



## СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ РНК В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПИРИМИДИНОВЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕОЗИДОВ

ХАЧАТРЯН Г. С., ГАЛСТЯН Г. Г., АНТОНЯН А. А., АЛАВЕРДЯН А. А.,  
ХАЧАТРЯН В. Г., МИНАСЯНЦ Р. Т., ВАГРАДЯН А. Г., АДАМЯН М. Х.

Филиал ВНИИГИНТОКСа, Ереван

Изучено действие внутрицистернально введенных пириимидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов на генную экспрессию клеток головного мозга. Установлено значительное увеличение содержания я-РНК AU типа (пре-м-РНК), р-РНК и т-РНК в клетках мозга на 30- и 60-й дни после введения сСМР, сUMP, цитидина и уридина в концентрации 50 и 100 мкг/200 г массы животного соответственно. Эффект сСМР и цитидина оказался более значимым. Точкой приложения пириимидиновых циклических нуклеотидов оказались как нейроны, так и глиоциты. Однако активность синтеза исследуемых нуклеиновых кислот, а следовательно, и содержание различных форм РНК (в пг/клетку) в нейронах значительно выше, чем в глиоцитах. Показана однонаправленность действия сСМР и цитидина, а также сUMP и уридина на нуклеиновый обмен. Кроме подтверждения важной биологической роли фосфодиэфирной структуры циклических нуклеотидов в генной экспрессии, допускается возможность существования идентичных или близких механизмов в действии сСМР, сUMP и их соответствующих нуклеозидов при связывании ими соответствующих рецепторов или вовлечении в метаболические пути своими пириимидиновыми конфигурациями. Выдвинута идея о возможном образовании пириимидиновых циклических нуклеотидов в живой клетке и существовании циклоцитидилат- и циклоуридилатчувствительной транскрипции.

Изучению механизмов синтеза и формирования различных классов РНК в клетках млекопитающих посвящен ряд работ [1—4], однако регуляторные механизмы биогенеза нуклеиновых кислот остаются недостаточно изученными. Головной мозг высших животных высокодифференцирован, нервные клетки не реплицируются после рождения [5]. Продолжительность жизни мозговой р-РНК колеблется в пределах 6—15 дней, что в два раза больше, чем в других тканях. Скорость синтеза предшественников РНК и их формирование, активность РНК-полимеразы, ядерно-цитоплазматический транспорт рибосом в мозгу значительно ниже, чем в печени [6], но, несмотря на эти особенности, зрелый мозг характеризуется относительной интенсивностью метаболизма РНК и белков [1, 7]. Функциональное состояние ЦНС базируется на рецеп-

торных перестройках и внутриклеточной медиации сигналов информации, в которых участвуют нейрогормоны, нейромедиаторы, пептиды, нуклеозиды, циклические нуклеотиды и другие соединения. За последние годы опубликован ряд работ о биологической роли пуриновых циклических нуклеотидов в генной экспрессии, контроле роста и пролиферации клеток [1, 4, 8, 9], об участии нейромедиаторов в индукции биосинтеза и регуляции уровней сАМР и сGMP посредством специфических циклаз и фосфодиэстераз в различных структурах мозга и других тканей. В клетках животных кроме пуриновых циклических нуклеотидов найден и идентифицирован пиримидиновый циклический нуклеотид 3',5'-сМР [10], функция которого не выяснена. Не изучен вопрос о наличии в клетках и биологической роли сUMP, сTMP. Недостаточно исследована функция пиримидиновых нуклеозидов в механизме генной экспрессии.

Нами установлено стимулирование биосинтеза различных форм РНК в головном мозгу при внутрицистернальном введении пуриновых циклических нуклеотидов [3, 4]. В частности, показано, что 3',5'-АМР стимулирует, в основном, биосинтез р-РНК и т-РНК, а 3',5'-GMP индуцирует синтез ядерной РНК АУ типа (пре-м-РНК). 2',3'-АМР, как правило, выступает в качестве ингибитора биосинтеза всех форм РНК мозга. Характеристика различных форм РНК при действии пуриновых и пиримидиновых циклических нуклеотидов по критериям содержания ДНК, увеличения метки с применением [<sup>14</sup>C] UMP в РНК-синтезирующей системе дана в нашей предыдущей публикации [11]. Для выяснения роли пиримидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов в генной экспрессии клеток головного мозга в данной работе мы изучали содержание различных форм РНК в целом мозгу, нейронах и глиоцитах при действии экзогенно введенных сСМР, сUMP, цитидина и уридина.

### Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Первая серия экспериментов служила в качестве контроля. Животным других серий опытов внутрицистернально вводили сАМР, сUMP, цитидин и уридин («Sigma», США), соответственно в концентрации 50 и 100 мкг/200 г массы животного. Концентрацию вводимых доз применяемых нами активных веществ определяли экспериментальным путем. Через 30 и 60 мин после введения соответствующих доз нуклеотидов или нуклеозидов животных подвергали замораживанию в жидком азоте. В холодильной комнате при 0° у замороженных крыс извлекали головной мозг, отделяли его от оболочек, крупных сосудов, гипофиза и нижележащих отделов. Коровое вещество большого мозга оставляли в холодильной комнате на 1 ч до повышения температуры до 2° и гомогенизировали в 0,25 М сахарозе в течение 2 мин в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенат использовали для выделения я-РНК АУ и GC типов, р-РНК и т-РНК. Выделение, очистку и количествен-

ное определение различных форм РНК проводили разработанным нами комбинированным методом фенольной экстракции, дифференциальной ультрацентрифугации и гель-фильтрации без предварительного гидролиза с последующей ультрафиолетовой спектроскопией и идентификацией полученных РНК с чистыми РНК («Sigma», США) [4]. Содержание РНК выражали в мкг/г свежей мозговой ткани.

**Ядерная РНК.** Изолированные при центрифугировании гомогената при 600 g ядра суспендировали в 10 объемах 0,5 М трис-буфера, рН 7,6, содержащего 0,003 М  $\text{CaCl}_2$ , и перемешивали на мешалке в течение 3 мин при 600 g. Полученную суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g. ДНК из осадка удаляли смешиванием с 20 объемами 1 М раствора  $\text{NaCl}$ . Для разрушения образующегося геля смесь интенсивно встряхивали и экстрагировали в течение 16 ч при 2°. Полученный вязкий раствор центрифугировали 15 мин при 40000 g на центрифуге «Spinco L-2-65K», осадок суспендировали в 10 объемах 0,05 М фосфатного буфера (рН 6,85), добавляли равный объем 90%-ного фенола, смесь встряхивали в течение 60 мин при комнатной температуре и центрифугировали 30 мин при 1000 g и 2°. В результате образовывалось четыре слоя: водный (РНК+полисахариды), промежуточный (нерастворимые белки), фенольный и осадок (белки+ДНК). В верхнем водном слое находилась я-РНК GC типа. Этот слой отсасывали, а фенольный и промежуточный промывали равным объемом 0,05 М фосфатного буфера, рН 6,85 и центрифугировали 20 мин при 2000 g. Надосадочную жидкость собирали, объединяли с водным слоем и доводили до конечной 2%-ной концентрации.

**Получение я-РНК GC типа.** я-РНК GC типа осаждали 2 объемами холодного 96° этанола. Осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 2000 g и 2°, растворяли в дистиллированной воде и я-РНК GC типа осаждали в водной фазе 2 объемами холодного 96%-ного этанола. После центрифугирования (2000 g, 20 мин, 2°) осадок растворяли в 20 мл дистиллированной воды и наносили на колонку с сефадексом G-200. Для выделения всех форм РНК использовали колонку размерами 18×180 мм с холодильной рубашкой, которую уравнивали трис-НСI буфером, рН 7,02. После нанесения соответствующего раствора РНК проводили элюцию тем же 0,05 М трис-НСI буфером, рН 7,02, со скоростью 30—35 мл/ч и собирали элюаты по 3,5 мл.

**Получение я-РНК AU типа.** Объединенные (фенольная и промежуточная) фазы обрабатывали 5 объемами смеси этанол-эфир (4:1) и центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g и 2°. После повторного центрифугирования к осадку добавляли 10 объемов дистиллированной воды и встряхивали на мешалке в течение 60 мин при комнатной температуре. Полученный экстракт центрифугировали 30 мин и к надосадочной жидкости приливали равный объем 90%-ного фенола и вновь встряхивали в течение 60 мин. После 30-минутного центрифугирования получали четыре слоя. Верхний водный слой, в котором находилась я-РНК AU типа, отсасывали и к нему добавляли калий-ацетат до конечной

2%-ной концентрации.  $\gamma$ -РНК АС типа осаждали добавлением 2 объемов холодного 96%-ного этанола. Центрифугировали в течение 20 мин при 1000 г и 2°. Осадок растворяли в дистиллированной воде и наносили на колонку с сефадексом G-200.

**Рибосомная РНК.** Надосадочную жидкость, содержащую микросомы, центрифугировали на ультрацентрифуге «Spinco L-2-65 K» (ротор 65 г) в течение 60 мин при 2° и 105000 г. Осадок, содержащий микросомы и рибосомы, суспендировали в 3 мл 0,25 М сахарозы и центрифугировали на той же центрифуге в течение 60 мин при 105000 г и 2°. Надосадочную жидкость и промывные воды, содержащие т-РНК, использовали для определения количества т-РНК, а осадок, содержащий микросомы и рибосомы, суспендировали в среде «А», содержащей 17,1 г сахарозы, 25 мл 0,2 М трис, 3,5 мл HCl, конечный pH 7,6; 5 мл 1 М HCl и 10 мл 0,1 М MgCl<sub>2</sub>. Перед применением в среду «А» добавляли 33 мл 3%-ного ДОХ-На и объем смеси доводили дистиллированной водой до 100 мл. Полученную суспензию центрифугировали в течение 45 мин при 2° и 105000 г. К осадку добавляли среду «В» для промывания рибосом следующего состава: 11,7 г сахарозы, 25 мл 0,2 М трис, 3,5 мл 1 М HCl, 0,125 мл 1 М KCl, 0,4 мл 0,1 М MgCl<sub>2</sub>; объем воды доводили до 100 мл. Для депротенинизации полученного осадка применяли смесь фенол-версен (90%-ный фенол и 10<sup>-2</sup> М версен) в соотношении 1:1 из расчета 380 мл фенол-версена/4,0 г сырой мозговой ткани. К осадку (рибосомы) добавляли 10 мл смеси фенол-версен и суспендировали в течение 60 с в гомогенизаторе. Всю смесь переносили в колбу Эрленмейера, куда добавляли 1 М бензоат натрия (pH 8,0) до конечной концентрации 0,2 М. Полученную суспензию встряхивали на магнитной мешалке в течение 30 мин при 20°, добавляли хлороформ в соотношении 100:5 и снова встряхивали в течение 30 мин при 20°. Добавление хлороформа способствовало лучшему отделению белков. Полученную суспензию центрифугировали при 2000 г в течение 10 мин при 2°. В результате образовывалось три слоя. В верхнем водном слое находились  $\rho$ -РНК и полисахариды. Большая часть белков растворялась в фенольном слое, часть белков оставалась на границе водной и фенольной фаз (промежуточный слой). Осторожно, не смешивая слои, верхний слой переносили в колбу Эрленмейера и к нему добавляли 90%-ный фенол в соотношении 1:1. Снова встряхивали в течение 20 мин при 20° на мешалке. К суспензии добавляли хлороформ в соотношении 100:5 и встряхивали в течение 20 мин при 20°. Центрифугировали при 2000 г в течение 10 мин при 2°. Последнюю процедуру повторяли трижды.  $\rho$ -РНК осаждали добавлением к верхнему водному слою 3 объемов 96%-ного этанола при -6°, 20%-ного уксуснокислого калия (в соотношении 1:10) и 10%-ного NaCl в тех же пропорциях и оставляли на холоде при -2°, несколько раз помешивая стеклянной палочкой. Затем центрифугировали при 2000 г и 2° в течение 15 мин. Осадок, содержащий  $\rho$ -РНК, растворяли в 40 мл дистиллированной воды. 10 мл этого раствора наносили на колонку с сефадексом G-200.

*Транспортная РНК.* Надосадочная фракция при 105000 g содержала исключительно т-РНК и ее депротенинизация позволяла получить очищенную РНК. К надосадочной фракции добавляли разный объем 90%-ного фенола, встряхивали в течение 60 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 2500 g в течение 25 мин. В результате образовывалось три слоя. Осторожно, не смешивая слои, верхний водный слой, в котором находилась растворенная т-РНК, отсасывали и к нему добавляли 90%-ный фенол в соотношении 1:1. Вновь встряхивали на мешалке 20 мин, добавляли хлороформ из расчета 5 мл на каждые 100 мл суспензии и встряхивание продолжали еще в течение 20 мин. После центрифугирования при 2500 g в течение 20 мин при 2° верхний слой отсасывали, к нему добавляли 1/10 объема 20%-ного уксуснокислого калия и т-РНК осаждали 2,5 объема холодного 96° этанола. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 10 мл дистиллированной воды и наносили на колонку с сефадексом G-200.

*Выделение нейронов и глиоцитов.* Обогащенные фракции нейронов и глии выделяли по методу Blomstrand, Hamberger [12] и Henn [13]. Все процедуры выполняли в холодных условиях. Измельченную ткань коры головного мозга суспендировали в 15 мл среды, содержащей 7,5% поливинилпирролидона, 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, и разрушали протягиванием через тефлоновый шприц (объем 10 мл), конец которого был закрыт нейлоновым ситом (размер пор 1000 мкм). Разрушенную мозговую ткань суспендировали в 35—40 мл среды, содержащей 0,3 М сахарозу, 10 мМ трис-НСI буфер, рН 7,4, 1 мМ ЭДТА, 2%-ный фиколл и 1%-ный БСА. Суспензию клеток последовательно без давления пропускали через нейлоновые сита с уменьшающимися размерами пор (1000, 110, 75, 50 мкм и двойной слой 50 мкм нейлонового сита). Конечную взвесь центрифугировали при 150 g в течение 5 мин и осадок суспендировали в 30%-ном растворе фиколла (конечная концентрация 20%). В 35 мл пробирках последовательно наслаивали 5 мл 40%-ной сахарозы, 5 мл 30%-ного фиколла, 15 мл клеточной суспензии, 5 мл 15%-ного фиколла и, наконец, 5 мл 10%-ного фиколла, изготовленные в 1%-ном растворе БСА. Клетки разделяли центрифугированием при 54000 g 120 мин в роторе SW 28 на центрифуге «Вескмап L-2-65 К». Нейроны и глиоциты собирали пастеровской пипеткой и промывали 0,32 М сахарозой, содержащей 10 мМ трис-НСI буфер, рН 7,4 и 1 мМ CaCl<sub>2</sub>.

*Чистоту изолированных клеточных фракций* определяли фазоконтрастной микроскопией при увеличении в 400—1000 раз. Исследовали также препараты, окрашенные 0,1%-ным раствором метиленовой сини. Морфологическую целостность клеток определяли электронномикроскопическим исследованием.

*Количество клеток* в единице объема измеряли путем подсчета окрашенных ядер в камере Горяева. Число ядер определяли в нескольких последовательных разведениях и выводили среднюю величину.

## Результаты и обсуждение

Как показывают данные табл. 1, действие пиримидиновых циклических нуклеотидов приводит к значительным сдвигам в содержании исследуемых форм РНК в мозгу как на 30-й, так и на 60-й дни после их введения. Оба циклических нуклеотида (сСМР и сУМР) вызывают достоверное повышение содержания р-РНК, т-РНК и я-РНК АУ типа в мозгу во все сроки исследования. При этом сСМР выступает в качестве мощного стимулятора активности генетического аппарата нервных клеток и вызывает значительное повышение содержания всех изученных форм РНК. Особо следует отметить факт стимуляции биосинтеза я-РНК АУ типа и р-РНК под действием сСМР. Содержание этих форм РНК на 30- и 60-й дни исследования по сравнению с контролем повышается соответственно на 40 и 57% и 37 и 45%. Значительное повышение содержания т-РНК отмечается и при действии сУМР, которое составляет 35 и 46% по сравнению с контролем соответственно в указанные сроки исследования. При этом достоверно повышается и содержание р-РНК и я-РНК АУ типа.

В отличие от сСМР сУМР понижает содержание я-РНК GC типа на 30-й дни исследования и достоверно повышает ее содержание на 60-й дни эксперимента. Известно, что я-РНК GC типа является предшественником р-РНК. В наших экспериментах уровень р-РНК исключительно высок при действии сСМР и сУМР ( $1772.70 \pm 14.97$  и  $1611.34 \pm 14.27$  мкг/г соответственно), а уровень я-РНК GC типа при этом значительно ниже.

Данное явление, по-видимому, объясняется тем, что исследуемые циклические нуклеотиды, кроме стимуляции биосинтеза указанной РНК, которая в дальнейшем определяется в составе р-РНК, способствуют ее транспорту из ядра в цитоплазму и уменьшению ее ядерного пула.

Arisawa и соавт. [14] изучали эффект сСМР в переднем гипофизе в опытах *in vitro*. Было показано, что гипофизарное содержание сСМР по сравнению с другими органами значительно меньше, при стимуляции препаратом LH-RF оно не меняется, тогда как сАМР увеличивается. Это дало основание полагать, что сСМР метаболически инертен и менее активен. В противовес этому Helfman, Kuo [15] обнаружили способность гомогенной сСМР-фосфодиэстеразы из печени свиньи катализировать гидролиз как пиримидиновых, так и пуриновых циклических 2',3'- и 3',5'-нуклеотидов. При этом выявлен следующий ряд скорости гидролиза 2',3'-нуклеотидов: сСМР (100), сУМР (46), сGMP (28), сАМР (2) и циклических 3',5'-нуклеотидов—сАМР (25), сGMP (19) соответственно. Все циклические 2',3'-нуклеотиды оказались конкурентными ингибиторами гидролиза 3',5'-СМР. Авторы допускают, что в гидролизе пиримидиновых и пуриновых циклических 2',3'- и 3',5'-нуклеотидов принимает участие единый центр каталитического участка сСМР-фосфодиэстеразы и данный фермент является первой и уникальной мультифункциональной фосфодиэстеразой, способной гидролизовать различные и несходные по своей структуре циклические нуклеотиды.

Полученные нами данные относительно стимуляции биосинтеза различных форм РНК в нервной ткани под действием сСМР и сУМР могли быть интерпретированы как результат непосредственного действия этих внутриклеточных медиаторов, способных индуцировать генетический аппарат посредством их вовлечения в соответствующие рецепторы своей фосфодиэфирной конфигурацией, или их коферментной активностью в процессе фосфорилирования соответствующих РНК-полимераз [4]. Кроме того, существует возможность их участия в биосинтезе цитидиловых и уридилловых полифосфатов с последующим их вовлечением в биосинтез РНК. При этом не исключается и роль пиримидинового участка структуры испытанных циклических нуклеотидов в индукции генетического аппарата. Для решения последнего вопроса в другой серии опытов мы изучали непосредственное действие пиримидиновых нуклеозидов—цитидина и уридина на процессы геной экспрессии нервных клеток.

Из приведенных данных (табл. 2) видно, что внутрицистернально введенные цитидин и уридин, в основном, оказывают аналогичное с пиримидиновыми циклическими нуклеотидами действие на обмен нуклеиновых кислот. Содержание р-РНК, т-РНК и я-РНК АУ типа значительно повышается во все сроки исследования. Сдвиги в содержании этих нуклеиновых кислот при действии цитидина оказались более выраженными. Изменение в содержании различных классов РНК при действии уридина, за исключением я-РНК GC типа, оказалось также значимым. В отличие от сСМР и сУМР их соответствующие нуклеозиды вызвали понижение содержания я-РНК GC типа. Данное понижение оказалось более выраженным при действии уридина. Подобный эффект в отношении я-РНК GC типа наблюдался и при действии сУМР на 30-ой мин исследования.

Анализ полученных однонаправленных сдвигов в нуклеиновом обмене при действии сСМР и цитидина, с одной стороны, сУМР и уридина—с другой, указывает на возможность существования идентичных механизмов действия пиримидиновых циклических нуклеотидов и соответствующих нуклеозидов на геноую экспрессию. По-видимому, как циклические нуклеотиды, так и нуклеозиды занимают одни и те же рецепторы своими пиримидиновыми компонентами. Кроме того, не исключена возможность действия этих нуклеозидов в качестве нейротрансмиттеров в индукции биосинтеза сСМР и сУМР и проявления их эффекта на нуклеиновый обмен посредством увеличения их концентрации в нервной ткани.

В пользу нашего предположения о возможном участии цитидина и сСМР в индукции биосинтеза нуклеиновых кислот свидетельствуют некоторые данные литературы по ингибиторному анализу. Показано, что арабинозилцитозин ингибирует полуконсервативный синтез ДНК [16, 17], возможно, включаясь в цепь ДНК и оказывая ингибирующее влияние на процессы терминации, либо на конформационные изменения спиральной структуры ДНК [17].

Таблица 1  
Содержание различных классов РНК в мозгу при действии пиримидиновых  
цианосетических нуклеотидов в мкг/г ткани

Класс РНК	Контроль	сСМР		сУМР	
		30 мин	60 мин	30 мин	60 мин
p-РНК	1232, 10 ± 12, 80	1668, 6 ± 26, 1*	1772, 70 ± 14, 97*	1560, 30 ± 20, 80*	1611, 34 ± 14, 27*
t-РНК	284, 60 ± 5, 79	351, 38 ± 4, 60*	382, 56 ± 6, 32*	380, 38 ± 6, 97*	415, 84 ± 6, 21*
r-РНК GC типа	53, 69 ± 2, 51	60, 32 ± 2, 76	81, 08 ± 4, 02	41, 38 ± 2, 20*	76, 90 ± 3, 40*
r-РНК AU типа	272, 96 ± 8, 40	350, 28 ± 6, 54*	425, 26 ± 7, 42*	290, 44 ± 5, 38	320, 16 ± 5, 26
Общая РНК	1843, 35	2450, 48	2664, 58	2337, 40	2424, 24

Примечание: \* p < 0,001.

Таблица 2  
Содержание различных классов РНК в мозгу при действии инримидиновых  
нуклеозидов в мкг/г ткани

Класс РНК	Контроль	Цитидин		Уридин	
		30 мин	60 мин	30 мин	60 мин
p-РНК	1262, 33 ± 9, 75	1618, 28 ± 13, 91*	1690, 04 ± 26, 73*	1473, 08 ± 13, 09**	1521, 78 ± 13, 54*
t-РНК	294, 92 ± 8, 29	426, 18 ± 9, 97*	462, 78 ± 6, 41*	346, 04 ± 4, 51**	437, 64 ± 5, 29*
r-РНК GC типа	73, 10 ± 3, 89	61, 38 ± 3, 81**	58, 42 ± 2, 77*	38, 52 ± 1, 98*	42, 90 ± 2, 07*
r-РНК AU типа	295, 66 ± 7, 57	551, 36 ± 8, 03*	582, 50 ± 7, 64*	425, 8 ± 6, 0*	454, 54 ± 7, 98*
Общая РНК	1926, 01	2660, 20	2793, 74	2283, 40	2466, 86

Примечание: \* p < 0,001, \*\* p < 0,01

Введенный в организм цитидин, кроме стимуляции активности генетического аппарата в качестве биологически активного вещества, может подвергаться фосфорилированию и переходу в дезоксицитидинфосфат. Показано, что после внутривентрикулярного введения [ $^3\text{H}$ ] цитидина [ $^3\text{H}$ ] дезоксицитидин быстро исчезает из СМЖ и частично из мозга, где около 65% [ $^3\text{H}$ ] дезоксицитидина переходит в [ $^3\text{H}$ ] дезоксицитидинфосфат [18]. Дезоксицитидиннуклеотиды образуются из цитидина рибонуклеотидредуктазой или транспортируется из крови в ЦСЖ и мозг специальной глубокой транспортной системой через спинальное сплетение [19]. После гомогенизации и субклеточного фракционирования мозговых срезов и инкубации с [ $^3\text{H}$ ] дезоксицитидином в течение 30 мин увеличивается процентное соотношение [ $^3\text{H}$ ] дезоксицитидинфосфатов и [ $^3\text{H}$ ] ДНК, которые присутствуют в ядерной и митохондриальной фракциях всех отделов мозга.

На основании приведенных литературных и полученных нами данных по значительной индукции биосинтеза различных классов РНК, в особенности я-РНК АУ типа и р-РНК, можно сделать вывод о возможности непосредственного участия цитидина и сСМР в процессах синтеза ДНК, в активации цитидинкиназы, ДНК-полимеразы, в механизмах терминации и конформационных изменений ДНК в процессе транскрипции и синтеза различных классов РНК в нервной ткани.

Изучение метаболизма уридина в сетчатке золотистых рыб при повреждении оптического нерва выявило увеличение захвата уридина и аденозина сетчаткой, мечення р-РНК и содержания РНК [20]. Повышение накопления радиоактивности и увеличение захвата уридина из экстрацеллюлярной среды или усиление метаболической ловушки можно было бы объяснить внутриклеточным фосфорилированием уридина. С помощью 5'-дезоксаденозина показано, что нуклеозиды внутри клетки не фосфорилируются [21] и их поглощение одинаково для нормальной и поврежденной сетчатки. Биохимическая характеристика механизмов индукции биосинтеза РНК по результатам усиления метаболизма уридина в сетчатке при повреждении зрительного нерва могла бы иметь прямое отношение к природе инициации процессов нервной регенерации.

Для изучения процессов индукции генетического аппарата представляет определенный интерес также состояние активности тимидинкиназы в качестве маркера клеточной пролиферации и определяемой тотальной активности ферментов, обеспечивающих внедрение тимидина в ДНК [22]. Ашапкин и соавт. [23] показали усиление внедрения [ $^3\text{H}$ ] тимидина в ДНК коры мозга крыс при активном условном рефлексе избегания по сравнению с активным контролем.

В свете полученных по нуклеиновому обмену данных при действии пиримидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов представляло особый интерес изучение содержания различных форм РНК в нейронах и глиоцитах. Для сохранения функции генома необходимы репаративные процессы, которые могли бы обеспечить функциональную целостность ДНК нейронов и направлены на синтез необходимых форм

Содержание различных классов РНК в нейронах и ганглионгах головного мозга  
(в мкг/г и нг/капсула) при дегенерации пирамидальных цитоксических нуклеотидов

Класс РНК	Виды клеток	Контроль		сСМР		сУМР	
		мкг/г	нг/капсула	мкг/г	нг/капсула	мкг/г	нг/капсула
р-РНК	нейрон	548,50±5,93	34,90±0,26	680,50±14,42*	43,66±0,02*	622,80±2,16*	39,50±0,02*
	глия	654,25±8,85	11,30±0,20	764,13±4,65	13,26±0,02	735,25±3,28	12,70±0,02
т-РНК	нейрон	108,13±1,74	6,05±0,07	196,80±3,23*	11,01±0,03*	136,02±1,08	7,70±0,002*
	глия	132,28±2,06	3,02±0,02	125,25±2,47	2,85±0,02	123,0±1,89	2,81±0,02
р-РНК GC-типа	нейрон	30,22±0,79	2,40±0,014	31,33±0,35	2,47±0,013	28,17±0,14	2,23±0,01
	глия	23,52±0,56	0,80±0,01	38,28±0,09*	1,72±0,01*	37,26±0,21	1,26±0,01
р-РНК AU-типа	нейрон	102,12±2,91	6,02±0,16	256,34±3,94	15,11±0,05*	222,96±0,70	11,45±0,20*
	глия	135,73±3,98	2,88±0,06	273,67±4,20*	5,88±0,03*	313,20±7,13*	6,64±0,12*
Общая РНК	нейрон	789,97	49,37	1164,97	72,25	1019,93	60,68
	глия	945,78	18,00	1201,33	23,71	1208,71	23,41
Сумма всех форм РНК		1734,75	67,37	2366,30	95,96	2218,64	84,09

Примечание. \* достоверно по отношению к контролю.

РНК, нейроспецифических белков, ферментов и других веществ, хотя нейроны в мозгу зрелых животных незаменимы и неспособны к редупликации ядерной ДНК, связанной с митозом и образованием новых клеток. В экспериментах с внутрицистернальным введением сСМР и сUMP была выявлена интересная закономерность в распределении и количественных сдвигах различных форм РНК в нейронах и глиоцитах.

Как показывают данные табл. 3, содержание всех форм РНК в контрольных опытах в расчете на 1 г мозговой ткани в глиоцитах больше, чем в нейронах. При этом содержание р-РНК, т-РНК, я-РНК, АУ типа в глиоцитах составляет  $654,25 \pm 8,85$ ;  $132,28 \pm 2,06$ ;  $135,73 \pm 3,98$  мкг/г против  $548,50 \pm 5,93$ ;  $108,13 \pm 1,74$ ;  $102,12 \pm 2,91$  мкг/г соответственно в нейронах. Однако при расчете содержания исследуемых форм РНК на 1 клетку обнаруживается противоположная картина в количественной характеристике изученных форм РНК. В расчете на 1 клетку содержание р-РНК, т-РНК и я-РНК ГС и АУ типов оказалось в 2—3 раза больше в нейронах, чем в глиоцитах. Оно в нейронах соответственно составляет  $34,90 \pm 0,26$ ;  $6,05 \pm 0,07$ ,  $2,40 \pm 0,014$ ;  $6,02 \pm 0,16$  пг/г клетка против  $11,30 \pm 0,20$ ;  $3,02 \pm 0,02$ ;  $0,80 \pm 0,01$  и  $2,88 \pm 0,06$  пг/клетка в глии. Таким образом, в норме содержание различных форм РНК в нейронах значительно больше, чем в глиоцитах, что, по-видимому, связано со специфической функцией генетического аппарата нейронов.

После установления контрольного фона содержания исследуемых форм РНК в нейронах и глиоцитах было испытано действие сСМР и сUMP, при этом выявлена однонаправленность в их действии на нуклеиновый обмен как в целом мозгу, так и в нейронах и глиоцитах с характерными особенностями. Как и в контрольных опытах, при действии сСМР и сUMP содержание различных форм РНК в расчете на мкг/г ткани в глиоцитах было больше, чем в нейронах, однако при пересчете на 1 клетку содержание всех форм РНК в нейронах по сравнению с контролем увеличилось почти в два раза. Хотя точкой приложения циклических нуклеотидов оказались как нейроны, так и глиоциты, была выявлена значительная разница в индукции биосинтеза РНК в указанных клеточных структурах. Активность синтеза нуклеиновых кислот в нейронах оказалась значительно интенсивней. Из данных табл. 3 видно, что содержание р-РНК, т-РНК я-РНК АУ типа в нейронах при действии сСМР соответственно составляют  $43,66 \pm 0,002$ ;  $11,01 \pm 0,03$  и  $15,11 \pm 0,05$  пг/клетка, а в глии  $13,26 \pm 0,02$ ;  $2,85 \pm 0,02$  и  $5,88 \pm 0,03$  пг/клетка. Аналогичная закономерность отмечается и при действии сUMP. При этом содержание р-РНК, т-РНК и я-РНК АУ типа в нейронах составляет  $39,60 \pm 0,02$ ;  $7,700 \pm 0,002$ ;  $11,45 \pm 0,20$ , а в глиоцитах  $12,70 \pm 0,02$  и  $6,64 \pm 0,02$  пг. Хотя повышение содержания различных форм РНК в нейронах при действии сUMP также было достоверным, уровни исследуемых РНК колебались на сравнительно низких цифрах, чем при действии сСМР. Содержание т-РНК почти не изменялось или даже несколько понижалось в глиоцитах при действии

cCMP и cUMP. В отношении содержания я-РНК GC типа в нейронах и глиоцитах была выявлена противоположная картина. В нейронах почти не отмечалось повышения его содержания, в то время как в глиоцитах оно имело место.

Таким образом, экзогенно введенные cCMP и cUMP оказались мощными стимуляторами биосинтеза р-РНК, т-РНК, я-РНК AU типа. Причем эффект применяемых циклических нуклеотидов в нейронах значительно больше, чем в глиоцитах. Интенсивность обмена РНК в нейронах ядер шва мозга крыс по сравнению с глиоцитами в условиях лишения сна показана и другими авторами [24].

На основании полученных нами и литературных данных можно заключить, что не исключается возможность образования в живой клетке пиримидиновых циклических нуклеотидов; подтверждается их важная роль в генной экспрессии и других биохимических механизмах при экзогенном их введении. Какова интенсивность образования cCMP, cUMP и, возможно, cTMP посредством своих специфических циклаз, если таковые имеются, метаболизируются ли они через соответствующие фосфодиэстеразы, каким изменениям подвергаются их уровни в нервной клетке при стимуляции различных рецепторов и выделении соответствующих нейротрансмитторов?—изучение этих вопросов, являющихся важнейшими аспектами современной молекулярной биологии и функциональной нейрохимии, станет задачей специального рассмотрения.

## THE EFFECT OF PYRIMIDINE-CONTAINING CYCLIC NUCLEOTIDES ON THE CONTENT OF VARIOUS TYPES OF BRAIN RNA

KNACHATRIAN G. S., GALSTIAN H. G., ANTONIAN A. A., ALAVERDIAN A. A.,  
KNACHATRIAN V. G., MINASIAN R. T., VAHRADIAN H. G.,  
ADAMIAN M. K.

An affiliate of VNIIGINTOX, Yerevan

The effect of intracysternally injected pyrimidine-containing cyclic nucleotides and nucleosides on the gene expression in brain cells has been studied. A significant increase in the content of nRNA AU type (pre-mRNA), r-RNA and t-RNA in brain cells 30 and 60 min after injection of cGMP, cUMP, cytidine and uridine in concn. of 50 and 100 mcg/200 g b. w. respectively has been established. The effect of cCMP and cytidine was more significant. Pyrimidine-containing cyclic nucleotides injected affect both neurons and glial cells. However, the activity of nucleic acids synthesis and therefore the content of various forms of RNA (pg/cell) in neurons was greater than in glial cells. The effect of cCMP and cytidine, on one hand and of cUMP and uridine on the other hand on nucleic acid metabolism has been established. Besides the confirmation of a significant biological role of

phosphodiether structure of cyclic nucleotides in gene expression, a possibility of the existence of identical or similar mechanisms of action of cCMP, cUMP and corresponding nucleosides in the occupation of the corresponding receptors or involvement in the metabolic pathways with their pyrimidine moieties is supposed.

An idea about a possible biogenesis of pyrimidine-containing cyclic nucleotides in the living cell and existence of cyclocytidilate and cyclouridilate-sensitive transcription is put forward.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Perry R. P. *Annu. Rev.*, v. 45, p. 605—630, 1976.
2. Hadjalov A. A.—In *subcell. Biochem.* (ed. O. B. Roodyn), v. 7, p. 1—80, N. Y., Plenum Press, 1980.
3. Хачатрян Г. С.—В кн.: Циклические нуклеотиды, с. 73—78, М.: Наука, 1979.
4. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, Айастан, 1981.
5. Davison A. N., Dobbing J. *Appl. Neurochem.* (Eds. A. N. Davison, J. Dobbing), p. 253—286, Oxford, Blackwell Scientific publ. 1968.
6. Stoykova A. S., Dudov K. P., Dabeva M. D., Hadjalov A. A. *J. Neurochem.*, v. 41, № 4, p. 942—949, 1983.
7. Lajta A., Dunlop D. *Life Sci.*, v. 29, p. 755—767, 1981.
8. Pastan I. H., Johnson G. S., Anderson W. B. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 44, p. 491—522, 1975.
9. Goldberg N. D., Haddox M. F. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 46, p. 832—896, 1977.
10. Bloch A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 58, p. 652—659, 1974.
11. Галстян Г. Г., Захарян Р. А., Хачатрян Г. С. *Нейрохимия*, т. 5, с. 413—415, 1986.
12. Blomstrand C., Hamberger A. *J. Neurochem.*, v. 16, p. 1401—1407, 1969.
13. Henn F. A. *Adv. in cell Neurobiol.*, v. 1, p. 379—403, 1981.
14. Arisawa M., Makino T., Lin H., Ohno T., Lizuka R. *Endocrinol. Jpn.*, v. 29, № 2, p. 241—244, 1982.
15. Helfman D. M., Kuo J. F. *J. Biol. Chem.*, v. 257, № 2, p. 1044—1047, 1982.
16. Cohen S. S.—In: *Progr. Nucleic acid Research and Molecular Biology* (eds. J. M. Davidson, W. E. Dohn), v. 5, p. 1—88, New-York, Acad. Press, 1966.
17. Hunter T., Francke B. *J. Virol.*, v. 15, p. 759—755, 1975.
18. Spector R., Huntoon S. *J. Neurochem.*, v. 40, № 5, p. 1481—1486, 1983.
19. Spector R., Huntoon S. *J. Neurochem.*, v. 41, p. 1131—1136, 1983.
20. Burell H. R., Dokas L., Agranoff B. W. *J. Neurochem.*, v. 31, p. 289—298, 1978.
21. Kessel D. *J. Biol. Chem.*, v. 253, p. 400—403, 1978.
22. Ellims P. H., Gan T. E., Cosgrove L. *Mol. and Cell. Biochem.*, v. 45, p. 113—116, 1982.
23. Лшапкин В. В., Романов Г. А., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б. Ф., *Биохимия*, т. 48, вып. 3, с. 355—362, 1983.
24. Маликов У. М., Панов А. Н. *Физиол. журн. СССР*, т. 67, № 10, с. 1506—1510, 1981.

Поступил 13. II. 1987