

УДК 547.963.3

Л. А. КАРАПЕТЯН, Э. Б. МАНУКЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, А. А. ГАЛОЯН

НЕКОТОРЫЕ СТОРОНЫ ДЕЙСТВИЯ АКТГ И ДЕКСАМЕТАЗОНА (16- α МЕТИЛ-9 α -ФТОРПРЕДНИЗОЛОНА) НА РНК МОЗГА

Изучались включение P^{32} в рибонуклеиновые кислоты мозга под действием дексаметазона, а также изменение в нуклеотидном составе РНК хромосомно-ядрышкового аппарата клеток мозга под влиянием АКТГ и дексаметазона. Под влиянием дексаметазона коэффициент специфичности Г+Ц/А+У повышается до 1,21 при 0,93 в контроле для РНК хромосомно-ядрышкового аппарата. Аналогичный, но более слабый эффект имеет место при введении АКТГ. Дексаметазон ингибирует включение P^{32} во фракции РНК; РНК хромосомно-ядрышкового аппарата ингибируется на 32%, тогда как цитоплазматическая РНК подавляется на 18%.

Одной из наиболее интересных проблем изучения действия стероидных гормонов является вопрос об их влиянии на генетический аппарат клеток мозга.

Рядом авторов было показано значительное снижение количества ДНК в клетках мозга, необратимое уменьшение объема мозга, числа нервных и глиальных клеток при повышении уровня кортикостероидов. По данным Мак Ивен и др. [9], кортикостероиды после внутрибрюшинного введения появляются в ЦНС в значительных концентрациях уже через 30 мин, избирательно связываясь и относительно долго задерживаясь в лимбической структуре мозга. Относительно высокий уровень избирательного накопления кортикостероидов отмечен также для гипоталамуса и коры мозга.

Поскольку биосинтез белка в клетках детерминирован нуклеиновыми кислотами, выводы о механизме действия гормонов могут быть сделаны лишь при анализе изменений последних в клетке.

Настоящее исследование посвящено изучению включения P^{32} в рибонуклеиновые кислоты мозга под действием дексаметазона, а также изменению в нуклеотидном составе РНК хромосомно-ядрышкового аппарата клеток мозга под влиянием АКТГ и дексаметазона.

Материал и методика. Для опыта использовались крысы весом 100—120 г обоих полов. Суспензия дексаметазона, приготовленная на 0,9% NaCl, 0,4% Tween—80, 0,5% карбоксиметилцеллюлозе и 0,5% бензил спирту, вводилась крысам внутрибрюшинно за 4 часа до забоя из расчета 25 мкг на 100 г веса животного.

Для мечення РНК использовался препарат двузамещенного фосфорнокислого натрия с радиоактивным изотопом P^{32} , который вводился в количестве 150 мккюри на 100 г веса животного за 5 час. до забоя.

Фракции РНК из мозга крыс получали фенольным методом термического фракционирования по Георгиеву и Мантьевой [4]. По литературным данным, эта методика широко применялась для выделения различных фракций РНК в основном из печени.

Крыс декапитировали, мозг извлекали при 4—6°C, гомогенизировали на холоду 1 мин в гомогенизаторе Уоринга в десятикратном объеме 0,14 М раствора NaCl. К гомогенату добавляли равный объем охлажденного водонасыщенного фенола (pH 5,9). Смесь взбалтывали 15 мин и центрифугировали на холоду 10 мин при 6000 об/мин. Получали три слоя, водную фазу декантировали и использовали для получения РНК цитоплазмы + ядерного сока. Промежуточный слой (интерфаза — неочищенные фенольные ядра), образующийся на границе водной и фенольной фаз, был использован для получения тотальной хромосомно-ядрышковой РНК путем термической экстракции при 65°. При изучении нуклеотидного состава РНК хромосомно-ядрышкового аппарата клеток целого мозга под влиянием АКТГ последний вводили за 4 часа до забоя животных из расчета 100 ед. на 1 кг веса. Фенольные ядра экстрагировали при 40 и 55°C, к ним добавляли 3—4 объема смеси 0,14 М NaCl + фенол и взбалтывали на водяной бане при 40°C в течение 20 мин. Смесь охлаждали до 6°C и центрифугировали при 6000 об/мин. Водную фазу декантировали и использовали для получения РНК, содержащей в основном р-РНК и некоторое количество ДНК — подобной РНК. К оставшейся интерфазе с фенолом добавляли равный объем 0,14 М NaCl. Смесь взбалтывали на водяной бане, нагреваемой до 55°C 15 мин, охлаждали, вновь центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин, декантировали водную фазу и из нее получали фракцию РНК, обогащенную ДНК-подобной РНК. После повторной депротенинизации фенолом с 0,5% SDS к водным фазам добавляли 2,5 объема холодного этанола, 0,1 объем 20% ацетата калия и оставляли на ночь при 4°C с целью осаждения РНК.

Отсутствие ДНК в пробах нуклеиновых кислот констатировалось по реакции ДНШЕ [6]. Радиоактивность фракций РНК подсчитывалась на газовом счетчике марки 4П. Для определения нуклеотидного состава РНК гидролизовали в 1 N HCl в течение одного часа при 100°C.

Идентификацию оснований проводили методом хроматографии на бумаге в системе метанол-HCl-вода (7:2:1). Нуклеотиды и основания определяли на регистрирующем спектрофотометре SP-800 (Uniscam).

Результаты и обсуждение. По нуклеотидному составу тотальная РНК хромосомно-ядрышкового аппарата мозга крыс (табл. 1) резко от-

Таблица 1

Нуклеотидный состав РНК в норме и под влиянием дексаметазона

Фракции РНК		Молярные соотношения нуклеотидов				$\frac{П+У}{П+И}$	$\frac{Г+Ц}{А+У}$
		Г	А	Ц	У		
Контроль	цитоплазмы и ядерного сока	30,2	24,0	29,0	17,5	1,16	1,42
	хромосомно-ядрышкового аппарата	23,3	26,5	26,0	25,1	0,97	0,93
Дексаметазон	цитоплазмы и ядерного сока	30,0	21,0	30,0	18,0	1,06	1,55
	хромосомно-ядрышкового аппарата	25,7	19,2	29,0	26,1	0,81	1,21

личается от суммарной цитоплазматической РНК и РНК ядерного сока; значительную часть этой фракции составляет РНК рибосомального типа. Коэффициент специфичности $Г+Ц/А+У$ суммарной цитоплазматической РНК и РНК ядерного сока равен 1,42 и 0,93 для тотальной РНК хромосомно-ядрышкового аппарата. Последняя отличается более высо-

ким содержанием аденина и урацила, что связано с гетерогенностью ее и присутствием в ее составе ДНК-подобной РНК с коэффициентом специфичности $K=0,71$. Расчетная величина содержания ДНК-подобной РНК в тотальной РНК хромосомно-ядрышкового аппарата клеток мозговой ткани составляет около 50%. ДНК-подобный нуклеотидный состав является одним из критериев, позволяющих отнести данный тип РНК к информационной, значительная часть которой (около 75%), по литературным данным, имеет константу седиментации 12—16S. Ранее мы выделили из ядерной РНК нейрогипофиза фракцию РНК, близкую по составу к ДНК-подобной РНК, которая, согласно профилю элюции на колонке МАК, имеет константу седиментации 10—14S [1].

Из первой же таблицы видно изменение нуклеотидного состава фракций РНК под влиянием дексаметазона. Для цитоплазматической РНК коэффициент специфичности $G+C/A+U$ повышается до 1,55 против 1,42 в контроле; для РНК хромосомно-ядрышкового аппарата отношение $G+C/A+U$ равно 1,21 при 0,93 в контроле. Полученные сдвиги в нуклеотидном составе РНК хромосомно-ядрышкового аппарата свидетельствуют о резком снижении ДНК-подобной РНК в ядрах под воздействием кортикостероида, при одновременной стимуляции рибосомальной фракции РНК.

Подтверждением изменения нуклеотидного состава РНК в результате введения дексаметазона является разный уровень включения метки P^{32} во фракции РНК в норме и под воздействием кортикостероида.

Таблица 2

 Влияние дексаметазона на включение P^{32} во фракции РНК мозга

Фракции РНК	Включение метки во фракции РНК, имп/мин/мг РНК		% ингибирования
	контроль	дексаметазон	
Цитоплазмы и ядерного сока	1560	1290	18
Хромосомно-ядрышкового аппарата	3200	2200	32

Как видно из табл. 2, дексаметазон ингибирует включение метки в обе фракции РНК по сравнению с контрольными. Степень угнетения включения метки неодинакова, так включение во фракции РНК хромосомно-ядрышкового аппарата ингибируется дексаметазоном на 32% по сравнению с контролем, тогда как синтез РНК цитоплазмы и ядерного сока подавляется на 18%, почти вдвое меньше. Аналогичная картина ингибиции включения P^{32} в нуклеиновые кислоты лимфоидных клеток и опухолевых тканей была получена Кит и др. [10].

Подобная же закономерность представлена в работе Древис [7], где в опытах с P^{32} ортофосфатом преднизолон вызывает общую ингибицию синтеза РНК и особенно РНК рибосом клеток тимуса.

Для сравнения действия дексаметазона (мощного синтетического аналога преднизолон) с влиянием естественных кортикостероидов на

фракции РНК в следующей серии опытов был изучен нуклеотидный состав фракции РНК под воздействием эндогенных стероидов, индуцированных введением АКТГ, хотя в данном случае нельзя исключить возможность влияния самого АКТГ на обменные процессы нуклеиновых кислот.

Таблица 3

Нуклеотидный состав РНК в норме и под влиянием АКТГ

Фракции РНК		Молярное соотношение нуклеотидов				$\frac{\text{Пу}}{\text{Пи}}$	$\frac{\text{Г}+\text{Ц}}{\text{А}+\text{У}}$
		Г	А	Ц	У		
Контроль	4—6°	29,6	20,6	30,0	20,0	1,00	1,40
	40°	28,1	22,9	26,7	22,6	1,03	1,22
	55°	23,9	24,3	22,9	28,6	0,91	0,88
АКТГ	4—6°	29,6	20,6	30,0	19,6	1,01	1,47
	40°	26,6	20,9	31,1	21,1	0,91	1,38
	55°	23,2	23,2	26,8	24,1	0,91	1,08

При термическом фракционировании при 40° экстрагируется значительная часть РНК рибосомального типа. Расчетная величина содержания ДНК-подобной РНК в данной фракции составляет 30 к 70% РНК рибосомального типа. При 55° в основном экстрагируется ДНК-подобная РНК, содержание которой в данной фракции составляет 70 к 30% р-РНК.

Нуклеотидный состав изученных фракций изменяется под влиянием экзогенно введенного АКТГ (табл. 3), что может быть расценено как результат выброса в кровь после введения АКТГ эндогенных кортикостероидов, эффект которых при сравнении с таковым дексаметазона слабее. О более сильном действии дексаметазона по сравнению со своими естественными аналогами свидетельствуют эксперименты Бартон и др. [5]. Ими установлено, что стероидные гормоны в зависимости от химической структуры обладают различным влиянием на пикноз ядер лимфоидных клеток: дексаметазон действовал в значительно меньшей концентрации, чем остальные кортикостероиды.

В случае АКТГ для РНК, экстрагируемой при 40°С, коэффициент специфичности поднимается, $\text{Г}+\text{Ц}/\text{А}+\text{У}$ равен 1,38 по сравнению с 1,22 в контроле; для РНК, экстрагируемой при 55°С, он повышается до 1,08 против 0,88 в контроле. В случае дексаметазона имеет место более резкий сдвиг в нуклеотидном составе. Ранее нами [3] было показано, что дексаметазон повышал коэффициент специфичности $\text{Г}+\text{Ц}/\text{А}+\text{У}$ до 1,46 вместо 1,22 и 1,21 против 0,88 в контроле для РНК 40° и РНК 55° соответственно. В литературе имеются указания [8, 11] на то, что в процессе репликации ДНК образуются относительно короткие полинуклеотидные цепи 4—10S, которые затем сшиваются между собой с помощью фермента ДНК-лигазы.

Блокада фермента ДНК-лигазы дексаметазоном может ингибировать синтез полноценной ДНК и вызывать накопление с выходом в цитоплазму сравнительно коротких отрезков ДНК. Нами было установлено [2], что после однократного введения дексаметазона количество цитоплазматической ДНК клеток мозга крыс увеличивается. Как нам представляется, в результате активации специфических ДНК-аз кортикостероидами возможна ограниченная селективная деструкция ядерной ДНК с образованием и выходом в цитоплазму ее фрагментов.

В нашей лаборатории исследовался уровень 5 метилцитозина (5 CH₃—цитозин) в ДНК головного мозга. После введения дексаметазона выявлено увеличение метилирования последней. До сих пор значение метилирования ДНК в животных клетках еще не совсем ясно, однако несомненно, что эта модификация генома является высокоспецифичной, отражается на вторичной структуре ДНК: по-видимому, метилирование играет большую роль в регуляции активности генов, в особенности влияя на уровень репликации и транскрипции.

Дексаметазон, действуя на уровне генома, по-видимому, задерживает синтез соответствующей м-РНК, ответственной за образование кортикотропиносвобождающего гормона полипептидной природы, параллельно стимулируя образование рибосомальной РНК. Механизм глюкокортикоидной блокады синтеза ДНК и транскрипции РНК является, по всей вероятности, существенным моментом в реализации действия кортикостероидов на генетический аппарат мозговой ткани, в реализации ингибирующего действия глюкокортикоидов на образование и выделение АКТГ и релизинг фактора мозга.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 17.I 1973 г.

Լ. Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Է. Ք. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Ա. Ա. ԳԱՆՈՅԱՆ

ՌԵԶԵԴԻ ՌԵՔ՝ ԿՐԱ ԱԿՏԷ-Ի ԵՎ ԴԵՔՍԱՄԵՏԱԶՈՆԻ (16-α ՄԵԹԻԼ -9 α-ՖՏՈՐՊՐԵԴՆԻԶՈԼՈՆ) ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԻ ՔԱՆԻ ՀԱՏԿԱՆԻՇՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Մեր խնդիրն է եղել ուսումնասիրել P³² ներդրում ունենակող թթուներում դեքսամետազոնի, ինչպես նաև ՌՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմը ԱԿՏԷ-ի և դեքսամետազոնի ազդեցությամբ: Հետազոտություններից պարզվեց, որ նիշի ներդրումը ՌՆԹ-ի ֆրակցիայի մեջ կոնտրոլի համեմատությամբ պակասում է: Նիշի ներդրման ձեռքման աստիճանը տարբեր է՝ ցիտոպլազմայի և կորիզահյուսի մեջ 18%, իսկ քրոմոսոմի կորիզակային ապարատի ՌՆԹ-ում 32%:

Դեքսամետազոնի ազդեցությամբ փոփոխություն կատարվում է ՌՆԹ-ի նուկլեոտիդային կազմում՝ դեպի ԳՑ-զույգի ավելացում:

Նույն էֆեկտը ստացվում է ԱԿՏՀ-ի ադդեցությունից ավելի մեղմ, քան ստերոիդների սինթետիկ անալոգի կողմից:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Захарян Р. А., Абеян Ж. Г. Вопросы биохимии мозга, 4, 157, 1968.
2. Галоян А. А., Захарян Р. А., Гарибян Дж. В., Галфаян В. Т. ДАН АрмССР (в печати).
3. Галоян А. А., Захарян Р. А., Карапетян Л. А., Манукян Э. Б. ДАН АрмССР, 56, 5, 1973.
4. Георгиев Г. П., Мантьева В. Л. Биохимия, 27, 5, 949, 1962.
5. Burton A. F., Storr J. M., Dun W. Z. Canad. J. Biochem., v. 45, 2, 289, 1967.
6. Dische Z., Schwartz K. Microchim. Acta, 2, 13, 1937.
7. Drews J. Europ. J. Biochem., 7, 2, 203, 1969.
8. Habener J. F., Bynum B. S. and Shack J. Biochem. et Biophys. Acta, 33, 484, 1969.
9. McEwen B. S., Weiss L. M., Schwartz L. S. Nature, 220, 911, 1968.
10. Kit S., Bacila M., Barron G. Biochem. et Biophys. Acta, 13, 4, 516, 1956.
11. Schandl E. K., Taylor J. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 34, 3, 1969.