

УДК 612.82+616.831+612.015.33+615.9

Л. А. ҚАРАПЕТЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, Ф. М. СААКЯН, А. А. ГАЛОЯН

ДЕКСАМЕТАЗОН И РИБОНУКЛЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МОЗГА

Проведено изучение РНК-азной активности ядерной, митохондриальной и надосадоочной фракций мозга в норме и под воздействием дексаметазона—синтетического аналога гидрокортизона. Введение дексаметазона приводит к значительному усилению ферментативной активности ядерной и митохондриальной фракций с максимальным подъемом ко второму часу после введения указанного стероидного гормона.

Рибонуклеазы являются одним из основных участников метаболизма рибонуклеиновых кислот. Регулируя процессы гидролиза РНК, рибонуклеазы затрагивают обменные процессы белков и ферментов, поскольку метаболизм последних детерминирован нуклеиновыми кислотами.

Наиболее изученной является РНК-аза поджелудочной железы быка [9, 18, 21, 22, 24], а также РНК-аза печени и селезенки [10, 17, 19, 20]. Исследованию РНК-азной активности мозговой ткани посвящено сравнительно мало работ [3, 5, 7].

В настоящей работе была поставлена цель изучить РНК-азную активность ядерной, митохондриальной и надосадоочной фракций головного мозга в норме и под воздействием дексаметазона (декадрона)—синтетического аналога гидрокортизона.

Опыты ставились на белых крысах обоих полов весом 100—150 г. Крысы делились на две группы: контрольную и подопытную. Подопытным животным дексаметазон вводили внутрибрюшинно из расчета 50 мкг на 100 г веса животного за 2 и 4 часа до забоя животных. Контрольным животным аналогично вводили 0,9% NaCl. Все операции проводились в холодной камере при 4°C. Крыс декапитировали, извлекали головной мозг, в некоторых опытах выделяли также гипоталамус.

Ткань мозга в количестве 4 г гомогенизировали в течение 1,5 мин. в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 20 мл 0,25 М сахарозы. Ядра выделяли по методу Спорна, Ванко и Дингмана [23]. Гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. для осаждения ядер. Ядра промывали еще 3 раза 0,25 М раствором сахарозы, центрифугуя каждый раз в течение 15 мин. при 1000 g. С целью осаждения митохондрий надосадоочная жидкость подвергалась дальнейшему центрифугированию при 12000 g в течение 25 мин. Каждый из осадков ядер и митохондрий суспендировали в 6 мл H₂O. Полученные суспензии, а также надосадоочную, полученную после осаждения митохондрий, использовали для определения РНК-азной активности по методу Магдональда [18] с некоторыми модификациями, внесенными Г. А. Нечаевой [2] и

Г. С. Хачатряном [7]. Белок определяли по Лоури [16]. К пробам, содержащим 0,3—0,4 мг белка, добавляли 96 мг мочевины (конечная концентрация 4 М), смесь оставляли в течение 30 мин. при 0°C. Добавляли 0,4 мл РНК в ацетат-вероналовом буфере (конечная концентрация 0,3%) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. в водяном термостате. Реакцию останавливали добавлением 57% перхлорной кислоты при 0°C. Через 30 мин. центрифугировали 10 мин. при 1000 g. Полученную надосадочную фракцию разбавляли 40 раз и определяли поглощение при 260 мкм. В контрольные пробирки вначале добавляли перхлорную кислоту, а затем раствор РНК.

За единицу ферментативной активности принимали прирост оптической плотности на одну единицу при 260 мкм в течение 30 мин. при 37°C. Число единиц выражалось на мг белка.

Полученные данные приведены в табл. 1, из которой видно, что РНК-азная активность в исследуемых нами фракциях при pH 6,0 составляет: ядерная— $12,23 \pm 0,18$, митохондриальная— $20,27 \pm 0,17$ и надосадочная фракция— $16,39 \pm 0,17$ ед/мг белка. Наибольшая активность РНК-азы мозга обнаруживается в митохондриальной фракции, затем в надосадочной фракции, что в основном совпадает с литературными данными.

Таблица 1
РНК-азная активность в ед/мг белка фракций головного мозга при pH 6,0

Этапы исследования	Ядерная	Митохондриальная	Надосадочная
	$M \pm m$ (пределы колебаний)	$M \pm m$ (пределы колебаний)	$M \pm m$ (пределы колебаний)
Норма (n=12)	$12,23 \pm 0,18$ (11,00—13,00)	$20,27 \pm 0,17$ (19,10—21,00)	$16,39 \pm 0,17$ (15,20—17,10)
Через 2 ч. после введения дексаметазона (n=11)	$24,10 \pm 0,30$ (22,80—26,00) $p < 0,001$	$33,11 \pm 0,18$ (32,10—34,20) $p < 0,001$	$17,12 \pm 0,10$ (16,10—18,20) $p < 0,01$
Через 4 ч. после введения дексаметазона (n=11)	$19,64 \pm 0,18$ (18,80—20,85) $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	$28,55 \pm 0,21$ (27,00—30,50) $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$	$16,12 \pm 0,20$ (15,00—17,20) $p < 0,5$ $p_1 < 0,001$

Из табл. 1 следует, что через 2 часа после введения дексаметазона РНК-азная активность ядер повышается в 2 раза, а митохондрий в 1,5 раза по сравнению с контролем. После четырехчасовой экспозиции гормона РНК-азная активность ядерной и митохондриальной фракций по сравнению с 2-часовым интервалом падает соответственно с $24,10 \pm 0,30$ до $19,64 \pm 0,18$ и с $33,11 \pm 0,18$ до $28,55 \pm 0,21$ ед/мг белка, оставаясь, однако, значительно выше исходных цифр. Ферментативная активность надосадочной фракции заметным изменениям не подвергается.

В табл. 2 представлена РНК-азная активность отдельных фракций гипоталамуса. Наибольшая РНК-азная активность данного отдела мозга сосредоточена в митохондриях и надосадочной фракции. Через 4 часа после инъекции дексаметазона в гипоталамусе также наблюдается

значительное повышение РНК-азной активности ядерной и несколько меньшее митохондриальной фракций.

Таблица 2
РНК-азная активность в ед/мг белка фракций гипоталамуса при pH 6,0

Этапы исследования	Ядерная	Митохондриальная	Надосадовная
	$M \pm m$ (пределы колебаний)	$M \pm m$ (пределы колебаний)	$M \pm m$ (пределы колебаний)
Норма (n=7)	10,60 $\pm$ 0,41 (8,90—11,90)	13,47 $\pm$ 0,34 (12,20—14,60)	14,73 $\pm$ 0,23 (14,00—15,60)
Через 4 ч. после введения дексаметазона (n=7)	18,37 $\pm$ 0,37 (17,50—20,20) p<0,001	17,50 $\pm$ 0,19 (17,00—18,40) p<0,001	15,84 $\pm$ 0,20 (15,20—16,70) p<0,01

Таким образом, при введении дексаметазона мы наблюдаем повышение РНК-азной активности ядерной и митохондриальной фракций как больших полушарий мозга, так и гипоталамической области. Аналогичный эффект получен рядом авторов в отношении других тканей. Де Дюва и Ватто [12] утверждают, что при введении ряда стероидных гормонов происходит освобождение лизосомальных ферментов, таких как ДНК-аза, РНК-аза и др., ответственных за катаболические изменения в лимфоидной ткани. В работе Абелана и Рюта [8] показано, что при введении крысам 9- α -фторпреднизолона активность кислой РНК-азы к восемнадцати часам достигает трехкратной величины. В некотором отношении заметна определенная корреляция, и данные этих авторов могут сопоставляться с нашими, однако нельзя забывать, что в нашем случае изучалась мозговая ткань и игнорирование ее морфо-функциональных особенностей было бы ошибочным. В литературе имеются указания, что адреналин вызывает повышение количества нуклеиновых кислот нервной ткани [6], наряду с этим отмечено также увеличение активности кислой РНК-азы митохондрий [4]. Положительная корреляция между содержанием РНК и активностью кислых РНК-аз была отмечена в различных тканях рядом авторов [11, 14, 15]. Считают, что в тканях РНК-азы, помимо расщепления, могут принимать участие и в процессе синтеза рибонуклеиновых кислот реакцией трансфосфорилирования. Нами получены данные относительно стимуляции дексаметазоном синтеза г-РНК в ткани мозга. Весьма интересным представляется процесс формирования под влиянием дексаметазона в мозговой ткани стабильных, возможно, временно неактивных полисом, устойчивых к РНК-азе [13], программированных к активированию через определенный интервал времени. Такая система позволяла бы осуществлять гормональную регуляцию генов, в частности кортикостероидами, на уровне трансляции.

Необходимо отметить, что в мозговой ткани кислые РНК-азы находятся в двух формах: активной и латентной. Понятно, что под влиянием тех или иных факторов соотношение между этими формами может меняться. Полученная в нашем случае повышенная РНК-азная активность ядерной и митохондриальной фракций под воздействием дексаметазона,

как нам представляется, может быть также результатом индукции гормоном синтеза фермента *de novo*. Не исключена возможность влияния дексаметазона на активацию фермента путем перевода ее латентной формы в активную.

Результаты исследований показали повышение активности РНК-азы в ядрах и митохондриях мозга при введении стероидного гормона. Дальнейшее изучение этих вопросов позволит раскрыть некоторые стороны механизма молекулярного действия стероидных гормонов.

Институт биохимии АН Арм. ССР

Поступила 24/XI 1973 г.

Լ. Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱԽԱՐՅԱՆ, Ֆ. Մ. ՍԱԶԱԿՅԱՆ, Ս. Ա. ԳԱՂՅԱՆ

ՈՒՂԵՂԻ ՌԻՐՈՆՈՒՎԵԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԴԵՔՍԱՄԵԹԱԶՈՆԸ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Ներկա աշխատանքը նվիրված է ուղեղի կորիզային, միտոքոնդրիալ և հետմիտոքոնդրիալ ֆրակցիաներում ռիբոնուկլեազային ակտիվության ուսումնասիրությանը դեքսամեթազոնի ազդեցության տակ: Նորմայում ֆերմենտը առավել ակտիվ է միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում: Դեքսամեթազոնի ազդեցության տակ ֆերմենտի ակտիվությունը զգալի աճում է կորիզային և միտոքոնդրիալ ֆրակցիաներում: Պետք է նշել, որ ֆերմենտի ակտիվության խիստ մեծացում նկատվում է վերոհիշյալ ստերոիդ պրեպարատի ներարկելուց երկու ժամ հետո:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алавердян А. А. Автореферат канд. дисс. Ереван, 1973.
2. Нечаева Г. А. Украинский биохимический журнал, 1964, 36, 4, стр. 607.
3. Нечаева Г. А. Биохимия, 1965, 30, стр. 3.
4. Нечаева Г. А. Труды IV Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы. Тарту, 1969, стр. 323.
5. Палладин А. В. В кн.: Biochemistry of the developing nervous system ed H. Wal-sch. N. Y., 1955, 177.
6. Певзнер Л. З. ДАН СССР, 1964, 156, 15, стр. 1213.
7. Хачатрян Г. С. Материалы IX научной сессии Ереванского медицинского института. Ереван, 1971.
8. Abellan E., Roth J. S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 28, 2, 244.
9. Anfinsen C. B., Aqvist S. E., Cooke I. R., Jonsson B. J. Biol. Chem., 1959, 234, 118.
10. Beard J. R., Razzel W. E. J. Biol. Chem., 1964, 239, 4186.
11. Brody S. Biochem. et biophys. acta, 1957, 24, 502.
12. Duve C. de, Wattiaux R. Ann. Rev. Physiol., 1966, 28, 435.
13. Kaulenas M. S., Fairbairn D. Develop. Biol., 1966, 14, 481.
14. Kessler B., Engelberg N. Biochem. biophys. acta, 1962, 55, 70.
15. Ledoux L., Pileri A., Vanderhaege P., Brandey. Nature, 1957, 180, 1048.
16. Lowry O. H., Rosenborough J. N. et al. J. Biol. Chem., 1957, 193, 265.
17. Maver M. E., Greco A. E. J. Biol. Chem., 1962, 237, 736.
18. Mc Donald M. R. Methods in Enzymol., 1955, 2, 427.
19. Reid E., Nodess J. T. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959, 81, 3, 618.
20. Roth J. S. J. Biol. Chem., 1954, 208, 181.
21. Sheraga H. A., Rupley J. A. Adv. in Enzymol., 1955, 2, 427.
22. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. J. Biol. Chem., 1960, 235, 648.
23. Sporn M. B., Wanko T., Dingman W. J. Cell. Biol., 1962, 15, 109.
24. Taborski G. J. Biol. Chem., 1959, 234, 2652.