

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЬЦИЕВОГО ПРЕЦИПИТАТА ДВУХСПИРАЛЬНОЙ РНК

А.С. АГАБАЛЯН*, И.В. АВЕТИСЯН*, Р.С. БАБЛОЯН*, Р.А. ЗАХАРИЯН**

*Ереванский государственный медицинский университет, 375025

**Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375014, Ереван

Изучали некоторые биологические и физико-химические свойства кальциевого преципитата двухспиральной РНК (Ca-дсРНК). Показана его резистентность к действию РНК-азы и нуклеазы S1. При длительном введении Ca-дсРНК мышам в дозе 5 и 10 мг/мышь никакого токсического действия на организм не выявлено. Повышение активности ферментов и увеличение концентрации сывороточных глобулинов у животных в ответ на введение дсРНК свидетельствует об иммуномодулирующих свойствах препарата Ca-дсРНК.

Ուսումնասիրվել են երկպարույր ՌՆԹ-ի կալցիումական նստվածքի (Ca-ԵսՐՆԹ) որոշ կենսաքանական և ֆիզիկո-քիմիական հատկությունները: Ցույց է տրվել այդ պրեպարատի կայունությունը ռիբոնուկլեազի և S1 նուկլեազի ազդեցության նկատմամբ: Հաստատվել է, որ պրեպարատի երկարատև ներարկումը 5 և 10 մգ/մուկ քանակությամբ որևէ տոքսիկ ազդեցություն օրգանիզմի վրա չի ունենում: Ֆերմենտների ակտիվության բարձրացումը և շիճուկային գլոբուլինների քանակի ավելացումը վկայում են Ca-ԵսՐՆԹ-ի իմունակարգավորիչ հատկությունների մասին:

Some biological and physico-chemical properties of calcium precipitate of double-stranded RNA (Ca-dsRNA) have been studied. The preparation was stable to RNA-ase and nuclease S1. Long-term injection of Ca-dsRNA in doses 5 and 10 mg/mouse didn't cause any toxic effect. The rise of enzymes activity and the increase of serum globulins concentration testified the immunomodulate properties of Ca-dsRNA.

Кальциевый преципитат дсРНК - характеристика физико-химическая и биологическая

Ранее было установлено влияние экзогенных нуклеиновых кислот, в частности РНК и ее двухспиральной формы (дсРНК), на восстановительные процессы при различных патологических состояниях. Наиболее эффективной формой нуклеиновых кислот с широким спектром биологического действия является дсРНК [1,9,10], обладающая способностью к индукции эндогенного интерферона, активации процесса фагоцитоза, стимуляции первичного и вторичного иммунного ответа, активации мембранных функций клетки, имеющая антивирусные, противовоспалительные и противоопухолевые свойства, усиливающая процессы регенерации в раневых тканях и др. [2,3,5,8].

Вместе с тем до настоящего времени не в полной мере изучены физико-химические свойства и возможное токсическое влияние дсРНК на клетки, ткани и органы, что и послужило целью выполнения данной работы. Представлялось также целесообразным изучить влияние дсРНК на активность ряда ферментов и количественный баланс сывороточных глобулинов у здоровых животных.

Материал и методика. дсРНК получали из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методом фенольной депротеинизации. Фракционирование тотального пула

РНК осуществляли при помощи хроматографии на колонках с немодифицированной целлюлозой (микроцеллюлоза) [11]. Гомогенность полученных результатов дсРНК проверяли посредством электрофореза в 1%-ном геле агарозы по описанному ранее методу [8]. Визуализацию препаратов дсРНК и определение ее молекулярной массы проводили электронномикроскопически [8].

Кальциевые преципитаты дсРНК получали известным способом [7]. Обработку препаратов РНК проводили панкреатической рибонуклеазой (РНК-аза) и эндогенной нуклеазой S1 как описано ранее [4]. Активность ферментов определяли при помощи биохимического анализатора FP-901, посредством которого определяли также концентрацию сывороточных глобулинов. Эксперименты проводили на 140 белых мышах линии СВА и линии клеток L 1210.

Для отделения препаратов дсРНК от возможной примеси односпиральных форм РНК тотальный пул препарата подвергали хроматографии на немодифицированной целлюлозе, разделяющей нуклеиновые кислоты в зависимости от степени их спирализации. Предварительно, до хроматографии препараты РНК обрабатывали РНК-азой и нуклеазой S1, расщепляющей все типы односпиральных нуклеиновых кислот. Элюцию препаратов РНК проводили с помощью различных концентраций перегнанного этанола в буфере STE (0,1M NaCl, 0,001M ЭДТА, 0,01M трис, pH 7,2). Подробно фракционирование РНК описано нами ранее [6].

Результаты и обсуждение. Первая серия экспериментов была посвящена изучению физико-химических характеристик дсРНК, выделенной из *Saccharomyces cerevisiae*. Как видно из рис. 1, РНК, обработанная РНК-азой, вымывается с колонки одним пиком и по своей резистентности к действию фермента соответствует двухспиральной форме РНК, в то время как при элюции РНК, не обработанной РНК-азой, выявляются два вида РНК,

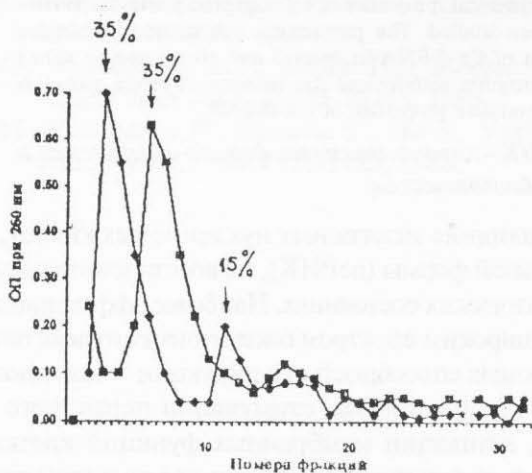


Рис. 1. Фракционирование РНК на немодифицированной целлюлозе:

- - РНК, обработанная РНК-азой;
 - ◆ - РНК, не обработанная РНК-азой.
- Элюция препаратов РНК 35%- и 15%-ным этанолом

элюируемые разными концентрациями этанола: 35%-ным - дсРНК, 15%-ным - односпиральная РНК.

С целью определения гомогенности полученных препаратов дсРНК их подвергали электрофорезу в 1%-ном геле агарозы (рис.2). Из рисунка видно, что препараты дсРНК мигрируют в агарозном геле одной группой, что говорит о гомогенности полученных препаратов.

Электронномикроскопический анализ препаратов дсРНК выявил набор

молекул с молекулярной массой от 5×10^5 до 8×10^5 дальтон.

В последующих экспериментах изучали некоторые биологические свойства препаратов дсРНК. С этой целью последние переводили в форму Са-дсРНК. На модели злокачественно-трансформированных клеток L1210 изучали влияние Са-дсРНК на рост и размножение этих клеток, для чего последние инкубировали с Са-дсРНК в среде RPMI 1640 в течение 48ч при

37° с постоянной подачей 5%-го CO₂. Концентрации препаратов Са-дсРНК варьировали от 6,2 до 2000 мкг/мл. Анализом полученных данных установлено, что при воздействии Са-дсРНК в указанных концентрациях 91,3% клеток L 1210 сохраняли жизнеспособность, это свидетельствует о нетоксичности использованных препаратов. Токсического действия Са-дсРНК не было обнаружено также при ее в/бр введении животным ежедневно в течение 15 и 30 дней в концентрациях 5 и 10 мг/мышь.

Для исследования влияния дсРНК на внутренние органы экспериментальных животных, получавших Са-дсРНК в течение 30 дней, последних забивали, отбирали мозг, печень, селезенку и тимус и изучали их весовые характеристики по сравнению с таковыми у контрольных, интактных животных (табл. 1).

Таблица 1. Влияние Са-дсРНК на весовые характеристики внутренних органов животных

| Органы животных | Са-дсРНК (10мг/мышь) и вес органов, г | | | |
|-----------------|---------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | контроль | | опытные животные | |
| | самцы (n=15) | самки (n=15) | самцы (n=15) | самки (n=15) |
| Тимус | 28 | 34 | 27 | 33 |
| Селезенка | 108 | 99,6 | 122 | 121 |
| Мозг | 242 | 297 | 256 | 350 |
| Печень | 1194 | 1109,8 | 1240 | 1245 |

Из таблицы видно, что длительное введение мышам Са-дсРНК не изменяет весовых характеристик внутренних органов животных, что также свидетельствует о нетоксичности использованного препарата.

При изучении биологических свойств Са-дсРНК исследовали влияние последнего на активность щелочной фосфатазы, креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы, кислой фосфатазы, аланинтрансаминазы и аспартаттрансаминазы, а также на количественный баланс сывороточных белков. С этой целью мышам линии СВА в/бр вводили Са-дсРНК ежедневно в течение 30 дней в дозе 5 мг/мышь (табл. 2).

Анализ данных таблицы выявил тенденцию к повышению активности исследованных ферментов и увеличению концентрации сывороточных глобулинов. Последнее обстоятельство однозначно свидетельствует об

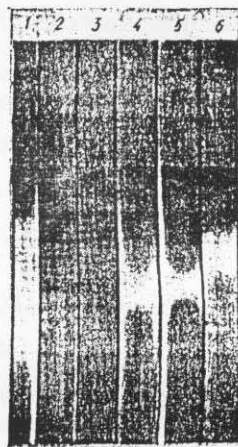


Рис. 2. Электрофоретический профиль препаратов РНК:

1. Односпиральная РНК
2. РНК, элюированная 15%-ным этанолом, обработанная РНК-азой
3. РНК, элюированная 15%-ным этанолом, обработанная нуклеазой S1
4. РНК, элюированная 35%-ным этанолом (дсРНК)
5. РНК, элюированная 35%-ным этанолом, обработанная РНК-азой
6. РНК, элюированная 35%-ным этанолом, обработанная нуклеазой S1

иммуностимулирующих свойствах Са-дсРНК.

Таблица 2. Активность ферментов и количественная характеристика сывороточных глобулинов мышей, стимулированных Са-дсРНК

| Ферменты | Активность, Е/л | | Сывороточные белки | Концентрация, г/л | |
|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-------------------|-----------------|
| | контроль (n=25) | Са-дсРНК (n=25) | | контроль (n=25) | Са-дсРНК (n=25) |
| Щелочная фосфатаза | 228,1 ± 4,3 | 319,3 ± 11,2 | Альбумин | 3,3 ± 0,21 | 4,62 ± 0,19 |
| Креатинфосфокиназа | 93,5 ± 4,01 | 166,1 ± 3,3 | α ₁ -глобулин | 0,25 ± 0,04 | 0,41 ± 0,031 |
| Лактатдегидрогеназа | 212,2 ± 3,6 | 290,7 ± 8,07 | α ₂ -глобулин | 0,51 ± 0,02 | 0,92 ± 0,08 |
| Кислая фосфатаза | 8,3 ± 0,21 | 14,4 ± 0,91 | β-глобулин | 0,55 ± 0,05 | 1,12 ± 0,092 |
| Аланинтранс-аминидаза | 15,1 ± 1,02 | 41,8 ± 0,71 | γ-глобулин | 0,90 ± 0,073 | 2,52 ± 0,12 |
| Аспартат-трансаминаза | 11,5 ± 0,32 | 32,8 ± 0,63 | | | |

Таким образом, проведенные исследования позволили заключить, что гомогенные препараты дсРНК, использованные в виде Са-дсРНК, не токсичны для мышей при их длительном введении, обладают иммуностимулирующим действием, что в конечном счете приводит к повышению неспецифической резистентности организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабалян А.С., Казанчян А.Ф. и др. ДАН Армении, 5, 228-231, 1983.
2. Агабалян А.С., Назаров Л.У. и др. ДАН Армении, 3, 173-177, 1993.
3. Агабалян А.С., Рухкян Л.А. и др. ДАН Армении, 88, 93-96, 1989.
4. Агабалян А.С., Захарян Р.А. и др. Микробиология, 1, 97-100, 1078.
5. Веревкина К.Н., Даниленко Е.Д. Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол., 7, 69-72, 1988.
6. Зарафян И.М., Агабалян А.С. и др. Биол. журн. Армении, 29, 5, 45-50, 1976.
7. Захарян Р.А., Казарян П.А. и др. ДАН Армении, 2, 63-66, 1997.
8. Захарян Р.А., Месропян Н.П. и др. Экспер. онкология, 3, 54-56, 1985.
9. Земсков А.М., Земсков В.М. и др. Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол., 9, 9-13, 1982.
10. Земсков А.М. Иммунология, 4, 88-95, 1988.
11. Barber R. Biochem. Biophys. Acta, 114, 422-425, 1966.

Поступила 3.III.1997