

УДК 547.963.3

А. Р. Джербашьян, Р. А. Захарян, П. А. Казарян,
С.Н. Симонян, академик К.Г. Карагезян

Действие дсРНК и полинуклеотидов на апоптоз

(Представлено 19/VII 1999)

Индукция глюкокортикоидами межнуклеосомной фрагментации ДНК хроматина впервые была показана в [1]. В дальнейшем описанное явление получило название "запрограммированной гибели" клетки. Это феномен, являющийся наиболее характерным биохимическим тестом апоптоза [2]. Апоптоз рассматривается как необходимый процесс для поддержания гомеостаза организма (3). Известны гены как индуцирующие (сed 3, sed 4), так и подавляющие (red 9) апоптоз [4].

Показано, что двухспиральная РНК (дсРНК) обладает антивирусной, интерферониндуцирующей, противоопухолевой и иммуностимулирующей активностью [5, 6].

В данной работе мы исследовали действие дсРНК, полинуклеотидов поли (А), поли (У) и поли (Г) на апоптоз как с целью изучения регуляции апоптоза, так и для оценки антивирального и противоопухолевого действия вышеуказанных веществ.

В работе использовали 3 - 4-недельные белые крысы. Клетки тимуса извлекали гомогенизацией тимуса в слабо притертом гомогенизаторе Даунса в среде RPMI 1640, 2 mM глютамин с 10% телячьей эмбриональной сывороткой. Суспензию клеток фильтровали через 4 слоя марли и инкубировали 4 ч при 37°C.

После инкубации клетки осаждали центрифугированием 400 x g 10 мин. Осадок клеток суспензировали в 20 mM трис-HCl pH 7.4, 25 mM Na-ЭДТА буфере, клетки лизировали добавлением тритона X-100 до конечной концентрации 1% с последующей инкубацией 10 мин при 0°C. Добавляли Na-додецилсульфат до конечной концентрации 0.5%. ДНК выделяли обработкой протеиназой К, депротенизацией смесью хлороформ - изоамиловым спиртом (24:1) и последующей обработкой РНК-азой.

Фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 1.5%-ной агарозе в системе трис-борат pH 8.0 [7].

In vitro инкубация тимоцитов без добавок вызывает слабый апоптоз. В наших экспериментах мы обнаружили слабую межнуклеосомную деградацию ДНК хроматина при инкубации тимоцитов в среде без добавок (рис. 1, ряд 1).



Рис.1.



Рис.2.

Рис.1. Действие дсРНК на межнуклеосомную фрагментацию ДНК хроматина тимоцитов крыс: 1-контроль без добавок; 2-инкубация клеток с дексаметазон ацетатом 5 мкг/мл; 3-инкубация с дексаметазон ацетатом 10 мкг/мл; 4-инкубация с дексаметазон ацетатом 10^{-6} м; 5-инкубация с дсРНК 100 мкг/мл; 6-инкубация с дсРНК 250 мкг/мл; 7-инкубация с дсРНК 500 мкг/мл; 8-инкубация с дсРНК 250 мкг/мл и дексаметазон ацетатом 10^{-6} м.

Рис.2. Действие полинуклеотидов на межнуклеосомную фрагментацию ДНК хроматина тимоцитов: 1-ДНК тимуса без инкубации, контроль; 2-инкубация клеток с поли (А) 50 мкг/мл; 3-инкубация с поли (А) 100 мкг/мл; 4-инкубация с поли (У) 50 мкг/мл; 5-инкубация с поли (У) 100 мкг/мл; 6-инкубация с поли (Г) 50 мкг/мл; 7-инкубация с поли (Г) 100 мкг/мл.

дсРНК индуцирует апоптоз при *in vitro* действии и в концентрациях 100, 250 и 500 мкг/мл вызывает межнуклеосомную фрагментацию ДНК хроматина тимоцитов (рис. 1, ряд 5-7).

В качестве контрольного апоптоза анализировали действие дексаметазонацетата (рис. 1, ряд 2-4). Индукция апоптоза усиливается при совместном действии дсРНК и дексаметазон ацетата (рис. 1, ряд 8).

Полинуклеотиды поли (А), поли (У) и поли (Г) индуцируют апоптоз и в концентрациях 50 и 100 мкг/мл вызывают межнуклеосомальную фрагментацию хроматина (рис. 2, ряды 2-7; ряд 1 - ДНК тимоцитов без инкубации).

Наибольший индуцирующий эффект на апоптоз имеет действие поли (У), наименьший индуцирующий эффект имеет поли (Г).

Ранее было показано лигандообразование дсРНК с белками мозга [8].

Известно, что при вирусных инфекциях и раковых образованиях подавляется апоптоз [3, 9].

Полученные результаты показали, что молекулярный механизм действия дсРНК, поли (А), поли (У) и поли (Г) опосредован через индукцию запрограммированной гибели клетки.

Вышеуказанные вещества, а из полинуклеотидов особенно поли (У), могут быть рекомендованы к применению при вирусных заболеваниях как апоптоз - индуцирующие вспомогательные терапевтические средства.

Институт молекулярной биологии НАН РА
Республиканский гематологический центр

Литература

1. Захарян Р.А., Погосян Р.Г. ДАН АрмССР 1978. Т. 67. № 2. С. 110-113.
2. Willie A.N. - Nature. 1980. V. 284. P. 555-556.
3. Thompson C.B. - Science. 1995. V. 267. P. 1456-1462.
4. Steller H. - Science - 1995.V. 267. P. 1445-1449.
5. Фелдмане Г.Я., Умбрашко Ю.Б., Буйкис А.Х. и др. - Вопр. вирусологии. 1984. Т. 4. С. 463-468.
6. Фомина А.Н., Григорян С.С., Зайцева О.В. и др. - Антибиотики. 1980. Т. 1. С. 28-32.
7. Хансон К.П. - Изв. АН РФ. Сер. биол. 1998. Т. 2. С. 134-141.
8. Маниатис Т., Фриг Э., Сембрук Дж. Методы генетической инженерии. М., 1984.
9. Zakharyan R.A. - QLT/congress, ENA/FBBS-BRA. Cambridge. 1991.

**Ա.Ռ. Զրբաշյան, Ռ.Ա. Զաքարյան, Պ.Ա. Ղազարյան,
Ս.Ն. Սիմոնյան, ակադեմիկոս Կ.Գ. Ղարազյոզյան
ԷսՌՆԹ-ի և պոլինուկլեոտիդների ազդեցությունը ապոպտոզի վրա**

Հետազոտվել է երկսպիրալ ՌՆԹ-ի (ԷսՌՆԹ), պոլինուկլեոտիդների պոլի (Ա), պոլի (ՈԻ) և պոլի (Գ)-ի ազդեցությունը ապոպտոզի վրա առնետների թիմոցիտներում: Ապոպտոզի առկայությունը դիտարկվել է ըստ բջիջների քրոմատինի ԴՆԹ-ի միջնուկլեոտմային ֆրագմենտացիայի: Ցույց է տրված, որ ԷսՌՆԹ-ն, պոլի (Ա)-ն , պոլի (ՈԻ)-ն և ավելի թույլ պոլի (Գ)-ն առաջացնում են ապոպտոզ: ԷսՌՆԹ-ի և պոլինուկլեոտիդներ պոլի (Ա), պոլի (ՈԻ) և պոլի (Գ)-ի ազդեցության մոլեկուլային մեխանիզմները առնչվում են բջջի ծրագրավորված մահի հետ: