

УДК 577.2.575

БИОХИМИЯ

К. А. Бакунц, М. Г. Геворкян, Г. Г. Голстян, Р. А. Захарян

Индукция интерферона дцРНК плаценты человека

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагезяном 6/VII 1987)

Круг известных синтетических и природных индукторов интерферона в настоящее время достаточно широк. Вместе с тем ни один из известных интерферогенов не отвечает тем критериям, которые предъявляются к этим веществам в практической медицине как к препаратам профилактического или лечебного действия. Наиболее перспективным на сегодня является получение и изучение индукторов интерферона на основе полирибонуклеотидов—двухцепочечных РНК, являющихся наиболее эффективными (1,2).

Целью настоящей работы явилось изучение в эксперименте на мышцах способности к индукции интерферона дцРНК плаценты человека. Одновременно была изучена активность данной дцРНК в форме Ca^{2+} преципитата, устойчивого к нуклеазному расщеплению (3).

Препарат дцРНК был выделен из плаценты человека горячей фенольной экстракцией при 65°C (4). Плаценту гомогенизировали с помощью двухножевого гомогенизатора МР 324 в 0,14 М NaCl. Выделенные ядра суспендировали в 0,14 М NaCl и дважды депротенизировали фенолом рН 6,0 при 65°C 20 мин при интенсивном встряхивании. Один раз депротенизацию провели в присутствии хлороформа. РНК осадили спиртом, осадок растворили в 2XSSC и обработали РНК-азой (50 мкг/мл). Двухспиральную РНК отделяли на колонке с немодифицированной целлюлозой элюцией буфером TES (0,01 М NaCl, 0,001 М ЭДТА, 0,05 М трис HCl рН 6,9) (5). Фракцию, содержащую дцРНК, осадили спиртом и хранили при -15°C.

Использовали кальциевую форму препарата дцРНК, которую получали по методу, описанному ранее (6), и дцРНК в комплексе с ДЭАЭ декстраном в соотношении 1:5.

Интерферониндуцирующую активность препарата дцРНК изучали на мышцах линии СВА, противовирусное действие—на белых беспородных.

Интерферон определяли в сыворотке крови и экстрактах мозговой ткани мышей через определенные сроки после внутрибрюшинного введения животным препарата в дозе 50 мкг/мышь.

Выделение интерферона из мозга проводили по известному методу (7). Титрование интерферона проводили на пластиковых микропанелях по подавлению цитопатического действия вируса энцефаломиокардита мышей (ЕМС) на клетках L-929 (8). За титр интерферона

принимали то максимальное разведение, которое защищало клетки от цитодеструктивного действия вируса на 50%.

Концентрацию циклических нуклеотидов определяли радиоиммунным методом (9), используя стандартный набор реактивов «Amersham».

Рядом авторов было показано, что при добавлении к клеткам в различных интерферониндуцирующих системах избыточных концентраций ионов Ca^{2+} интенсивность индукции интерферона двуспиральными полинуклеотидами существенно повышается. Возможными факторами стимуляции рассматриваются: стабилизация кальцием молекулы полинуклеотида при контакте с клеточной поверхностью, повышение синтеза и интенсивности трансляции мРНК интерферона, блокирование активности репрессора интерферонообразования (10, 11).

Ранее нами в экспериментах *in vitro* на модельных системах было показано, что дцРНК является мембранно-активным соединением, в основе действия которого лежат механизмы, связанные и с активацией трансмембранных токов экстрацеллюлярного Ca^{2+} , более выраженных при использовании индуктора в форме Ca^{2+} преципитата (12, 13). Целесообразность использования дцРНК в виде преципитата Ca^{2+} в экспериментах *in vivo* следует также и из большей устойчивости данного комплекса к нуклеазам, в том числе и специфическим нуклеазам, гидролизующим полинуклеотид (14).

Интерферониндуцирующая активность кальциевой формы дцРНК плаценты была исследована на мышах линии СВА. Динамика накопления интерферона в мозгу и сыворотке крови индуцированных животных показана на рис. 1, 2.

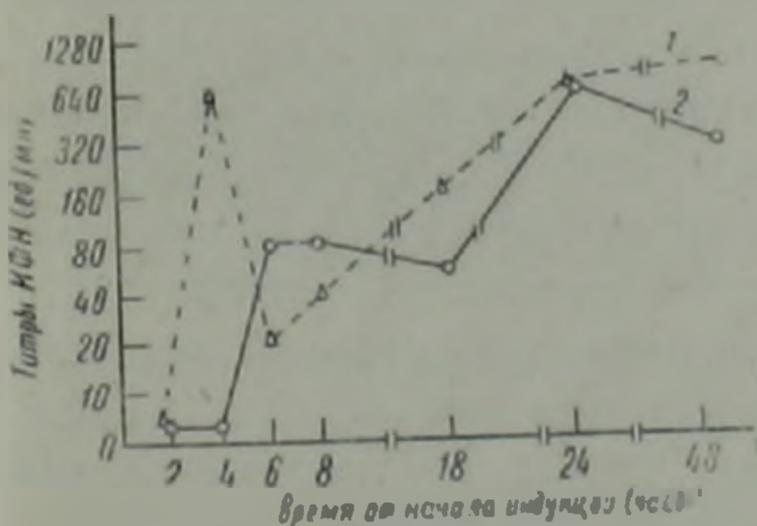


Рис. 1. Динамика накопления интерферона в мозгу (1) и сыворотке крови (2) мышей в ответ на введение Ca^{2+} дцРНК плаценты

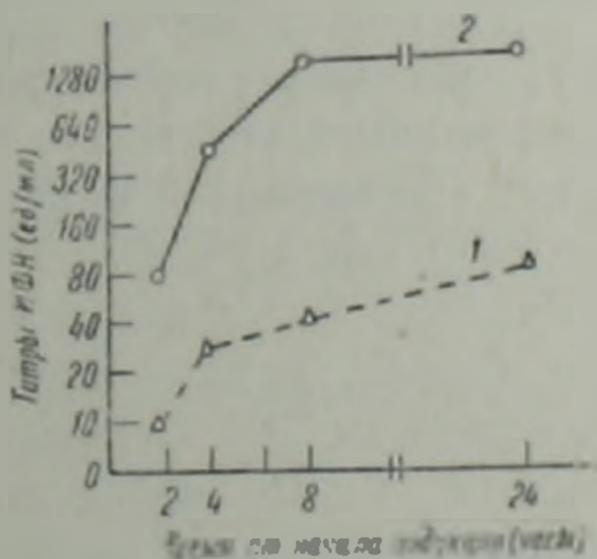


Рис. 2. Динамика накопления интерферона в мозгу (1) и сыворотке крови (2) мышей в ответ на введение плацентарной дцРНК с ДЭАЭ декстраном

Образование интерферона в мозгу мышей, которым вводилась Ca^{2+} дцРНК, протекало довольно интенсивно (рис. 1, кривая 1). Первый ранний пик интерферонообразования наблюдался через 4 ч после индукции и составлял 640 ед/мл. В период между 6—8 ч происходит заметный спад продукции интерферона до 20—40 ед/мл, по-видимому, обусловленный развитием состояния гипореактивности в клетках. Ин-

тервал между 8—24 ч характерен постепенным восстановлением синтеза интерферона, обусловленного, по всей вероятности, наличием активного индуктора, циркулирующего в тканях мозга, а также постепенным уменьшением уровня фактора гипореактивности (репрессора продукции интерферона).

Второго—позднего пика (640 ед/мл) продукция интерферона достигает через 24 ч после индукции и сохраняется на этом уровне до конца срока наблюдения—до 48 ч.

Параллельно у тех же животных была определена активность сывороточного интерферона (рис. 1, кривая 2). Согласно приведенным на рисунке данным, интерферон с активностью 80 ед/мл начинает секретироваться в кровь через 6 ч после введения мышам препарата. Продукция достигает максимума—640 ед/мл через 24 ч после индукции. При сопоставлении этих двух кривых видно, что ранний интерферон, продуцируемый мозговой тканью, практически не переходит через гематоэнцефалический барьер в кровь.

Исходя из стимулирующего эффекта ДЭАЭ декстрана на интерферониндуцирующую активность дцРНК (¹⁵), на другой группе животных была испытана дцРНК плаценты с полианионом. Из рис. 2 следует, что в крови имеет место активная продукция интерферона с титрами 320—640 ед/мл уже через 4 ч после индукции с максимумом накопления через 8 ч от начала эксперимента. Накопление же интерферона в мозгу протекает довольно слабо (40—80 ед/мл), по всей видимости, из-за того, что комплекс дцРНК-ДЭАЭ декстран с трудом проникает через гематоэнцефалический барьер. В данном случае не исключена возможность переноса малых количеств сывороточного интерферона в мозг с током крови.

Пролонгированное действие Ca^{2+} -дцРНК является, по-видимому, следствием стабильности молекулы к нуклеазному расщеплению и относительно медленного разрушения индуктора в организме животного, а повышенной вторичной индукции интерферона благоприятствует, скорее всего, возрастание в клетке уровня цАМФ, входа экстрацеллюлярного Ca^{2+} , индуцируемого преципитатом Ca^{2+} -дцРНК (¹⁶).

Особый интерес представляют вопросы, касающиеся механизма действия дцРНК. Согласно полученным нами ранее данным (¹⁷), Ca^{2+} -дцРНК *in vitro* эффективно пересекает барьер плазматической мембраны, проникает в клетки и обнаруживается в ядрах.

В то же время препарат модифицирует мембранно-зависимые процессы, протекающие в клетке. В частности, контакт дцРНК с тканями мозга как *in vivo*, так и *in vitro* способствует увеличению уровня цАМФ в клетках в 2—3 раза (табл. 1). В соответствии с приведенными в таблице данными действие индуктора наиболее выражено проявляется через 30 и 90 мин после введения дцРНК *in vivo* и к 30, 45 мин в условиях *in vitro*.

Полученная кинетика свидетельствует, что повышение уровня цАМФ предшествует индукции интерферона в мозгу и в условиях *in vivo* носит двухфазный характер. Из литературных источников известно, что относительно высокий уровень цАМФ в клетке потенцирует противовирусное состояние клеток, вызываемое интерфероном (¹⁸). На

Действие Ca^{2+} дцРНК плаценты на уровень цАМФ

Длительность обработки клеток, мин	Условия проведения эксперимента	
	in vivo	in vitro
Контрольные клетки	1,95; 1,8	1,24; 1,32
30	3,42; 4,2	3,15; 4,65
45	Н. Д.	3,05; 4,05
60	2,26; 3,3	Н. Д.
90	3,75	1,32
120	2,05*	1,38

* Количество цАМФ, выраженное в нМ/г мозга.

рис. 3 изображена радиоэлектрофорграмма фосфорилированных по γ [^{32}P] АТФ в присутствии дцРНК белков плазматической мембраны клеток головного мозга. Полученный спектр молекулярных масс фосфорилированных белков в целом близок к полученному ранее для белков

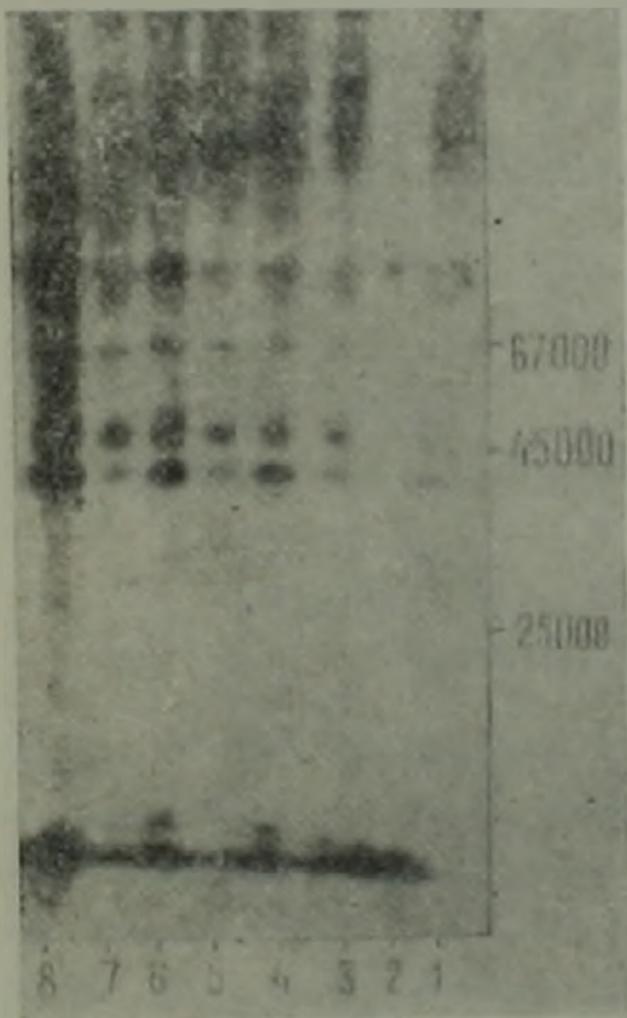


Рис. 3. Авторадиография электрофореграммы мембранных белков, фосфорилированных γ [^{32}P] АТФ в присутствии дцРНК, слева направо: 1,3,5,7 — фосфорилирование в отсутствие дцРНК (контроль); 2, 4, 6, 8 — фосфорилирование в присутствии дцРНК за 5, 10, 20, 30 мин соответственно.

фракции мозга по цАМФ-зависимому фосфорилированию. Представленные результаты в совокупности с полученными ранее данными (12 , 13) показывают, что индукции интерферона предшествуют изменения в метаболизме плазматической мембраны: увеличение цАМФ, стимуляция трансмембранных токов экстрацеллюлярного кальция, повышение уровня фосфорилирования белков плазматической мембраны (12 , 13), — являющиеся частью системы, обеспечивающей индукцию интерферона и противовирусную защиту клетки.

Противовирусное действие Ca^{2+} дцРНК плаценты изучали при экспериментальной вирусной инфекции, вызванной вирусом ЕМС. В табл. 2 приведены данные по защитному действию препарата на животных. Они получены на 10-й день после заражения животных летальной дозой ЕМС. Как следует из этих данных, при введении препарата за 4—24 ч до вируса выживаемость животных повышалась до 52—48%, степень защиты по сравнению с контролем составляла 34—

Противовирусное действие Ca^{2+} дцРНК на мышах (вирус ЭМК)

Индуктор	Время введения индуктора до заражения, час	Выживаемости, %	Степень защиты	P
—		18		
дцРНК	4	52	34	0.01
дцРНК	24	48	30	0.01
Ca^{2+} дцРНК	24	72	50	0.01

30%. Индуктор же, вводимый в форме Ca^{2+} преципитата, оказался более эффективным, что выражалось в повышении выживаемости до 72% и степени защиты до 50%.

Исходя из представленных данных относительно интерферониндуцирующего и противовирусного действия Ca^{2+} дцРНК плаценты на экспериментальных животных, можно рекомендовать кальциевую форму дцРНК различного происхождения при профилактике вирусных заболеваний, в частности, поражающих нервную систему. Более того, в отличие от комплекса ДЭАЭ-декстран-дцРНК кальциевая форма полинуклеотида способна преодолевать гематоэнцефалический барьер.

Институт экспериментальной
биологии Академии наук Армянской ССР

Կ. Ա. ԲԱԿՈՒՆՅ, Մ. Գ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Հ. Գ. ԳԱԼՍՏՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

Ինտերֆերոնի ինդուկցիան մաքուր ընկերֆից
անջատված Երկշղթանի ՌՆՔ-ով

Կիրառվել է մաքուր ընկերֆից մաքրված Երկշղթանի ՌՆՔ-ի կալցիումական ձևի օրոք է տրված, որ ինտերֆերոնի ինդուկցիայի հարցում այն ունի երկարացված ազդեցություն, որն ըստ երևույթին բացատրվում է նրա կայունությամբ: Երկշղթա ՌՆՔ-ի կալցիումական ձևը in vitro փորձի պայմաններում արդյունավետորեն անցնում է պլազմատիկ թաղանթի արգելքը և նստաստում է բջիջներում ցիկլիկ ԱՄՖ-ի քանակի զգալի բարձրացմանը՝ 2—3 անգամ: Երկշղթա ՌՆՔ-ի կալցիումական ձևը in vivo փորձի պայմաններում անցնում է հեմատոէնցեֆալիկ արգելքը և կենդանիների ուղեղում խթանում ինտերֆերոնի բավականին բարձր մակարդակ:

Ի մի բերելով ստացված արդյունքները՝ ինտերֆերոնի խթանումը, երկշղթա ՌՆՔ-ի հակավիրուսային ազդեցությունը փորձարկվող կենդանիների մոտ, նշված պատրաստուկը կարելի է առաջարկել վիրուսային հիվանդությունների, հատկապես նյարդային համակարգի հիվանդությունների, պրոֆիլակտիկայի համար:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Г. Я. Фелдмане, Ю. Б. Умбрашко, А. Х. Куйкис и др., Вопросы вирусологии, № 4, 1984. ² А. Н. Фомина, С. С. Григорян, О. В. Зайцева и др., Антибиотики, № 1, 1980. ³ Р. А. Захарян, Тезисы докл. II респ. конф. посвященной проблемам физ.-хим. биологии, Ереван, 1986. ⁴ D. A. Kramerov, A. P. Ryskov, G. P. Georgiev, B. B. A., v. 475, p. 461 (1977). ⁵ L. Kronenberg, T. Humphreys, Biochemistry, v. 11, 40

р. 2020 (1972). ⁴ F. Graham, Vender, Ebb A., Virology, v. 55, p. 456 (1973). ⁷ Н. Н. Амитина, Б. А. Завизион, Э. Б. Тазулахова, Методические рекомендации по применению совр. методов исследований в общей и мед. вирусологии, М., 1984. ⁸ J. Campbell, T. Greenberg, M. Kochman, Can. J. Microbiol., v. 21, p. 1247—1253 (1975). ⁹ A. L. Steiner, A. S. Paglara, J. R. Chase e. a., J. Biol. Chem., v. 247, p. 1114—1120 (1972). ¹⁰ Т. Г. Орлова, А. Н. Бохонько, Т. В. Мамонтова и др., Вопросы вирусологии, № 3, 1985. ¹¹ A. Meager, H. E. Graves, T. R. Bradshaw, FEBS Lett., v. 87, № 2, p. 303 (1978). ¹² С. Н. Айрапетян, Р. А. Захарян, Г. Е. Рычков и др., ДАН СССР, т. 284, № 6, с. 1499—1502 (1985). ¹³ Р. А. Захарян, Г. Е. Рычков, С. С. Дадалян и др., Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 239 (1986). ¹⁴ J. Nordlung, S. Wolf, H. Levy, PNAS and Med., v. 133, p. 439 (1970). ¹⁵ V. Trautman, FEBS Lett., v. 98, № 1, p. 107—111 (1979). ¹⁶ Р. А. Захарян, Тезисы докл. респ. конф. „Макромолекулы и функционирование клетки“, Ереван, 1986. ¹⁷ К. А. Бакунц, Н. У. Наджарян, Н. Г. Гаспарян и др., Тезисы докл. 5-го съезда АО ВОГиС, 1987, 16—17 марта. ¹⁸ J. M. Weber, R. B. Stewart, J. Gen. Virol., v. 24, p. 363—372 (1975).