

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Базян А. С. Успехи соврем. биол., т. 92, № 4, с. 115—125, 1981.
2. Базян А. С., Бродский Б. Л. Биофизика, т. 28, № 5, с. 858—862, 1983.
3. Базян А. С. Биофизика, т. 29, № 3, с. 470—472, 1984.
4. Базян А. С., Кругликов Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 172—179, 1986.
5. Базян А. С., Беркинблит М. Б., Бродский Б. Л. Биофизика, т. 29, № 5, с. 895—898, 1984.
6. Базян А. С., Майсов Н. И. Успехи соврем. биол., т. 96, № 6, с. 435—450, 1983.
7. Старк К.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), с. 135—176, М., Медицина, 1982.
8. Shenoy A. K., Ziance R. J. Life Sci., v. 24, № 3, p. 255—264, 1979.

Поступила 12. II 1986

УДК 577.352.5:612.822

ДЕЙСТВИЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК НА МЕМБРАННЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕЙСМЕКЕРНОГО НЕЙРОНА

ЗАХАРЯН Р. А., РЫЧКОВ Г. Е., ДАДАЛЯН С. С., БАКУНЦ И. С.,
АГАБАЛЯН А. С., РУХКЯН Л. А., АПРАПЕТЯН С. Н.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Изучено действие двухцепочечной РНК (дцРНК) на пейсмерную активность нейрона РРА1 ЦНС виноградной улитки. Исследована зависимость действия дцРНК на активность идентифицированных нейронов от содержания Ca^{2+} , K^{+} и Cl^{-} в перфузирующем растворе. Показано, что дцРНК существенно увеличивает амплитуду колебаний мембранного потенциала, что сопровождается значительным увеличением амплитуды фазы межпачковой гиперполяризации. Действие дцРНК может быть опосредовано активацией Na^{+} -насоса и увеличением входа Ca^{2+} внутрь клетки.

В настоящее время дцРНК рассматривается не только как индуктор интерферонов, но и как модулятор различных биохимических реакций, протекающих в клетке и зависящих, по крайней мере, от двух процессов, индуцируемых дцРНК в клетке: 1) активация синтеза (2'—5')-олигоаденилата, в свою очередь активирующего латентную РНКазу-Н [1]; 2) индукция дцРНК-зависимой протеникиназы, фосфорилирующей фактор инициации eI_1-2 [2]. Установлена тесная функциональная связь между регуляторными системами клетки, зависящими от 3', 5'-сАМР (сАМР) и (2'—5')-олигоаденилата [3].

Показано, что дцРНК является стимулятором первичного и вторично-гуморального ответов [4, 5]. Хотя препараты РНК используются при лечении разных заболеваний—тапето-ретиальной дистрофии, язвы желудка, бронхиальной астмы, пневмонии, трофических язв [6, 7], мембранный механизм действия остается практически не изученным.

Наряду с этим известно, что пейсмерная активность клетки играет важную роль в поддержании общего физиологического тонуса организма, так как пейсмерной активностью обладают такие жизненно важные органы, как сердце, кровеносные сосуды, гладкая мускулатура внутренних органов, ряд нервных образований в мозгу животного. Общепринятой моделью для исследования пейсмерной активности являются экспериментально легкодоступные специальные нейроны в ЦНС виноградной улитки, нейрон RPa1 по классификации Шаланки и Сахарова [8], так называемый «параболический» пейсмерный нейрон, который отвечает вспышкообразной гиперактивностью, прерывающейся кратковременными гиперполяризациями мембраны.

Изучение действия дцРНК на характеристики пейсмерной активности нейрона, с одной стороны, позволит предсказать характер действия дцРНК на пейсмерную активность клеток и органов, а с другой—приблизит нас к пониманию мембранных механизмов, лежащих в основе действия дцРНК на клетку.

Материалы и методы

Методы получения, фракционирования и концентрирования дцРНК из дрожжей и внутриклеточной регистрации электрической активности гигантского нейрона улитки описаны нами ранее [9, 10]. Зависимость входа Ca^{2+} от концентрации дцРНК определяли с помощью изотопа ^{45}Ca . Предварительно взвешенные ганглии инкубировали при 20° по 5 штук в течение часа в 2 мл раствора Рингера, pH 7,8, содержащего дцРНК и 5 мкл $^{45}CaCl_2$ с активностью 12,5 мКи. После инкубации ганглии 3-кратно промывали по 8 мин в нормальном растворе Рингера. Промытые ганглии растворяли в течение суток в растворе KOH. Для подсчета количества вошедшего изотопа использовался сцинтиллятор Брея и счетчик RGT (ГДР), настроенный на изотоп ^{45}Ca . Используемый физиологический раствор, в котором находился изолированный ганглий, содержал (в мМ): NaCl—85, KCl—4, $CaCl_2$ —8, $MgCl_2$ —10, трис-HCl—10, глюкозы—5.

Содержание сАМР оценивали в ганглиях радиоиммунологическим методом с использованием стандартного набора для определения сАМР фирмы «Amersham» (Англия). Измерение радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-30» (Франция) с использованием стандартного диоксано-вого сцинтиллятора.

Результаты и обсуждение

Препарат дцРНК добавляли в перфузирующий физиологический раствор в концентрации 2 мкг/мл. На рис. 1, а, представлена запись электрической активности клетки RPa1, произведенная на самописце КСП—4, где темными участками изображена пачечная активность клетки, а направленные вниз гиперполяризационные фазы соответствуют межпачковой гиперполяризации клетки. Как видно из рис. 1, б, добавление в среду дцРНК приводит через 20 мин к резкому увеличению амплитуды колебания мембранного потенциала, которое сопровождается значительным возрастанием амплитуды межпачковой гипер-

поляризации и урежением ее частоты. При удалении из среды дцРНК отмечается полное восстановление электрической активности (рис. 1, в).

Увеличение амплитуды колебания мембранного потенциала, вызванное дцРНК, может быть отнесено за счет специфического воздействия дцРНК, а также, что мало вероятно в условиях нашего эксперимента, за счет эффекта смеси нуклеотидов или олигонуклеотидов—продуктов возможного ферментативного распада дцРНК. Известно, что дцРНК относительно стабильна к РНКазам; более того, дцРНК в растворе Рингера образует с Ca^{2+} микро-Са-преципитат РНК, который не подвержен деградации РНКазам. Тем не менее, устойчивость приме-

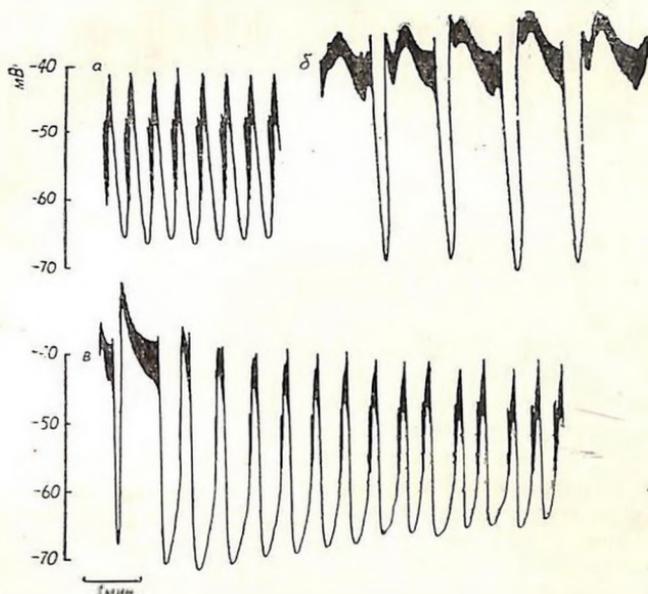


Рис. 1. Действие дцРНК на пейсмекерную активность нейрона RPa1. Электрическая активность нейрона в условиях: а—нормального физиологического раствора; б—через 20 мин после добавления в перфузирующий раствор дцРНК; в—через 10 мин после начала отмывки препарата

няемого Са-дцРНК комплекса к РНКазам нами тестирована, и нативность обработанного РНКазам препарата установлена электрофоретически в 1%-ном агарозном геле и 10%-ном ПААГ. Более того, препарат дрожжевой РНК после удаления из его состава дцРНК, использованный в тех же количествах, что и дцРНК, то есть 2 мкг/мл, оказался не эффективным в плане индукции увеличения амплитуды колебания мембранного потенциала.

Таким образом, одновременно отпадает и вариант индукции эффекта за счет неспецифического действия продуктов возможного распада РНК, в противном случае должна была бы проявиться актив-

ность смеси олигонуклеотидов от распавшейся дрожжевой РНК, не содержащей дцРНК.

Таким образом, действие дцРНК специфично для проявления эффекта необходимо постоянное ее присутствие в среде. Hamburg и соавт. [11] на другом объекте также показали, что активация макрофагов дцРНК нуждается в постоянном присутствии в среде активатора.

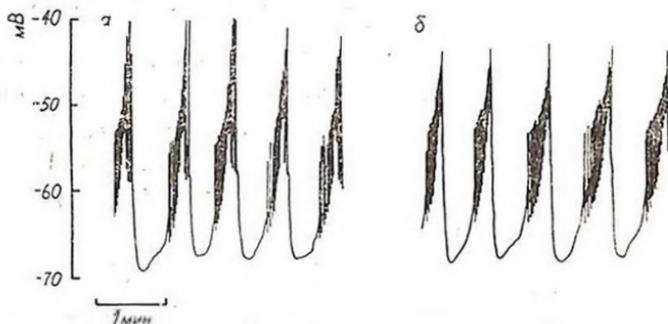


Рис. 2. Действие дцРНК на пейсмекерную активность нейрона RPa1 в условиях холода. а—активность нейрона в отсутствие препарата; б—через 30 мин после добавления в раствор дцРНК

Известно, что пейсмекерная активность клетки в значительной мере зависит от её метаболической активности [12]. Для выяснения, является ли действие дцРНК на пейсмекерную активность клетки следствием изменения метаболических или пассивных свойств мембраны, была изучена температурная зависимость действия дцРНК на пейсмекерную активность. Оказалось, что на холоду (7°) дцРНК не вызывала сколько-нибудь заметного изменения пейсмекерной активности клетки (рис. 2). Поскольку на холоду, когда имеет место деполяризация мембраны (5—7 мВ), метаболические процессы подавляются больше, чем диффузные, то можно предполагать, что дцРНК осуществляет свое действие на пейсмекерную активность через метаболическую активность клетки.

Ранее нами было показано, что Na^{+} -насос является модулятором пейсмекерной активности клетки [10, 13]. Для определения возможной активации Na^{+} -насоса дцРНК, которая и обуславливает повышенную гиперактивность пейсмекерного нейрона, изучали его действие на пейсмекерную активность клетки в условиях инактивации Na^{+} -насоса бескальциевым раствором или уабаином (10^{-4} М).

Предыдущими работами было показано, что после предварительной инкубации нейрона в бескальциевой среде при их реинкубации в физиологическом растворе, содержащем нормальную концентрацию K^{+} наблюдается кратковременная гиперполяризация мембраны, обусловленная активацией работы электрогенного натриевого насоса [10]. Как видно из рис. 3, в присутствии дцРНК амплитуда указанной ги-

перполяризации существенно образом увеличивалась, что свидетельствует об активации диРНКазной работы электрогенного Na^+ -насоса.

При исследовании действия диРНК на пейсмекерную активность клетки в условиях инактивации Na^+ -насоса [10] оказалось, что как в условиях холода, так и в бескальциевом и убаинсодержащем растворах стимулирующий эффект диРНК на гиперполяризацию отсутствовал.

Тот факт, что эффект диРНК на пейсмекерную активность клетки на ее конечной фазе отсутствует в условиях выключения работы Na^+ -насоса, позволяет предположить, что модуляционное действие диРНК опосредовано через работу Na^+ -насоса. В пользу этого представления свидетельствуют полученные нами ранее данные [10] о том, что в норме при охлаждении, в бескальциевой среде в присутствии убаина происходит частичное или полное подавление межпачковой гиперполяризации мембраны.

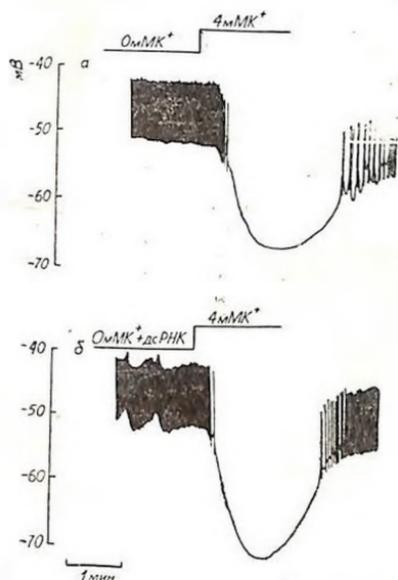


Рис. 3. Действие диРНК на насос-вызванную гиперполяризацию мембраны нейрона RPa1 после инкубации ганглия в бескальциевом растворе в течение 30 мин: а—в отсутствие препарата; б—после инкубации в бескальциевом растворе, содержащем диРНК

Таким образом, по-видимому, можно заключить, что усиление гиперполяризации пейсмекерного нейрона, вызванное диРНК, есть результат стимуляции работы Na^+ -насоса. В пользу такого представления свидетельствуют также полученные нами ранее данные о том, что электрогенный Na^+ -насос может играть триггерную функцию в генерации пейсмекерной активности клетки [14].

Другим метаболическим механизмом, обуславливающим стимулирующее действие диРНК на пейсмекерную активность клетки, может служить система сАМР клетки, модулирующая вход Ca^{2+} в нейрон

через кальциевые каналы [15] и Na/Ca^{2+} -обмен [16]. В связи с этим в последующей серии экспериментов мы исследовали как зависимость действия диРНК на пейсмекерную активность — клетки от наружной концентрации Ca^{2+} , так и действие диДНК на суммарный вход ^{45}Ca в клетку, а также влияние диРНК на содержание сАМР в нервных ганглиях.

Оказалось, что латентный период действия диРНК на пейсмекерную активность нейрона в значительной степени зависит от концентрации Ca^{2+} в среде (рис. 4). При увеличении концентрации Ca^{2+} в растворе от 8 до 16 мМ латентный период действия диРНК сокращается с 20 до 8 мин. Следует отметить, что при этом укорачивается и время, необходимое для восстановления нормальной активности клетки после удаления препарата из среды. При уменьшении же концентрации Ca^{2+} в среде до 1 мМ вышеуказанный эффект диРНК отсутствовал. Одновременно было показано, что диРНК стимулировала вход ^{45}Ca внутрь клеток при 1-часовой инкубации нервных ганглиев улитки в нормальном физиологическом растворе, содержащем ^{45}Ca . После удаления внесклеточного ^{45}Ca ганглии содержали 1503 ± 109 в норме и 2108 ± 99 имп/мг влажного веса в присутствии в инкубационной среде 2 мкг/мл диРНК.

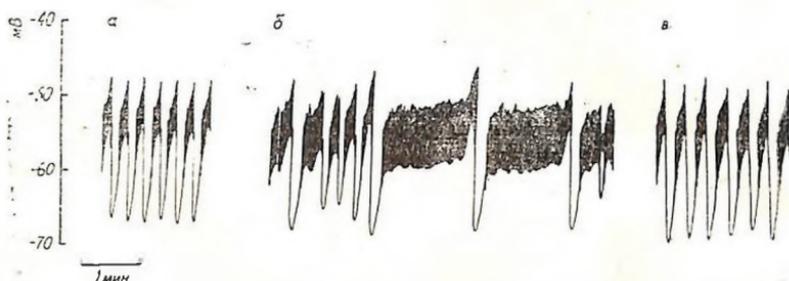


Рис. 4. Действие диРНК на пейсмекерную активность нейрона RPa1 в растворе, содержащем 16 мМ Ca^{2+} . а—активность нейрона в отсутствие препарата; б—через 8 мин после добавления в раствор диРНК; в—через 7 мин после начала отмывки препарата

Убаин (10^{-4} М) хотя и не оказывал существенного влияния на вход ^{45}Ca в норму (1418 ± 69 имп/мг влажного веса), полностью снимал стимулирующий эффект диРНК на вход ^{45}Ca в клетку (1442 ± 53 имп/мг влажного веса), вход которых в клетку обеспечивается как через потенциалзависимый Ca^{2+} -канал, так и через Na^+ , Ca^{2+} -обмен. По-видимому, подавляющий эффект убаина на диРНК-вызванное увеличение входа Ca^{2+} можно объяснить тем, что, как было показано Аугарстуап и соавт. [17], при действии убаина в результате подавления Na^+ -насоса увеличивается внутриклеточное содержание АТФ, которая в свою очередь подавляет средство хеморецепторов мембраны к своим лигандам в результате их фосфорилирования.

Эти данные позволяют заключить, что для осуществления действия дцРНК на пейсмекерную активность клетки важную роль играют также ионы кальция. Известно, что в некоторых случаях уабани стимулирует вход Ca^{2+} внутрь клетки [18—20]. Это объясняется уменьшением Na^+ -градиента на мембране в результате инактивации Na^+ -насоса. Очевидно, что этот эффект четко выявляется в клетках, в которых имеется высокая исходная проницаемость для Na^+ , например, в срезах головного мозга млекопитающих (*in vitro*). Отсутствие достоверного сдвига входа Ca^{2+} при действии уабани в условиях нашего эксперимента, по-видимому, можно объяснить относительно низкой проницаемостью мембраны нейронов виноградной улитки для Na^+ . Однако данное предположение нуждается в экспериментальной проверке на обоих объектах. Можно предположить, что дцРНК в нейронах увеличивает количество сАМР, которая в свою очередь стимулирует вход Ca^{2+} именно через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен, функционирующий преимущественно в период покоя нейрона.

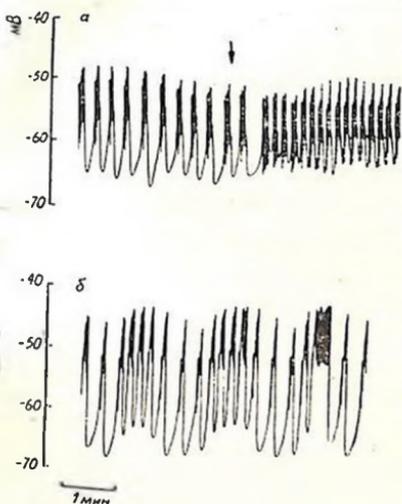


Рис. 5. Действие дцРНК на пейсмекерную активность нейрона RPa1 в растворе, содержащем 50 мМ Cl^- . а—активность нейрона в нормальном физиологическом растворе и в растворе с низким содержанием Cl^- (смена растворов обозначена стрелкой); б—активность нейрона в растворе, содержащем 50 мМ Cl^- через 20 мин после добавления дцРНК

Это предположение подтверждается данными относительно действия дцРНК на содержание сАМР в нейронах. Оказалось, что содержание сАМР, выраженное в пмоль/мкг белка в норме (контроль), составляло $7,50 \pm 0,82$, а после 20 мин инкубации ганглиев в растворе, содержащем дцРНК, количество сАМР достигало $22,87 \pm 1,34$. Интересно отметить, что как и в случае электрофизиологического эксперимента, при действии дцРНК в отсутствие K^+ (в бескальневой среде уровень сАМР составлял $30 \pm 0,73$) содержание сАМР в клетках также уменьшалось ($13,88 \pm 1,53$).

В другой серии экспериментов была исследована зависимость действия дцРНК на пейсмекерную активность нейрона от содержания Cl^- в перфузирующем растворе. Снижение концентрации Cl^- до

50 мМ путем замены NaCl на ацетат натрия в исходном физиологическом растворе (рис. 5) не изменяло характер действия дцРНК на активность клетки. Как и в нормальном физиологическом растворе, в этом случае также увеличивалась амплитуда межпачковой гиперполяризации и количество импульсов в пачке.

Таким образом, дцРНК является высокоактивным мембранным препаратом, стимулирующим амплитуду колебаний мембранного потенциала пейсмекерного нейрона на основе как активации электронного Na⁺-насоса, так и повышения содержания сАМР в клетке, сопровождающегося увеличением входа Ca²⁺ внутрь клетки.

EFFECT OF DOUBLE-STRAND RNA ON THE MEMBRANE OF PACEMAKER NEURON

ZAKHARIAN R. A., RICHKOV G. E., AGABALIAN A. S., DADALIAN S. S., BAKUNTS I. S., RUKHIKIAN L. A., AYRAPETYAN S. N.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of Armenian SSR, Yerevan

The action of ds-RNA on pacemaker activity in neuron RPa-1 from *Helix pomatia* central nervous system has been studied.

The dependence of ds-RNA action on the activity of nerve cells from Ca, K and Cl ions in the perfusion solution was investigated.

It was shown that ds-RNA is a powerful membrane-active preparation, which stimulates the pacemaker activity of neuron, activating the sodium pump, and increasing Ca ions influx into the cell.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ratner L., Wiegand R. C., Farrel P. G., Sen G. C., Carber B., Lengyel P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 81, p. 947—952, 1978.
2. Farrel P. G., Sen G. C., Dubois M. F., Ratner L., Lengyel P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Biol. Sci., v. 75., p. 893—897, 1978.
3. Kripsin M. U., Parfenova M. M., Itkes A. V., Balandin I. G., Kuznetsov V. P., Severin E. S. Biochem. Int., v. 8, № 1, p. 159—164, 1984.
4. Mathe G., Florentin I., Olsson L., Bruely-Rosset M., Schultz J., Kiger M., Orbach-Arboyas S., Schwazzenberg L., Pinittart P., Wassal F. Cancer Treat Rep., v. 62, p. 1613—1621, 1978.
5. Han I. H., Johnson A. G. J. Immunol., v. 117, p. 423—427, 1976.
6. Земсков А. М., Повторов В. М., Никитин А. В. Антибиотики, т. 11, с. 853—855, 1979.
7. Земсков А. М., Земсков В. М., Передерий В. Г. Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол., т. 9, с. 9—13, 1983.
8. Sakharov D. A., Salanki J. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., v. 35, p. 19—30, 1969.
9. Захарян Р. А., Месропян Н. П., Мовсесян А. В., Лебядяня А. С., Акопян Ж. Н. Экспериментальная онкология, т. 7, № 3, с. 54—56, 1985.
10. Ayrapetyan S. N. Neurobiology of Invertebrates (ed. J. Salanki), p. 353—376, Budapest, 1975.
11. Hamburg S. I., Fliet H. B., Unkeless J. C., Rabinovitsch M. Ann. N. Y. Ac. Sci., v. 350, p. 72—91, 1980.

12. *Chalazonitis N., Arvanitaki A.* Adv. Biochem. Psychopharmacology, v. 2, p. 245—284, 1970.
13. *Kojima M., Ayrapetyan S. N., Koketsu K.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 77A, p. 577—583, 1984.
14. *Айрапетян С. Н.* Биофизика, т. 14, № 5, с. 768—771, 1979.
15. *Kostyuk P. G.* Biochim. et biophys. acta, v. 621, p. 128—150, 1981.
16. *Bittar E. E.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 76A, p. 763—771, 1983.
17. *Ayrapetyan S. N., Arvanov V. L., Maginyan S. B., Azatyan K. V.* Cell. and Molecular Neurobiology, v. 5, № 3, p. 231—243, 1985.
18. *Глебов Р. Н.* Укр. биохим. журн. т. 55, № 4, с. 460—465, 1983.
19. *Глебов Р. Н.* Успехи физиол. наук, т. 15, № 3, с. 83—90, 1984.
20. *Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.

Поступила 26. XI 1985

УДК 547.781

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА И АКТИВНОСТЬ ДИАМИНОКСИДАЗЫ ПРИ ТЕРМИНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ, ВОССТАНОВЛЕНИИ ЖИЗНЕННЫХ ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА И ДЕЙСТВИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

ХАЧАТРЯН Г. С., ВАРТАНЯН Г. Г.

Филиал ВНИИ гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров и пластических масс, Ереван

Изучены распределение гистамина в различных отделах мозга и активность диаминооксидазы при экспериментальной клинической смерти и в восстановительном периоде. При смертельном кровопускании отмечается значительное снижение концентрации гистамина в лобной доле и гипоталамической области и повышение в стволовой части и теменно-височной доле коры мозга. При клинической смерти содержание гистамина резко понижено в лобной доле, гипоталамической области, теменно-височной и затылочной долях, за исключением стволовой части, в которой уровень гистамина повышен. Нормализация уровня гистамина в изученных отделах в постреанимационном периоде протекает циклично и выравнивается после 80-й мин оживления. Активность диаминооксидазы в мозгу при смертельном кровопускании повышена и находится в прямой зависимости от концентрации гистамина. При клинической смерти активность фермента падает почти в 2 раза параллельно с резким понижением содержания гистамина и остается на низком уровне в начале восстановительного периода и лишь на 80-й мин после оживления приближается к уровню контроля. Введение в кровь адепозина и гуанозина значительно ускоряет нормализацию уровня гистамина в мозгу.

При терминальных состояниях важное значение приобретает изучение молекулярных основ нарушения компенсаторно-приспособительных реакций ЦНС и повреждения морфофункциональных структур головного мозга с целью выработки укороченных методов восстановления жизненных функций организма.