

СТРУКТУРА ДНК И ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
НЕКОТОРЫХ АНТИАМНЕСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВГАРИБЯН Д. В., ДЖАГАЦЯНЯН И. А., ДАНИЕЛЯН Н. С., МЕЛИКЯН Г. Г.,
АКОПЯН А. Г., БАБАЯН Ю. С., АВЕТИСЯН М. Г., ГАРИБДЖАНИЯН Б. Т.

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Милджояна НАН Армении, Ереван

В специализированных отделах мозга обученных животных и животных с ретроградной амнезией исследовано влияние некоторых антиамнестических средств на характер метилирования и вторичную структуру ДНК. Анализ полученных данных показал, что как при выработке условного рефлекса, так и при применении веществ, восстанавливающих ретроградную амнезию, в коре больших полушарий наблюдается заметное увеличение содержания 5-метилцитозина. При этом меняется дифференциальная кривая плавления, в частности уменьшается температура плавления и увеличивается его интервал. Предполагается существование коррективной связи между отмеченными изменениями в уровне метилирования и вторичной структурой, с одной стороны, и функциональной активностью генома, с другой.

В последнее время отмечается повышенный интерес к изучению состояния ДНК в активно функционирующих нервных клетках мозга. Известно, что воздействие нейротропных средств на процесс обучения вызывает перестройку генома, обуславливая, главным образом, метаболические изменения в ДНК клеток головного мозга [1]. Ванюшин и соавт. показали [2], что выработка условного рефлекса сопровождается изменением степени реакции метилирования, о которой судили по содержанию в ДНК минорного основания 5-метилцитозина (5-МЦ).

Целью настоящего исследования было изучение характера метилирования и вторичной структуры ДНК в специализированных структурах мозга при обучении и ретроградной амнезии под влиянием антиамнестического препарата пирацетама и соединения АН—346, синтезированного в ИТОХ НАН РА и проявившего антиамнестическую активность.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах массой 130—150 г, разделенных на 4 группы (по 15 крыс в каждой): 1—пассивный контроль (интактные животные, содержащиеся в обычных клетках), 2—активный контроль (животные, прошедшие процедуру обучения), 3—получавшие пирацетам, 4—получавшие соединение

АН—346. С целью анализа антиамнестического эффекта вырабатывали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ) с последующим применением электрошока в качестве амнестического фактора по модифицированной методике Bures и Buresova [3]. После 3-минутной регистрации времени пребывания животного в светлом и темном отсеках, в последнем оно подвергалось однократному удару током через электродный пол (обучение). Для получения амнезии использовали максимальный электросудорожный припадок. Проведение электрошока непосредственно после обучения вызывало стирание памятного следа. Тест на воспроизведение осуществляли через 24 ч после обучения, в течение которого контрольные животные забывали обучение и предпочитали находиться в темной части камеры. Критерием антиамнестического эффекта веществ служило предпочтительное нахождение во второй день в светлом отсеке.

3- и 4-й опытным группам животных производили внутрибрюшинное введение субстанции пираретама 200 мг/кг и соединения АН—346 4 мг/кг в виде взвеси с твин—80 и через 45 мин вырабатывали реакцию пассивного избегания с последующим применением электрошока. Сразу после опыта животных деканитировали, из мозжечка и коры больших полушарий по модифицированному методу Мармура [4] выделяли препараты ДНК, содержавшие не более 1,5—2% белка и РНК. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая 5—МЦ, препараты ДНК высушивали при температуре 105° и гидролизовали до оснований (99%-ная муравьиная кислота, 175°, 30 мин). Основания фракционировали с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге с последующим спектрофотометрированием [5].

Тепловую денатурацию ДНК проводили в водном растворе, содержащем 0,02 М NaCl, pH 7,3. Кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAM SP—8000 при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,25 град/мин.

Для выяснения особенностей в характере поведения кривых плавления был осуществлен переход дифференциальной кривой плавления (ДКП). ДКП были получены путем численного дифференцирования нормированных кривых плавления по специальной программе [6].

Результаты и обсуждение

Из табл. 1 с данными нахождения животных в светлой камере в течение 3 мин можно видеть, что введение пираретама приводило к удлинению времени воспроизведения рефлекса крыс, то есть к проявлению антиамнестического эффекта. Так, после его применения животные на 2-й день эксперимента пребывали в светлой камере 121,3 с, а после введения АН-346—146,3 с, что в 50,5 и 60,9 раз превосходило соответствующие показатели у животных в активном контроле.

При анализе состава ДНК контрольных животных (пассивный и активный контроль) явно выделяется разница в уровне их метилиро-

вания, причем выработка условного рефлекса сопровождается повышением степени метилирования в обеих изученных структурах мозга, хотя и в мозжечке этот сдвиг оказывается менее выраженным, соответственно на 56,7 и 64,7%. Этот факт свидетельствует об участии генома клеток мозга в формировании условнорефлекторной связи, при этом сам он претерпевает заметные структурные изменения.

Таблица 1

Характеристика параметров мнестических функций мозга на модели электрошоковой амнезии УРПИ после пиретама и АН-346

Вещества	Время нахождения в светлой камере	
	I-ый день	II-ой день
Контроль пассивный	2,1 (1,8÷2,4)	3,4 (1,0÷5,8)
Контроль активный	2,4 (2,39÷2,4)	2,4 (1,7÷3,1)
Пиретам	2,7 (2,3÷3,2)	121,3 (72,9÷168,8)*
АН-346	3,1 (2,4÷3,8)	146,3 (108,4÷184,2)*

Примечание. В скобках — доверительные интервалы при $p=0,05$; * $p<0,05$.

ДНК, выделенные из мозга животных, получивших пиретам и соединение АН-346, имеют разный уровень метилирования. Нуклеотидный состав этих ДНК не отличается от ДНК контрольных животных и соответствует правилам Чаргаффа. Изученные препараты принадлежат к АТ типу, количество ГЦ пар оснований (Г+Ц+МЦ) в них составляет 42,9—44,8% и отражает среднее не менее чем из шести определений для каждого препарата ДНК.

Как явствует из табл. 2, под воздействием пиретама и соединения АН-346 в коре больших полушарий обученных животных отмечается увеличение содержания 5-МЦ по сравнению с контролем на 22 и 94% соответственно.

Таким образом, при применении испытуемых препаратов в коре больших полушарий, связанной с условнорефлекторной деятельностью и формированием памяти происходит индуцируемое увеличение содержания 5-МЦ, а в мозжечке, не обладающем этой функцией, не отмечается статистически достоверных сдвигов содержания 5-МЦ. Судя по имеющимся данным [7, 8], одной из особенностей действия некоторых нейротропных средств, защищающих животных от ретроградной амнезии, вызванной электрошоком, является облегчение у них процессов обучения. Механизм действия этих веществ связывается с активацией деятельности неокортекса, ускорением выработки и повышением устойчивости условных рефлексов. Кроме того, поскольку обнаружено, что при выработке условного рефлекса суперметилированной оказывалась ДНК неокортекса и гиппокампа [2], не исключено, что одним из возможных механизмов дифференциальной регуляции транскрипции

Таблица 2

Нуклеотидный состав и некоторые параметры плавления ДНК

Отдел мозга	Группа животных	Основания в ДНК, мол%						Температура плавления	Интервал плавления
		Г	А	Ц	МЦ ±σ	Т	Г+Ц+ +МЦ		
Мозжечок	контроль пассивный	21,3	28,4	20,9	$0,74 \pm 0,24$	28,1	42,9	—	—
	контроль активный	21,5	28,9	20,4	$1,16 \pm 0,11$	28,0	43,0	—	—
	получивших пирацетам	21,6	28,6	20,5	$1,17 \pm 0,11$	28,2	43,2	—	—
	получивших АН—346	21,9	28,5	21,0	$1,00 \pm 0,13$	28,3	43,9	—	—
Кора больших полушарий	контроль пассив.	21,7	28,7	21,0	$1,02 \pm 0,19$	28,5	42,8	—	—
	контроль актив.	21,5	28,7	20,4	$1,50 \pm 0,11$	28,3	43,5	$73,1 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,1$
	получивших пирацетам	21,5	28,2	20,4	$1,84 \pm 0,12$	28,0	43,7	$69,5 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,2$
	получивших АН—346	21,6	28,0	20,4	$2,91 \pm 0,25$	28,0	44,8	$67,4 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,2$

Примечание: достоверность отличия по количеству МЦ от контроля ($p < 0,05$)

является процесс метилирования ДНК с вероятным ускорением синтеза РНК и появлением в клетках мозга новых РНК [9]. Как следует из рисунка и табл. 2, с увеличением содержания 5-МЦ при применении пираретама, и особенно соединения АН-346, имеет место уменьшение температуры плавления и увеличение его интервала. В низкотемпературной области (53—63°) на ДКП указанных ДНК отмечается появление пика, отсутствующего в ДНК контроля (рис.). Возможно, что увеличение интервала плавления с повышением содержания 5-МЦ обусловлено возрастанием количества дестабилизированных областей в молекуле ДНК, вследствие чего эти молекулы становятся более гетерогенными системами [10]. Следовательно, наблюдаемые изменения параметров плавления и вида ДКП ДНК под действием изучаемых веществ связаны с изменением метилирования цитозина.

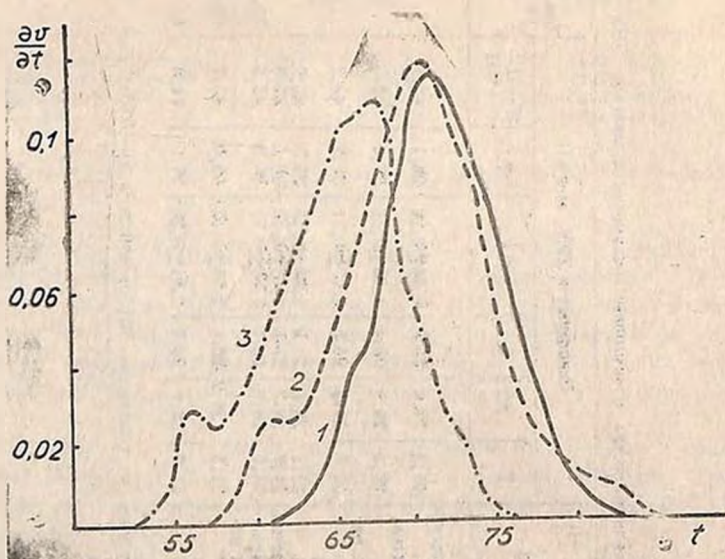


Рис. Дифференциальные кривые плавления ДНК больших полушарий: контрольных кривые (1), получивших пираретам (2), получивших соединение АН-346 (3). γ — степень спиральности ДНК.

При применении исследуемых антиамнестических средств изменения, происходящие в реакциях метилирования и вторичной структуре ДНК, по-видимому, зависят от степени выработки и упроченности условного рефлекса. Не исключено, что индуцируемое метилирование связано с изменениями в дезоксирибонуклеопротеиде с появлением новых доступных для метилирования участков, а также возможными сдвигами активности самих ДНК-метилаз, что может быть одним из последствий реорганизации соответствующих областей хроматина при их активации.

Таким образом, выработка условных рефлексов, характеризующаяся процессами запоминания, связана с транскрипцией и модификацией генома, функциональная активность которого может быть изменена при воздействиях на ЦНС антиамнестическими средствами.

STRUCTURE OF DNA AND THE POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION OF SOME ANTIAMNESIC DRUGS

GHARIBIAN G. V., JAGHIATSPANIAN I. A., DANIELIAN I. S.,
MELIKIAN H. H., HAKOPIAN H. G., BABAYAN Yu. S., AVETISSIAN M. G.,
GARIBIANIAN B. T.

A. L. Mnjoyan Institute of Fine Organic Chemistry,
Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

The influence of some antiamnesic drugs on the character of methylation and the secondary structure of DNA in the specialized parts of the brain has been investigated in trained animals and in animals with retrograde amnesia. The analysis of the obtained data has shown that a marked increase in the content of 5-methylcytosine in the cortex of the large hemispheres is noted both during the formation of the conditioned reflex and during the use of antiamnesic drugs, the differential melting curve being modified, the melting point depressed and the melting interval being enlarged. It is assumed that the observed modifications in the methylation and the secondary structure of DNA may be correlated with the functional activity of the genome.

ЛИТЕРАТУРА

1. Третьяк Т. М. Успехи соврем. биол. т. 100, № 1 (4), с. 20—28, 1985.
2. Гуськова Я. В., Бурцева Н. Н., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б. Ф. Докл. АН СССР, т. 233, с. 993, 1977.
3. Bures J., Buresova O. G. Comp. Physiol. Psychol., v. 56, p. 268—272, 1963.
4. Васильев В. К., Гарибян Д. В., Захарян Р. А., Галоян А. А., Ванюшин Б. Ф. Докл. АН СССР, т. 205, № 3, с. 721—723, 1972.
5. Ванюшин Б. Ф. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1964.
6. Бабалян Ю. С., Гарибян Д. В., Даниелян Н. С. и др. Вопр. мед. химии, т. 30, № 5, с. 92—94, 1984.
7. Giurgea C., Lefevre D. Psychopharmacologia, B. 20, S. 160—168, 1971.
8. Машковский М. Д., Рощина Л. Р., Полежаева Г. С. и др. Хим. фармацевт. журн., т. 11, № 8, с. 132—139, 1977.
9. Gallo J., Bonnet K. Psychol. Rev., v. 75, p. 109, 1971.
10. Adams R. L. P., Eason R. Nucleic Acids Res. v. 12, № 14, p. 5869—5877, 1984.

Поступила 19. IX, 1991