

Вплив 2',5' олігоаденілатів та їхніх аналогів на рівень циклічних нуклеотидів в системах *in vivo* та *in vitro*

З. Ю. Ткачук, В. В. Ткачук, Л. В. Ткачук, Л. І. Семерникова, Г. Х. Мацука

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Показано, що препарати аналогів 2', 5' А при введенні в органи і тканини тварин впливають на концентрацію сАМР, але не сGMP. Подібний ефект має концентраційну залежність і дозволяє застосовувати метод тестування сАМР для визначення специфічної дії препаратів аналогів 2', 5' А, які можна використовувати при трансплантації органів та алергічних захворюваннях.

Вступ. Останнім часом відкрито цілий ряд регуляторних систем, під контролем яких знаходиться життєдіяльність клітини. Найважливішою, багатофункціональною і досить добре вивченою є система сАМР. Іншою регуляторною системою, до якої звернено увагу широкого кола дослідників, є система 2', 5' олігоаденілату (2', 5' А). Це пов'язано, перш за все, з тим, що в клітинах, оброблених інтерфероном, спостерігається значний ріст вмісту цього олігонуклеотиду.

Основний біохімічний механізм дії 2', 5' А, як показують численні дослідження, пов'язаний з активацією ним латентної рибонуклеази (РНКази L [1], РНКази F [2]), яка в присутності 2', 5' А гідролізує одонитчасту РНК як вірусного, так і клітинного походження [3]. Здатністю активізувати РНКази L володіють лише молекули 2', 5' А з три- чи дифосфатною групою на 5'-кінці [4].

З літератури відомо, що при підвищенні внутрішньоклітинного вмісту сАМР відбувається зміна активностей як 2', 5' А-синтетази, так і 2'-фосфодіестерази [5].

Система 2', 5' А — це одна з багатофункціональних регуляторних систем клітини: інтерферон активує синтез ферментів, що входять до цієї системи. Однак існує низка інших причин, що

викликають модуляцію їхньої активності. Одна з них — активація сАМР-залежного фосфорилування; у цьому випадку 2', 5' А виступає як медіатор проліферативної і антивірусної дії сАМР. Існують також шляхи сАМР-залежної регуляції вмісту 2', 5' А і, навпаки, — 2', 5' А-залежної регуляції вмісту сАМР, що забезпечує координацію функціонування даних агентів. Останнє дає підставу розглядати сАМР та 2', 5' А як компоненти єдиної регуляторної системи клітини.

Раніше ми показали, що аналоги 2', 5' А володіють антипроліферативною дією стосовно Т-лімфоцитів. Це виражається в їхній здатності пригнічувати відторгнення органів і тканин при трансплантації [6].

Припускають, що антипроліферативна дія 2', 5' А і їхніх аналогів пов'язана з активацією системи сАМР, що проявляється в зміні міжклітинного рівня сАМР [7]. Очевидно, що цей універсальний ефект є результатом дії сАМР/2', 5' А системи на фермент РНКази L, яка при активації її 2', 5' А оліго А зменшує тотальний рівень синтезу білка і прискорює деградацію клітинної РНК. Вважають, що така активація розпаду РНК сприяє переходу клітин до стану спокою, що у випадку трансплантації пригнічує активність Т-лімфоцитів — головних чинників відторгнення трансплантату.

У попередніх дослідках нам не вдалося кількісно визначити ендогенний рівень 2', 5' А і їхніх ана-

логів в органах і тканинах у разі їхньої терапевтичної дії. Тому, виходячи з тісного взаємовпливу і взаємозалежності 2', 5' А і сАМР систем, ми вирішили вивчити кореляцію між ефектом аналогів 2', 5' А на культуру клітин та органи тварин і концентрацією сАМР і сGMP у цих тканинах. За умов існування такої прямої кореляції можна буде судити про терапевтичну дію різних концентрацій аналогів 2', 5' А.

Матеріали і методи. В роботі використано 2', 5' олігоаденілати: природний «кор» 2', 5' оліго A_3 — (2', 5' АрАрА) та його аналог 2', 5' епокси A_3 (2', 5' А $_{(RA)}$), які синтезовано в Інституті біоорганічної хімії АН Беларусі [8].

Вміст сАМР і сGMP визначали в клітинах Т-лімфоцитів Mol T₄, в плазмі крові мишей, селезінці та печінці мишей при попередній обробці олігоаденілатами.

Клітини Т-лімфоцитів Mol T₄ вирощували на середовищі RPMI з 10 % телячої сироватки, осаджували при 1200 об/хв протягом 5 хв на центрифугі К-70, ресуспендували в середовищі RPMI з 2,5 г/л глюкози, попередньо підігрівши її при температурі 37 °С. В камері Горяєва підраховували кількість клітин Т-лімфоцитів. У лунки плашки вносили по 1 мл клітинної суспензії ($3,5 \cdot 10^6$ клітин/мл).

Олігоаденілати (2', 5' АрАрА і (2', 5' A_2) $_{(RA)}$) в концентраціях від 10^{-4} до 10^{-6} М інкубували з клітинами протягом 1, 5, 24 год. Відібрані проби центрифугували при 3000 об/хв (5 хв), ресуспендували в 50 мМ трис-НСІ, 4 мМ ЕДТА, рН 7,5. Далі проби витримували протягом 3 хв на киплячій водяній бані, центрифугували при 5000 об/хв (15 хв), відбирали супернатант і зберігали при -20 °С для визначення сАМР та сGMP.

Для визначення вмісту сАМР і сGMP у плазмі крові, печінці, селезінці мишам лінії Balb (п'ятимісячні самці) вводили 2', 5' оліго A_3 та 2', 5' епокси A_3 по 5—25 мкг на мишку у хвостову вену. Через 1 і 24 год мишей забивали, брали в досліди кров, печінку, селезінку. Кров відбирали в пробірки з 0,5 мл 1 %-го ЕДТА (на льоду), центрифугували при 2000 об/хв (3 хв). Відбирали супернатант, додавали по 2 мл етанолу (96°) і залишали на 60 хв при кімнатній температурі для коагуляції білків. Знову центрифугували при 2000 об/хв (5 хв), збирали супернатант, осад ресуспендували в суміші етанол:вода (2:1) в 1 мл, знову центрифугували і об'єднували обидва супернатанти, які заморожували при -20 °С.

На другий день концентрували проби на роторному упарювачі. Печінку (зважували по 1 г) і селезінку (зважували по 100 мг) гомогенізували в

скляних гомогенізаторах, до гомогенату додавали 1 мл 1 %-го розчину ЕДТА (0,5 М) для попередження ферментативної руйнації сАМР. Гомогенізовані тканини кип'ятили на водяній бані протягом 3 хв для коагуляції білків, центрифугували при 10000 об/хв. Зібраний супернатант заморожували при температурі -20 °С.

Концентрацію циклічних АМР і GMP визначали за допомогою тест-системи фірми «Amersham» (Велика Британія). Процедура визначення концентрації циклічних нуклеотидів ґрунтується на конкурентному зв'язуванні неміченого сАМР (сGMP) і фіксованої кількості міченої за тритієм сАМР (сGMP) з білком, який має високу специфічність і спорідненість до сАМР (сGMP). Кількість утвореного міченого комплексу білок—сАМР зворотно пропорційна такій неміченого сАМР, присутнього в зразку, що вивчається. Визначення радіоактивності зв'язаного білка дозволяє розрахувати кількість неміченого сАМР (сGMP) у зразку.

Концентрацію сАМР у зразках визначали в системі, що містила 50 мкл 0,05 М трис-НСІ буфера, рН 7,5, 4 мМ ЕДТА, 100 мкл зв'язуючого білка з м'язів бика, 50 мкл стандарту [8-³Н]аденозин-3', 5'-циклічний фосфат (180 пМ), який містить 185 кБк (5 мкКі). Аліквоти досліджуваних зразків інкубували протягом 2 год при температурі 2—8 °С. Потім до цієї суміші додавали 100 мкл вугільної суспензії, перемішували і центрифугували (5 хв) при 5000 об/хв для осаджування вугілля. Відбирали надосадову рідину (200 мкл) і вносили її у флакони з рідинним сцинтилятором (ЖС-8) і міряли радіоактивність на лічильнику «Intertech-nique» (Франція).

Кількість неміченого сАМР визначали за калібровочною кривою з використанням стандартів сАМР від 1 до 16 пМ. Визначення концентрації сGMP має певні відмінності.

У реакційну суміш, що містила 100 мкл 0,05 М трис-НСІ, рН 7,5, 4 мМ ЕДТА, 50 мкл антисироватки, специфічної до сGMP, 50 мкл [8-³Н]гуанозин-3',5'-циклофосфат, 80 пМ, 59 кБк (1,6 мкКі), вносили по 100 мкл досліджуваних зразків. Для побудови калібровочної кривої вносили по 100 мкл стандартного розчину неміченого сGMP (1—8 пМ).

Реакційну суміш інкубували протягом 1,5 год при температурі 2—8 °С, після чого додавали 1 мл льодяного 60 %-го розчину $(NH_4)_2SO_4$, центрифугували, відбирали рідину (1 мл) і міряли на лічильнику «Intertech-nique», як у випадку з сАМР.

Результати і обговорення. Згідно з літературними джерелами, циклічні нуклеотиди широко розповсюджені у тканинах усіх видів тварин, рослин, бактерій та інших одноклітинних організмів. Внут-

рішньоклітинний рівень сАМР у ссавців за нормальних умов складає 0,1—0,5 пмоль/г сирової тканини, або 0,5—2,6 пмоль/г білка, тобто 10^{-7} М [9]. Рівень внутрішньоклітинної концентрації сАМР регулюється відповідною активністю аденілатциклази, яка утворює сАМР з АТР, з одного боку, і фосфодіестерази, що гідролізує циклічний нуклеотид з утворенням 5' АМР, — з іншого.

Вміст сАМР в усіх тканинах тварин домінує над сGMP. Винятком з цього загального положення, очевидно, є лише сітчатка — єдина тканина, сильно збагачена сGMP [10].

Ці дані цілком узгоджуються з одержаними нами результатами з визначення рівнів циклічних АМР та GMP у культурі клітин та в органах ссавців.

Показано, що при інкубації Т-лімфоцитів з 2', 5' епокси A_3 в концентрації 10^{-6} М протягом 1 год

рівень сАМР збільшився в 2 рази (контроль — 1,5 пМ, 2', 5' епокси A_3 — 3,1 пМ). Зростання концентрації 2', 5' епокси A_3 до 10^{-5} і 10^{-4} М не вплинуло на рівень сАМР, що залишився таким же, як у контролі (рис. 1).

Природний дефосфорильований «коровий» тример 2', 5' оліго A_3 при інкубації з Т-лімфоцитами протягом 1 год у концентрації 10^{-5} та 10^{-4} М призводив до зниження кількості сАМР приблизно у 2 рази (контроль — 1,5 пМ, 2', 5' оліго A_3 — 0,7 пМ). Цей же тример у концентрації 10^{-6} М суттєво не змінював рівня сАМР стосовно контролю (контроль — 1,5 пМ; 2', 5' оліго A_3 — 1,7 пМ).

При збільшенні часу інкубації досліджуваних препаратів з Т-лімфоцитами до 5 та 24 год концентрація сАМР у всіх варіантах залишалася на рівні контролю. Причому при 24 год-інкубації рівень сАМР у Т-лімфоцитах зменшувався в 5—10 разів як у контрольних, так і в дослідних зразках, що свідчило про виснаження клітинних ресурсів Т-лімфоцитів у підтримуючому середовищі.

З вищевикладених результатів із визначення вмісту сАМР у Т-лімфоцитах стає зрозумілим, що воно є достовірним лише при інкубації клітин з препаратами протягом 1 год. Експерименти показали, що рівень сGMP як у контрольних, так і в дослідних зразках нижчий за рівень сАМР приблизно в 5 разів, що добре узгоджується з літературними даними, наведеними раніше. Але суттєвої різниці в концентраціях сGMP у контролі і в дослідних зразках виявити не вдалося ні у випадку 2', 5' A_3 , ні у випадку 2', 5' епокси A_3 при різних концентраціях.

Наступним етапом було проведення серії дослідів на мишах лінії Balb (п'ятимісячні самці) для визначення змін у концентрації сАМР та сGMP під впливом тріолігоаденілатів у плазмі крові та деяких органах ссавців.

Препарати «корового» тріолігоаденілату та його аналогу вводили у хвостову вену мишам по 5 і 25 мг на мишку. Відбір проб крові здійснювали через 1 та 24 год після введення препаратів.

Показано, що через 1 год після введення 5 мг 2', 5' епокси A_3 в плазмі крові рівень сАМР збільшився в 2 рази порівняно з контролем (контроль — 2,7 пМ, 2', 5' епокси A_3 — 4,7 пМ). При введенні 25 мг 2', 5' епокси A_3 рівень сАМР у плазмі крові збільшився в 1,5 разу в порівнянні з контролем (3,7 і 2,7 пМ відповідно). У випадку 2', 5' оліго A_3 рівень сАМР зріс несуттєво порівняно з контролем — 3 пМ (рис. 2).

Рівень сGMP у пробах плазми крові, відібраної через 1 год як у дослідних зразках, так і в контролі, був у слідових кількостях. У зразках

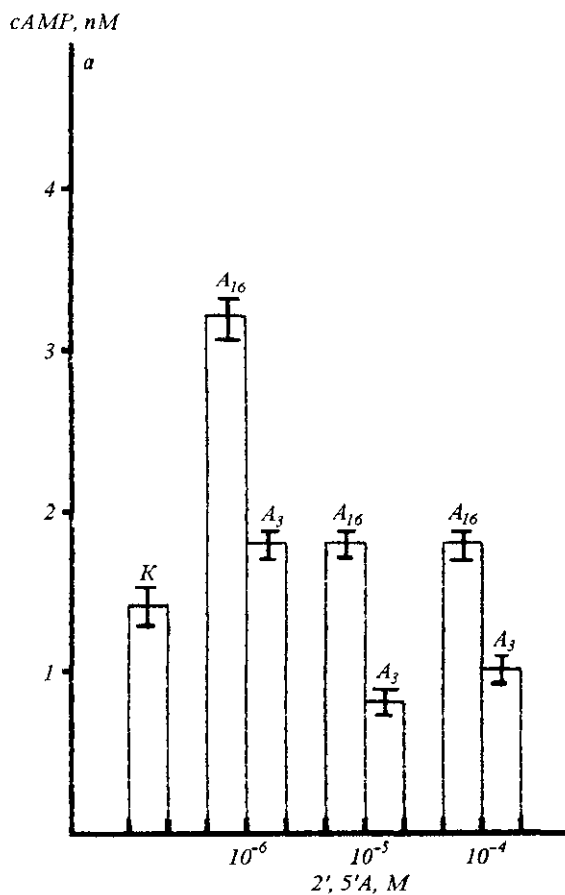


Рис. 1. Вплив 2', 5' олігоаденілатів на рівень сАМР у культурі клітин Т-лімфоцитів шол Т₄ (час інкубації з препаратом 1 год): 1 — 2', 5' A_2 (RA); 2 — 2', 5' ArArA; К — контроль

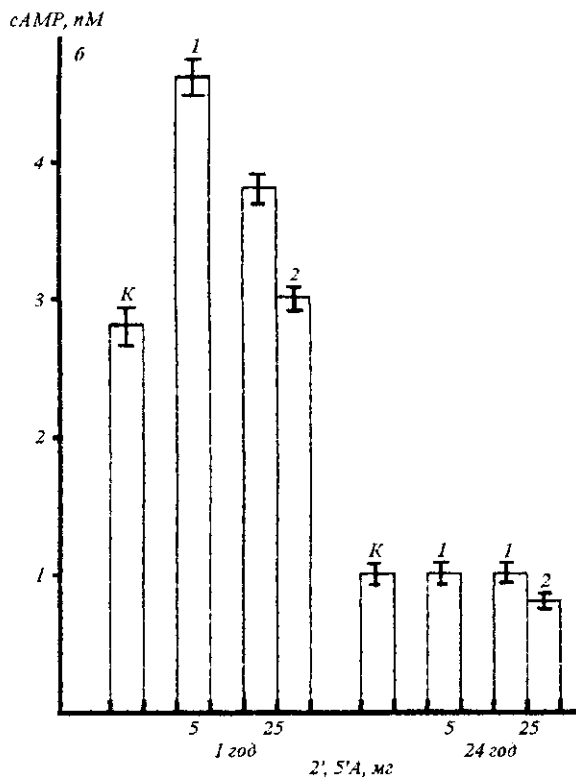


Рис. 2. Вплив 2', 5' олігоаденілатів на рівень сАМР у плазмі крові мишей (час інкубації 24 год): 1 — 2', 5' А₂ (R_ΔA); 2 — 2', 5' АрАрА; К — контроль

плазми крові, відібраних через 24 год після введення 2', 5' олігоаденілатів, рівень сАМР був однаковим у контрольних і дослідних пробах незалежно від концентрацій досліджуваних препаратів (контроль — 1 пМ, дослід — 0,8—1,2 пМ), а концентрація сGMP була ще нижчою в усіх варіантах (слідові кількості).

Виконано серію дослідів з визначенню вмісту сАМР і сGMP у печінці та селезінці мишей після введення досліджуваних препаратів через 24 год.

Як показали результати експериментів, при введенні 25 мг 2', 5' епоксидоліго А₂ вміст сАМР у печінці мишей збільшився до 4,4 пМ, тоді як у контролі він складав 2,8 пМ. При введенні мишам 5 мг цього препарату спостерігався незначний ріст концентрації сАМР (3,2 пМ). Результати дослідження природного «кору» 2', 5' оліго А₂ (5 і 25 мг) не виявили значних змін у рівні сАМР порівняно з контролем (рис. 3).

Рівень сGMP у печінці мишей, в аналогічних умовах був нижчий в 3—5 разів, ніж рівень сАМР,

і не було виявлено суттєвої різниці в дослідних і контрольних зразках.

При вивченні впливу препаратів на вміст сАМР та сGMP у селезінці мишей виявлено деякі інші закономірності. Так, препарат 2', 5' епоксид А₂ та «кор» 2', 5' оліго А₂ в концентрації 25 та 5 мг сприяли зниженню рівня сАМР у 2—2,5 разу на відміну від наведених вище результатів, де спостерігалось збільшення вмісту сАМР (рис. 4). Рівень сGMP у селезінці був таким же низьким, як і в печінці, а результати контрольних і дослідних зразків не різнилися між собою.

З одержаних результатів видно різницю в дії досліджуваних 2', 5' олігоаденілатів. На наш погляд, дія 2', 5' епоксид А₂ краще вписується в класичну схему взаємної регуляції систем 2', 5' А і сАМР за механізмом зворотного зв'язку. Попередні наші дослідження також дозволяють вважати 2', 5' епоксид А₂ перспективним препаратом у плані протівірусної дії, оскільки він виявляє вдвічі біль-

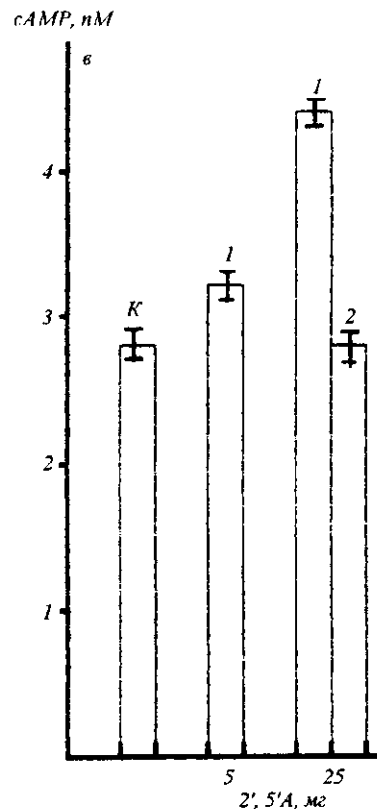


Рис. 3. Вплив 2', 5' олігоаденілатів на рівень сАМР у печінці мишей (час інкубації 24 год): 1 — 2', 5' А₂ (R_ΔA); 2 — 2', 5' АрАрА; К — контроль

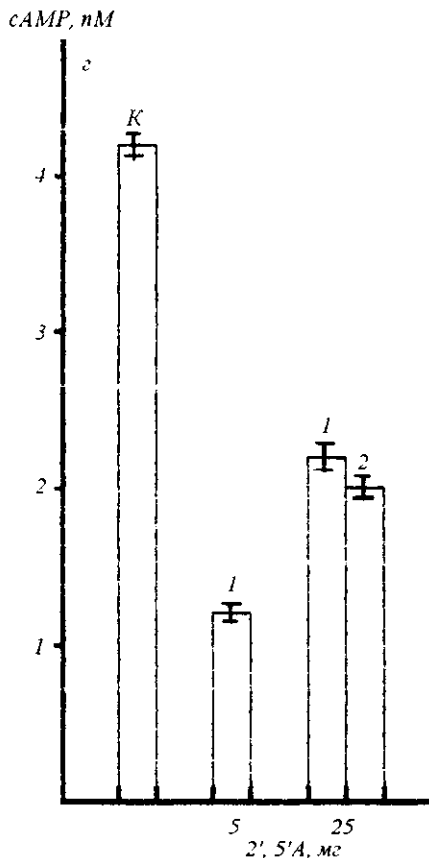


Рис. 4. Вплив 2', 5' олігоаденілатів на рівень сАМР у селезінці мишей (час інкубації 24 год): 1 — 2', 5' А₂ (R_AA); 2 — 2', 5' АрА; К — контроль

шу інтерферогенну дію, ніж природний «кор» 2', 5' оліго А₃ [11].

Насамкінець можна зробити декілька висновків. По-перше, 2', 5' оліго А і його аналоги дуже тісно пов'язані з системою сАМР і в той же час не впливають на систему сGMP, що дає можливість досить чітко окреслити сферу можливої терапевтичної дії аналогів 2', 5' А в зоні безпосередньої біологічної активності сАМР. А це, в першу чергу, захворювання, пов'язані з проліферативною активністю клітин, — онкологічні хвороби, вірусні захворювання, дерегуляція гормональних систем та алергічні хвороби. Крім цього, в перспективі можна спробувати використати аналоги 2', 5' А при хворобах, де потрібно вживати сАМР, який дуже важко проникає до клітини і його через це не використовують. По-друге, по концентрації сАМР в органах і тканинах після введення аналогів 2', 5' А

можна досить швидко (уже через 1 год) виявити їхню терапевтичну дію. До того ж, що особливо важливо, є реальним досить швидко і точно визначити по концентрації сАМР необхідні терапевтичні концентрації аналогів 2', 5' А, які потрібно вводити при тих чи інших захворюваннях і, таким чином, створити правильні схеми лікування. До цього часу у зв'язку з великими труднощами у визначенні 2', 5' А і їхніх аналогів в органах і тканинах такої можливості не було, що стримувало використання цих дуже перспективних препаратів у медицині. Описаний метод визначення сАМР в органах і тканинах досить широко використовується в медичній діагностиці, що дозволить у перспективі застосовувати його в клініці.

Z. Yu. Tkachuk, V. V. Tkachuk, L. V. Tkachuk, L. I. Semernikova, G. Kh. Matsuka

Influence of 2', 5' oligoadenylates and theirs analogues on the cyclic nucleotides level *in vivo* and *in vitro*

Summary

It was demonstrated that 2', 5' A analogues, when introduced to organs and tissues in animals, influenced the concentration of cAMP but not cGMP. The effect depends on the concentration and, therefore, one can employ the method of testing cAMP to determine the specific action of 2', 5' A analogues, which could be used at organ transplantation and allergy.

З. Ю. Ткачук, В. В. Ткачук, Л. В. Ткачук, Л. И. Семерникова, Г. Х. Мацука

Влияние 2', 5' олигоаденилатов и их аналогов на уровень циклических нуклеотидов в системах *in vivo* и *in vitro*

Резюме

Показано, что препараты аналогов 2', 5' А при введении в органы и ткани животных влияют на концентрацию сАМР, но не сGMP. Подобный эффект имеет концентрационную зависимость и позволяет применять метод тестирования сАМР для определения специфического действия препаратов аналогов 2', 5' А, которые можно использовать при трансплантации органов и аллергических заболеваниях.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ratner L., Wiegand R. C., Farrell P. G., Seng G. C., Gabrer B., Lengyel P. Interferon, double-stranded RNA degradation. Fractionation of the endonuclease in svstem into two macromolecular components; role of a small molecule in nuclease activation // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1978.—81, N 3.—P. 947—954.
2. Schmidt A., Zilberstein A., Shulman L., Federman P., Berissi H., Revel M. Interferon action: izolation of nuclease F; a translation inhibitor activated by interferon-induced (2'—5') oligoisoadenylate // FEBS Lett.—1978.—95, N 2.—P. 257—264.

3. Ratner L., Seng G. C., Brown R. E., Lebleu B., Kawakita M., Gabrer B., Slattery E., Lengyel P. Interferon double-stranded RNA and degradation, characteristics of endonuclease activity // *Eur. J. Biochem.*—1977.—79, N 2.—P. 565—577.
4. Vilcek S. Inducia enzymovych aktivít v bunkach po posobeni interferonu // *Chem. Listy.*—1984.—78.—P. 400—432.
5. Иткес А. В., Туницкая В. Л., Северин Е. С. Механизмы регуляции биологической активности клетки с участием 2', 5' олигоаденилата // *Биохимия.*—1985.—50, № 4.—С. 531—542.
6. Pat. USA 5, 571, 799. (2'—5') Oligoadenylate analogues useful as inhibitors of host-V₅-graft response / Z. Tkachuk, E. Kvasyuk, G. Matsuka, I. Mikhailopulo.—Publ. Nov. 5, 1996.
7. Itkes A. V. Oligoadenylate and cyclic AMP: interrelation and mutual regulation // *Progr. Mol. Subcell. Biol.*—1994.—14.—P. 209—221.
8. Mikhailopulo I. A., Baran E. A., Tkachuk L. V. Synthesis and use in kidney transplantations in rabbits and monkey of (2'—5')-oligoadenylate trimers modified at the 2', 5'-terminus // 4th Int. Symp. on Mol. Aspects of Chemother. (23—25 June, 1993, Gdansk).—Gdansk, 1993.—P. 61.
9. Туракулов Я. Х., Саатов Т. С., Халиков С. К., Исаев Э. И., Гайнутдинов М. Х. Циклические нуклеотиды и регуляция клеточного метаболизма.—Ташкент: Фан, 1983.—240 с.
10. Keppens S., Vandenheede J. R., De Wulf H. Stimulation of adenosine triphosphatase (ATPase) by calcium, magnesium and bicarbonate in rat pancreatic plasma membranes // *Arch. Int. Physiol. Biochem.*—1976.—84, N 5.—P. 1082—1084.
11. Ткачук З. Ю., Рибалко С. А., Семерникова Л. І., Ткачук В. В., Завелевич М. П., Ткачук Л. В., Михайлопуло І. О., Мацука Г. Х. Дія 2', 5'-триолігоаденілату та його епокси-похідного на репродукцію вірусу імунодефіциту людини та на активність зворотної транскриптази ретровірусів // *Біополімери і клітина.*—1999.—15, № 4.—С. 314—319.

УДК 517. 113. 3. 6. + 57. 053. 4
Надійшла до редакції 24.07.2000