



УДК 612.822.1:577.214.3

## СИНТЕЗ РНК В КЛЕТОЧНЫХ ЯДРАХ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭТИМИЗОЛА

КАПЛИКОВА О. Г., БЕЛЯВЦЕВА Л. М., РАЗУМОВСКАЯ Н. И., БОРОДКИН Ю. С.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград,

Исследована РНК-синтезирующая система клеточных ядер гиппокампа, серого и белого вещества коры больших полушарий головного мозга крыс. Показано, что препараты клеточных ядер, выделенные из этих отделов мозга, различны по содержанию нейрональных и глиальных элементов, уровню матричной активности хроматина, активности РНК-полимеразы и рибонуклеазы. Введение этимизола за 1 ч до опыта повышало матричную активность хроматина и активности РНК-полимераз I и II в клеточных ядрах гиппокампа и серого вещества коры. Добавление этимизола к изолированным ядрам в опытах *in vitro* в концентрациях  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М стимулировало, а в концентрациях  $10^{-4}$ — $10^{-2}$  М ингибировало синтез РНК. Предполагается, что эффекты этимизола связаны с метаболизмом кальция и циклических нуклеотидов.

При изучении метаболических звеньев, связанных с процессами обучения и консолидации памяти, целесообразно использование фармакологических нейротропных препаратов, оказывающих определенное регулирующее воздействие на эти процессы. Особый интерес в этом аспекте вызывает препарат из ряда метилксантинов, являющийся моноциклическим аналогом кофеина с разомкнутым пиримидиновым кольцом, в котором произведена взаимная перестановка групп *СО* и *NH*,—этимизол. Установлено, что этимизол (этилнорантинфен) не только стимулирует процесс обучения, но и обладает исключительной способностью к удлинению времени сохранения выработанного навыка [1].

В настоящее время считается установленным, что в консолидации долговременной памяти необходимым этапом является активация синтеза РНК. О возможном влиянии этимизола на этот процесс свидетельствует обнаруженная ранее стимуляция включения меченого уридина в клеточные ядра под влиянием больших доз этого препарата [2] или после многократного его введения [3]. Однако особенностью эффекта этимизола на память является способность улучшать закрепление следа памяти уже после его однократного введения в дозе 1,5 мг/кг.

Задачей настоящей работы явилось исследование системы синте-

за РНК и ее чувствительности к однократному введению малой дозы этимизола в различных типах клеточных ядер мозга. В качестве объекта исследования были выбраны клеточные ядра гиппокампа, серого вещества коры больших полушарий (структур, которым отводят ведущую роль в формировании энграммы памяти), а также белого вещества больших полушарий.

### Материалы и методы

В работе использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 200—250 г. Этимизол из расчета 1,5 мг/кг массы тела вводили внутривенно за 1 ч до декапитации; контрольным крысам вводили физиологический раствор. Клеточные ядра из серого вещества коры, белого вещества больших полушарий и гиппокампа выделяли по методу Ausloker и соавт. [4]. Чистоту полученных препаратов контролировали световой микроскопией после окраски толуидиновым синим. Идентификацию ядер проводили согласно Løvtrop-Rein и McEwen [5]. Растворимый хроматин получали по методу Singh и Sung [6]. Чистые ядра дважды мягко гомогенизировали в ЭДТА-буфере (0,02 М ЭДТА, 0,08 М NaCl и 0,005 М трис-HCl, pH 5,4) с осаждением центрифугированием при 10000  $g$  в течение 10 мин, затем дважды в 0,02 М трис-HCl буфере с pH 8,0 и озвучивали 90 с на ультразвуковом дезинтеграторе «УЗДН-1-У-4-2» при 44 кГц с 20-секундными перерывами через каждые 10 с. Озвученный препарат центрифугировали при 12000  $g$  30 мин. Выход растворимого хроматина составлял около 20%. В полученных препаратах растворимого хроматина отношение белок/ДНК составляло 3,1, и величина  $A_{230}/A_{260}$  равнялась 1,3, что согласуется с литературными данными [7, 8]. О синтезе РНК судили по количеству включенного  $^3H$ -УТР в кислотонерастворимый осадок после инкубации ядер в течение 10 мин при 37°. Инкубационная среда в объеме 0,5 мл содержала (в мкмоль): трис-HCl (pH 8,0)—20; KCl—35;  $MgCl_2$ —2,5;  $MnCl_2$ —0,65; дитиотрейтол—0,5; АТР, ГТР, СТР по 0,5; 15 мкКи  $^3H$ -УТР (У. А. 22,8 Ки/моль), 0,1 мл суспензии ядер (до 20 мкг ДНК). Среда для определения матричной активности хроматина содержала дополнительно 5,05 ед. РНК-полимеразы *E. coli* (СКТГ БАВ, Новосибирск), количество  $^3H$ -УТР 5 мкКи на пробу.

Активность РНК-полимеразы определяли аналогичным способом. Среда для определения активности РНК-полимеразы I содержала 3 мкМ  $MgCl_2$ ; для РНК-полимеразы II—дополнительно содержала 0,3 М  $(NH_4)_2SO_4$ , и вместо  $MgCl_2$ —1,5 мкМ  $MnCl_2$ . По окончании реакции пробы помещали в лед, добавляя равный объем охлажденной 10%-ной ТХУ, содержащей 0,015 М  $PP_i$ -Na и 0,5%-ный раствор альбумина в качестве носителя. Осадки промывали 3 раза 5%-ной ТХУ и растворяли в 2,5%-ном КОН. Радиоактивность подсчитывали в сцинтилляционной смеси Bruy [9] на счетчике Isosar-300 («Nuclear Chicago»). При определении матричной активности хроматина ТХУ-осадок переносили на миллиметровые фильтры Syprog (диаметр пор—0,3 мкм) и промывали последовательно 15 мл 5%-ной ТХУ и 10 мл этанола. Фильтры с пробami просчитывали в стандартном толуоловом сцинтилляторе. Включение метки выражали в имп/мин/мг ДНК. ДНК-зависимость включения  $^3H$ -УТР в ядра проверяли в специальных опытах с использованием актиномицина D, тормозившего включение на 95%. Добавление в пробы панкреатической рибонуклеазы (РНКазы) также тормозило включение на 90%.

Активность РНКазы ядер определяли в условиях, оптимальных для синтеза РНК, но вместо нуклеозидтрифосфатов инкубационная среда содержала 0,2 мг высокополимерной РНК из бычьей печени («Sigma», США). Инкубацию вели 10 мин при 37°, реакцию останавливали добавлением равного объема 1N хлорной кислоты с последующим центрифугированием при 1000  $g$  10 мин. Надосадочную жидкость разводили водой и измеряли оптическую плотность при 260 нм. За единицу РНКазной активности принимали количество белка, которое вызывает изменение оптической плотности

на 1 ед. при указанных условиях определения. Ферментативную активность выражали в ед/мг белка. Содержание ДНК определяли по Burton [10], белка—по Lowry и соавт. [11]. Статистическую обработку данных производили с использованием критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Определение способности клеточных ядер головного мозга интактных животных включать  $^3\text{H}$ -УТР показало, что клеточные ядра из коры больших полушарий, выделенные из серого и белого вещества и имеющие различный морфологический состав (препараты ядер серого вещества коры содержали в среднем 70% нейрональных ядер, а белого—70—80% глиальных), отличаются по исходному уровню синтеза РНК: включение  $^3\text{H}$ -УТР в ядра серого вещества было примерно в 1,7 раз выше, чем в ядра белого вещества (табл. 1). Полученные ре-

Таблица 1

Влияние этимизола на синтез РНК в клеточных ядрах головного мозга крыс

Отделы мозга	Уровень включения $^3\text{H}$ -УТР в кислотонерастворимую фракцию ядер, имп/мг ДНК		Изменение относительно контроля, %
	Контроль	Опыт	
Серое вещество коры больших полушарий (n=9)	1179600±48392	1486600±83217	+26 p<0,01
Белое вещество больших полушарий (n=7)	711610±37784	688860±41770	-4 p>0,05
Гиппокамп (n=7)	1053700±7875	1303700±101400	+24 p<0,05

*Примечание.* Здесь и в табл. 2, 3, 4 n—число опытов. В каждом опыте использовали по 20 животных, результат опыта является усредненной величиной. Таким образом, общее количество животных равно n×20, но средняя ошибка рассчитана для величины n.

Результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о неодинаковой способности различных типов клеточных ядер мозга к синтезу РНК [4, 12]. Нельзя не отметить, что различия в уровне включения  $^3\text{H}$ -УТР в кислотонерастворимую фракцию ядер зависят не только от различного содержания нейрональных и глиальных элементов, но и от функциональных особенностей ткани, так как препараты ядер гиппокампа, содержавшие приблизительно одинаковое количество нейрональных и глиальных ядер, включали  $^3\text{H}$ -УТР с такой же интенсивностью, что и ядра серого вещества коры больших полушарий.

Через 1 ч после внутривенного введения этимизола наблюдалось увеличение интенсивности включения меченого предшественника РНК в ядра серого вещества коры и гиппокампа (на 26 и 24% соответственно) при отсутствии достоверных изменений РНК-синтезирующей активности в ядрах из белого вещества больших полушарий (снижение на 4%). Чтобы выяснить, не обусловлено ли увеличение

интенсивности включения  $^3\text{H}$ -УТР в ядра торможением распада вновь синтезированной РНК под влиянием этимизола, была определена суммарная РНКазная активность исследуемых клеточных ядер (табл. 2). Было установлено, что, если скорость распада РНК в клеточных ядрах измеряли в условиях, оптимальных для определения РНК-синтезирую-

Таблица 2

Влияние этимизола на РНКазную активность клеточных ядер головного мозга крыс

Отделы мозга	РНКазная активность $\Delta A_{260}$ мг белка · 10 мин		Изменение относитель- но контроля, %
	Контроль	Опыт	
Серое вещество коры больших полушарий (n=10)	3,0±0,11	3,5±0,31	+17 p>0,05
Белое вещество боль- ших полушарий (n=4)	5,6±0,54	4,7±0,46	-61 p>0,05
Гиншоками (n=4)	4,8±0,62	4,7±0,58	—

щей активности, однократное введение этимизола увеличивало, хотя и недостоверно, уровень РНКазной активности в ядрах из серого вещества коры (на 17%) и снижало его в ядрах из белого вещества (на 16%). Следовательно, усиление включения  $^3\text{H}$ -УТР в этих условиях было обусловлено увеличением именно скорости синтеза РНК.

Таблица 3

Влияние этимизола на РНК-полимеразную активность клеточных ядер головного мозга крыс (в имп/мин/мг ДНК)

Отделы мозга	Контроль		Опыт			
	РНК-по- лимераза I	РНК-по- лимераза II	РНК-по- лимераза I	Измене- ние отно- сительно по контро- ля, %	РНК-по- лимераза II	Измене- ние отно- сительно контроля, %
Серое вещество коры больших полушарий (n=7)	184870 ±5929	1093300 ±51614	222290 ±25716	+20 p>0,05	1248700 ±100550	+14 p>0,05
Белое вещество больших полушарий (n=7)	123780 ±8163	619110 ±40762	91876 ±7434	-26 p<0,02	560360 ±76579	-9 p>0,05
Гиншоками (n=7)	183370 ±6828	1196600 ±42045	246100 ±17305	+34 p<0,02	1680400 ±205720	+40 p<0,0 5

Далее были исследованы обе части транскрипционного комплекса: ферментативная и матричная. Сравнение активностей двух форм РНК-полимераз во всех исследуемых типах ядер показало, что у нитактных животных их соотношение было сходно с соотношением уровней общего включения  $^3\text{H}$ -УТР в ядра. Наименьшей активностью обладали РНК-полимераза I и II в препаратах ядер из белого вещества (табл. 3). Введение этимизола за 1 ч до опыта оказывало небольшое

стимулирующее влияние на ферменты серого вещества коры и существенно активировало обе формы полимераз гиппокампа, в то время как в белом веществе наблюдалось незначительное снижение активности этих ферментов.

При транскрипции хроматин, выделяемых из исследуемых ядер, экзогенной РНК-полимеразой *E. coli* у интактных животных было выявлено обратное соотношение: наибольшей матричной активностью обладал хроматин белого вещества. Этимизол изменял матричную активность хроматинов в том же направлении, что и активность полимераз, но в более выраженной степени; особенно значительно и в этом случае оказалось повышение активности хроматина гиппокампа (табл. 4).

Таблица 4

Влияние этимизола на матричную активность хроматина клеточных ядер различных отделов головного мозга крыс

Отделы мозга	Уровень включения $^3\text{H}$ -УТР нмп/мин/мг ДНК $\times 10^3$		Изменение от- носительно кон- троля, %
	Контроль	Опыт	
Серое вещество коры больших полушарий	6918 $\pm$ 574 (n=10)	9338 $\pm$ 293 (n=8)	+35 p<0,01
Белое вещество боль- ших полушарий	13475 $\pm$ 644 (n=6)	8823 $\pm$ 1906 (n=5)	-35 p=0,05
Гиппокамп	4879 $\pm$ 974 (n=7)	10899 $\pm$ 943 (n=6)	+123 p<0,01

Приведенные данные позволяют заключить, что изменение функционального состояния головного мозга в результате действия этимизола сопровождалось увеличением РНК-синтезирующей способности клеточных ядер нейронов (но не глиальных клеток). Этимизол активировал как хроматин, так и ферменты транскрипции, причем наибольшую чувствительность к нему проявляли хроматин и РНК-полимеразы гиппокампа.

В настоящее время можно рассматривать различные предполагаемые пути действия этимизола на генетический аппарат клетки. Если исходить из данных о повышении концентрации сАМР в ткани в результате введения больших доз препарата [2], можно предполагать, что этимизол, взаимодействуя с аденозинновыми рецепторами на клеточной мембране [13], активирует аденилатциклазу, что приводит к активации сАМР-зависимых протеникиназ. В таком случае влияние этимизола на функционирование ядерных структур клетки должно осуществляться опосредованно, через клеточные мембраны. Вместе с тем, при исследовании распределения меченого этимизола между цитоструктурами ткани мозга ранее нами было обнаружено, что наибольшая доля метки связывается с клеточными ядрами и с одной из фракций белков эндоплазматической сети [14]. В связи с этим представлялось интересным выяснить возможность влияния этимизола на

синтез РНК при его непосредственном контакте с ядрами в опытах *in vitro*. Результаты этих опытов, представленные на рисунке, показали, что изолированные ядра также обладают чувствительностью к этимизолу. Его влияние проявлялось в строгих концентрационных границах

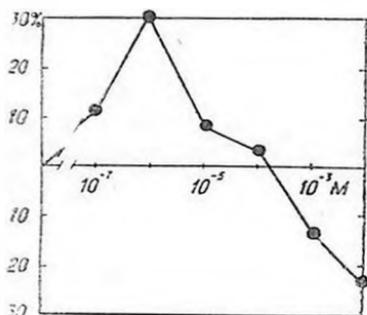


Рис. Влияние этимизола на РНК-синтезирующую активность ядер клеток серого вещества коры больших полушарий головного мозга крысы в опытах *in vitro*. По оси абсцисс—концентрация добавленного этимизола в М; по оси ординат—изменение уровня синтеза РНК в % по отношению к контролю

цах и носило двухфазный характер: этимизол в концентрациях  $10^{-7}$ — $10^{-1}$  М стимулировал синтез РНК, в концентрациях же  $10^{-1}$ — $10^{-2}$  М—ингибировал. Этот факт свидетельствует о возможности существования каких-то акцепторных участков для этимизола на самих клеточных ядрах.

Так как этимизол является структурным аналогом кофенна, можно полагать также, что его эффекты связаны с изменениями кальциевого гомеостаза клеточных ядер. Предварительные данные, полученные нами, указывают на изменение чувствительности хроматина к  $Ca^{2+}$  после введения этимизола. По-видимому, влияние этимизола на внутриклеточные процессы, как и влияние других метилксантинов, реализуется через систему кальций—циклические нуклеотиды, однако конкретные пути его действия подлежат выяснению.

## RNA SYNTHESIS IN THE DIFFERENT BRAIN CELL NUCLEI IN AETHIMIZOL TREATED ANIMALS

KULIKOVA O. G., BELYAVTSEVA L. M., RAZUMOVSKAYA N. I.,  
BORODKIN Yu. S.

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Leningrad

The RNA synthesizing system in the cellular nuclei of rat hippocampus, cerebral cortex and cerebral hemispheres white matter was studied. The injection of aethimizol results in 1 h in an increase of both template activity chromatin and activity of RNA polymerase I and II in the nuclei of hippocampus and cerebral cortex. *In vitro* aethimizol ( $10^{-7}$  M— $10^{-1}$  M) stimulates RNA synthesis in isolated nuclei while in concentration of  $10^{-1}$ — $10^{-2}$  M inhibits it. It is supposed that the aethimizol effects are related to the metabolism of calcium and cyclic nucleotides.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Бородкин Ю. С., Зайцев Ю. В.*—В кн.: Нейрохимические и функциональные основы долговременной памяти. с. 141—184. Л., Медицина, 1982.
2. *Заводская И. С., Мигас Э. А., Новиков В. П.* Фармакология и токсикология, т. 45, № 2, с. 5—9, 1982.
3. *Дамбинова С. А., Шабанов П. Д.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 81, с. 306—307, 1981.
4. *Austoker J., Cox D., Mathias A. P.* Biochem. J., v. 129, p. 1139—1155, 1972.
5. *Löwtrup-Rein H., McEwen B. J.* Cell Biol., v. 30, p. 405—415, 1966.
6. *Singh V. K., Sung S. C.* Biochem. J., v. 130, p. 1095—1099, 1972.
7. *Грумбкова Л. О., Бохонько Л. П.* Биохимия, т. 45, с. 1146—1150, 1980.
8. *Миронов Н. М., Лобансков В. В., Шапог В. С.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 89, с. 164—165, 1980.
9. *Dyer A.* An Introduction to Liquid Scintillation Counting, p. 29—31, (London; Heyden) 1974.
10. *Burton K.* Biochem. J., v. 62, p. 315—323, 1956.
11. *Lowry O. H., Rosebrough J. N., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
12. *Джохадзе Д. И.* Биохимические особенности клеточных ядер различных тканей, с. 1—176, Тбилиси, Мецниереба, 1977.
13. *Мигас Э. А.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, с. 70—71, 1982.
14. *Разумовская Н. И., Лапина И. А., Белянцева Л. М., Куликова О. Г., Матисева И. М., Лосев Н. А., Бородкин Ю. С.*—В кн.: Тезисы Всесоюзн. симп. «Механизмы временной организации клетки и их регуляция на различных уровнях», с. 36, Пушкино, 1983.

Поступила 16. V 1984