

УДК 591.1.05

БИОХИМИЯ

В. И. РЫКОВА, Г. М. РОНИЧЕВСКАЯ, Л. Ф. НИКИФОРОВСКАЯ,  
Л. Н. ЧЕРНИЧЕНКОКАНЦЕРОСТАТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ГЛИКОПЕПТИДНОЙ  
ПРИРОДЫ, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ПРЕПАРАТОВ ПЕЧЕНОЧНОЙ РНК

(Представлено академиком С. Е. Севериным 30 VI 1972)

В предыдущих работах (<sup>1-4</sup>) показано, что препараты РНК, полученные методом фенольной депротеинизации по Кирби (<sup>5</sup>) из печени мышей и крупного рогатого скота, обладают способностью тормозить рост спонтанной аденокарциномы молочных желез у мышей высокоракковых линий СЗН/Не и А. При дополнительной очистке этих препаратов диметилсульфоксидом и цетавлоном (<sup>6</sup>) или хлорной кислотой получена высокоочищенная РНК (80–84%) и выделена примесь. Установлено, что противоопухолевая активность неочищенных препаратов РНК обусловлена как самой РНК, действующей, очевидно, через иммунобиологические системы организма, так и присутствующим в них в качестве примеси фактором не нуклеиновой природы, влияющим непосредственно на опухолевые клетки и отделяющимся при очистке. В настоящей работе описана методика выделения этого канцеростатического фактора и дана его химическая характеристика.

Для выделения канцеростатического фактора к водному раствору препаратов печеночной РНК на холоду медленно добавляли концентрированную  $\text{HClO}_4$  до конечной концентрации 0,5 N. Центрифугированием (при 5000 об/мин) удаляли выпавший осадок РНК; кислый супернатант диализовали против дистиллированной воды до выпадения из диализуемого раствора белого осадка, который отделяли и высушивали при комнатной температуре. Обычно из 1 г препарата РНК нам удавалось получить 12–25 мг канцеростатического фактора. По данным элементарного анализа, выполненного в аналитической лаборатории Института химической кинетики и горения Сибирского отделения Академии наук СССР, он содержит

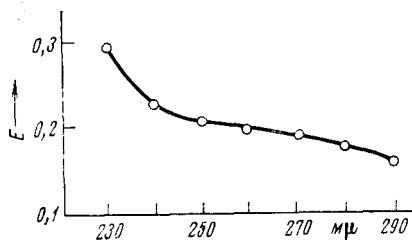


Рис. 1. Спектр поглощения гликопептида (при концентрации 200  $\mu\text{г}$  в 1 мл физиологического раствора) в у.-ф. области

33,5% углерода, 6,9 водорода, 6,12% азота, 47,5% кислорода, 6% серы и не содержит фосфора. Последнее свидетельствует об отсутствии в нем нуклеиновых кислот. На это же указывают данные у.-ф. спектра поглощения, в котором не имеется характерного для нуклеиновых кислот максимума при 260  $\mu\text{м}$  (рис. 1).

При изучении химического состава канцеростатического фактора найдено, что он содержит 80–85% кислых мукополисахаридов (табл. 1). Наличие кислых мукополисахаридов установлено по уроновым кислотам карбазольным методом Динне (<sup>7</sup>) в модификации Биттера (<sup>8</sup>). Сиаловые кислоты реакцией с тиобарбитуровой кислотой по методу Уоррена (<sup>9</sup>) не обнаружены. Аминосакхара определяли по Рейсигу (<sup>10</sup>). Хроматографией на дауксе 50 (<sup>11</sup>) гидролизата гликопептида установлено, что имеющийся в нем аминосахар является галактозаминном. Канцеростатический фактор

содержит также 2,3–3,0% нейтральных гексозахаров, обнаруживаемых реакцией с антроновым реактивом <sup>(12)</sup>, и 8–9% белка. Белок определен методом Лоури <sup>(13)</sup>. Аминокислотный анализ, проведенный при помощи аминокислотного анализатора, показал наличие в нем только семи аминокислот: аланина, глицина, лизина, серина, аспарагина, аспарагиновой и глютаминовой кислот.

После обработки канцеростатического фактора смесью хлороформа и метанола (2:1) при комнатной температуре или при 37° он почти полностью сохранял свою биологическую активность *in vitro*, проявляя цитопатогенное и цитостатическое действие в первичной опухолевой культуре при тех же концентрациях, что и до обработки; в хлороформно-метанольном экстракте липиды отсутствовали. Однако вопрос о содержании липидных веществ в исследуемом факторе требует дальнейшего изучения.

Таким образом, приведенные данные позволяют идентифицировать выделенный из печеночных препаратов РНК канцеростатический фактор как гликопептид, углеводная часть которого состоит из гексуриновых кислот, галактозамина и небольшого количества нейтральных гексозахаров, а белковая представлена пептидом, состоящим из семи аминокислот. Содержание в гликопептиде серы (6%), не входящей в состав аминокислот, дает основание считать, что кислые мукополисахариды, составляющие основной компонент гликопептида, являются сульфатированным соединением. По природе аминсахара (галактозамин) и по количеству сульфатной серы это соединение более всего походит на хондроитинсульфат типа А, В или С, в котором примерно один сульфатный остаток приходится на остаток галактозамина (теоретическое значение серы 5,6–5,8%) <sup>(14)</sup>.

Таблица 4

Действие гликопептида, выделенного из разных препаратов печеночной РНК, на опухолевые клетки мышей в условиях *in vivo* и *in vitro*

Гликопептид, выделенный из партий РНК	Содержание в гликопептиде, %			Минимальная цитопатогенная концентрация гликопептида, мг/мл **	Торможение роста асцитной карциномы Эрлиха, в % ***
	кислые мукополисахариды *	белки	нейтральные гексозахара		
1	85	8,9	2,3	0,047	49
2	80	8,2	2,3	0,047	51
3	81	7,9	2,7	0,047	50
4	83	9,2	2,5	0,047	40
5	84	8,0	2,9	0,047	45

\* Процентное содержание рассчитано по урановым кислотам к сухому весу препарата.

\*\* Минимальная концентрация гликопептида, вызывающая цитопатогенный эффект в первичной опухолевой культуре.

\*\*\* Торможение определяли по обычной методике при суммарных дозах гликопептида 5 мг на мышь СС37Вг весом 18 г.

Гликопептид, по-видимому, является гомогенным веществом: при его ультрацентрифугировании (40 000 об/мин) наблюдается четкий симметричный пик. На основании определения константы седиментации ( $s_{20w}$ ), равной 1,3, можно сделать заключение, что молекулярный вес данного вещества составляет 10 000.

Гликопептид представляет собой вещество, нерастворимое в холодной воде, в органических растворителях, таких как этиловый, метиловый, бутиловый спирты, эфир, хлороформ, пиридин, диметилсульфоксид. Он растворим в горячей воде, в водных растворах щелочей, кислот, а также в 10–15% растворах различных солей. В слабых солевых растворах (в 0,14 M растворе NaCl, в 0,1 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  и др.) гликопептид образует тонкую суспензию, не оседающую в течение 2–3 час.

Полученный препарат достаточно устойчив: при комнатной температуре он полностью сохранял свою биологическую активность в течение года. Водные растворы его не изменяли своей активности после 30-минутного кипячения и даже после автоклавирования при температуре 120°. Однако препарат легко разрушался в водных растворах щелочей при повышенной температуре. Щелочной гидролиз (в 0,5 N растворе NaOH) в течение 18–20 час. при 37° приводил почти к полной потере его биологической активности. Повышенная чувствительность гликопептида к щелочам обусловлена, вероятно, О-гликозидной связью между углеводными единицами и серином (<sup>15</sup>). Следует подчеркнуть, что гликопептиды, выделенные из 5 различных партий РНК, имели постоянный химический состав и обладали, в отличие от препаратов печеночной РНК, почти одинаковой биологической активностью в условиях *in vivo* и *in vitro*. Из табл. 1 видно, что минимальная цитопатогенная концентрация гликопептида в первичной монослойной культуре спонтанной аденокарциномы молочной железы мышей линии СЗН была одинакова для всех 5 гликопептидов, полученных из различных препаратов РНК и составляла 0,047 мг/мл. Эти же гликопептиды почти в одинаковой степени тормозили и развитие асцитной карциномы Эрлиха у мышей СС57Вг: при внутрибрюшинном введении гликопептида в суммарной дозе 5 мг на 1 мышшь весом 18–20 г отмечалось торможение роста опухоли на 40–50%.

По характеру действия гликопептида на опухолевые клетки его можно отнести к цитостатикам организменного происхождения: гликопептид при определенных дозах существенно снижал темп клеточного деления как в первичной опухолевой культуре (при концентрации 0,047 мг/мл), так и в асцитной карциноме Эрлиха. При введении животным отмечалась прямая зависимость между тормозящим действием препарата на опухоль и его суммарной дозой. Так, при суммарной дозе препарата 15 мг на 1 мышшь коэффициент торможения опухоли был равен 100%, при 10 мг 78%, при 5 мг 50%, при 2,5 мг 30%, при 1 мг 20%. Необходимо отметить, что при суммарных дозах 10–15 мг имели место обычно общие токсические явления, которые вели к гибели части экспериментальных животных. Токсичность препарата, по-видимому, обусловлена цитостатическим действием его не только на опухолевые клетки, но и на нормальные клетки интенсивно пролиферирующих органов. Однако наличие значительного противоопухолевого эффекта, при суммарных дозах гликопептида 1–5 мг на мышшь без какого-либо токсического влияния на организм, дает основание полагать, что гликопептид представляет интерес как цитостатическое вещество с определенной противоопухолевой активностью.

За техническую помощь в работе выражаем благодарность И. М. Базавлуку и З. П. Троценко.

Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Академии наук СССР  
Новосибирск

Поступило  
24 VI 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Д. К. Беляев, Р. П. Мартынова и др., ДАН, 169, № 5, 728 (1966).
- <sup>2</sup> Н. А. Матиенко, Г. М. Роничевская и др., Изв. СО АН СССР, в. 1, № 5, 401 (1970).
- <sup>3</sup> Н. А. Матиенко, Г. М. Роничевская и др., Патол. физиол. и эксп. терап., 1, 45 (1971).
- <sup>4</sup> Г. М. Роничевская, Н. А. Матиенко, Р. П. Мартынова, Вопр. онкол., 17, 62 (1971).
- <sup>5</sup> K. S. Kirby, Biochem. J., 64, 405 (1956).
- <sup>6</sup> R. K. Ralph, A. R. Bellamy, Biochem. et biophys. acta, 87, 9 (1964).
- <sup>7</sup> Z. Dische, J. Biol. Chem., 167, 189 (1947).
- <sup>8</sup> T. Bitter, H. Muir, Anal. Biochem., 4, 330 (1962).
- <sup>9</sup> I. Warren, J. Biol. Chem., 234, 1971 (1959).
- <sup>10</sup> I. L. Reissig, J. L. Strominger, L. F. Leboir, J. Biol. Chem., 217, 959 (1959).
- <sup>11</sup> S. Gardell, Acta chem. scand., 7, 207 (1953).
- <sup>12</sup> J. H. Roe, R. E. Dailey, Anal. Biochem., 15, 245 (1966).
- <sup>13</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., 265, 193 (1951).
- <sup>14</sup> А. Готтшальк, Гликопротеины, 1, М., 1969, стр. 19.
- <sup>15</sup> K. Tanaka, M. Bertolini, W. Pigman, Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, № 5, 404 (1964).