24 ^б	18.00 \pm 1.50 ^б	6.80 \pm 0.82 ^б
	2	95.10 \pm 11.00	48.70 \pm 6.20	20.40 \pm 3.00
Фракция 1—10 кДа из мозга якутской лошади, 0.1 мг/мл, $n = 8$	1	20.80 \pm 1.80 ^б	16.40 \pm 1.80 ^б	5.00 \pm 0.70 ^б
	2	80.68 \pm 11.20	49.20 \pm 8.00	21.30 \pm 3.20
Фракция 1—10 кДа из мозга якутской лошади, 1.0 мг/мл, $n = 6$	1	12.40 \pm 1.50 ^б	9.50 \pm 1.40 ^б	2.06 \pm 0.33 ^б
	2	92.30 \pm 12.25	49.47 \pm 4.20	18.00 \pm 2.40
Фракция 1—10 кДа из мозга якутской лошади, выделенной в летний период, 0.1 мг/мл, $n = 6$	1	33.05 \pm 4.20 ^г	24.75 \pm 0.90	12.00 \pm 1.20 ^г
	2	82.30 \pm 9.69	45.00 \pm 5.40	18.55 \pm 1.80
Альбумин, 1.0 мг/мл, $n = 6$	1	37.85 \pm 4.90 ^г	28.20 \pm 2.10	16.96 \pm 1.82
	2	80.50 \pm 10.20	42.49 \pm 5.30	18.50 \pm 2.15

^а 1 — включение в кислотонерастворимую фракцию, 2 — включение в кислоторастворимую фракцию. ^{б-г} Достоверность различий по отношению к контролю: ^б $P < 0.001$, ^в $P < 0.01$, ^г $P < 0.05$.

рушением их транспорта в клетки АКЭ, о чем свидетельствуют сопоставимые с контролем уровни радиоактивности кислоторастворимой фракции, содержащей не включившиеся в макромолекулы предшественники. Напротив, фракции 1—10 кДа из мозга гибернирующих сусликов и холодоадаптированных лошадей даже заметно стимулируют процесс трансмембранного переноса предшественников.

Удаление из инкубационной среды фракции 1—10 кДа путем промывания клеток раствором, не содержащим препарата, приводит к существенному восстановлению включения меченых предшественников в белки и нуклеиновые кислоты, хотя его величина не достигает контрольного уровня. Это особенно заметно после преинкубации клеток в среде с высокой концентрацией фракции 1—10 кДа и, возможно, объясняется частичным проникновением низкомолекулярных биологически активных протеинов в клетки АКЭ.

Поскольку показатели включения меченых предшественников без учета их пула еще не отражают уровня биосинтеза исследуемых макромолекул, нами были проведены расчеты относительного включения ^{14}C -аминокислот, ^3H -тимидина и ^3H -уридина. Результаты проделанной работы отображены на рис. 2, 3. Их анализ позволяет заключить, что фракция 1—10 кДа из мозга гибернирующих сусликов и из мозга холодоадаптированных якутских лошадей дозозависимо достоверно ингибирует в клетках АКЭ биосинтез белков и нуклеиновых кислот. Препараты из обоих исследуемых источников ингибируют биосинтез белков примерно одинаково, в то же время биосинтез ДНК и особенно РНК сильнее подавляется препаратом из мозга холодоадаптированных якутских лошадей.

В пользу специфичности ингибирования белоксинтезирующего аппарата опухолевых клеток препаратом 1—10 кДа из мозга животных, подвергнутых холодо-

вому воздействию, свидетельствуют данные высокой относительной радиоактивности белков и нуклеиновых кислот при внесении в инкубационную среду препарата 1—10 кДа, выделенного из мозга якутских лошадей летом, и альбумина (рис. 2). Следует, однако, отметить, что, в случае использования фракции 1—10 кДа из мозга якутских лошадей летнего периода ингибирования все же сохраняется на уровне достоверности исследуемого явления. Это, по-видимому, обусловлено присутствием какого-то количества регуляторных пептидов в мозге животных даже в летний период, что согласуется с представлениями, развиваемыми в работах Колаевой и соавторов (Иваницкий и др., 1982; Колаева и др., 1984).

Из представленных на рис. 3 данных следует, что ингибирование синтеза белков, РНК и ДНК фракциями 1—10 кДа из мозга гибернирующих сусликов и из мозга холодоадаптированных лошадей носит обратимый характер. Так, показатели относительной радиоактивности этих макромолекул после удаления этих препаратов из инкубационной среды приближаются к контрольным величинам. Неполное восстановление исследуемых процессов, особенно при высоких концентрациях фракции 1—10 кДа во время инкубации, по-видимому, обусловлено, как уже предполагалось выше, частичным проникновением регуляторных пептидов внутрь клеток либо снижением жизнеспособности клеток из-за нарушения состава внутриклеточной среды, в частности концентраций субстратов или ионов K^+ , Na^+ и Ca^{2+} , вследствие изменений проницаемости мембран под влиянием препаратов (Гулевский и др., 1992; Gulevsky et al., 1994).

В настоящее время показано, что фракция 1—10 кДа из тканей гибернирующих и холодоадаптированных животных содержит регуляторные пептиды, обладающие выраженной биологической активностью: гипометаболической (Swan, Schatte, 1977; Amorese et al., 1982; Колаева и др., 1984; Крамарова и др., 1987; Сухова и др., 1990), гипо-

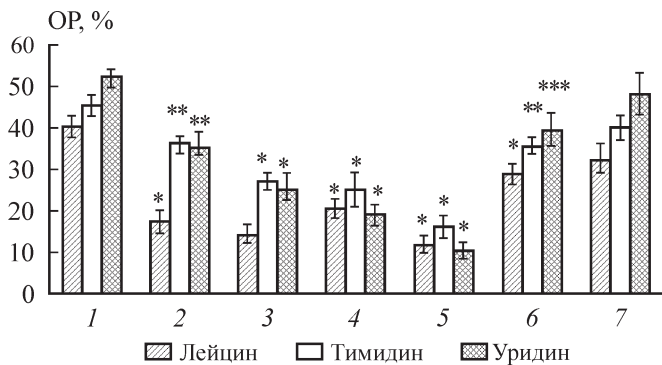


Рис. 2. Влияние фракций 1—10 кДа, выделенных из тканей гибернирующих и холодоадаптированных животных, на относительное включение меченых предшественников в суммарные белки, ДНК и РНК клеток АКЭ ($\bar{x} \pm s_x$).

По горизонтали — условия эксперимента: 1 — контроль, без добавок ($n = 10$); 2 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга сусликов в концентрации 0.1 мг/мл ($n = 8$); 3 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга сусликов в концентрации 1.0 мг/мл ($n = 6$); 4 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга якутских лошадей в концентрации 0.1 мг/мл, ($n = 6$); 5 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга якутских лошадей в концентрации 1.0 мг/мл ($n = 6$); 6 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга якутских лошадей, выделенную в летний период, в концентрации 1.0 мг/мл ($n = 6$); 7 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли альбумин в концентрации 1.0 мг/мл ($n = 6$). По вертикали — относительная радиоактивность (ОР), которую определяли как отношение метки, включившейся в макромолекулы, к общему количеству метки, находящемуся в 1 мл гомогената. Достоверность отличий от контроля: одна звездочка — $P < 0.001$, две звездочки — $P < 0.01$, три звездочки — $P < 0.05$.

Fig. 2. The influence of 1—10 kDa fractions isolated from tissues of the hibernating and cold-adapted animals on the relative incorporation of labeled precursors into total proteins, DNA, and RNA in EAC cells ($\bar{x} \pm s_x$).

X-axis — experimental conditions: 1 — control, without any additions, $n = 10$; 2 — 1—10 kDa fraction from the brain of *Citellus undulatus* was added to the incubation medium of EAC cells (0.1 mg/ml), $n = 8$; 3 — 1—10 kDa fraction from the brain of *C. undulatus* was added to the incubation medium of EAC cells (1.0 mg/ml), $n = 6$; 4 — 1—10 kDa fraction from the Yakut horse brain was added to the incubation medium of EAC cells (0.1 mg/ml), $n = 8$; 5 — 1—10 kDa fraction from the Yakut horse brain was added to the incubation medium of EAC cells (1.0 mg/ml), $n = 6$; 6 — 1—10 kDa fraction isolated from the Yakut horse brain in summer was added to the incubation medium of EAC cells (1.0 mg/ml), $n = 6$; 7 — albumin was added to the incubation medium of EAC cells (1.0 mg/ml), $n = 6$. Y-axis — relative radioactivity, calculated as a ratio of the incorporated label to the total label quantity in 1 ml of a homogenate. Significant difference from the control: one asterisk — $P < 0.001$, two asterisks — $P < 0.01$, three asterisks — $P < 0.05$.

термической (Myers et al., 1981; Пастухов, Чепкасов, 1983; Игнатьев и др., 1987, 1989; Сухова и др., 1990), кардиотропной (Кокоз и др., 1987; Гулевский и др., 1992; Gulevsky et al., 1994), а также цитостатической (Amorese et al., 1982; Колаева и др., 1984; Крамарова и др., 1987).

Проведенное нами исследование позволило выявить у фракции 1—10 кДа из мозга гибернирующих сусликов и из мозга холодоадаптированных якутских лошадей наличие цитостатической активности в отношении опухолевых клеток АКЭ. Это подтверждается более низкой концентрацией опухолевых клеток в асците животных, которым были перевиты клетки АКЭ, обработанные фракцией 1—10 кДа в концентрации 0.1—1.0 мг/мл инкубационной среды. Обнаруженный факт свидетельствует о сохранности рецепторов к регуляторным полипептидам из тканей и органов гибернирующих и холодоадапти-

рованных животных у опухолевых клеток АКЭ. Наблюдаемый цитостатический эффект носит частично обратимый характер, так как он уменьшается при удалении фракции 1—10 кДа из инкубационной среды. На специфику цитостатической активности в отношении клеток АКЭ указывает отсутствие или незначительность эффекта при использовании альбумина или фракции 1—10 кДа из мозга животных, выделенной в летний период.

Полученные данные указывают на то, что реализация цитостатического действия фракции 1—10 кДа включает в себя ее воздействие на генетический аппарат опухолевых клеток, о чем свидетельствует ингибирование биосинтеза ДНК и в еще большей мере — РНК и белков.

На стадии получения фракций 1—10 кДа из тканей зимоспящих и холодоадаптированных животных работы выполнялись совместно с сотрудниками лаборатории Ин-

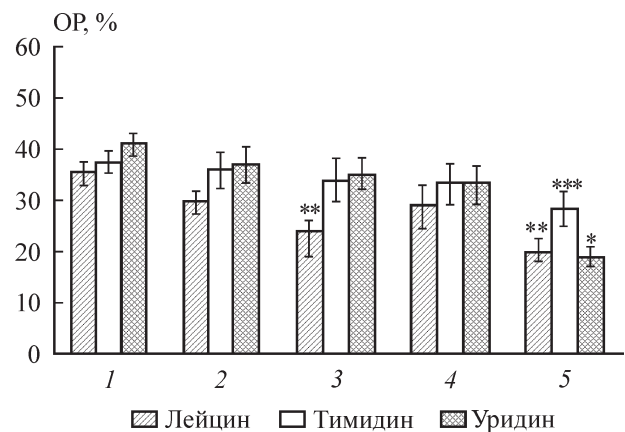


Рис. 3. Относительное включение меченых предшественников в суммарные белки, ДНК и РНК клеток АКЭ после отмывки от вносимых в среду инкубации фракций 1—10 кДа, выделенных из тканей гибернирующих и холодоадаптированных животных ($\bar{x} \pm s_x$).

По горизонтали — условия эксперимента: 1 — контроль, без добавок ($n = 10$); 2 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга сусликов в концентрации 0.1 мг/мл ($n = 8$); 3 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга сусликов в концентрации 1.0 мг/мл ($n = 6$); 4 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга якутских лошадей в концентрации 0.1 мг/мл ($n = 8$); 5 — в среду инкубации клеток АКЭ добавляли фракцию 1—10 кДа из мозга якутских лошадей в концентрации 1.0 мг/мл ($n = 6$). По вертикали — относительная радиоактивность (ОР), которую определяли как отношение метки, включившейся в макромолекулы, к общему количеству метки, находящемуся в 1 мл гомогената. Достоверность отличий от контроля: одна звездочка — $P < 0.001$, две звездочки — $P < 0.01$, три звездочки — $P < 0.05$.

Fig. 3. Relative incorporation of labeled precursors into the total proteins, DNA, and RNA in EAC cells after washing from 1—10 kDa fractions isolated from tissues of hibernating and cold-adapted animals ($\bar{x} \pm s_x$).

X-axis — experimental conditions: 1 — control, without any additions, $n = 10$; 2 — 1—10 kDa fractions isolated from the brain of *Citellus undulatus* was added to the incubation medium of EAC cells (0.1 mg/ml), $n = 8$; 3 — 1—10 kDa fraction from the brain of *C. undulatus* was added to the incubation medium of the Yakut horse brain was added to the incubation medium of EAC cells (0.1 mg/ml), $n = 8$; 4 — 1—10 kDa fraction from the Yakut horse brain was added to the incubation medium of EAC cells (1.0 mg/ml), $n = 6$. Y-axis — relative radioactivity calculated as a ratio of the incorporated label to the total label quantity in 1 ml of a homogenate. Significant difference from the control: one asterisk — $P < 0.001$, two asterisks — $P < 0.01$, three asterisks — $P < 0.05$.

ститута биологической физики РАН (Пушино-на-Оке) Д. А. Игнатъевым и С. Г. Колаевой, а также с сотрудником Якутского института биологии А. К. Ахременко.

Список литературы

Виноградова М. С. 1987. Функциональная морфология эпителиоцитов желудка в период зимней спячки. В кн.: Механизм зимней спячки. Сб. науч. тр. Пушино. 160—168.

Гордон Р. Я., Бочарова Л. С., Попов В. И. 1987. Структурно-функциональные основы метаболизма РНК в мозге зимне-спящих в период зимней спячки. В кн.: Механизм зимней спячки. Сб. науч. тр. Пушино. 168—175.

Грищенко В. И., Загнойко В. И., Гулевский А. К., Щенявский И. И. 1991. Особенности функционирования белоксинтезирующего аппарата гибернирующих *Citellus undulatus*. ДАН СССР. 318 (2) : 466—470.

Гулевский А. К., Грищенко В. И., Терещенко О. С., Загнойко В. И. 1992. Влияние фракции 1—10 кД из мозга якутской лоси на Ca^{2+} -транспортирующие системы в везикулах сарколеммы кардиомиоцитов. Бюл. эксперим. биол. мед. 9 : 274—278.

Загнойко В. И., Гулевский А. К., Ильясова Е. И., Щенявский И. И. 1991. Биосинтез суммарных белков и РНК в клетках печени длиннохвостых сусликов *Citellus undulatus*, находящихся в различных функциональных состояниях. Цитология. 10 (1) : 89—93.

Иваницкий Д. А., Колаева С. Г., Пастухов Ю. Ф., Крамарова Л. И., Сапожкова Г. Г., Чепкасов И. Е., Ильясов Ф. Э., Ильясова Е. И. 1982. Эффект выраженного снижения метаболизма у теплокровных эндогенными веществами из тканей зимоспящих в состоянии спячки. ДАН СССР. 267 (2) : 978—990.

Игнатъев Д. А., Колаева С. Г., Крамарова Л. И., Кравченко И. И. 1989. Гипотермическое влияние на мышечной фракции 1—10 кД тонкой кишки гибернирующего суслика (*Citellus undulatus*) в условиях гипоксии и гиперкапнии. Журн. эволюц. биохим. физиол. 25 : 318—323.

Игнатъев Д. А., Колаева С. Г., Михалева И. И., Крамарова Л. И., Свириев В. И., Полькина О. В. 1987. Результаты тестирования некоторых биологически активных фракций, выделяемых из тканей зимоспящих. В кн.: Механизм зимней спячки. Сб. науч. тр. Пушино. 106—118.

Кенпел В. 1970. Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка. М.: Наука. 248 с.

Кокос Ю. М., Накимова О. В., Свириев В. И., Крамарова Л. И., Повзун А. А., Михалева И. И., Фрейдин А. А., Малыгин А. М., Колаева С. Г., Ильясов Ф. Э. 1987. Действие веществ, содержащихся во фракциях мозга и тонкой кишки гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*), на возбудимость миокардных волокон. В кн.: Механизм зимней спячки. Сб. науч. тр. Пушино. 146—159.

Колаева С. Г., Крамарова Л. И., Иваницкий Д. А. и др. 1984. Влияние низкомолекулярных фракций, выделенных из мозга и

слизистой оболочки кишечника сусликов (*Citellus undulatus*) в состоянии спячки, на оплодотворенные яйцеклетки морских ежей *Stongylocentrotus intermedius*. ДАН СССР. 279 (3) : 755—757.

Крамарова И. Г., Колаева С. Г., Крамарова Л. И., Аристанкесян В. А., Шиллинг Н. В., Хомуецкая О. Е., Сапожкова Г. Г. 1984. Влияние экстракта кишки зимоспящего суслика (*Citellus undulatus* Pallas) на форму покоя первичного сна травяной лягушки. Криобиология и криомедицина. 15 : 36—40.

Крамарова Л. И., Колаева С. Г., Бронников Г. Е., Крафтс И. В. 1987. Низкомолекулярные вещества кишечника зимоспящих сусликов (*Citellus undulatus*) — ингибиторы развития оплодотворенных яйцеклеток морских ежей (*Stongylocentrotus intermedius*). В кн.: Механизм зимней спячки. Сб. науч. тр. Пушино. 138—145.

Пастухов Ю. Ф., Чепкасов И. Е. 1983. Изменение терморегуляции у белых мышей при действии эндогенными веществами из ткани кишечника. Физиол. журн. СССР. 69 (11) : 1485—1490.

Сухова Г. С., Игнатъев Д. А., Ахременко А. К., Левашов В. Г., Михалева И. И., Свириев В. И., Ануфриев А. И., Зиганшин Р. Х., Крамарова Л. И., Гнутов Д. Ю., Колаева С. Г., Аумарин И. П. 1990. Кардиотропная, гипометаболическая и гипотермическая активность пептидных фракций из тканей зимоспящих и холодоадаптированных животных. Журн. эволюц. биохим. физиол. 26 (5) : 623—629.

Франкфурт О. С. 1975. Клеточный цикл в опухолях. М.: Медицина. 172 с.

Amorese P. A., Swan H., Bamburg J. K. 1982. Extracts from the brains of hibernating and alert ground squirrels: effects on cells in culture. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Neurobiology. 79 : 6375—6379.

Gulevsky A. K., Grischenko V. I., Tereshchenko O. S., Zagnoiko V. I. 1994. The effect of a (1—10 kD) fraction of Yakut horse brain on the kinetic parameters of Ca^{2+} -transporting systems in cardiomyocyte sarcolemma vesicles. Cryo-Letters. 1 : 27—32.

Gulevsky A. K., Grischenko V. I., Zagnoiko V. I., Shchenyavsky I. J., Ilyasova E. N. 1992. Peculiarities of functioning of protein-synthesizing apparatus of the hibernator (*Citellus undulatus*). Cryobiology. 29 : 679—684.

Jonstone R. M. 1974. Role of ATP on the initial rate of amino acid uptake in Ehrlich ascites cells. Biochim. biophys. acta. 356 : 362—370.

Myers R. D., Oeltgen P. R., Spurrier W. A. 1981. Hibernation «trigger» injected in brain induces hypothermia and hypophagia in the monkey. Brain. Res. Bull. 7 : 691—695.

Plagemann H. G. W., Wohlhueter R. M. 1980. Permeation of nucleosides nucleic acid bases and nucleotides in animal cells. Curr. Top. Membranes and Transp. N. Y. 14 : 228—330.

Swan H., Schatte C. 1977. Anti-metabolic extract from the brain of hibernating ground squirrel *Citellus tridecemlineatus*. Science. 195 : 84—85.

Поступила 26 V 2005

LOW-MOLECULAR PEPTIDES FROM TISSUES OF HIBERNATING AND COLD-ADAPTED ANIMALS INFLUENCE CELL PROLIFERATION IN THE EHRlich ASCITIC CARCINOMA

A. K. Gulevsky, V. I. Grishchenko, O. S. Tereshchenko, I. J. Shchenyavsky

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov;
e-mail: ivanou@rambler.ru

Polypeptides with cytostatic activity are known to be present in animal tissues during winter dormancy. A 1—10 kDa polypeptide fraction with cytostatic activity was obtained from brain tissue of hibernating ground squirrels and cold-adapted Yakut horses. The pattern of cytostatic activity of this fraction towards tumor cells is of great interest. We present results testifying to cytostatic activity of this fraction towards the Ehrlich ascitic carcinoma cells. The cytostatic effect is realized in tumor cells at the genetic level.

Key words: Ehrlich ascitic carcinoma, hibernating and cold-adapted animals, proliferation, cytostatic effect.