

Г. Г. ГАЛСТЯН, Г. С. МХИТАРЯН, Н. Т. ГАСПАРЯН,
М. К. ВАРДАНЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

ВЛИЯНИЕ ДС РНК НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ ЭУКАРИОТ

Результаты исследований показали, что внутрибрюшинное введение крысам дс РНК приводит в первые 45 мин. к четкому увеличению в изученных тканях уровня сАМР, который к 2 часам воздействия препарата достоверно понижается. Концентрация сGMP в тканях меняется менее значительно.

Двуспиральная РНК (дс РНК) играет важную роль в формировании антивирусной резистентности клеток, а также в регуляции клеточной пролиферации [3, 11, 12]. Дс РНК—зависимая интерферониндуцируемая протеинкиназа фосфорилирует α -субъединицу фактора инициации белкового синтеза, что приводит к ингибированию синтеза белка и тормозит размножение вируса [8, 12]. Другим механизмом её действия является стимулирование синтеза 2,5-олигоаденилата [7, 9, 11], который подавляет как пролиферацию клеток, так и размножение вирусов. Предполагается также, что дс РНК—опосредованное фосфорилирование мембранных белков, повышение текучести мембраны могут подавлять сорбцию вирусов на плазматической мембране [4].

Система дс РНК находится в тесном взаимодействии с другими регуляторными системами клетки, в частности с системой циклического аденозинмонофосфата (сАМР). сАМР ингибирует активность фосфатазы I, которая дефосфорилирует фосфоформу α -субъединицы фактора инициации белкового синтеза [8]. сАМР, как и дс РНК, участвует в регуляции уровня олигоаденилата в клетке [5, 6], который, в свою очередь, механизмом обратной отрицательной связи способствует понижению уровня сАМР. В то же время дс РНК посредством индуцирования интерферона [2] может способствовать увеличению уровня сАМР в клетке [10]. Но прямое воздействие дс РНК на уровень циклических нуклеотидов в различных клетках не изучено.

Материал и методы

В экспериментах *in vivo* были использованы белые беспородные крысы-самцы массой 100—120 г, *in vitro*—клетки саркомы 45, культура клеток гепатомы I, клетки костного мозга мышей. Животным внутрибрюшинно вводили 250 мкг Ca^{2+} -преципитат дс РНК. Через определенные промежутки времени животных усыпляли и забивали декапитированием. Исследуемый орган гомогенизировали в растворе, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 7,4) и 5 мМ ЭДТА. Циклические нуклеотиды экстрагировали этиловым спиртом. Их содержание в безбелковых экстрактах определяли радиоиммунным методом, используя стандартный набор реактивов фирмы «Amersham». В экспериментах *in vitro* концентрация дс РНК в инкубационной среде составляла 5 мкг/мл. Отрезок тонкой кишки инкубировали в среде, содержащей

35 мМ трис-НСl (рН 7,4), 5 мМ Na-фосфатный буфер (рН 6,8), 5 мМ KCl, 2,5 мМ MgCl₂, 5 мМ глюкозы, 2,5 мМ аденозиндифосфата (АДР), 120 мМ NaCl. Суспензию клеток головного мозга, полученную по прописи [13], инкубировали в среде, содержащей 38 мМ трис-НСl (рН 7,4), 2 мМ Na-фосфатный буфер (рН 6,8), 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1,8 мМ CaCl₂, 10 мМ глюкозы. Клетки гепатомы, костного мозга и саркомы 45 инкубировали в минимальной среде Игла с 10% сывороткой крупного рогатого скота. После инкубации клетки или ткань тонкой кишки разрушали гомогенизированием. Концентрацию циклических нуклеотидов определяли вышеописанным способом.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что при действии дс РНК во всех изученных тканях концентрация сАМР примерно в 3—4 раза увеличивается (табл. 1). Первые изменения уровня сАМР выявляются уже через 3—5 мин после её воздействия. Привлекает внимание динамика увеличения концентрации сАМР. Например, в экспериментах в клетках тонкой кишки концентрация сАМР достигает максимума через 15 и 45 мин после воздействия дс РНК. Подобная картина с некоторым смещением во времени характерна для всех нормальных тканей, следует отметить также, что через 90—120 мин после воздействия дс РНК в клетках тонкой кишки, гепатомы, костного мозга, печени выявляется достоверное понижение концентрации сАМР. Примерно двукратное понижение концентрации сАМР выявляется также в клетках головного мозга, но через 5—10 мин после воздействия дс РНК. В клетках гепатомы и саркомы 45 концентрация сАМР достигает максимума через 30 мин после воздействия дс РНК и примерно на таком уровне продерживается 90—120 мин. Интересно отметить, что увеличение концентрации сАМР и одновременное, примерно четырехкратное, понижение уровня гуазинмонофосфата (сGMP, табл. 2) в клетках саркомы 45 сопровождается уменьшением их прививаемости. Причем этот феномен выявляется только после инкубации клеток с дс РНК 30 и более минут.

В отличие от клеток саркомы 45 при воздействии дс РНК в клетках гепатомы выявляется более чем десятикратное увеличение концентрации сGMP (табл. 2). При этом максимальное увеличение уровня сGMP выявляется при инкубации 120 минут.

Как видно из данных табл. 2, в нормальных тканях концентрация циклического сGMP меняется менее значительно, чем в трансформированных. В клетках тонкой кишки через 5 мин после воздействия дс РНК концентрация этого нуклеотида примерно в два раза понижается, а через 30—45 мин—увеличивается. Максимальное увеличение концентрации сGMP в клетках печени выявляется через 90 мин после воздействия дс РНК. В клетках головного мозга концентрация сGMP при действии дс РНК практически не меняется. Увеличение концентрации циклических нуклеотидов в кровяной плазме является отражением её повышения в тканях.

Содержание сАМР в различных тканях при действии дсРНК
(пМ/г ткани, в кл. гепатомы и кост. мозга—пМ/10⁶ кл)

Время инку- бации, мин	Контроль	3	5	10	15	30	45	60	90	120
Ткань										
Тонкие кишки (4) (in vitro) Р**	389±25	837±67	592±40	500±47	1232±90	816±100	1296±113	336±40	229±12	—
Тонкие кишки (4) (in vivo) Р	451±28	—	620±71	950±73	1150±108	1425±97	566±45	725±56	950±102	524±48
Саркома 45 (4) Р	66±5	—	98±13 <0,1	170±25 <0,02	202±20 <0,01	226±23 <0,01	195±17 <0,02	—	175±18 <0,01	—
Гепат. ма (5) Р	1,7±0,1	—	1,5±0,2 н. д.	—	4,4±0,6 <0,01	7,6±1,1 <0,01	—	3,8±0,5 <0,01	4,3±0,6 <0,01	0,9±0,2 <0,05
Костный мозг (5) Р	0,8±0,2	—	2,9±0,3 <0,01	—	4,3±0,7 <0,01	3,1±0,3 <0,01	—	0,9±0,1 н. д.	0,2±0,1 <0,05	1,0±0,2 н. д.
Печень (5) Р	585±49	—	1216±164 <0,02	2534±465 <0,01	1010±123 <0,05	766±75 <0,1	1935±228 <0,01	495±61 н. д.	326±45 <0,02	295±44 <0,01
Головной мозг (4) (in vivo) Р	1950±140	—	1750±197 н. д.	1040±94 <0,01	4360±554 <0,02	3810±537 <0,05	4025±430 <0,01	2780±395 <0,1	3755±363 =0,01	2050±178 н. д.
Головной мозг (5) (in vitro) Р	1240±79	1745±160	730±89	2750±233	1380±128	3900±434	3250±351	3530±314	1320±122	1380±145
Кров. плазма (5) Р	11,5±0,3	10,7±0,6 н. д.	17,5±1,2 <0,01	24,5±1,5 <0,001	23,2±1,8 =0,001	35,7±2,4 <0,001	27,2±2,5 <0,01	32,4±2,2 <0,001	25,7±2,3 <0,01	32,5±2,1 <0,001

*—количество экспериментов; **—статистическая достоверность различия с контролем.

Таблица 2

Содержание cGMP в различных тканях при действии дсРНК (пМ/г ткани, кл. гепатомы и костного мозга—пМ/10⁶ кл)

Ткань	Время инкубации, мин									
	Контроль	3	5	10	15	30	45	60	90	120
Тонкие кишки (4) (in vitro)	58±5	38±4	26±2	40±5	85±7	103±10	62±7	83±10	50±6	—
Р		<0,05	<0,05	н. д.	<0,05	<0,02	н. д.	н. д.	н. д.	47±7
Тонкие кишки (4) (in vivo)	61±6	—	75±8	57±4	79±7	146±17	162±20	98±14	44±5	н. д.
Р			н. д.	н. д.	<0,1	<0,01	<0,01	<0,1	н. д.	
Саркома 45 (4)	55±5	—	86±14	43±7	20±3	25±4	18±4	—	13±3	—
Р			<0,1	<0,1	<0,01	=0,01	<0,01		<0,01	
Гепатома (5)	0,06±0,01	—	0,06±0,01	0,05±0,02	—	0,04±0,01	—	0,15±0,04	0,25±0,07	0,82±0,1
Р			н. д.	н. д.		н. д.		=0,05	<0,05	<0,001
Печень (5)	50±6	—	39±6	43±7	58±7	51±8	86±12	45±7	105±16	60±10
Р			н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	<0,05	н. д.	<0,05	н. д.
Головной мозг (4) (in vivo)	64±6	—	71±9	97±13	83±11	59±8	87±10	60±7	65±10	72±8
Р			н. д.	<0,1	н. д.	н. д.	<0,1	н. д.	н. д.	н. д.
Головной мозг (5) (in vitro)	93±9	—	105±13	135±18	75±7	82±12	65±7	57±7	75±7	115±12
Р			н. д.	<0,1	н. д.	н. д.	<0,1	<0,1	н. д.	н. д.
Кров. плазма (5)	4,7±0,6	—	3,8±0,4	4,7±0,7	4,5±0,5	3,2±0,5	5,9±0,4	3,7±0,2	9,2±0,7	8,7±0,7
Р			н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	<0,01	<0,01

Следует отметить, что в некоторых случаях изменение концентрации циклических нуклеотидов в тканях коррелирует с изменением их функций. Например, увеличение концентрации сАМР в клетках головного мозга сопровождается увеличением титра интерферона в спинномозговой жидкости. Такое же явление наблюдается в плазме.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступила 26/V 1988 г.

Հ. Գ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ, Գ. Ս. ՄԽԻՏԱՐՅԱՆ, Ն. Տ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ,
Մ. Կ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱԽԱՐՅԱՆ

**ԵՐԿԹԵԼԱՆԻ ՌՆԹ-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԲԱՐՁՐԱԿԱՐԳ ԿՆԵՂԱՆԻՆԵՐԻ
ՏԱՐԲԵՐ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ՑԻԿԼԻԿ ՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴՆԵՐԻ
ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ**

Անցկացված հետազոտությունների արդյունքները ցույց են տալիս, որ երկթելանի ՌՆԹ-ի (եթ-ՌՆԹ) ազդեցության տակ գլխուղեղի, բարակ աղիների, ոսկրածուծի, լյարդի, հեպատոմայի և սարկոմա 45 բջիջներում ցԱՄՖ-ի քանակությունը 3—4 անգամ ավելանում է: Լյարդի և հեպատոմայի բջիջներում ավելանում է նաև ցԳՄՖ-ի պարունակությունը, մինչդեռ սարկոմա 45 բջիջներում այն իջնում է: Բարակ աղիների բջիջներում ցԳՄՖ-ի պարունակությունը սկզբում է իջնում (5—10 րոպե), իսկ այնուհետև՝ բարձրանում (3—45 րոպե):

H. G. GALSTIAN, G. S. MKHITARIAN, N. T. GASPARIAN, M. K. VARDANIAN,
P. A. ZAKHARIAN

THE EFFECT OF dhRNA ON THE CONTENT OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN VARIOUS TISSUES EUARYOTES

The obtained results of the studies show that cAMP was increased at 3—4 times under the effect of dhRNA in the cells of brain, intestine, marrow, liver, sarcoma 45, hepatoma and also in blood serum. The concentration of cGMP was increased in the cells of liver and hepatoma and was decreased in the cells of sarcoma 45 under the effect of dhRNA. The concentration of cGMP was twice increased after a short time decreasing in the cells of intestine.

The changes in the cocentration of cyclic nucleotides in the brain, intestine and sarcoma 45 cells were correlated with the changes of their functions under the effect of dhRNA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексанян Ю. Т., Басмаджян М. Е., Мовсесян К. С., Манукян Л. Л., Геворкян С. К. Бюл. exper. биол. мед., 1972, 73, с. 94.
2. Дужак Л. Б., Костанакха А. Н., Лобова Н. Н., Подгорный В. Ф., Носик Н. Н., Ершов Ф. И. Антибиотики и мед. биотехнология, 1985, 1, с. 19.
3. Иткес А. В., Туницкая В. Л., Северин Е. С. Успехи биол. химии, 1985, 1, 26, с. 125.
4. Карагезян К. Г., Захарян Р. А., Овакимян С. С. Биол. ж. Армении, 1987, 40, с. 979.
5. Itkes A. V., Turpacy K. T., Kartashova O. N. et al. Mol. and Cell. Biochem., 1984, 58, 1—2, 165.

6. Kafilant G. A., Itkes A. V., Kartashova O. N. et al. Adv. Enzyme Regul., 1983, 21, 353.
7. Ceasev A. A., Eppstein D. A., Marsh V. Y., Khan Z., Merigan I. C. Mol. and Cell. Biol., 1983, 3, 780.
8. Hovanessian A. G., Kerr I. M. Europ. J. Biochem., 1979, 93, 515.
9. Lenguel P. In: Interferon 3/ed. I. Gresser, N. Y.: Acad. Press, 1981, 78.
10. Meldolesi M. F., Friedman R. M., Kohn L. D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, 79, 239.
11. Minks M. A., West D. K., Benven C. J. Biol. Chem., 1979, 254, 1380.
12. Rice A. B., Kerr I. M. J. Virol., 1984, 50, 229.
13. Yanagihara I. J. Neurochem., 1979, 32, 169.

УДК 615.214.22.015.4.07

Р. А. САМСОНЕНКО, А. Т. ДОЛЖЕНКО, А. В. ТИТИЕВСКИЙ

ВЛИЯНИЕ β -КАРБОЛИНОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ И СУБСТАНЦИИ «Р» В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ШОКА

В опытах на интактных крысах и животных в условиях травматического шока установлено, что гарман и 3,4-тетраметилгарман модулируют процесс высвобождения в плазму крови субстанции Р и опиоидных пептидов (лей-энкефалина и бета-эндорфина). Повышая содержание опиоидных пептидов в плазме крови интактных животных, гарманы способствуют существенному их снижению у крыс в условиях тяжелого стрессового воздействия. Бета-карболины понижают содержание субстанции Р в плазме крови как интактных, так и подвергнутых травматическому воздействию крыс.

В механизме развития шока, особенно в его начальном периоде, главенствующее значение имеют расстройства функций регуляторных систем организма, вызванные болевыми воздействиями. Функция регуляторных, в частности ноцицептивной и антиноцицептивной систем мозга, осуществляется с участием множества медиаторов и нейромодуляторов, существенное значение среди которых имеют опиоидные пептиды и субстанция Р. В настоящем сообщении представлены результаты исследований влияния β -карболинов (гармана и 3,4-тетраметилгармана) на содержание опиоидных пептидов (лей-энкефалина и бета-эндорфина), а также субстанции Р в плазме крови интактных и подвергнутых травматическому воздействию крыс. Гарман, β -карболин-3-карбоновая кислота являются естественными метаболитами в организме человека и рассматриваются [3, 4] в качестве потенциальных эндогенных лигандов бензодиазепиновых рецепторов. Известно, что некоторые производные β -карболина проявляют свойства транквилизаторов [1] и в радиолигандных экспериментах повышают сродство ^3H -дигидроморфина к местам специфического связывания [2].

Материал и методы

Опыты выполнены на крысах-самцах массой 200 ± 30 г. У интактных животных и крыс, подвергнутых травматическому воздействию, в плазме крови определяли методом радиоиммунного анализа с ис-