

СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ РНК
В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ДЕЙСТВИИ
ПИРАЗОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙХАЧАТРЯН Г. С., АДАМЯН М. Х., АНТОНЯН А. А.,
КАЗАРЯН А. Р., САЯДЯН К. С.

Ереванский государственный медицинский институт

Изучено действие пиразоловых соединений из группы ингибиторов нитрификации на активность генетического аппарата нервных клеток высших животных. Показано усиление биосинтеза я-РНК АУ (более чем в 2 раза) и GC типов, р-РНК и т-РНК в клетках головного мозга при действии метилпиразола и карбамоилметилпиразола в острых экспериментах (1—3 дня). В подострых экспериментах (1—3 месяца) действие пиразоловых соединений в отношении нуклеинового обмена, за исключением я-РНК АУ типа, имеет противоположную направленность. С увеличением содержания я-РНК АУ типа наступает подавление синтеза я-РНК GC типа (предшественник р-РНК), р-РНК и т-РНК, что свидетельствует о преимущественном поражении ядрышкового аппарата нервных клеток, ответственных за биосинтез указанных форм РНК. В механизме действия указанных соединений первый лог (N1) пиразола рассматривается в качестве активного центра, реализующего их действие на нуклеиновый обмен клеток мозга.

Интенсивное применение синтетических химических соединений и других ксенобиотиков нередко сопровождается ухудшением экологического состояния и ростом нейро-психических и других заболеваний. Конкурируя с природными индукторами и ингибиторами генной активности, ксенобиотики могут вызвать специфические и неспецифические реакции интоксикации, нарушающие процессы репликации, транскрипции и трансляции и в результате повреждения или мутации структур генетического материала привести к нежелательным последствиям в результате нейротоксического действия. В связи с отмеченным представляет исключительный интерес выявление механизма влияния различных ксенобиотиков на генную активность, а также выяснение вопроса реальности существования специфических рецепторов для связывания ксенобиотиков при генной экспрессии и разыгрывании процессов интоксикации и мутации. Эти и другие задачи по сей день остаются недостаточно освещенными [1—6]. Изучение путей нейротоксического действия многих ксенобиотиков с учетом особенностей функционирования генома нервных клеток представляет одну из интересных и важнейших направлений молекулярной биологии.

Настоящая работа является фрагментом наших исследований молекулярно-биологического и нейрохимического профиля, посвященных изучению особенностей действия ксенобиотиков в плане исследования в клетках головного мозга эффектов пиразоловых соединений (3-метилпиразол, 1-карбамоил-3/5-метилпиразол, ингибиторы нитрификации), на количественную характеристику ядерных РНК АУ (предшественник информационной РНК) и GC (предшественник рибосомной РНК) типов, р-РНК и т-РНК.

Материалы и методы

Эксперименты проводили в остром опыте на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Метилпиразол (МП) и карбамоилметилпиразол (КМП) вводили перорально в концентрациях 1:3, 1:5, 1:10 ЛД₅₀ в течение 3-х дней по одному разу. Смертельная доза (ЛД) применяемых препаратов составила 3840 мг/кг. В подострых экспериментах применяли 1:50, 1:100, 1:1000 ЛД₅₀ препаратов в течение 1 и 3 месяцев (ежедневный однократный прием).

Выделение, очистку и количественное определение различных классов РНК клеток головного мозга проводили разработанным нами комбинированным методом фенольной экстракции, дифференциального ультрацентрифугирования, гель-фильтрации с последующей ультрафиолетовой спектроскопией полученных РНК и идентификацией последней со стандартным образцом РНК («Sigma», США) [7--9]. В итоге в чистом виде были получены и изучены типы ядерных РНК GC и АУ, а также р-РНК и т-РНК. Количество РНК выражали в мкг/г мозговой ткани.

Использовали ультрацентрифугу Spinco (модель L-2-65K), фракционный коллектор (модель Müfem), спектрофотометр VSU 2-P, стандартные препараты т-РНК, р-РНК, т-РНК («Sigma», США). Все эксперименты выполняли в холодильной комнате при 2°.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования по изучению действия МП на количественную характеристику различных классов РНК в клетках мозга в острых и подострых экспериментах приведены в табл. 1, согласно которой в клетках головного мозга содержание я-РНК АУ и GC типов, р-РНК и т-РНК в контрольных опытах составляет $272 \pm 0,62$, $185 \pm 0,62$, $1090 \pm 32,2$, $287 \pm 3,0$ мкг/г ткани соответственно, а количество общей РНК колеблется в пределах 1834 мкг/г.

Эффекты пиразоловых соединений сопровождаются значительными изменениями в головном мозгу количественных характеристик различных классов РНК. В острых опытах МП в концентрации 1:3 ЛД₅₀ приводит к чувствительным сдвигам в содержании почти всех изученных форм РНК, выражающимся в достоверном увеличении концентрации как ядерных, так и цитоплазматических форм РНК. Согласно нашим данным, уровень я-РНК АУ типа возрастал

более чем в 2 раза, приблизительно составляя $582 \pm 6,44$ мкг/г ткани против $272 \pm 0,62$ мкг/г в контроле. На этом фоне количество р-РНК по сравнению с исходным увеличилось примерно на 1:3, составляя $1635 \pm 34,84$ мкг/г против $1090 \pm 32,2$ мкг/г; аналогичные достоверные сдвиги прослеживались и со стороны содержания я-РНК GC типа и т-РНК и общего РНК, которое по сравнению с контролем (1834 мкг/г) достигало 2818 мкг/г. Полученные результаты свидетельствуют о мощном стимулирующем влиянии МП на активность генетического аппарата. Выдвинутое нами предположение полностью подтвердилось при испытании препарата в концентрации 1:5 и 1:10 ЛД₅₀. Из приведенных в таблице данных видно, что под действием указанной дозы содержание изученных нами форм РНК в мозгу еще больше возрастало для я-РНК GC и AU типов, р-РНК и т-РНК соответственно, содержание же общей РНК в тех же условиях эксперимента возрастало на 78%, количество я-РНК AU типа—более чем в 3 раза, т-РНК—почти в 2 раза. Применение МП в концентрации 1:10 ЛД₅₀ характеризовалось увеличением содержания я-РНК GC и AU типов, р-РНК и т-РНК.

Как показали результаты проведенных наблюдений, все дозы МП, особенно 1:5 ЛД₅₀ обладают значительным эффектом в индукции генома нервных клеток. Установленный нами впервые в острых опытах индуцирующий эффект МП на нуклеиновый обмен имеет прямое отношение к перенапряжению функций генома и интенсивности биосинтеза белков в клетке. Таким образом, этот неконтролируемый интенсивно протекающий синтез биополимеров—РНК и белков может оказать пагубное влияние на регуляторные системы в процессе апластического роста клеток и тканей. Для окончательного обоснования выдвигаемого заключения представлялось необходимым проследить за действием МП как на нуклеиновый обмен подострых экспериментах, так и на активность ферментов метаболизма РНК—рибонуклеазу и ДНК-зависимую РНК-полимеразу.

Как вытекает из данных табл. 1, месячная затравка животных МП в концентрации 1:50 ЛД₅₀ вызывает статистически достоверное повышение содержания лишь я-РНК AU типа, являющегося предшественником информационной РНК. На этом фоне содержание других разновидностей РНК претерпевало противоположные сдвиги. Его уменьшение для я-РНК GC типа как предшественника рибосомной РНК, р-РНК и т-РНК, за редким исключением, статистически достоверно устанавливалось приблизительно в пределах $120 \pm 0,45$, $880 \pm 22,42$ и $180 \pm 0,42$ мкг/г соответственно против $185 \pm 0,65$, $1090 \pm 32,22$ и $287 \pm 0,32$ мкг/г в контроле.

Аналогичная закономерность повторялась при действии меньших концентраций препарата. Одномесячная затравка МП в концентрации 1:100 ЛД₅₀, как и при дозе 1:50 ЛД₅₀ сопровождается понижением содержания всех изученных трех форм РНК, причем количество я-РНК AU типа, достоверно увеличивается, составляя примерно $420 \pm 16,24$ мкг/г против $272 \pm 0,06$ мкг/г в контроле (табл. 1).

Таблица 1

Содержание различных классов РНК в головном мозгу
при действии метилпиразола (мкг/г)

Класс РНК	Контроль	Приемые концент. аци		
		1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
я-РНК GC типа	185±0,62	220±0,64	240±0,74**	230±0,25**
я-РНК AU типа	272±0,62	682±6,41***	794±0,08***	702±1,83***
р-РНК	1090±32,2	1636±34,84*	1707±3,90***	1429±34,13*
т-РНК	287±3,00	3,81±6,4***	541±6,44***	350±5,15**
общая РНК	1831	2818	3282	2714

Подострые эксперименты

Класс РНК	Контроль	1/50 ЛД ₅₀	1/100 ЛД ₅₀	1/50 ЛД ₅₀	1/50 ЛД ₅₀
		1 месяц	1 месяц	3 месяца	3 месяца
я-РНК GC типа	185±0,65	120±0,15**	150±0,48*	125±0,36***	120±0,42***
я-РНК AU типа	272±0,052	440±0,72***	420±16,24***	320±2,4*	280±0,62
р-РНК	1090±32,22	880±24,42**	960±28,46**	680±12,54***	680±12,64***
т-РНК	287±0,32	180±0,42***	240±5,4**	100±0,25***	120±0,45
общая РНК	1831	1630	1770	1215	1180

Примечание. Здесь и в табл. 2: число опытов в каждом ряду—8, * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Анализ полученных результатов позволяет допустить возможность поражающего действия МП после перенапряжения функций генома в острых опытах в отношении ферментативных систем биосинтеза я-РНК GC типа, р-РНК и т-РНК в хроническом эксперименте, осуществляемого в основном с участием ядрышковой ДНК-зависимой РНК-полимеразы. На этом фоне МП по-прежнему продолжает индуцировать биосинтез предшественника информационной РНК (я-РНК AU типа), определяющего характер и специфику синтезируемого белка. Не исключена возможность негативного влияния МП на биосинтез строительных блоков РНК и на предшествующих этапах развития этого процесса, изучение которого и других важных аспектов нуклеинового обмена в деталях под действием пирозоловых соединений потребует проведения специальных исследований.

Существенный интерес представляют результаты экспериментальных исследований по месячной затравке МП, который в концентрации 1:50 ЛД₅₀ оказывает ярко выраженное подавляющее действие на синтез изученных форм РНК. Так, например, согласно нашим наблюдениям, содержание я-РНК GC типа, р-РНК и т-РНК по сравнению с контролем убывает соответственно на 32, 37 и 65%, а содержание я-РНК AU типа увеличивается на 17%. При 3-месячной затравке МП в концентрации 1:100 ЛД₅₀ содержание я-РНК GC типа, р-РНК и т-РНК по-прежнему статистически достоверно уменьшается соответственно на 37, 39 и 58%, а уровень я-РНК AU типа лишь колеблется в пределах контроля, что не исключает возможности поражения на этой стадии как ферментативной системы, синтезирующей информационную РНК, так и других регуляторных процессов синтеза азотистых оснований, нуклеотидов в цепи биосинтетических реакций РНК.

Таким образом, тенденция к повышению содержания я-РНК AU типа при действии всех испытанных нами доз МП продолжается и в подострых экспериментах, в то время как содержание трех других форм РНК (я-РНК GC типа, р-РНК и т-РНК), наоборот, уменьшается. Не исключено, что после определенного перенапряжения генома в остром периоде интоксикации подострое и хроническое воздействие препарата приводит к поражению РНК-синтезирующей системы. Полученные данные свидетельствуют о непосредственном действии на геном нервных клеток, вызывающем ненормальный рост нуклеиновых клеток в период острой интоксикации и поражение генетического аппарата, приводя таким образом к уменьшению или почти остановке синтеза нуклеиновых кислот в условиях хронической интоксикации. В обоих случаях эти явления расцениваются как весьма негативное для жизнедеятельности клеток организма. Интенсивный рост количества биополимеров (РНК, а соответственно и белков) в период острой интоксикации не исключает возможность ускорения неконтролируемых репаративных процессов в пути неопластического роста клеток, в то время как поражение

генетического аппарата при хронической интоксикации приводит к прекращению его функции головного мозга.

Для окончательного суждения о вредном влиянии пиразоловых соединений мы сочли необходимым изучить нуклеиновый обмен головного мозга и под действием их другого представителя—КМП, отличающегося от МП наличием карбамильной группы в 1-м положении азота пиразолового кольца.

Как вытекает из данных табл. 2, в острых опытах КМП в концентрации 1:3 ЛД₅₀ вызывает статистически достоверное понижение содержания я-РНК АУ типа и, наоборот, повышение количества т-РНК, составляя соответственно $200 \pm 8,42$ и $459 \pm 4,78$ мкг/г ткани против $272 \pm 0,62$ и $287 \pm 3,0$ в контроле. При этом содержание я-РНК GC типа и р-РНК, имея тенденцию к повышению, тем не менее колебалось в пределах контроля. В тех же условиях эксперимента в концентрации 1:5 ЛД₅₀ КМП вызывают значительное повышение содержания я-РНК АУ типа, р-РНК и т-РНК соответственно до $592 \pm 5,63$, $1760 \pm 39,99$ и $440 \pm 3,22$ мкг/г. Содержание я-РНК АУ типа и т-РНК увеличивается в 2,9 и 1,5 раза, р-РНК—на 61%. Содержание я-РНК GC типа также повысилось, а уровень общей РНК возрастал до 3017 мкг/г, что по сравнению с контролем составляет 64%. Сопоставление полученных результатов по действию КМП и МП при одинаковых концентрациях позволяет выявить однонаправленность в действии этих двух пиразоловых соединений с той разницей, что КМП выступает также в роли мощного индуктора активности генетического аппарата клеток головного мозга.

Примечательно, что содержание изученных форм РНК в головном мозгу значительно увеличивается и при действии сравнительно меньшей концентрации (1:10 ЛД₅₀) препарата. При этом в нервных клетках уровень я-РНК GC и АУ типов, р-РНК и т-РНК доходит до $236 \pm 0,84$, $469 \pm 3,70$, $1690 \pm 35,42$, $340 \pm 3,20$ мкг/г соответственно, а количество общей РНК доходит приблизительно до 2735 мкг/г против 1834 мкг/г в контроле. Эти сдвиги по сравнению с контролем составляют соответственно 27, 72, 61, 18 и 49%.

Анализ полученных данных показывает, что КМП в индукции генетического аппарата обладает почти теми же свойствами, что и МП.

Направленность и эффективность реакции интоксикации обоих препаратов на нуклеиновый обмен протекает однотипно, по-видимому, по одному и тому же механизму. По всей вероятности, эффект действия КМП в острых опытах проявляется после потери карбамильной группы и высвобождения N¹ в пиразоловом кольце. В пользу такого вывода свидетельствует сравнительно активное действие МП на нуклеиновый обмен при концентрации 1:3 ЛД₅₀, при котором КМП не оказывает заметных сдвигов в содержании изученных форм РНК. Более высокая концентрация последнего—1:3 ЛД₅₀, по-видимому, влияет на интенсивность течения ферментатив-

Таблица

Содержание различных классов РНК в головном мозгу
при действии карбамонметилпиразола (мкг/г)

Класс РНК	Контроль	Применяемые концентрации		
		1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
я-РНК GC типа	185±0,62	194±6,65	225±0,32*	236±0,84
я-РНК AU типа	272±0,62	200±8,42	592±5,63***	439±3,70***
р-РНК	1099±32,2	1165±32,52	1760±9,99***	1690±35,42**
т-РНК	287±3,00	458±4,78***	440±3,32***	340±3,20**
общая РНК	1834	2018	3017	2735

Подопытные эксперименты

Класс РНК	Контроль	1/50 ЛД ₅₀	1/100 ЛД ₅₀	1/50 ЛД ₅₀	1/100 ЛД ₅₀
		1 месяц	1 месяц	3 месяца	3 месяца
я-РНК GC типа	185±0,65	120±0,32***	163±0,64**	80±0,22***	130±0,42***
я-РНК AU типа	272±0,52	420±0,65***	450±0,78***	419±0,66***	476±0,62***
р-РНК	1090±32,22	889±18,46**	920±22,44*	720±16,42**	572±16,42**
т-РНК	287±0,32	240±0,36	276±0,46	250±0,24**	248±0,66
общая РНК	1834	1660	1841	1170	1220

ных реакций, которые направлены на отщепление карбамонильной группы от КМП и ее дальнейшие превращения.

Однозначность или сходство механизмов действия КМП и МП на нуклеиновый обмен головного мозга подтверждают и результаты наших исследований по изучению влияния КМП на это звено метаболизма в подострых экспериментах.

Как показывают данные табл. 2, КМП в концентрации 1:50 и 1:100 ЛД₅₀ в подострых опытах вызывает аналогичные с действием МП сдвиги в нуклеиновом обмене. Содержание я-РНК АУ типа при действии указанных концентраций препарата достоверно повышается соответственно до $420 \pm 0,65$ и $480 \pm 0,42$ мкг/г против $272 \pm 0,62$ мкг/г в контроле. Как и в хронических опытах с МП, КМП вызывает статистически достоверное понижение количества я-РНК GC типа и р-РНК соответственно до $120 \pm 0,32$, $163 \pm 0,64$, $880 \pm 18,46$ и $920 \pm 22,44$ мкг/г. Аналогичная закономерность в нуклеиновом обмене прослеживается и при действии указанных концентраций препарата, применяемых в течение 3-х месяцев, когда содержание предшественника информационной РНК, как и при однемесячной заправке, статистически достоверно возрастает, составляя $440 \pm 0,66$ и $476 \pm 0,62$ мкг/г против $272 \pm 0,62$ мкг/г в контроле, а уровень р-РНК понижается и колеблется в пределах $720 \pm 16,42$ и $872 \pm 16,42$ мкг/г против $1090 \pm 32,22$ мкг/г в контроле; аналогично изменяется и содержание общей РНК. При действии указанных концентраций КМП значительно убывает и содержание я-РНК GC типа соответственно до $80 \pm 0,22$ и $130 \pm 0,42$ мкг/г против $185 \pm 0,65$ мкг/г в контроле.

На основании анализа данных, полученных в хроническом эксперименте, можно предположить об избирательном воздействии КМП преимущественно на ядрышковый аппарат клетки, где сосредоточены ферменты биосинтеза предшественников рибосомной и транспортной РНК. Этим, по всей вероятности, и можно объяснить резкое снижение количества я-РНК GC типа, р-РНК, установленное нами в подострых экспериментах.

Таким образом, при высоком содержании информационной РНК КМП в острых экспериментах вызывает индукцию биосинтеза всех форм РНК, а в подострых—резкое уменьшение содержания я-РНК GC типа и р-РНК.

Полученные данные приводят нас к твердому убеждению, что указанные ирразоловые соединения действуют единым механизмом на функцию генетического аппарата, в начале в качестве индукторов биосинтеза РНК, вызывая ненормальный рост биополимеров, а в дальнейшем и чрезмерное напряжение функции генома в первичных клетках, что приводит к понижению РНК-синтезирующих систем в ядерном и ядрышковом аппаратах клеток. Не исключено поражающее воздействие изученных факторов в хронических экспериментах и на предшествующие этапы нуклеинового обмена, при этом уменьшается пул азотистых оснований, нуклеозидов и нуклео-

тидов, необходимых строительных блоков, вовлекающихся в реакции биосинтеза нуклеиновых кислот.

Результаты исследований по острым и подострым экспериментам с применением 1:3, 1:5 и 1:10 ЛД₅₀ (в острых) и 1:10, 1:100 ЛД₅₀ (в подострых, 1—3 месяца) препаратов МП и КМП служат основанием считать метилпиразоловую конфигурацию и в особенности первый азот (N¹) пиразолового кольца действующим началом в структуре молекулы обоих препаратов, способным индуцировать геном первичных клеток в пути биосинтеза различных классов РНК. Хотя изученные соединения выступают в роли мощных индукторов нуклеинового обмена, вызывающих одностороннее и несколько разное действие на генетический аппарат, МП оказывается более активным, а КМП осуществляет свое влияние на генетический аппарат, по-видимому, после потери карбамонильной группы и перехода в МП. Активная роль первого азота пиразолового кольца, по нашему мнению, может заключаться в приеме и отдаче различных функциональных групп, в том числе и карбамонильной группы, благодаря чему он может вовлекаться во временное взаимодействие со структурой хроматина для разделения цепей двуцепочечной ДНК и создания условий интенсификации функциональной активности реплицирующих и транскрибирующих ферментов. С другой стороны, эти препараты во времени формируют определенный фон напряжения функции генома, поражая некоторые регуляторные системы, в особенности РНК-синтезирующий аппарат. Частичный ответ на эти и другие вопросы мы получим после рассмотрения наших экспериментальных данных, посвященных изучению изменений в активности рибонуклеазы основного фермента деградирующего РНК и ДНК-зависимых РНК-полимераз, обеспечивающих биосинтез различных форм РНК в клетках.

THE CONTENT OF VARIOUS CLASSES OF BRAIN RNA UNDER THE EFFECT OF PYRAZOLE COMPOUNDS

KNACHATRIAN G. S., ADAMIAN M. KH., ANTONIAN A. A., KAZARIAN A. R., SAYADIAN K. S.

Yerevan Medical Institute, Scientific Research Institute of Toxicology

Effect of pyrazole compounds from the group of inhibitors of nitric acid at the activity of genetic apparatus of animal nerve cells was studied. An increase of biosynthesis of n-RNA of AU and GC types, r-RNA and t-RNA in the brain cells under the effect of methylpyrazole and carbamoyl methylpyrazole in acute experiments (1—3 days) was shown. The content of n-RNA of AU type (pre-m-RNA) was elevated more than two times. In nonacute experiments (1—3 months) the effect of pyrazole compounds in regard to nucleic acid metabolism despite of

n-RNA AU type had an opposite direction. With the increase of the content of n-RNA AU type there came the depression of the synthesis of n-RNA GC-type (precursor of r-RNA), r-RNA and t-RNA, which shows a primary affect of nucleotic apparatus of nerve cells, responsible for the biosynthesis of indicated forms of RNA. The first nitrogen (N) of pyrazole was considered to be an active centre of the effect of indicated compounds in the mechanism of their action at the nucleic acid metabolism of brain cells.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Hodgson E., Bent J. R., Phillips R. M. (ed), Reviews in biochemical toxicology, New York e. a. Elsevier, v. 7, № 15, p. 237, 1985.*
2. *Calzavara J., Gibson G. G., Gordon J. W., Pachs D. V. Xenobiotica, v. 16, № 10—11, p. 733—1078, 1986.*
3. *Drake J. M. The molecular basis of mutation, Holden-Day, San Francisco, 1970.*
4. *Ames B. N. Science, v. 204, p. 587—593, 1979.*
5. *Cairns J. Cancer problem, Sci. Am. v. 233, p. 61—78, 1975.*
6. *Casida J. E., Rizo L. O. Xenobiotica, v. 16, № 10—11, p. 1003—1015, 1986.*
7. *Хачатрян Г. С., Антоян А. А., Алсвердян А. А., Саркисян Ф. А., Минасян Р. Т., Вестр, биохимия мозга, АН АрмССР, Ереван т. 9, с. 123—150, 1974.*
8. *Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, «Айтастан», 1981.*
9. *Хачатрян Г. С., Галстян Г. Г., Антоян А. А., Алсвердян А. А., Хачатрян В. Г., Минасян Р. Т., Варадян А. Г., Адамян М. Х. Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 552—664, 1987.*

Поступила 12. VI. 1991