

УДК 577.123.5

АКТИВНОСТЬ РИБОНУКЛЕАЗЫ И ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК ПОЛИМЕРАЗЫ В МОЗГУ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПИРАЗОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

ХАЧАТРЯН Г. С., АНТОНЯН А. А., КАЗАРЯН А. Р., ХАЧАТРЯН В. Г., ГАЛСТЯН Г. Г., ВАГРАДЯН А. Г.

Филиал ВНИИГИНТОКСа, Ереван

Изучена активность рибонуклеазы, ДНК-зависимой РНК-полимеразы в клетках головного мозга крыс при острой интоксикации пиразоловыми соединениями. Показано значительное ингибирование (в 2—3 раза) активности рибонуклеазы при пероральном действии 1/3, 1/5, 1/10 LD_{50} концентраций метилпиразола и карбамоилметилпиразола в острых экспериментах (однократный трехдневный прием). Аналогичная концентрация указанных ксенобиотиков не вызывает особых изменений в активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы I, между тем как активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы II, при тех же воздействиях, достоверно повышается (на 40—60%). Делается заключение о том, что высокие концентрации пиразоловых соединений выступают в качестве ингибиторов активности рибонуклеазы и индукторов активности нуклеоплазматической ДНК-зависимой РНК-полимеразы, синтезирующей РНК АУ типа (пре-м-РНК), содержание которого значительно (в 2—3 раза) увеличивается в мозгу при действии тех же пиразоловых соединений. Обсуждается механизм действия указанных препаратов.

Разработка молекулярно-биологических, физико-химических и энзимологических основ повреждения генетического аппарата клеток функционально активных органов, каковым является головной мозг, при действии синтетических химических соединений, широко применяемых в хозяйстве, является важнейшей задачей современной нейрoхимии и молекулярной токсикологии.

В наших прежних исследованиях было изучено действие пиразоловых соединений на количественную характеристику различных классов РНК в мозгу. Вредное влияние пиразоловых соединений на организм человека и животных занимает особое место в оценке экологического состояния определенных регионов и здоровья людей, занятых в производстве и применении указанных препаратов из группы ингибиторов нитрификации.

Рассмотрение результатов наших прежних исследований относительно действия метилпиразола и карбамоилметилпиразола на нуклеиновый обмен в головном мозгу в острых экспериментах показало значительное увеличение количества я-РНК АУ и GC типов, р-РНК и т-

РНК. При этом содержание я-РНК АУ типа (предшественник информационной РНК) возрастало в 2—3 раза. При подострых и хронических воздействиях указанных препаратов (1—3 месяца) в мозгу отмечалось подавление синтеза почти всех форм РНК, за исключением я-РНК АУ типа. Указанные изменения выявили определенное перенапряжение в функции генетического аппарата нервных клеток при острых и хронических пиразоловых интоксикациях.

Попытки в расшифровке механизма изменений количественной характеристики различных классов РНК при острых и хронических пиразоловых интоксикациях привели нас к причинно-следственному рассмотрению изменений в активности ключевых ферментов биосинтеза и распада нуклеиновых кислот в головном мозгу при действии указанных соединений.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах, массой 150—200 г. Экспериментальных животных в острых опытах подвергали пероральному влиянию пиразоловых соединений. Вводили 3-метилпиразол и 1-карбамоил-3,5-метилпиразол, в виде химически чистых препаратов в концентрациях 1/3, 1/5 и 1/10 ЛД₅₀ (однократный прием в течение трех дней). Половина летальной дозы препарата (ЛД₅₀) составляла 1920 мг/кг веса животного. В основу методов выделения, очистки и определения активности рибонуклеазы были положены исследования ряда авторов [1—3] в нашей модификации [4, 5]. Субклеточные частицы мозга (ядра, митохондрии, рибосомы и др.) выделяли методом дифференциального ультрацентрифугирования. В полученной суспензии субклеточных частиц определяли РНКазную активность по методу Mc Donald [6], Uchida, Egami [7], Takahashi [8]. Из различных субклеточных частиц мозга готовили инкубационную смесь, содержащую 0,2—0,3 мг белка (ядерного, рибосомного, надосадочной жидкости при 105000 g) в 0,4 мл, в которую добавляли 96 мг мочевины (конечная концентрация 4 M) и оставляли ее при 0° в течение 30 мин. Затем в среду вносили 0,4 мл РНК в ацетат-вероналовом буфере при pH 5,4, 6,0, 7,6, 7,9, 8,1 и инкубировали ее при 37° в течение 30 мин. Для осаждения неразложившейся РНК к пробам добавляли 0,1 мл перхлорной кислоты при 0°, через 30 мин их центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость разводили в 40 раз. Кислоторастворимые продукты расщепления РНК определяли в 10 мм кювете при 260 мкм. За единицу РНКазной активности принимали увеличение оптической активности на 1 ед. при длине волны 260 мкм в условиях опыта. Число ед. активности фермента выражали в мг ядерного, рибосомного белка и белка растворимой фракции. Ниже приводятся данные РНКазной активности ядерной фракции мозга при pH 6,0.

В основу определения активности фермента положены методы Albertson [9], Kornberg, Okasaki [10]. Выделение, очистку и определение активности фермента из мозга проводили по прописи Weiss [11]. Дебова и Вогрина [12] в нашей модификации. Активность фермента определяли включением радиоактивного рибонуклеозид-трифосфата в РНК в присутствии всех других необходимых нуклеозидтрифосфатов. Реакция полимеризации протекает в присутствии ДНК. После получения суспензии фермента в 0,05 трис-буфере, pH 8,1, в белковой концентрации 10—12 мг на мл суспензии, собирали инкубационную смесь, содержащую 100 мкмоль трис-HCl буфера, pH 8,1, 5 мкмоль $MgCl_2$, 10 мкмоль меркаптоэтанол, 2 мкмоль соответственно АТР, СТР, ГТР и 0,1 мкмоль меченой УТР [^{14}C] с У.А. 5—10⁶ Кп/мин/мкмоль. Количество включенной метки в РНК рассчитывали путем деления общего показателя, обнаруживаемого во фракции РНК (минус показание контроля), на У.А. меченого субстрата. Смесь инкубировали в 10 мл флаконах при 35° в течение 30 мин и реакцию останавливали добавлением равного объема 10%-ной ТХУ. В качестве носителя использовали 200 мкг БСА. Радиоактивность просчитывали на титре целлюлозных фильтров и выражали в нмоль [^{14}C]UMP/мг ДНК. Меченым нуклеотидом мог служить любой другой. Проводили дифференциальное определение активностей I и II форм РНК-полимераз [13]. Активность I формы РНК-полимеразы определяли в 250 мкл смеси, содержащей 75 мМ трис-HCl буфер, pH 8,0, 0,05 мМ ЭДТА, 0,08 мМ ДТТ, 1,5 мМ спермидин, по 32 мМ АТР, СТР и ГТР, 0,06 мМ немеченой УТР, 0,034 мМ [^{14}C] УТР (2 мКп) и 10 мМ $MgCl_2$. Количество вносимых в среду ядер рассчитывали исходя из 20—25 мкг по ДНК. При определении активности II формы РНК-полимеразы pH смеси снижали до 7,5, добавляли 320 мМ $(NH_4)_2SO_4$ и вместо $MgCl_2$ использовали 2 мМ $MnCl_2$. Инкубацию проводили при 37° в течение 20 мин, реакцию останавливали перенесением проб в ледяную баню, объем смеси доводили до 1 мл раствором немеченого носителя (200 мкг БСА на пробу) и добавляли равный объем 10%-ного раствора ТХУ с определенным радиоактивностью по вышеописанному методу.

Результаты и обсуждение

Как вытекает из данных табл. 1, активность рибонуклеазы ядерной фракции мозга в контрольных опытах при pH 6,0 составляет $19,10 \pm 0,83$ ед., что соответствует литературным данным [4].

Действие метилпиразола и карбамоилметилпиразола в концентрации 1/3 ЛД₅₀ вызвало многократное понижение активности рибонуклеазы в ядерной фракции мозга, составляя соответственно $5,72 \pm 0,40$ и $7,33 \pm 1,89$ ед. против $19,0 \pm 0,83$ ед. в контроле. Аналогичная закономерность, но с меньшей выраженностью, отмечается при действии указанных соединений и в концентрации 1/5 ЛД, с активностью фермента, составляющей соответственно $10,25 \pm 0,97$ и $7,85 \pm 0,69$ ед.

Анализ полученных данных показывает значительное (2—3-кратное) подавление активности рибонуклеазы в ядерной фракции мозга

при действии высоких концентраций метилпиразола и карбамоилметилпиразола. В отличие от метилпиразола, карбамоилметилпиразол достоверно понижал активность рибонуклеазы и при действии сравнительно меньшей концентрации препарата (1/10 ЛД₅₀), составляя в контроле, по данным табл. 1, $12,33 \pm 1,12$ ед. против $19,10 \pm 0,83$ ед.

Таблица 1

Активность рибонуклеазы в ядерной фракции головного мозга при действии пиразоловых соединений (рН 6,0)

Конт- роль	Метилпиразол			Карб. амилметилпиразол		
	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
19,10 $\pm 0,83$ п 12 р —	5,72 $\pm 0,40$ 8 <0,001	10,25 $\pm 0,97$ 8 <0,001	18,05 $\pm 0,84$ 12 —	7,33 $\pm 1,89$ 8 <0,001	7,85 $\pm 0,69$ 8 <0,001	12,33 $\pm 1,12$ 8 <0,001

Согласно полученным данным, испытанные нами пиразоловые соединения в условиях *in vivo* выступают в роли ингибиторов активности рибонуклеазы.

Сопоставление этих данных с ранее полученными по изучению количественных сдвигов в содержании различных классов РНК при тех же воздействиях позволяет проследить определенное соответствие. Подавление активности рибонуклеазы указанными препаратами, возможно, оказывает значительное индуцирующее действие на биосинтез я-РНК AU- и CG-типов, р-РНК и т-РНК в мозгу. С другой стороны, не исключено, что метилпиразол и карбамоилметилпиразол, в острых экспериментах в высоких и средних концентрациях, чувствительно подавляют или даже полностью приостанавливают катаболизм РНК, способствуя тем самым относительному накоплению различных форм РНК. По данным наших экспериментов, механизм ингибирования активности фермента в мозгу под действием пиразоловых соединений остается невыясненным и требует проведения специальных исследований в модельных системах, несмотря на полнейшую достоверность описанных фактов.

В проведенных исследованиях особый интерес представляло изучение динамики изменения активности РНК-синтезирующей системы (ДНК-зависимая РНК-полимераза) на фоне увеличения содержания различных форм РНК в мозгу при действии примененных соединений. Большим достижением в понимании регуляции биосинтеза различных классов РНК в эукариотических клетках было открытие множественных форм ядерных ДНК-зависимых РНК-полимераз [14], в частности РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы II [14, 15], локализованных: первая — в основном в ядрышках клеток и отвечающая за синтез р-РНК, а вторая — в нуклеоплазме и синтезирующая я-РНК AU типа (предшественники информационной РНК). Изучение активности ука-

занных форм фермента ядерной фракции мозга проводили под действием 1/3, 1/5, 1/10 ЛД₅₀ метилпиразола и карбамоилметилпиразола.

Как показывают данные табл. 2, активность РНК-полимеразы I в контроле составляет $132,20 \pm 1,61$ нМ [¹⁴C] UMP на мг ДНК, которая под влиянием метилпиразола и карбамоилметилпиразола в концентрации 1/3 ЛД₅₀ достоверно понижается соответственно до $120 \pm 11,27$ и $102,50 \pm 8,05$ ед. Аналогичная картина была зарегистрирована и с применением 1/5 и 1/10 ЛД₅₀ концентраций изученных препаратов. Примечательно, что активность РНК-полимеразы I в указанных экспериментах не подвергается большим изменениям и колеблется в пределах контроля. По всей вероятности, как метилпиразол, так и карбамоилметилпиразол не доходят до ядрышкового аппарата клетки, где, фактически, располагается ДНК-зависимая РНК-полимераза I, обеспечивающая синтез р-РНК, а возможно и т-РНК, чем и можно объяснить отсутствие видимых изменений в активности РНК-полимеразы I.

Таблица 2

Активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы I в мозгу при действии пиразоловых соединений (нМ [¹⁴C] UMP на мг ДНК)

Контроль	Метилпиразол			Карбамоилметилпиразол		
	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
$132,10 \pm 1,61$ n 6 p	$120,09 \pm 11,27$ 6 —	$119,60 \pm 7,57$ 6 —	$102,00 \pm 7,2$ 6 <0,05	$102,5 \pm 0,5$ 6 <0,05	$110,0 \pm 2,4$ 6 —	$110,0 \pm 9,66$ 6 —

Изучение изменений в активности РНК-полимеразы II при действии тех же соединений было предпринято на основании известной лимитирующей роли данной формы фермента в биосинтезе я-РНК АУ типа и наших ранее проведенных наблюдений, показавших значительный рост содержания я-РНК в мозгу при всех примененных концентрациях и формах затравки животных пиразоловыми препаратами.

По данным табл. 3, активность РНК-полимеразы II, составляющая в контроле $157 \pm 3,86$ ед. в острых опытах под действием метилпиразола и карбамоилметилпиразола возрастала соответственно до $254,0 \pm 17,0$ и $230 \pm 16,9$ ед.

Сопоставление полученных результатов с прежними по изучению количественных сдвигов в содержании различных форм РНК в мозгу при действии тех же концентраций исследуемых пиразоловых соединений, позволяет выявить однонаправленность в их течении. Нарастание активности РНК-полимеразы II во времени сопровождается со значительным ростом содержания различных форм РНК, в особенности я-РНК АУ типа. При этом обнаруживается полное причинно-следственное соответствие между уровнем активности фермента и содержанием синтезируемых им форм РНК.

Достоверное повышение активности РНК-полимеразы II отмечалось и при других, сравнительно меньших концентрациях пиразоловых соединений. Как показывают данные табл. 3, 1/5 и 1/10 ЛД₅₀ концентрации метилпиразола и карбамоилметилпиразола также вызывают достоверное повышение активности указанной формы фермента, составляющей соответственно $220,0 \pm 16,9$, $219,00 \pm 11,27$ и $201,0 \pm 12,9$, $204,0 \pm 12,0$ ед. против $157 \pm 3,86$ ед. в контроле.

Таблица 3

Активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы II в мозгу при действии пиразоловых соединений (нМ [¹⁴C] UMP на мг ДНК)

Контроль	Метилпиразол			Карбамоилметилпиразол		
	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
157 ±3,86 п 6 р —	254 ±17,0 6 <0,001	220 ±16,9 6 <0,01	219 ±11,27 6 <0,001	230 ±16,9 6 <0,001	201 ±12,9 6 <0,01	204 ±12,0 61 <0,00

Анализ полученных данных показывает, что пиразоловые соединения в острых экспериментах при высоких концентрациях выступают в качестве ингибиторов активности рибонуклеазы и индукторов активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы II, синтезирующей в основном я-РНК АУ типа.

На основании полученных данных можно допустить, что точкой приложения метилпиразола и карбамоилметилпиразола является нуклеоплазма нервных клеток, в которой проявляется эффект ингибирования рибонуклеазы и активирования нуклеоплазматической ДНК-зависимой РНК-полимеразы (полимераза II).

RIBONUCLEASE AND DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE ACTIVITY IN BRAIN UNDER THE EFFECT OF PYRAZOLE COMPOUNDS.

KHACHATRIAN G. S., ANTONIAN A. A., KAZARIAN A. R., KHACHATRIAN V. G., GALSTIAN G. G., VAHRADIAN H. G.

Scientific Research Institute of Toxicology, Yerevan Medical Institute

An activity of ribonuclease, DNA-dependent RNA polymerase in rat brain cells during acute intoxication by pyrazole compounds was studied. It was shown a significant inhibition (2—3 times) of ribonuclease activity during per oral effect 1/3; 1/5; 1/15 LD₅₀ concentration of pyrazole and carbamoyl methylpyrazole in acute experiments (single three day reception). Analogical concentration of indicated xenobiotics haven't brought

to particular changes in the activity of DNA-dependent RNA polymerase I, when the activity of DNA-dependent RNA polymerase II under the same effects reliably increased (at 40—60%). It can be concluded, that great concentrations of pyrazole compounds appeared to be inhibitors of ribonuclease activity and inductors of the activity of nucleoplasmatic DNA-dependent RNA AU type (pre-m-RNA). Its content was significantly increased (2—3 times) in brain during the effect of the same pyrazole compounds. The mechanism of the action of indicated preparations was considered.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hirs et al. J. Biol. Chem., v. 235, p. 633, 1960.
2. Spackman et al., J. Biol. Chem., v. 235, p. 643, 1960.
3. Шапот В. С. Нуклеазы, Медицина, М. 1968.
4. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Айастан, 1981.
5. Хачатрян Г. С., Антоян А. А., Алавердян А. А., Саркисян Ф. А., Вопр. биохимии мозга, т. 9, с. 151—170, 1974.
6. McDonald M. R. Meth. in Enzymology, v. 12, p. 428, 1955.
7. Uchida T. E., Egami F. Meth. in Enzymology, v. 12, p. 228—239, 1967.
8. Takahashi K. J. Biochem. (Tokyo), v. 49, p. 1, 1961.
9. Albertson P. A. Biochem. et biophys. acta, v. 103, p. 1, 1965.
10. Kornberg A., Okasaki T. J. Biol. Chem., v. 239, p. 259, 1964.
11. Weiss S. B. Meth. in Enzymology, v. 13, P. B. p. 555—565, 1967.
12. Дебов С. С., Вотрин И. И. Биохимия, т. 31, № 1, с. 125, 1966.
13. Гацзе Л. Н., Экизашили В. К., Кафиани К. А. Биохимия, т. 45, с. 1017—1026, 1980.
14. Chambon P. Annu. Rev. Biochem., v. 144, p. 613—638, 1975.
15. Lindell T. J. Pharm. and Ther., v. 2, p. 195—222, 1977.

Поступила 12. VI, 1991.