

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЬЦИЕВОГО ПРЕЦИПИТАТА ДВУХСПИРАЛЬНОЙ РНК

А.С. АГАБАЛЯН\*, И.В. АВЕТИСЯН\*, Р.С. БАБЛОЯН\*, Р.А. ЗАХАРИЯН\*\*

\*Ереванский государственный медицинский университет, 375025

\*\*Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375014, Ереван

Изучали некоторые биологические и физико-химические свойства кальциевого преципитата двухспиральной РНК (Ca-дсРНК). Показана его резистентность к действию РНК-азы и нуклеазы S1. При длительном введении Ca-дсРНК мышам в дозе 5 и 10 мг/мышь никакого токсического действия на организм не выявлено. Повышение активности ферментов и увеличение концентрации сывороточных глобулинов у животных в ответ на введение дсРНК свидетельствует об иммуномодулирующих свойствах препарата Ca-дсРНК.

Անումնասիրվել են երկպարույր ՌՆԹ-ի կալցիումական նստվածքի (Ca-ԵպՆՆԹ) որոշ կենսաքանական և ֆիզիկո-քիմիական հատկությունները: Ցույց է տրվել այդ պրեպարատի կայունությունը ռիբոնուկլեազի և S1 նուկլեազի ազդեցության նկատմամբ: Հաստատվել է, որ պրեպարատի երկարատև ներարկումը 5 և 10 մգ/մուկ քանակությամբ որևէ տոքսիկ ազդեցություն օրգանիզմի վրա չի ունենում: Ֆերմենտների ակտիվության բարձրացումը և շիճուկային գլոբուլինների քանակի ավելացումը վկայում են Ca-ԵպՆՆԹ-ի իմունակարգավորիչ հատկությունների մասին:

Some biological and physico-chemical properties of calcium precipitate of double-stranded RNA (Ca-dsRNA) have been studied. The preparation was stable to RNA-ase and nuclease S1. Long-term injection of Ca-dsRNA in doses 5 and 10 mg/mouse didn't cause any toxic effect. The rise of enzymes activity and the increase of serum globulins concentration testified the immunomodulate properties of Ca-dsRNA.

### *Кальциевый преципитат дсРНК - характеристика физико-химическая и биологическая*

Ранее было установлено влияние экзогенных нуклеиновых кислот, в частности РНК и ее двухспиральной формы (дсРНК), на восстановительные процессы при различных патологических состояниях. Наиболее эффективной формой нуклеиновых кислот с широким спектром биологического действия является дсРНК [1,9,10], обладающая способностью к индукции эндогенного интерферона, активации процесса фагоцитоза, стимуляции первичного и вторичного иммунного ответа, активации мембранных функций клетки, имеющая антивирусные, противовоспалительные и противоопухолевые свойства, усиливающая процессы регенерации в раневых тканях и др. [2,3,5,8].

Вместе с тем до настоящего времени не в полной мере изучены физико-химические свойства и возможное токсическое влияние дсРНК на клетки, ткани и органы, что и послужило целью выполнения данной работы. Представлялось также целесообразным изучить влияние дсРНК на активность ряда ферментов и количественный баланс сывороточных глобулинов у здоровых животных.

*Материал и методика.* дсРНК получали из клонерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методом фенольной депротеинизации. Фракционирование тотального пула

РНК осуществляли при помощи хроматографии на колонках с немодифицированной целлюлозой (микроцеллюлоза) [11]. Гомогенность полученных результатов дсРНК проверяли посредством электрофореза в 1%-ном геле агарозы по описанному ранее методу [8]. Визуализацию препаратов дсРНК и определение ее молекулярной массы проводили электронномикроскопически [8].

Кальциевые преципитаты дсРНК получали известным способом [7]. Обработку препаратов РНК проводили панкреатической рибонуклеазой (РНК-аза) и эндогенной нуклеазой S1 как описано ранее [4]. Активность ферментов определяли при помощи биохимического анализатора FR-901, посредством которого определяли также концентрацию сывороочных глобулинов. Эксперименты проводили на 140 белых мышах линии СВА и линии клеток L 1210.

Для отделения препаратов дсРНК от возможной примеси односпиральных форм РНК тотальный пул препарата подвергали хроматографии на немодифицированной целлюлозе, разделяющей нуклеиновые кислоты в зависимости от степени их спирализации. Предварительно, до хроматографии препараты РНК обрабатывали РНК-азой и нуклеазой S1, расщепляющей все типы односпиральных нуклеиновых кислот. Элюцию препаратов РНК проводили с помощью различных концентраций перегнанного этанола в буфере STE (0,1M NaCl, 0,001M ЭДТА, 0,01M трис, рН 7,2). Подробно фракционирование РНК описано нами ранее [6].

**Результаты и обсуждение.** Первая серия экспериментов была посвящена изучению физико-химических характеристик дсРНК, выделенной из *Saccharomyces cerevisiae*. Как видно из рис. 1, РНК, обработанная РНК-азой, вымывается с колонки одним пиком и по своей резистентности к действию фермента соответствует двухспиральной форме РНК, в то время как при элюции РНК, не обработанной РНК-азой, выявляются два вида РНК,

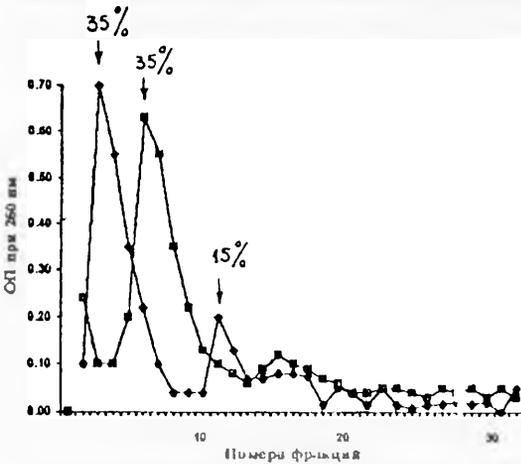


Рис. 1. Фракционирование РНК на немодифицированной целлюлозе:

- - РНК, обработанная РНК-азой;
  - ◆ - РНК, не обработанная РНК-азой.
- Элюция препаратов РНК 35%- и 15%-ным этанолом

молекул с молекулярной массой от  $5 \times 10^5$  до  $8 \times 10^5$  дальтон.

В последующих экспериментах изучали некоторые биологические свойства препаратов дсРНК. С этой целью последние переводили в форму Са-дсРНК. На модели злокачественно-трансформированных клеток L1210 изучали влияние Са-дсРНК на рост и размножение этих клеток, для чего последние инкубировали с Са-дсРНК в среде RPMI 1640 в течение 48ч при

элюируемые разными концентрациями этанола: 35%-ным - дсРНК, 15%-ным - односпиральная РНК.

С целью определения гомогенности полученных препаратов дсРНК их подвергали электрофорезу в 1%-ном геле агарозы (рис.2). Из рисунка видно, что препараты дсРНК мигрируют в агарозном геле одной группой, что говорит о гомогенности полученных препаратов.

Электронномикроскопический анализ препаратов дсРНК выявил набор

37° с постоянной подачей 5%-го CO<sub>2</sub>. Концентрации препаратов Са-дсРНК варьировали от 6,2 до 2000 мкг/мл. Анализом полученных данных установлено, что при воздействии Са-дсРНК в указанных концентрациях 91,3% клеток L 1210 сохраняли жизнеспособность, это свидетельствует о нетоксичности использованных препаратов. Токсического действия Са-дсРНК не было обнаружено также при ее в/бр введении животным ежедневно в течение 15 и 30 дней в концентрациях 5 и 10 мг/мышь.

Для исследования влияния дсРНК на внутренние органы экспериментальных животных, получавших Са-дсРНК в течение 30 дней, последних забивали, отбирали мозг, печень, селезенку и тимус и изучали их весовые характеристики по сравнению с таковыми у контрольных, интактных животных (табл. 1).

Таблица 1. Влияние Са-дсРНК на весовые характеристики внутренних органов животных

Органы животных	Са-дсРНК (10мг/мышь) и вес органов, г			
	контроль		опытные животные	
	самцы (n=15)	самки (n=15)	самцы (n=15)	самки (n=15)
Тимус	28	34	27	33
Селезенка	108	99,6	122	121
Мозг	242	297	256	350
Печень	1194	1109,8	1240	1245

Из таблицы видно, что длительное введение мышам Са-дсРНК не изменяет весовых характеристик внутренних органов животных, что также свидетельствует о нетоксичности использованного препарата.

При изучении биологических свойств Са-дсРНК исследовали влияние последнего на активность щелочной фосфатазы, креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы, кислой фосфатазы, аланинтрансминазы и аспартаттрансминазы, а также на количественный баланс сывороточных белков. С этой целью мышам линии СВА в/бр вводили Са-дсРНК ежедневно в течение 30 дней в дозе 5 мг/мышь (табл. 2).

Анализ данных таблицы выявил тенденцию к повышению активности исследованных ферментов и увеличению концентрации сывороточных глобулинов. Последнее обстоятельство однозначно свидетельствует об

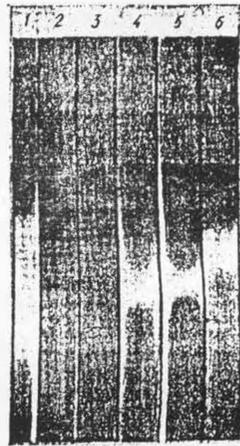


Рис. 2. Электрофоретический профиль препаратов РНК:

1. Односпиральная РНК
2. РНК, элюированная 15%-ным этанолом, обработанная РНК-азой
3. РНК, элюированная 15%-ным этанолом, обработанная нуклеазой S1
4. РНК, элюированная 35%-ным этанолом (дсРНК)
5. РНК, элюированная 35%-ным этанолом, обработанная РНК-азой
6. РНК, элюированная 35%-ным этанолом, обработанная нуклеазой S1

иммуностимулирующих свойствах Са-дсРНК.

**Таблица 2.** Активность ферментов и количественная характеристика сывороточных глобулинов мышей, стимулированных Са-дсРНК

Ферменты	Активность, Е/л		Сывороточные белки	Концентрация, г/л	
	контроль (n=25)	Са-дсРНК (n=25)		контроль (n=25)	Са-дсРНК (n=25)
Щелочная фосфатаза	228,1 ± 4,3	319,3 ± 11,2	Альбумин	3,3 ± 0,21	4,62 ± 0,19
Креатинфосфокиназа	93,5 ± 4,01	166,1 ± 3,3	α <sub>1</sub> -глобулин	0,25 ± 0,04	0,41 ± 0,031
Лактатдегидрогеназа	212,2 ± 3,6	290,7 ± 8,07	α <sub>2</sub> -глобулин	0,51 ± 0,02	0,92 ± 0,08
Кислая фосфатаза	8,3 ± 0,21	14,4 ± 0,91	β-глобулин	0,55 ± 0,05	1,12 ± 0,092
Аланинтранс-аминидаза	15,1 ± 1,02	41,8 ± 0,71	γ-глобулин	0,90 ± 0,073	2,52 ± 0,12
Аспарат-трансаминидаза	11,5 ± 0,32	32,8 ± 0,63			

Таким образом, проведенные исследования позволили заключить, что гомогенные препараты дсРНК, использованные в виде Са-дсРНК, не токсичны для мышей при их длительном введении, обладают иммуностимулирующим действием, что в конечном счете приводит к повышению неспецифической резистентности организма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агабян А.С., Казанчян А.Ф. и др. ДАН Армении, 5, 228-231, 1983.
2. Агабян А.С., Назаров Л.У. и др. ДАН Армении, 3, 173-177, 1993.
3. Агабян А.С., Рухкян Л.А. и др. ДАН Армении, 88, 93-96, 1989.
4. Агабян А.С., Захарян Р.А. и др. Микробиология, 1, 97-100, 1078.
5. Веревкина К.Н., Даниленко Е.Д. Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол., 7, 69-72, 1988.
6. Зарафян И.М., Агабян А.С. и др. Биол. журн. Армении, 29, 5, 45-50, 1976.
7. Захарян Р.А., Казарян П.А. и др. ДАН Армении, 2, 63-66, 1997.
8. Захарян Р.А., Месропян Н.П. и др. Экспер. онкология, 3, 54-56, 1985.
9. Земсков А.М., Земсков В.М. и др. Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол., 9, 9-13, 1982.
10. Земсков А.М. Иммунология, 4, 88-95, 1988.
11. Barber R. Biochem. Biophys. Acta, 114, 422-425, 1966.

Поступила 3.III.1997