

О МЕХАНИЗМЕ ВКЛЮЧЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО ПРЕЦИПИТАТА ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК В СИСТЕМУ РЕГУЛЯЦИИ ЭРИТРОПОЭЗА ПРИ ОСТРОЙ АНЕМИИ У КРЫС

Л.О. АБРОЯН, Е.М. КАРАЛОВА, Р.А. ЗАХАРЯН, С.А. КАРАПЕТАН,
Ю.А. МАГАКЯН

Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375014, Ереван

Анемия - эритропоэз - механизмы регуляции - двуспиральная РНК

Ранее на модели экспериментальной острой анемии у крыс, индуцированной введением фенилгидразина (ФГ), было показано (1), что в присутствии Са-дс-РНК в 1,5 раза возрастает в сравнении с “чистой” анемией число делящихся про- и эритробластов и в связи с этим резко сокращается доля микроцитов, играющих важную роль в восполнении численности клеток и содержания гемоглобина в крови после криза анемии. Менее выраженным оказалось влияние Са-дс-РНК на макроцитоз, сохраняющий свое значение несмотря на повышение скорости развития и численности нормальных эритроцитов в результате введения препарата. В итоге под воздействием препарата более чем на сутки сокращается период восстановления эритронов. Полученные нами данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии Са-дс-РНК, проявляющемся на всех этапах этого процесса. Однако оставался открытым вопрос о механизме включения Са-дс-РНК в систему регуляции эритропоэза при анемии. В данной статье предпринимается попытка дать ответ на этот вопрос.

Материал и методика. Подробное описание экспериментов и методов анализа было приведено ранее [1,4,5,6], поэтому мы ограничимся кратким их изложением. Взрослым белым крысам в течение 3 сут вводили ФГ, в результате чего достигалась острая форма анемии.

Через сутки после завершения инъекций ФГ, т.е. при кризе анемии [1], крысам однократно вводили дс-РНК, выделенную из тотальной РНК дрожжей [11,9] и растворенную в 1%-ном CaCl_2 , или вводили только CaCl_2 . Контролем служили интактные животные и крысы, подвергшиеся воздействию ФГ.

Клетки костного мозга и периферической крови извлекали на 5-8 сут после первой инъекции ФГ. Препараты анализировали с помощью сканирующего цитофотометра SMP 05 с управляющим компьютером IBM PC 386.

Результаты и обсуждение. Конкретные результаты эксперимента были представлены в предшествующем сообщении [1], что позволяет нам в данной статье ограничиться лишь кратким их изложением. Наиболее важным, по нашему мнению, является тот факт, что даже однократное введение Са-дс-РНК при кризе анемии существенно влияет на пролиферативную активность и скорость развития костномозговых клеток. Как было показано, доля делящихся клеток у подопытных крыс в 4 раза больше, чем у интактных, и в 1,5 раза выше, чем у крыс с “чистой” анемией. В связи с этим в костном мозге подопытных крыс в большем числе представлены про- и базофильные

эритробласты. Численность же клеток, находящихся на поздних стадиях развития, ниже, чем при "чистой" анемии. Это свидетельствует об ускорении темпов их развития под влиянием Са-дс-РНК. При этом наблюдается резкое снижение доли микроцитов, играющих важную роль в восполнении численности клеток и титра гемоглобина в крови в начале периода восстановления. Интересно, что распределение эритробластов крови по содержанию ДНК в течение всего этого периода характерно для пролиферирующих популяций. Лишь среди полихроматофильных и ортохромных эритробластов, не размножающихся, как и в норме, и в подавляющем большинстве диплоидных, выявляются вышедшие из цикла в фазе синтеза ДНК гипердиплоидные клетки, как и при "чистой" анемии, образующие фракцию макроцитов, доля которой, из-за резкого снижения числа микроцитов, оказывается даже несколько большей, чем при "чистой" анемии. Следовательно, механизмы гиперрепликации ДНК, обуславливающие формирование макроцитов, и в присутствии Са-дс-РНК сохраняют активность. Значение же микроцитоза становится значительно менее существенным. Естественно, что это обусловлено снижением острой "необходимости" образования большого числа микроцитов на фоне возрастания под влиянием Са-дс-РНК числа делящихся клеток, ускорения созревания и значительного увеличения доли нормальных клеток в костном мозге и периферической крови, а также суммарного содержания в ней гемоглобина [1,5,6]. Между тем у крыс с индуцированной ФГ анемией, которым вводили лишь CaCl_2 , достоверных различий в эритропоэзе, по сравнению с крысами при "чистой" анемии, не выявлено. Так каков же механизм включения Са-дс-РНК в систему регуляции эритропоэза при анемии?

Однозначно ответить на этот вопрос пока достаточно сложно прежде всего потому, что в литературе не обнаружено ни одного исследования, подобного нашему. Однако анализ литературных данных об использовании дс-РНК и их аналогов в качестве активаторов метаболических процессов в клетках различных популяций (большей частью в клетках иммунной системы), результатов попыток некоторых авторов объяснить молекулярные механизмы стимулирующей активности дс-РНК и данных нашего исследования позволяет прежде всего прийти к заключению, что введение дс-РНК вообще и, в частности, Са-дс-РНК не вносит принципиальных изменений в характер внутриклеточного обмена, а лишь стимулирует (или ингибирует) присущие данным клеткам в конкретных ситуациях процессы метаболизма и функциональной активности. В наших экспериментах, как было показано, влияние Са-дс-РНК отражалось на деятельности тех механизмов регуляции, изменения в активности которых происходили и без его воздействия и определялись условиями острой анемии [1,5,6]. Характер этих изменений свидетельствует о том, что введение Са-дс-РНК, по-видимому, затрагивает наиболее ранние звенья в цепи ответных реакций системы кроветворения при острой анемии, развитие которых, основываясь на данных литературы, можно представить следующим образом.

Так, уже достаточно давно установлено, что универсальным

мессенджером между действием гормонов и ферментов, регулирующих активность генов, ответственных за инициацию синтеза ДНК, пролиферации и дифференцировки, и ответными реакциями клеток является цАМФ и что катализирует его образование из АТФ аденилциклаза, обладающая удивительной способностью активизироваться под влиянием гормонов и различных биологически активных веществ, в том числе экзогенного происхождения [7]. Исходя из литературных данных, к таким веществам следует отнести и экзогенные дс-РНК, которые, как это было показано в целом ряде исследований, при введении в организм стимулируют образование и накопление в клетках цАМФ [2]. Есть основания полагать, что и Са-дс-РНК действует таким же образом, стимулируя накопление в клетках цАМФ и повышая активность ферментов, регулирующих синтез ДНК и белков, поскольку ранее в экспериментах на мышах было выявлено стимулирующее влияние на эритропоэз, важную роль в регуляции которого играет эритропоэтин, экзогенных цАМФ и его аналогов [12,13]. В нашем случае роль мессенджера может выполнить только эндогенный цАМФ, активизирующее же действие аденилциклазы может быть реализовано лишь через соответствующие рецепторы клеточной мембраны, ингибирующие ее активность в норме. Диссоциация рецепторов (фосфолипидного компонента) происходит под воздействием фосфолипаз, в регуляции активности которых участвуют дс-РНК [3] и ионы кальция или натрия [7,10]. Исходя из изложенного, механизм влияния экзогенного Са-дс-РНК на эритропоэз при анемии в целом можно представить в виде некоторой последовательности реакций внутри- и надклеточных механизмов регуляции процесса кроветворения. Вначале повышается проницаемость мембран гемопоэтических клеток, стимулируются активность аденилциклазы и накопление в клетках цАМФ, затем происходит активация цАМФ-зависимых киназ, реакций катализа (повышение энергетического ресурса клеток) и, наконец, синтеза ДНК, РНК и белков, что на клеточном уровне проявляется как активация пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток. Из этого следует, что Са-дс-РНК непосредственно воздействует, скорее всего, на индуктивную фазу кроветворения, стимулируя преобразование дополнительного числа покоящихся гемопоэтических стволовых клеток костного мозга в компетентные эритроидные клетки и размножение последних. Это подтверждают данные, представленные в предшествующих сообщениях [1,5,6]. Дальнейшие же события развиваются в рамках программы эритропоэза, изменения в реализации которой, наблюдавшиеся нами (микроцитоз, гиперрепликация ДНК и макроцитоз), зависят от конкретных условий восстановления эритрона после криза анемии в отсутствие или в присутствии Са-дс-РНК.

В связи с изложенным возникает вопрос: может ли оказать какое-то влияние на эритропоэз введение Са-дс-РНК нормальным животным или его воздействие проявляется лишь в условиях острой анемии? Есть сведения о том, что при инкубации колониеобразующих клеток костного мозга мышей с дибутирил-цАМФ повышалась активность включения ядра Н-тимидина, однако увеличение его концентрации в среде приводило к потере эффекта.

Дибутирил-цАМФ не оказывал влияния и на активность синтеза ДНК в стволовых клетках костного мозга при введении нормальным мышам [8]. Эти данные позволяют полагать, что при введении Са-дс-РНК нормальным крысам существенные изменения в процессе эритропоэза маловероятны. Косвенным подтверждением сказанного являются результаты анализа поведения гетерогенной ядерной РНК в нормальных малых лимфоцитах и лейкемических бластных клетках. В лимфоцитах эта РНК обнаруживалась лишь в течение непродолжительного времени, в лейкемических же клетках она преобразовывалась в подобные дс-РНК структуры, устойчивые к действию эндогенных нуклеаз и сохранявшиеся в клетках значительно дольше [14]. Несмотря на то, что эти данные получены на другой модели, можно предположить, что экзогенная дс-РНК, введенная нормальным крысам, также подвергнется деградации под воздействием нуклеаз. Намного более интересен вопрос о том, каким может оказаться эффект введения Са-дс-РНК не при кризе анемии, а до него? Вполне вероятно, что в этом случае острота анемии существенно снизится. Ответ на эти вопросы будет дан в следующих публикациях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аброян Л.О., Каралова Е.М., Захарян Р.А., Карапетян С.А., Магакян Ю.А. Биолог. журн. Армении, 51, 1-2, 30-31, 1997.
2. Земсков В.М., Лидак М.Ю., Земсков А.М., Микстайс У.Я. Низкомолекулярные РНК. Получение, гидролиз и применение в медицине. 201, Рига, 1985.
3. Карагезян К.Г., Захарян Р.А., Овакимян С.С. Биолог. журн. Армении. 40, 12, 979-985, 1987.
4. Магакян Ю.А., Каралова Е.М., Аброян Л.О. Цитология, 35, 8, 17-23, 1993.
5. Магакян Ю.А., Каралова Е.М., Аброян Л.О., Карапетян С.А. Цитология, 39, 8, 705-710, 1997.
6. Магакян Ю.А., Каралова Е.М., Аброян Л.О., Карапетян С.А. Цитология, 39, 8, 711-718, 1997.
7. Федоров Н.А. Регуляция пролиферации кроветворных клеток. 160, М., 1977.
8. Byron J.W. In: Cell Cycle controls. 87-99, N.Y.-L., 1974.
9. Graham F.L. Van der Eb A.J. Virology, 52, 456-461, 1973.
10. Haro, de, C., Herreros, de, A.G., Ochoa S. Cur. Top. Cell Regulation, 27, 63-81, 1985.
11. Kronenberg L.H., Humphreys T. Biochemistry, 11, 2020-2026, 1972.
12. Rodgers G.M., Fisher J.W., George W.J. Proc. Soc. Exp. Biol., 148, 380-382, 1975.
13. Rodgers G.M., George W.J., Fisher J.W. Proc. Soc. Exp. Biol., 40, 977-981, 1972.
14. Torelli U. Acta Haematol, 54, 234-241, 1975.

Поступила 22.IV.1997