

УДК 577.352.5.612.822

ИНДУКЦИЯ Ca^{2+} -дсРНК СИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА В МОЗГУ, ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ 2-5А-СИНТЕТАЗЫ, ПРОТЕИНКИНАЗЫ p67K

ЗАХАРЯН Р. А., ГЕВОРКЯН М. Г.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Интерферон индуцирует в клетке появление активности двух дсРНК-зависимых ферментов рррА (2' р 5' А) синтетазы (2-5А-синтетаза) и специфической протеинкиназы (р67K), фосфорилирующей белок с M_r 67 кД в мышечных клетках и р72K, фосфорилирующей белок с M_r 72 кД в человеческих клетках [1, 2]. Титр интерферона в крови, индуцированного введенным дсРНК, относительно быстро снижается за достаточно короткий период времени. Повышение же активности вышеуказанных ферментов, наблюдаемое в течение относительно долгого времени, свидетельствует о продолжающем специфическом воздействии индуцированного интерферона на те или иные ткани организма [3, 4]. Ca^{2+} -дсРНК впервые *in vivo* был применен нами как эффективный противовирусный препарат, в том числе и при ретровирусном поражении клеток костного мозга [5, 6]. Кальциевый препарат двуцепочечной РНК подавлял сорбцию вируса на плазматической мембране клетки и ингибировал активность фермента обратной ревертазы.

Ранее нами также было показано, что Ca^{2+} -соль дсРНК, полученной из плаценты человека, по сравнению с обычно используемой натриевой формой и с комплексом ДЭАЭ-декстран-дсРНК, индуцировала в мозгу достаточно высокий титр интерферона, по-видимому, проникая в мозг через ГЭБ [7]. Одновременно было также показано, что Ca^{2+} -дсРНК на порядок выше связывается с клетками костного мозга, HeLa, чем натриевая соль и обнаруживается в ядрах практически всех обработанных клеток.

В настоящем исследовании были изучены характер образования эндогенного интерферона, активность ферментов 2-5А-синтетазы, р67K киназы в мозгу мышей при внутрибрюшинном введении различных дсРНК в форме комплекса с Ca^{2+} .

Выбор мозга в качестве исследуемого органа определился его потенциальной возможностью служить органом-мишенью при малиг-

низации, а также вирусной инфекции, включая инфекцию вирусом СПИД.

Ca^{2+} -соль дсРНК получали по описанному ранее методу [8].

Для определения активности 2-5А-синтетазы мозг мышцей гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера при 0° в буфере, содержащем: 10 мМ НЕРЕС рН 7,6; 10 мМ КСl; 2 мМ Mg (CH₃COO)₂; 7 мМ 2-меркаптоэтанол, аprotинин 100 ед/мл.

Таблица

Уровень активности 2-5А-синтетазы (НМ АМР/мг/ч)
и р67К-протеникиназы (ФМ РО₄/мг/ч) в мозгу

Исследуемые ферменты	Контроль	Ca^{2+} -дсРНК		На дсРНК	Интерферон
		через 24 ч	через 56 ч		
2-5 синтетаз	30,2 ± 1,6	88,6 ± 6,5	51 ± 5,7	45,1 ± 5,2	19,2 ± 5,6
р67 протеникиназа	121 ± 25	478 ± 58	24 ± 29	193 ± 17	189 ± 25

Гомогенат оставляли при 4° 15 мин, добавляли NP40 до 0,5%-облучали ультразвуком 10 с и центрифугировали 5000 g 20 мин. Экстракт хранили при -70°. К 200 мкл экстракта (от 1 мг ткани) добавляли 400 мкл буфера: 20 мМ НЕРЕС рН 7,6; 50 мМ КСl, 25 мМ магний ацетат; 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 5 мМ АТР, 10 мМ креатинфосфат, 0,16 мг/мл креатинкиназы; 0,1 мг/мл поли (И)-поли (Ц) и 5 мкл [³H]АТР (0,4 мк Кю/мл). Смесь инкубировали при 30° 90 мин, реакцию останавливали нагреванием в течение 5 мин при 90°. Синтезированный [³H] 2-5А очищали на ДЭАЭ целлюлозе и просчитывали на сцинтилляционном радиосчетчике SL-30 («Intertechnique», Франция).

Активность 2-5А-синтетазы выражали в единицах имоль 2-5А, синтезированного в течение 1 ч на мг ткани.

Активность дсРНК-зависимой протеникиназы р67К определяли в экстракте из мозга мышцей после частичной очистки фермента на поли (И)-поли (Ц)-сефарозе в присутствии генарина (100 ед/мл) по методу, описанному Novalesian и соавт. [9].

В опытах использовали мышцей F-1 (гетерозиготы I поколения СВА и С57 ВlаК), предварительно тестированных на отсутствие интерферона в крови и в мозгу. Препарат Ca^{2+} -дсРНК вводили внутривентриально по 50 мкг/мышь.

Для тестирования исследуемых образцов на присутствие интерферона использовали трансформированную перевиваемую культуру мышечных клеток L-929. Титрование проводили микрометодом, с тест-вирусом, как описано ранее [10].

В качестве индукторов интерферона использовали отечественные препараты модифицированных дсРНК: ридостин, рифастин в форме Ca^{2+} -комплексов, а также Ca^{2+} -низкомолекулярную дсРНК, содержа-

щую до 50 пар оснований из дрожжей, полученную в нашем институте.

Стандартным препаратом служил маркер мышинного интерферона С002-904-511 с активностью 20000 МЕ/мл (Национальный Институт здоровья, США).

На рисунке представлена динамика накопления интерферона в мозгу и сыворотке крови мышей после введения им модифицирован-

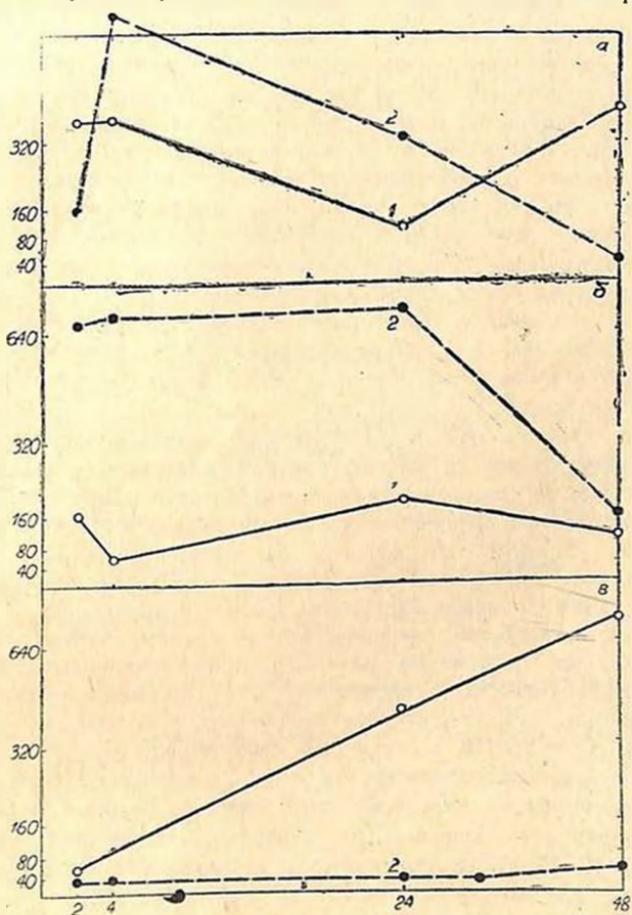


Рис. Динамика накопления интерферона в мозгу и сыворотке крови мышей после введения Ca^{2+} -дсРНК: 50 мкг/мышь Ca^{2+} -дсРНК (рифастин), 50 мкг/мышь Ca^{2+} -дсРНК (ридостин), 50 мкг/мышь Ca^{2+} -дсРНК (ИЭБ). По оси абсцисс—время после индукции, ч; по оси ординат—титры интерферона, 1—мозг, 2—кровь

ной дсРНК в форме Ca^{2+} комплекса. Динамика индукции интерферона не коррелирует с динамикой образования сывороточного интерферона, максимум интерферонообразования в мозговой ткани прихо-

дится на 1—2 сутки, в то время как пик сывороточного интерферона отмечается уже через 4 ч после индукции, и уровень его к 48 ч значительно снижается. Особый интерес представляет кривая интерферонообразования в мозгу после введения комплекса Ca^{2+} -низкомолекулярная дсРНК. Очевидно, что данный индуктор проникает в мозг, где стимулирует относительно автономный синтез интерферона, имеющей тенденцию к нарастанию через 48 ч на фоне незначительного уровня сывороточного интерферона. Как показали отдельно проведенные эксперименты, данная Ca^{2+} -дсРНК обладала на порядок большей противовирусной активностью при заражении мышей вирусом энцефаломиокардита мышей. С целью получения доказательств, свидетельствующих о специфическом воздействии индуцированного интерферона на мозговую ткань, мы изучили активность в мозговой ткани двух дсРНК-зависящих ферментов 2-5А-синтазы и рб7-киназы через 24 и 96 ч после внутривенного введения мышам комплекса Ca^{2+} -низкомолекулярная РНК.

Самкам мышей 2-месячного возраста вводили Ca^{2+} -дсРНК в дозе 50 мкг/мышь, в качестве контроля также использовали мышей, которым вводили интерферон (40000 ед/мышь или Na-дсРНК 50 мкг/мышь).

Как видно из таблицы, Ca^{2+} -дсРНК является достаточно эффективным индуктором ферментных систем, обеспечивающих противовирусную резистентность клетки. Активность последних в мозговой ткани обнаруживалась и через 96 ч после применения Ca^{2+} -дсРНК. Следует отметить, что активность исследуемых ферментов в присутствии индуктора была выше, чем при введении животным интерферона или дсРНК, особенно через 24 ч после введения препарата.

Ранее нами было показано, что активность фермента ревертазы в клетках костного мозга у мышей, инфицированных ретровирусом MULV и получивших препараты Ca^{2+} -дсРНК, ингибировалась на 75% и составляла 25% от активности фермента у мышей, не получивших препарат Ca^{2+} -дсРНК и имеющих явно выраженную иммуносупрессию; подавление активности ревертазы и сорбции вируса MULV на поверхностной мембране клеток-мишеней является одним из механизмов ингибирования процесса ретровирусной инфекции препаратом Ca^{2+} -дсРНК [7, 8], вызывающей целый комплекс биохимических изменений в плазматической мембране клетки [11, 12].

Полученные данные свидетельствуют, что Ca^{2+} форма дсРНК проникает через ГЭБ и индуцирует в мозгу синтез интерферона и активизирует ферментные системы, обеспечивающие противовирусную резистентность.

INDUCTION OF INTERFERON AND ACTIVATION OF 2-5A-SYNTHEASE AND P67K KINASE IN THE BRAIN BY Ca^{2+} dsRNA

ZAKHARYAN R. A., GEVORGYAN M. G.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

Ca^{2+} -double-stranded RNA passes the blood-brain barrier and induces in the brain the synthesis of interferon. It also activates two interferon-related enzymes, 2-5A-synthetase and p67k kinase which phosphorylates a 67 kDa protein.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hovanesian A. G., Riviere Y. *Ann. de Virologie*, v. 131, p. 501—516, 1980.
2. Hovanesian A. G., Moure E., Montegnier L. J. *Interferon Research*, v. 1, p. 179—180, 1981.
3. Riviere Y., Hovanesian A. G. *Cancer Research*, v. 43, p. 4596—4599, 1983.
4. Saron M. F., Riviere Y., Hovanesian A. G., Gullon I. C. *Virology*, v. 117, p. 213—256, 1983.
5. Рухкян Л. А., Захарян Р. А. — В кн.: Лекарственные и биологически активные вещества в животновод. и ветеринар., с. 89—94, Ереван, 1986.
6. Агабалян А. С., Рухкян Л. А., Захарян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 88, № 2, с. 93—96, 1989.
7. Бакунц К. А., Геворкян М. Г., Галстян Г. Г., Захарян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 1, с. 36—41, 1988.
8. Захарян Р. А., Агабалян А. С., Месропян И. А. Экспериментальная онкология, т. 7, № 3, с. 54—56, 1985.
9. Hovanesian A. G., Riviere Y., Krust B. *Ann. Biochem.*, v. 129, p. 349—356, 1983.
10. Cambell J., Gan. *J. Microbiol.*, v. 21, p. 1247—1253, 1975.
11. Ruchkian L. A., Zakharian R. A. IV International Congress of Cell Biology Montreal, Abstr. p. 5, 1, 6, 1988.
12. Карагезян К. Г., Захарян Р. А., Овакимян С. С. Биол. журн. Армении, т. 40, № 12, с. 979—985, 1987.

Поступила 17. VIII. 1990