

ГИПОТЕНЗИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА РНК

Р. А. ЗАХАРЯН, Р. Г. БОРОЯН, Д. С. ПЕТРОСЯН, Э. Г. ГРИГОРЯН

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Установлено наличие у препарата низкомолекулярной РНК, используемой в виде Са-преципитата РНК, отчетливого гипотензивного действия, выражающегося в понижении артериального давления в острых опытах. Гипотензивное действие препарата РНК не опосредуется ни холинэргическими, ни адренэргическими рецепторами: соответствующие блокаторы этих рецепторов при предварительном введении не уменьшают гипотензивного эффекта РНК.

РНК значительно повышает уровень цАМФ в клетках ткани аорты цыплят, включение экстрацеллюлярного Ca^{2+} в клетки, уровень активности фосфолипазы A_2 , высвобождение лизолецитинов и уровень цГМФ.

ՌՆԹ-ի ցիկլոպատի հիպոտենզիկ գործունեությունը չի պայմանավորված ոչ խոլինէրգիկ և ոչ էլ ադրենէրգիկ ռեցեպտորներով:

Համապատասխան ռեցեպտորների բլոկատորները նախնական արտված դեպքում չեն ցածրացնում ՌՆԹ-ի հիպոտենզիկ էֆեկտը:

ՌՆԹ-ն զգալիորեն բարձրացնում է ցիկլիկ ԱՄՖ-ի մակարդակը աորտայի շյուղվածքի բջիջներում, մտցնելով էքստրացելյուլար Ca^{2+} -ն բջիջների մեջ, բարձրացնում է ֆոսֆոլիպազ A_2 -ի ակտիվության մակարդակը, լիզոլեցիտինների առկայությունը և ցիկլիկ ԳՄՖ-ի մակարդակը:

In the experiments the clear hypotensive action of Ca^{++} -precipitated low molecular RNA was established revealing the lowering of arterial pressure.

RNA hypotensive action is mediated with neither cholinergic nor adrenergic receptors; the corresponding blockers of these receptors do not decrease the hypotensive effect of RNA.

RNA considerably increases the level of cyclic AMP in the cells of chicken aortae tissue, the inclusion of extracellular calcium into the cells, the activity of phospholipase A_2 , the lysolectines release and the level of cyclic GMP.

РНК — артериальное давление — цАМФ — цГМФ.

Экспериментальными исследованиями установлено, что ди-РНК являются модуляторами различных биохимических процессов, индукторами образования интерферона, стимуляторами первичного и вторичного иммунного ответов [6, 9]. Способность ди-РНК индуцировать различные биохимические реакции в клеточных системах зависят, по крайней мере, от способности ди-РНК изменять активность некоторых ферментов. Особого внимания заслуживает способность ди-РНК вызывать функциональные изменения в регуляторных системах клетки, зависящих от уровня внутриклеточных концентраций цАМФ и 2—5 олигоаденилата [5].

Сокращение: АД — артериальное давление.

Нами изучались некоторые первичные фармакологические эффекты, развивающиеся в ответ на введение препарата РНК, используемой в виде Ca^{2+} -преципитата РНК.

Материал и методика. Изучалось влияние препарата низкомолекулярной (15—20 оснований) РНК на уровень артериального давления в острых опытах на кошках обоего пола массой от 2,5 до 4 кг с использованием в качестве анестезирующего средства этаминала-натрия (30—40 мг/кг массы внутривенно).

Регистрацию артериального давления в системе бедренной артерии осуществляли с помощью ртутного манометра на кимографе. Раствор препарата РНК приготавливали непосредственно перед введением в организм подопытного животного. Объем вводимого раствора различной концентрации во всех опытах был равен 2 мл.

В отдельной серии экспериментов изучено действие РНК на уровень цАМФ и активность фосфодиэстеразы циклической АМФ с помощью радиоизотопных методов исследования [2, 7, 12].

Свежее выделенную порту цыпленка переносили в среду Кребса-Генселайта, в культивирующей среде добавляли в концентрации 5 мкг/мл среды РНК, переведенную в форму Ca^{2+} -преципитата. В определенные интервалы времени инкубации ткань аорты обрабатывали для определения концентрации цАМФ и цГМФ, содержание которых вычисляли по отношению к суммарному количеству белка.

Определение активности фосфодиэстеразы цАМФ проводили по радиоизотопному методу, описанному в работе [12]. Реакционная смесь в объеме 0,5 мл содержала: 40 мМ трис- HCl pH 8,0; 10 мМ MgCl_2 ; 2,5 мМ 2-меркаптоэтанол; 2×10^5 имп/мин [^3H]цАМФ (1 мкМ); 50 мкг бычьего сывороточного альбумина; 0,2 мМ CaCl_2 ; 20 пМ очищенного кальмодулина, выделенного из мозга быка, и 50 мкл частично очищенной фосфодиэстеразы РНК (из дрожжей) с молекулярной массой 15—20 $\times 10^3$ дальтон добавляли в реакционную смесь в концентрации 0,05 мкг—0,2 мкг.

Кальмодулин был получен из мозга быка по методу, описанному в работе [11]. Концентрацию белка определяли по Ловри [8].

Полученные результаты обработаны с помощью метода вариационной статистики, причем значения P , меньшие 0,05, принимались в качестве показателя статистически достоверной разницы между сравниваемыми величинами.

Результаты и обсуждение. Эксперименты прежде всего позволили выявить наличие у препарата РНК отчетливого гипотензивного действия.

Выявлено, что препарат РНК в дозах 10, 20 и 30 мг/кг после внутривенного введения вызывает выраженное понижение артериального давления (табл. 1).

Таблица 1. Изменение системного АД под влиянием РНК в острых опытах на анестезированных кошках

Доза препарата, мг/кг	Латентный период, мин	Понижение АД, в % от исходного уровня	Продолжительность действия, мин
10		32,4	
n=10	$2,1 \pm 0,02$	$P < 0,001$	$15,1 \pm 0,5$
20		32,5	
n=9	$3,2 \pm 0,15$	$P < 0,001$	$20,1 \pm 1,2$
30		34,9	
n=12	$2,3 \pm 0,2$	$P < 0,01$	$26,1 \pm 1,8$

Обращает на себя внимание то, что увеличение дозы препарата РНК с 10 до 20 и 30 мг/кг массы не сопровождается существенным усилением гипотензивного действия, однако продолжительность действия заметно и статистически достоверно возрастает с $15 \pm 0,5$ мин до $20 \pm 1,2$ мин ($P < 0,05$) при дозе, равной 20 мг/кг, и до $26 \pm 1,8$ мин ($P < 0,05$) при дозе, равной 30 мг/кг.

Как показали результаты проведенных исследований, гипотензивное действие препарата РНК не опосредуется ни холинергическими, ни адренергическими рецепторами, поскольку соответствующие блокаторы рецепторов при предварительном введении (за 5 мин до введения РНК) оказались неспособными уменьшить гипотензивный эффект РНК (табл. 2).

Таблица 2 Изменение систолического АД под влиянием препарата РНК (100 мг/кг) в условиях блокирования холино- и адренорецепторов

Блокатор рецепторов	Понижение АД (в среднем), и % от исходного уровня после введения РНК
1. Атропина сульфат (50 мкг/кг и.в.)	30,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,05$
2. Пропранолол (30 мг/кг и.в.)	25,5 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$
3. Фентоламин (10 мг/кг и.в.)	29,2 $P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$

Таким образом, гипотензивный эффект препарата РНК, по-видимому, опосредуется иным, чем воздействие на холино- или адренорецепторы, механизмами. По всей видимости, в этих эффектах РНК определенную роль играет способность препарата вызывать изменение внутриклеточных концентраций циклических нуклеотидов, в частности, изменение внутриклеточной концентрации цАМФ [2]. Как было ранее нами показано на мышинных фибробластах, препарат ди-РНК не повышал активности аденилатциклазы (в контроле—3485 имп/мин/100 мкг, после воздействия ди-РНК 3116 имп/100 мкг белка), однако в значительной степени подавлял активность фосфодиэстеразы, стимулируемой кальмодулином (в контроле—6582 имп/мин/100 мкг белка, после воздействия ди-РНК—2202 имп/мин/100 мкг белка).

Выявлено, что РНК, в концентрации 5 мкг/мл питательной среды значительно повышала уровень цАМФ в клетках тканей аорты.

Ткани млекопитающих содержат различные типы фосфодиэстераз циклических нуклеотидов, которые имеют различную субклеточную ло-

кализацию и в разной степени активируется Ca^{2+} и кальмодулином. Более того, выявлено, что в тканях кальмодулина активируемые фосфодиэстеразы представлены изоэнзимными формами, активность которых в разной степени зависит от присутствия кальмодулина.

В наших экспериментах мы использовали фосфодиэстеразу из цитозольной фракции сердца цыпленка, которая является Ca^{2+} -кальмодулин активируемым ферментом, обладает высоким сродством к цАМФ.

Эта фосфодиэстераза выделяется в виде одной единственной гомогенной фракции при хроматографии на ДЕАЕ-сефацэле [13].

Определение активности фосфодиэстеразы цАМФ в присутствии РНК показало, что РНК подавляла Ca^{2+} -кальмодулин-зависимую активацию фосфодиэстеразы и не влияла на неактивированную форму фосфодиэстеразы. Можно допустить, что данный механизм также вовлечен в процесс индукции повышения РНК уровня цАМФ в течение первых 1,0—2,5 мин. воздействия. Одновременно наблюдались постепенное нарастание включения экстрацеллюлярного Ca^{2+} в клетки эндотелия аорты, активация фосфолипазы A_2 , высвобождение лизолецитинов, активация гуанил-циклазы и повышение уровня цГМФ.

Аналогичный комплекс биохимических изменений индуцируют нуклеиновые кислоты, связываясь с поверхностью плазматической мембраны нейтрофилов [3].

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что гипотензивное действие РНК не опосредуется холинными адренорецепторами сосудов и, по-видимому, по крайней мере частично обусловлено ингибированием активности фосфодиэстеразы с возможным увеличением внутриклеточных концентраций цАМФ и цГМФ.

Следует отметить, что Ca^{2+} -преципитат ДНК также обладает гипотензивным действием, хотя и менее выраженным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захарян Р. А., Бакунц К. А., Скобелева Н. А. Нейрохимия, 8, 1, 34—38, 1989.
2. Захарян Р. А., Рычков Г. Е., Дадалян С. С., Бакунц К. А., Агабалян А. С., Агапетян С. Н. Нейрохимия 5, 3, 239—247, 1986.
3. Захарян Р. А., Рухлян Л. А. Докл. Акад. наук СССР, 302, 6, 1498—1500, 1988.
4. Карагезян К. Г., Захарян Р. А., Овсакмян С. С. Биол. ж. Армении, 40, 12, 979—985, 1987.
5. Северин Е. С. Гез. докл. XVI конф. ФЭБО, с. 23, 1984.
6. Henn L., Johnson A. G., J. Immunol. 117, 423—427, 1976.
7. Itkes A. V., Turpin K. G., Kartashova O. W., Vagonis A. J., Kafiant C. A., Severin E. S., Biochem. Int. 5, 1, 15—21, 1982.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall L. J., J. Biol. Chem. 193, 265—275, 1951.
9. Mathe G., Florensz L., O'sson L., Brutty M., Schultz J. Cancer Treat. Rep. 62, 1613—1621, 1978.
10. Ratner L., Wiegand R. E., Forrel P. G., et. al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 947, 1978.

11. Sharma R. K., Wang J. H., Adv. Cyclic Nucl. Res. 10, 187—193, 1979.
12. Thompson W. J., Terasaki W. L., Epstein P. M., Strata S., J. Adv. Cycl. Nucl. Res. 10, 69—92, 1979.
13. Volpi M., Shalaji R. I., Epstein P. M., Adregar D. M., Feinstein M. B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 795—799, 1981.

Биолог. журн. Армения, № 1 (47), 1994

УДК 577.352.315+27

АКТИВНОСТЬ TRK СИСТЕМЫ ПОГЛОЩЕНИЯ K^+ У АНАЭРОБНО ВЫРАЩЕННЫХ МУТАНТОВ E. COLI С UNC-ДЕЛЕЦИЕЙ

А. В. ВАСИЛЯН, Е. С. ОГАНДЖАНИЯ, А. А. ТРЧУНЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра физиологии растений, кафедра биофизики и лаборатория биофизики субклеточных структур

Показано, что поглощение K^+ у анаэробно выращенных мутантов E. coli с unc-делецией в отсутствие F_1F_0 -АТФазы осуществляется через Trk систему, однако в отличие от предшественника не подавляется с помощью N,N'-дихлорогексикарбодимида и не происходит в обмен на $2H^+$ выводимых из клетки. В то же время АТФазная активность изолированных мембран этих мутантов существенно ниже, чем у предшественника, и в отличие от него не подавляется с помощью ДЦКД и не зависит от концентрации K^+ в среде. АТФазная активность у предшественника подавляется с помощью ДЦКД, но не зависит от концентрации K^+ в среде при анаэробном росте бактерий, в присутствии ингибита. В то же время при таком росте АТФазная активность мутанта с unc-делецией также ниже и не зависит от концентрации K^+ в среде. Сделан вывод о том, что Trk система может работать отдельно и в мутантах в отсутствие F_1F_0 -АТФазы, но не обладает АТФазной активностью.

Ցույց է տրված, որ անաէրոբ աճումներից աճեցված E. coli-ի unc-դե-
լեցիայով մուտանտների մոտ K^+ -ի կոնցենտրացիան կատարվում է Trk համակարգի
միջոցով, սակայն ի տարբերություն իր նախնու, այն չի արգելակվում N,N'-դի-
ցլոհեքսիկարբոդիմիդով (DCCD) և չի իրադրոծվում $2H^+$ դուրս բերվող
 $2H^+$ -ով փոխանակմամբ: Միևնույն ժամանակ այդ մուտանտներից անջատված
մեմբրանների ԱՖՖ-ազային ակտիվությունը շատ փոքր է, բայց նախնիի մոտ, և
ի տարբերություն չի արգելակվում DCCD-ի միջոցով ու կախված չէ միջավայրում
 K^+ -ի կոնցենտրացիայից: Նախնու ԱՖՖ-ազային ակտիվությունը արգելակվում է
DCCD-ի միջոցով, բայց կախված չէ միջավայրում K^+ -ի կոնցենտրացիայից նու-
րապես առկայությամբ բակտերիաների աճման ժամանակ: Միևնույն ժամանակ
այդ աճման դեպքում սոս-դեկլեցիայով մուտանտների մոտ ԱՖՖ-ազային ակտի-
վությունը նույնպես փոքր է և կախված չէ միջավայրում K^+ -ի կոնցենտրացիա-
յից: Ներկայացված է, որ Trk համակարգը կարող է գործել սոսանձին նաև մու-
տանտներում F_1F_0 -ԱՖՖ-ազի րացակայությամբ, բայց օժտված չէ ԱՖՖ-ազային
ակտիվությամբ:

The K^+ uptake in anaerobically grown E. coli mutants with unc-de-
letion in the absence of the F_1F_0 -ATPase has been shown to be carried
out by the Trk system, but unlike its precursor it is not inhibited by
N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) and not exchanged for $2H^+$ ex-
truded from the cell. At the same time, ATPase activity of isolated