

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

ТЕРЕЩЕНКО ОЛЕГ СЕРГІЙОВИЧ

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА МЕХАНІЗМ ДІЇ  
ФРАКЦІЇ ПОЛІПЕПТИДІВ 1-10 КД З ТКАНИН ГІБЕРНУЮЧИХ ТА  
ХОЛОДОАДАПТОВАНИХ ТВАРИН

03.00.22 - кріобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т  
дисертації на здобуття вченого ступіня  
кандидата біологічних наук

Харків - 1994 р.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини Академії наук України

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор А.К.ГУЛЕВСЬКИЙ

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор В.А.ЧУИКО

академік АН України

Є.Я.ПАНКОВ

Провідна організація: Інститут біохімії ім. А.В.Паладіна АН України, м.Київ

Захист відбудеться "22" березня 1994 р. в 13<sup>30</sup> годин на засіданні спеціалізованої ради Д.016.60.01 при Інституті проблем кріобіології та кріомедицини АН України (ЗІООІБ, м. Харків, вул.Переяславська, 23)

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології та кріомедицини АН України

Автореферат розісланий "22" лютого 1994 р.

Вчений секретар Спеціалізованої ради, доктор медичних наук, професор А.Н.ГОЛЬЦЕВ

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00810452 (К)

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

В останні роки широко обговорюється питання про участь ендогенних біологічно активних речовин в холодовій адаптації та індукції зимової сплячки у ссавців. Виділені низькомолекулярні фракції поліпептидів біологічно активних речовин з тканин зимоспячих та холодоадаптованих тварин, структура активних компонентів яких поки що не ідентифікована. Ці речовини (фракції поліпептидів) викликають виражене зниження температури тіла (на 4-7°C), метаболізму (на 60-80%), кількості споживання їжі, частоти серцебиття, уповільнюють поведінкові рефлекси (Свон, 1977, Гулевський О.К., 1982, Іваницький Г.Р., 1982, Ігнат'єв Д.О., 1987 та ін.). Проте, здобуті результати до кінця не розкривають механізмів гуморальної регуляції рівня обміну речовин та фізіологічних функцій тварин в стані гібернації, холодового заціпеніння та холодової адаптації. На сучасному етапі розвитку науки дослідження такого роду становлять не тільки теоретичний, але й практичний інтерес: вони можуть знайти застосування як в експериментальній біології, так і в клінічній медицині, а також при розробці методів одержання стану штучного гіпобіозу, заснованого на природних фізіологічних механізмах.

Метою цієї роботи є дослідження біологічної активності та механізму дії фракції поліпептидів I-IO кД з органів та тканин гібернуючих та холодоадаптованих тварин.

### Задачі дослідження:

1. Дослідити кардіотропну активність та механізм дії фракції поліпептидів I-IO кД з тканин гібернуючих та холодоадаптованих тварин.

2. Дослідити цитостатичну активність та механізм дії фракції поліпептидів I-IO кД з органів та тканин зимоспячих та холодоадаптованих тварин.

3. Вивчити вплив фракції поліпептидів I-IO кД з мозку гібернуючих ховрахів (*Citellus undulatus*) на температурну рецепцію кішки та людини.

4. Дослідити жарознижуючу та протизапальну активність фракції поліпептидів I-IO кД з тканин холодоадаптованих та зимоспячих тварин.

Наукова новизна роботи. Вперше показана фармакологічна

активність фракції поліпептидів I-IO кД, виділеної з тканин гібернуючих та холодоадаптованих тварин, у відношенні гомойотермних тварин. Встановлена здатність фракції поліпептидів I-IO кД знижувати чутливість холодової рецепції шкіри. З'ясовано, що механізм дії фракції поліпептидів I-IO кД з тканин гібернуючих та холодоадаптованих тварин пов'язаний з впливом на Са-транспортуючі системи плазматичних мембран. Вперше з'ясована здатність фракції поліпептидів I-IO кД інгібувати біосинтез білків та нуклеїнових кислот пухлинних клітин.

Теоретична та практична значущість роботи.

Теоретичне значення роботи полягає в тому, що експериментально встановлена можливість рецепції регуляторних поліпептидів, виділених з органів та тканин гібернуючих та холодоадаптованих тварин в організмі гомойотермних тварин. Це відкриває перспективу утворення й розробки методів керованого штучного гіпобіозу тварин та людини. В практичному відношенні проведені дослідження створюють основу для розробки та застосування принципово нових лікарських засобів, володіючих жарознижуючою, протизапальною, кардіотропною та цитостатичною дією. Результати такого роду досліджень припускають використання фракції поліпептидів I-IO кД для захисту органів та тканин від пошкоджень на період гіпотермічного зберігання.

Головні положення, які виносяться на захист.

1. Фракція поліпептидів I-IO кД з органів та тканин гібернуючих та холодоадаптованих тварин володіє біологічною активністю у відношенні гомойотермних тварин.

2. Біологічна активність фракції поліпептидів I-IO кД має зворотній характер.

3. Дія фракції поліпептидів I-IO кД з тканин зимоспячих та холодоадаптованих тварин обумовлена взаємодією з йонотранспортними системами плазматичних мембран

Апробація роботи. Матеріали роботи доповідалися та обговорювалися на Міжнар. конф. ЮНЕСКО, 1992 р., конференції молодих вчених ІПКтаК АНУ, 1992 р.

Публікації. Головні положення дисертації викладені в 5 друкованих роботах.

Об'єм та структура роботи. Дисертація викладена на 114 стор.

машинописного тексту, складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, обговорення й висновків. Містить 6 таблиць та 24 малюнки. Список використаної літератури містить 125 найменувань.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В експериментах використовували фракції поліпептидів I-IO кД з тканин довгохвостого ховраха (*Citellus undulatus*) та якутського коня, які отримували по методу Свона, (1977) та Ахременко, (1990) відповідно. Про жарознижуючу активність фракцій робили висновок по їх здатності полегшувати гіпертермічну реакцію у щурів, викликану введенням прокип'яченого та підігрітого до 37-40°C молока. Протизапальну активність речовин досліджували на моделі гострого асептичного запалення, індукованого каррагенином (Sigma, США), Яковлева Л.В., 1988). Віскульовані препарати сарколеми виділяли по методу (L.V.Jones, 1979). Ізольоване перфузія сердець проводилася по методу Дворцевого В.К., (1986). Визначення ступінь пошкодження органу в процесі гіпотермічної перфузії проводили за власним методом (Авт.Свід., 1985). Включення та транспорт  $^{14}\text{C}$ -лейцину в клітини АKE досліджували, як описано в роботі (Johnstone, 1974). Дослідження включення та транспорту  $^3\text{H}$ -тимідину,  $^3\text{H}$ -уридину в клітинах АKE проводили по методу (Plagemann H.G., 1980). Дослідження терморезентів шкіри проводили по методу (Клейнбок І.Я., 1986, 1992). Статистичну обробку здійснювали по методу Ст'юдента-Фішера (Іванов К.П., 1990).

## РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Раніше було встановлено, що фракція поліпептидів I-IO кД з тканин зимосплячних та холодоадаптованих тварин володіє вираженим гіпотермічним та гіпометаболічним ефектом (Ахременко А.К., 1990, Ігнат'єв Д.А., 1987, Swan H., 1968, 1977), в зв'язку з цим, становило інтерес дослідити жарознижуючий та протизапальний ефекти. Було показано, що фракції поліпептидів I-IO кД, виділені з мозку якутського коня, а також з мозку та кишечника якутського ховраха (*Citellus undulatus*) володіють вираженими жарознижуючим та протизапальним ефектами. Величина цих ефектів залежить від дози та часу забору матеріалу (зима, літо).

В дослідженнях Г.С.Сухової з співавт. було показано, що фракція поліпептидів I-IO кД з органів та тканин гібернууючих та холодоадаптованих тварин чинить виражену кардіотропну дію, яке проявляється в зменшенні частоти й сили серцевих скорочень ізольованих сердець гоміотермних тварин, при введенні фракції поліпептидів I-IO кД в перфузійний розчин. В зв'язку з цим, являло інтерес дослідити вплив фракції поліпептидів I-IO кД на частоту скорочень, опірність судин та рівень флюоресценції ізольованих сердець щурів як при нормотермічній, так і при гіпотермічній перфузіях.

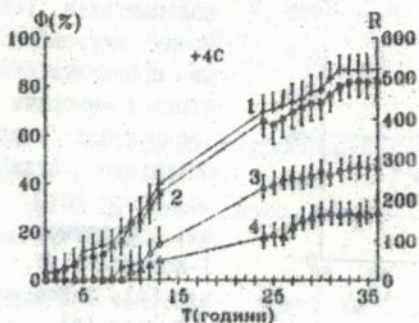
В першій серії дослідів проводилась ізольована нормотермічна (при +37°C) перфузія серця розчином Хенкса, в який вводили в різних концентраціях фракцію I-IO кД з мозку якутського коня. Було показано, що нормотермічна перфузія серця розчином, який містив фракцію I-IO кД (40 мг/л) приводила до кардіотропної дії, яка проявлялася в зменшенні частоти пульсації аж до припинення, а в кінці тридцятихвилинної перфузії паралельним збільшенням опірності судин серця. Для підтвердження ефекту зворотності кардіотропної дії фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня в наших дослідях, на відміну від дослідів Сухової Г.С., проводилося двократнє введення фракції поліпептидів: на початку перфузії та опісля двогодинної перфузії, з подальшою відмивкою. Таким чином, було показано, що введення фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня в перфузет ізольованих сердець щурів приводило до зворотнього ефекту зниження частоти скорочень й паралельному збільшенню опірності судин.

Введення фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня в середовище перфузії ізольованого серця при гіпотермічній перфузії не приводило до достовірної різниці в показниках опірності судин серця та збереження адатності до скорочення сердець як при використанні розчину Хенкса, так і при використанні розчину Бертшнейдера.

Враховуючи вище викладене, в наступних дослідях була змінена схема дослідів: за I годину до забору сердець, в черевнопорожнину щурів вводили розчин фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня. Подібний підхід захисту органу на період його консервування знайшов широке застосування в медичній практиці. (Виноградов В.М., 1966, Лискін Г.І., 1966, Онищенко Н.А., 1972). В

зв'язку з тим, що з'ясувати захисну дію фракції поліпептидів I-10 кД з мозку якутського коня в момент консервування серця базуючись на показниках опірності судин було складно, нами було вирішено додатково використати метод флуоресційного контролю збереження органу (А.С. № II46000, 1985), для чого в перфузат на час консервування органу в умовах гіпотермії (при  $+4^{\circ}\text{C}$ ) та нормотермії ( $+37^{\circ}\text{C}$ ) вводили флуоросцеїндіацетат (ФДА).

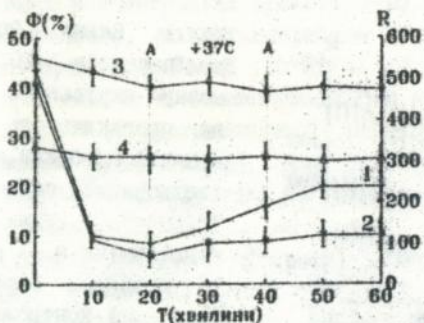
На мал. I представлені дані опірності судин та рівня флуоресценції на протязі 36-годинної гіпотермічної перфузії сердець щурів, яким за I годину до вилучення органу в черевнопорожнину вводили розчин фракції поліпептидів I-10 кД з розрахунку I мг/г ваги тварини.



Мал. I. Вплив фракції поліпептидів I-10 кД з мозку якутського коня на проникливість зовнішньої мембрани клітин ізольованих сердець та опірність судин при гіпотермічній перфузії розчином Берштейндера. 1-Контроль (R), 2-Дослід (R), 3-Контроль (Ф), 4-Дослід (Ф)

Видно, що показники опірності судин органу як в контрольній, так і в дослідній групі серцець достовірно не відрізнялись, при цьому опірність судин досягала максимальних значень через 30-32 години консервування, залишаючись максимально високою й стабільною на протязі послідууючого часу перфузії. На відміну від показників опірності судин, рівень флуоресценції в відтікаючому перфузаті в дослідній групі серцець після 10 годин перфузії в 2-2,5 рази був нижчим, в порівнянні з контролем. Ця відміна в рівні флуоресценції вказує на те, що при такій схемі введення, фракція поліпептидів I-10 кД з мозку якутського коня чинить стабілізуючий ефект на кардіоміоцити. Після 36 годин перфузії, при  $+4^{\circ}\text{C}$ , серця для оцінки їх скорочувальної здатності

підключались до перфузійної системи з розчином Хенкса (при  $+37^{\circ}\text{C}$ ), при цьому теж контролювались показники опірності судин та рівень флуоресценції в відтікаючому перфузаті. З мал.2 видно, що опірність судин в дослідній групі сердець була нижчою, ніж в контролі, до того ж ця різниця проявлялася після 40 хвилин перфузії після двократної стимуляції сердець розчином адреналіну. Показники флуоресценції були нижчими в дослідній групі сердець й залишались стабільними на протязі всієї перфузії. Після стимуляції сердець адреналіном в дослідній групі відзначено скорочення передсердь та шлуночків й відсутність цього в контролі.



Мал. 2. Вплив частоти поліпептидів I-10 кД з мозку якутського коня на проникливість зовнішньої мембрани клітин ізольованих сердець та опірність судин при нормотермічній перфузії розчином Хенкса I-Контроль (R), 2-Дослід (R), 3-Контроль (Ф) 4-Дослід (Ф)

Таким чином, одержані результати показали, що попереднє введення фракції поліпептидів I-10 кД з мозку якутського коня чинить певну захисну дію на міокард в умовах гіпотермічної перфузії.

Для аналізу механізму кардіотропної дії фракції поліпептидів I-10 кД з тканин гібернуючих та холодоадаптованих тварин являло інтерес вивчити її вплив на кінетичні параметри  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортуючих систем в візиках сарколеми кардіоміоцитів.

В результаті досліджень впливу різних концентрацій фракції поліпептидів I-10 кД мозку якутського коня на швидкість пасивного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  (нмоль/мг білка за хв.) в візикули сарколеми кардіоміоцитів були одержані дані, які приведені в таблиці I. При цьому були встановлені наступні закономірності: для всіх концентрацій досліджуваної фракції поліпептидів I-10 кД при

Таблиця I. Вплив різних концентрацій фракції поліпептидів I-IO кД мозку якутського коня на швидкість пасивного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в візикули сарколеми кардіоміоцитів.

Концентрація фракції поліпептидів, мг/мл	Швидкість пасивного транспорту $\text{Ca}^{2+}$ , нмоль/мг білка за хв.			
	I	II	III	IV
$1 \cdot 10^{-5}$	$2,26 \pm 0,25$	$3,29 \pm 0,47$	$10,50 \pm 1,33^*$	$31,79 \pm 4,48$
$1 \cdot 10^{-4}$	$2,37 \pm 0,42$	$3,92 \pm 0,52$	$8,84 \pm 1,03$	$29,58 \pm 0,45^*$
$1 \cdot 10^{-3}$	$2,48 \pm 0,56$	$3,40 \pm 0,26$	$10,90 \pm 0,14^*$	$30,44 \pm 0,19^*$
$1 \cdot 10^{-2}$	$2,63 \pm 0,56$	$3,48 \pm 0,49$	$10,03 \pm 1,24^*$	$29,00 \pm 3,31^*$
$3 \cdot 10^{-2}$	$2,68 \pm 0,38$	$4,11 \pm 0,26^*$	$11,39 \pm 1,85^*$	$26,02 \pm 1,71^*$
$1 \cdot 10^{-1}$	$2,60 \pm 0,38$	$4,33 \pm 0,41^*$	$11,03 \pm 0,84^*$	$25,54 \pm 1,27^*$
$3 \cdot 10^{-1}$	$2,61 \pm 0,34$	$4,53 \pm 0,61^*$	$11,89 \pm 1,07^*$	$24,89 \pm 0,31^*$
Контроль $\text{H}_2\text{O}$	$2,27 \pm 0,18$	$3,19 \pm 0,38$	$8,20 \pm 0,49$	$32,00 \pm 1,78$

Примітка : Початкова концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі інкубації складала : I-0,1 мМ; II-0,5 мМ; III-1,0 мМ; IV-3,0 мМ.

\* - різниця статистично значуща ( $p \leq 0,05$ ) у відношенні до контрольних показників.

концентрації субстрату переносу  $\text{Ca}^{2+}$  від 0,1 до 1 мМ, швидкість пасивного входу  $\text{Ca}^{2+}$  в візикули дещо збільшувалась, а при концентрації субстрату переносу  $\text{Ca}^{2+}$  3 мМ, яка є фізіологічною, для всіх концентрацій фракції поліпептидів I-IO кД мозку якутського коня, реєстрували значуще зменшення швидкості транспорту. В подальших дослідках був вивчений вплив фракції поліпептидів I-IO кД мозку якутського коня на кінетику активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ , який здійснюється в присутності АТФ (табл. 2).

При аналізі представлених результатів, можна прийти до висновку, що для всіх концентрацій досліджуваної фракції поліпептидів I-IO кД мозку якутського коня (від  $10^{-5}$  до  $3 \cdot 10^{-1}$  мг/мл) при концентрації в середовищі  $\text{Ca}^{2+}$  від  $10^{-7}$  М до  $3 \cdot 10^{-6}$  М в реакції енергозалежного переносу, величина швидкості накопичення  $\text{Ca}^{2+}$  перевищувала контрольні значення.

Таким чином, результати проведених дослідів вказують, що

Таблиця 2. Вплив різних концентрацій фракції поліпептидів I-IO кД мозку якутського коня на швидкість активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в інвертовані візикули сарколеми кардіоміоцитів.

Концентрація фракції поліпептидів, мг/мл	Швидкість активного транспорту $\text{Ca}^{2+}$ , нмоль/мг білка за хв.			
	I	II	III	IV
$1 \times 10^{-5}$	$2,78 \pm 0,82$	$6,70 \pm 0,71$	$6,83 \pm 0,47$	$59,12 \pm 7,78$
$1 \times 10^{-4}$	$3,29 \pm 0,35$	$6,84 \pm 1,02$	$7,50 \pm 1,38$	$63,47 \pm 1,57^*$
$1 \times 10^{-3}$	$3,00 \pm 0,02^*$	$6,67 \pm 0,43$	$6,78 \pm 2,79$	$63,02 \pm 8,24^*$
$1 \times 10^{-2}$	$3,33 \pm 0,24^*$	$6,80 \pm 1,43$	$6,30 \pm 0,33^*$	$58,76 \pm 5,03^*$
$3 \times 10^{-2}$	$3,40 \pm 0,19^*$	$7,46 \pm 0,21^*$	$8,46 \pm 0,51^*$	$71,99 \pm 12,03^*$
$1 \times 10^{-1}$	$2,81 \pm 0,55$	$7,86 \pm 0,27$	$11,00 \pm 2,14^*$	$67,83 \pm 9,94^*$
$3 \times 10^{-1}$	$3,55 \pm 0,08^*$	$8,52 \pm 0,50^*$	$11,72 \pm 3,07^*$	$68,59 \pm 6,55^*$
Контроль $\text{H}_2\text{O}$	$2,72 \pm 0,22$	$6,57 \pm 0,36$	$6,70 \pm 0,03$	$49,61 \pm 2,12$

Примітка : Початкова концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі інкубації складала : I- $1 \times 10^{-7}$ М; II- $3 \times 10^{-7}$ М; III- $1 \times 10^{-6}$ М; IV- $3 \times 10^{-6}$ М.

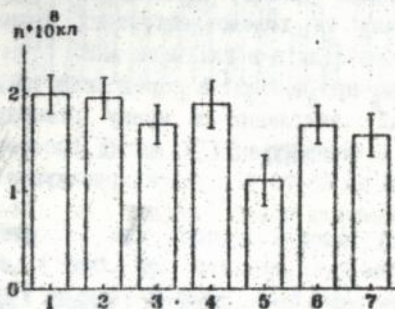
\* - різниця статистично значуща ( $p < 0,05$ ) у відношенні до контрольних показників.

Фракція поліпептидів I-IO кД, виділена з мозку якутського коня в зимовий період, сприяє зниженню швидкості пасивного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  та збільшує швидкість активного транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в інвертованих візикулах сарколеми кардіоміоцитів, при фізіологічній концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі інкубації. Це буде приводити до зниження внутрішньоклітинного вмісту цього катіону в інтактних кардіоміоцитах.

Раніше було показано (Колесова Г.С., 1984), що добавка фракції поліпептидів I-IO кД, виділеної з мозку та слизової оболонки кишечника гібернаючих ховрахів *Citellus undulatus* в середовище інкубації, викликає зворотне інгібування розвитку запліднених яйцеклітин морського їжака (*Strongylocentrotus intermedius*). Цікаві дані одержані Р.А.Аmorese, 1992, ним було знайдено, що при добавці фракції поліпептидів I-IO кД, виділеної з

мозку гібернаючого ховраха, в середовище інкубації культури тип відбувається інгібування синтезу ДНК. В зв'язку з цим, являло інтерес дослідити вплив фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня на проліферативні властивості пухлинних клітин, зокрема клітин виситної карциноми Ерліха (АКЕ).

На мал. 3 представлені результати впливу фракції поліпептидів I-IO кД на загальну кількість клітин АКЕ в ексудаті, який був одержаний з мишей на 7 добу після перещеплення.



Мал.3. Кількість клітин АКЕ в черевній порожнині мишей пухлино-носіїв на 7-му добу. 1- Контр. (без об.), 2-Контр. (без доб. з відм.) 3-Контроль (без доб., 2 рази відм.), 4-Досл. (з альб. 1мг/мл), 5-Досл. (з фр. I мг/мл), 6-Досл. (з фр. I мг/мл, відм.) 7-Досл. (поп. інк. фр.)

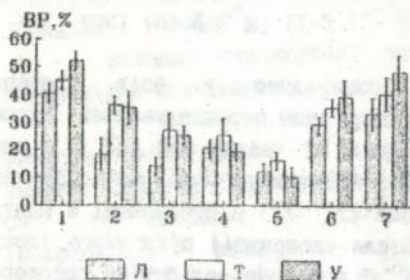
Видно, що пухлини розвивалися у всіх прищеплених тварин, однак ріст пухлин у мишей, яким перещеплювалась суспензія клітин, попередньо проінкубована 30 хвилин при +5° С в розчині фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня, був значно уповільнений ( $1,1 \pm 0,26 \cdot 10^8$  кл. АКЕ) в порівнянні з контролем ( $1,91 \pm 0,21 \cdot 10^8$  кл. АКЕ). Після експозиції пухлинного інкулята на протязі 30 хвилин при +5° С в розчині альбуміну спостерігали не достовірне уповільнення росту пухлини ( $1,89 \pm 0,24 \cdot 10^8$  кл. АКЕ) в порівнянні з контролем ( $1,95 \pm 0,21 \cdot 10^8$  кл. АКЕ), що підтверджує специфічність дії фракції поліпептидів I-IO кД, виділеної з мозку якутського коня. Варто також відзначити, що інгібувчий ефект фракції поліпептидів має зворотній характер, якщо порівнювати розвиток пухлини у мишей, яким прищеплювалась суспензія клітин АКЕ, попередньо проінкубована в розчині фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня, а потім ще раз відмитих, видно, що відмінності в розвитку пухлин в порівнянні з контролем

відсутні.

Таким чином, одержані результати свідчать про зниження проліферативної активності клітин АKE, підданих дії фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня, виділеної в зимовий період.

А злізуючи механізми цитостатичної дії фракції поліпептидів I-IO кД з тканин зимосплячих та холодоадаптованих тварин природньо було припустити, що в кінцевому рахунку цей ефект реалізується нарівні генетичного апарату клітин АKE, цьому ми рахували доцільним вивчити вплив фракції поліпептидів I-IO кД, виділеної з мозку гібернаючих та холодоадаптованих тварин на біосинтез нуклеїнових кислот та білків в клітинах АKE.

Було показано, мал. 4, що при добавці в середовище інкубації клітин АKE фракції I-IO кД, виділених з мозку гібернаючого ховраха та якутського коня в концентрації 1 мг/мл спостерігали інгібування біосинтезу білків на 65-70%, дезоксирибонуклеїнових кислот на 40-64% та рибонуклеїнових кислот на 52-77% по відношенню до контролю.



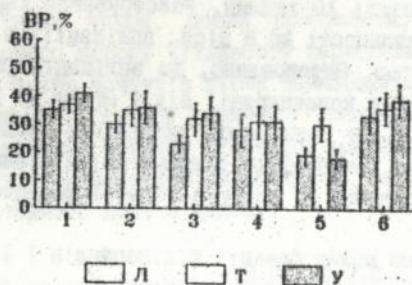
Мал. 4 Вплив фракції поліпептидів I-IO кД, виділених з тканин гібернаючих та холодоадаптованих тварин на відносне включення мічених попередників в сумарні білки, ДНК та РНК клітин АKE.

1- Контр. (без доб.);  
2-Досл. (доб. Фр. Cit. und. 0,1 мг/мл);

3-Досл. (доб. Фр. Cit. und. 1,0 мг/мл); 4-Досл. (доб. Фр. як. коня 0,1 мг/мл); 5-Досл. (доб. Фр. як. коня 1,0 мг/мл); 6-Досл. (доб. Фр. літн. як. коня 1,0 мг/мл); 7-Досл. (доб. альб. 1,0 мг/мл)

В подальших дослідях нами була вивченна можливість відновлення метаболізму білків та нуклеїнових кислот після видалення фракції поліпептидів I-IO кД з середовища інкубації в

результаті відмивки інкубаційним розчином, який не містив ізоваку. В результаті проведених експериментів видно (мал. 5), що відбувається нормалізація, хоча й не в повній мірі, біосинтезу нуклеїнових кислот та білків після вищезгаданої процедури.



Мал. 5 Відносне включення мічених попередників в сумарні білки, ДНК та РНК клітин АКЕ, після відмивки від внесених в середовище інкубації фракції поліпептидів I-IO кД, виділених з тканин гібернаючих та холодоадаптованих тварин.

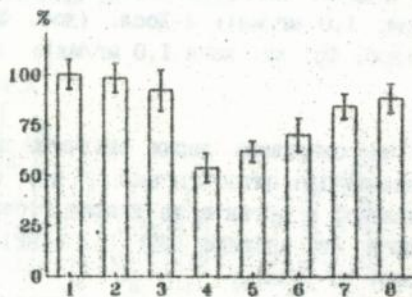
1- Контр. ( без доб.); 2-Досл. (доб. Фр. Cit. und. 0,1 мг/мл); 3-Досл. ( доб. Фр. Cit. und. 1,0 мг/мл); 4-Досл. (доб. Фр. як. коня 0,1 мг/мл); 5-Досл. (доб. Фр. як. коня 1,0 мг/мл); 6-Досл. (доб. альб. 1,0 мг/мл)

Таким чином, сукупність одержаних даних свідчить про те, що одним з реальних механізмів цитостатичної дії фракції поліпептидів I-IO кД, виділеної з органів та тканин гібернаючих та холодоадаптованих тварин на клітини АКЕ є інгібування біосинтезу нуклеїнових кислот та білків.

Гібернація є складним процесом поєднуючим запрограмовану зміну ряду фізіологічних функцій в організмі сплячої тварини, в тому числі й температурної рецепції, яка забезпечує з одного боку збереження енергетичних ресурсів, попереджуючи надмірну реакцію на холод, у вигляді скорочення м'язів (тремтіння), а з другого боку дозволяє зберегти рівень чутливості до температури та запобігає замерзненню тварини при зниженні температури. Можливо, що фракція поліпептидів I-IO кД містить нейрорегуляторні пептиди, які приймають участь в керуванні процесом зморозування. У зв'язку з цим становило інтерес вивчити вплив фракції поліпептидів I-IO кД з мозку гібернаючого ховраха (*Citellus undulatus*) на функціонування терморекторів кішки та людини.

В гострих експериментах на кішках з використанням термо-механостимуляції досліджені зміни текучої імпульсної активності аферентних волокон дорсальних корінців спинного мозку, зв'язаних з терморецепторами шкіри задньої кінцівки. На досліджувальну зону холодового рецептора аплікувався розчин фракції поліпептидів на протязі 10 хвилин. Рееструвався характер зміни частоти імпульсної активності до й після аплікації, а також при холодовій дії на рецептор. Встановлено, що аплікація розчину фракції поліпептидів I-10 кД в концентрації від 1 мг/мл до  $1 \cdot 10^{-4}$  мг/мл чинить тормозну дію на імпульсну активність холодових рецепторів як при початковій температурі ділянки шкіри кішки, яка вивчалася, так і при дії холодом на шкіру в області рецепторного поля.

Потім було досліджено вплив фракції поліпептидів I-10 кД з мозку гібернаючого ховраха на температурну реакцію шкіри людини.



Мал. 6. Вплив фракції поліпептидів I-10 кД з мозку гібернаючого ховраха (*Citellus undulatus*) на температурну порогову чутливість терморецепторів шкіри людини.

1-Контроль (до аплік.);  
2-Дослід (р-н альб.  
1 мг/мл); 3-Дослід  
(фізіол. р-н); 4-Дослід

(р-н Фр. 1 мг/мл); 5-Дослід (р-н Фр. 0,5 мг/мл); 6-Дослід (р-н Фр.  $10^{-2}$  мг/мл); 7-Дослід (р-н Фр.  $10^{-4}$  мг/мл); 8-Дослід (р-н Фр.  $10^{-6}$  мг/мл)

На мал. 6 видно, що після аплікації розчинів альбуміну 1 мг/мл та фізіологічного розчину, достовірних змін порогової чутливості не спостерігалось. Після аплікації розчину 1 мг/мл фракції поліпептидів I-10 кД з мозку гібернаючого ховраха (*Citellus undulatus*) поріг холодової чутливості помітно зменшився й становив 54% по відношенню до контролю. Варто також відзначити

й те, що змінилися почуття. Так, до аплікації почуття при температурній стимуляції кваліфікувались слідувачим чином: холод, сильний холод, мокрий холод, холодний біль. Після 10 хвилинної аплікації їх можна було кваліфікувати як: дотик, прохолодно, легкий холод, холод. Аналогічні ефекти чинили аплікації розчинів фракцій менших концентрацій.

Таким чином, можна припустити, що спостережене зниження холодового порогу чутливості терморецепторів шкіри передпліччя, а також зміна почуттів після температурної стимуляції при аплікації на шкіру розчину фракції поліпептидів I-IO кД з мозку гібернауючого ховраха (*Citellus undulatus*), відбувалися за рахунок впливу на тканевий метаболізм як самого рецептора, так і рецепторного поля в цілому.

## В И С Н О В К И

1. Встановлено, що фракція поліпептидів I-IO кД, виділена з мозку тонкого кишечника гібернауючого ховраха (*Citellus undulatus*) та мозку холодоадаптованого якутського коня володіють вираженим жарознижачим та протизапальним ефектами, які залежать від дози та часу забору матеріалу (зима чи літо).

2. Попереднє введення фракції поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня в організм тварини в дозі 1 мг/кг за 1 годину до вилучення серця приводило до покращання параметрів перфузії, що виражалося в зниженні опірності судин серця та стабілізації зовнішньої мембрани клітин органу, а також збереженні здатності серця доскорочення після 36-годинної гіпотермічної перфузії.

3. Фракція поліпептидів I-IO кД, виділена з мозку якутського коня в зимовий період, в діапазоні концентрацій від 10 мг/мл до 0,3 мг/мл викликає зниження швидкості пасивного транспорту кальцію та збільшення швидкості активного транспорту в інвертованих візікулах сарколем кардіоміоцитів при фізіологічній концентрації кальцію в середовищі інкубації.

4. При інкубації клітин АКЕ з фракцією поліпептидів I-IO кД з мозку якутського коня в дозі 1 мг/мл відбувається зниження проліферативної активності при щепленні їх мишам.

5. Фракція поліпептидів I-IO кД з мозку гібернауючого ховраха *Citellus undulatus* та з мозку якутського коня викликає в дослідях

in vitro дозозалежне інгібування біосинтезу білків, дезоксирибонуклеїнових та рибонуклеїнових кислот зворотнього характеру.

6. Аплікація розчину фракції поліпептидів 1-10 кД з мозку гібернаючого ховраха *Citellus undulatus* на рецепторне поле шкіри людини та кішки викликає достовірне зниження імпульсної активності та холододового порогу чутливості терморекторів.

#### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Терещенко О.С., Загнойко В.І. Вплив фракції (1-10 кД) мозку якутського коня на кінетичні параметри  $Ca^{2+}$ -транспортуючих систем у везикулах сарколеми кардіоміоцитів // В зб.: IV Український біохімічний з'їзд. - Київ. - 1992. - ч. I, с. 101.

2. Гулевский А.К., Грищенко В.И., Терещенко О.С. с соавт. Влияние фракции (1-10 кД) мозга якутской лошади на кинетические параметры  $Ca^{2+}$ -транспортирующих систем в везикулах сарколеми кардиомиоцитов // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1992. - № 9. - с. 274-278.

3. Терещенко О.С., Гулевский А.К., Ахременко А.К. Влияние фракции (1-10 кД) мозга якутской лошади на пассивный и активный АТФ-зависимый транспорт в везикулах сарколеми кардиомиоцитов // Тезисы II Межд. конф. "Успехи современной криобиологии" - Харьков 1992. - с. 78.

4. Гулевский А.К., Терещенко О.С., Ахременко А.К., Тищенко И.Д. Фармакологические эффекты из мозга адаптированной к холоду якутской лошади // Сб. научн. тр. "Лечебная гипотермия" - Харьков 1992. - с. 65.

5. A.K.Gulevsky, V.I.Grischenko, O.S.Tereschenko, V.I.Zagnoiko, A.K.Ahremenko 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. - 1994. - 1. - P. 27-32.

Підп. до друку 22.02.94. Формат 60 x 84 1/16.  
1,0 ум.-друк.арк., 1,0 обя.-вид.арк. Тираж 100. Зам.318.

---

Дільниця оперативного друку ХДАУ.





AB 29.973