

УДК 577.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

А. С. Агабалин, Л. А. Рухкян, Р. А. Захарян

Подавление размножения ретровируса MuLV препаратами Са-дн РНК и Са-низкомолекулярной РНК из дрожжей

(Представлено академиком АН Армянской ССР Э. Г. Африкьяном 1/IX 1988)

Двуинтевые РНК (дн-РНК) стимулируют первичный и вторичный иммунный ответ, а также индуцируют синтез интерферона. Эффект дн-РНК реализуется через синтез интерферона и ряд биохимических реакций, зависящих по крайней мере от двух процессов: а) повышения уровня 2—5-олигоаденилата, активирующего латентную дн-РНК-зависимую РНК-азу, б) индукции дн-РНК-зависимой протеинкиназы, фосфорилирующей фактор инициации eIF-2⁽¹⁻²⁾.

Ранее нами было показано, что дн-РНК существенно повышает уровень фосфорилирования белков плазматической мембраны, активирует трансмембранные токи экстрацеллюлярного Са²⁺, повышает активность фосфолипазы А₂, которая в свою очередь приводит к накоплению и высвобождению лизоформ фосфолипидов и ненасыщенных жирных кислот, обладающих иммуномодулирующими свойствами⁽³⁻⁴⁾.

Вместе с тем было показано, что индуцированное дн-РНК повышение уровня фосфорилирования плазматической мембраны, накопление в мембране лизофосфолипидов и ненасыщенных жирных кислот, повышающие текучесть мембраны, существенно нарушают рецепцию и подавляют сорбцию вируса (осповакцины, энцефаломиокардита) на плазматической мембране клетки⁽⁶⁾.

Изложенное послужило основанием для изучения влияния дн-РНК на развитие ретровирусной инфекции, эритрондной лейкемии у мышей.

В качестве дн-РНК использовали дрожжевую киллерную РНК с молекулярной массой 1,2—1,8×10⁶, низкомолекулярную РНК—препарат нуклеината натрия (Рига, Олайн), который, как нами было показано ранее, содержит в своем составе дн-РНК. РНК переводили в форму Са-преципитата. ³H дн-РНК с активностью 6,5×10³ имп/мкг была получена в тритиевой воде с удельной активностью 5 Кю/мл.

Взаимодействие ³H дн-РНК с клетками проводили в триэтаноловом буфере⁽⁷⁾ в суспензии при 4°C. В экспериментах использовано по 10⁷ клеток. Энзиматическую обработку клеток в суспензии проводили при 37°C в течение 60 мин.

Мышей линии ВЛ В/с заражали вирусом лейкемии Раушера—MuLV, через 2 недели у 20 зараженных мышей пальпировалась вирус-

индуцированная спленомегалия, вторая группа мышей (20) получала внутрибрюшинно Са-дн-РНК—10 мкг/мышь (по три раза в неделю), третья группа (20 мышей) получала 5 мг Са-преципитата низкомолекулярной РНК (по три раза в неделю). Четвертая группа (20 мышей) получала Са-дн-РНК (три раза в неделю) через 12 ч после заражения вирусом, пятая группа (20 мышей) получала Са-преципитат низкомолекулярной РНК (три раза в неделю) через 12 ч после заражения вирусом. Наблюдение проводили в течение 20 дней. Вес селезенки у интактных мышей контрольной группы, второй и третьей групп составлял $0,101 \pm 0,012$ г, $0,110 \pm 0,013$ г, и $0,108 \pm 0,015$ г соответственно; у первой группы мышей вес селезенки превышал нормальные значения в 15 раз ($1,565 \pm 0,253$ г); у четвертой и пятой групп мышей наблюдалось уменьшение веса селезенки по сравнению с селезенками инфицированных животных на 62 и 58% соответственно. У мышей, зараженных вирусом MuLV и леченных препаратами РНК, получали смывы клеток костного мозга из бедренных костей и в надосадочной жидкости определяли активность фермента ревертазы. Активность ревертазы у мышей, инфицированных MuLV и получавших препараты Са-РНК, составляла 25% от активности фермента у мышей первой группы, не получавших препараты РНК, с явно выраженной спленомегалией.

Прекращение лечения препаратами РНК приводило к повышению активности ревертазы до 50% уже в первые три дня.

Для суждения, насколько специфично взаимодействие дн-РНК с плазматической мембраной клеток костного мозга, нами был изучен процесс сорбции ^3H дн-РНК на клетках в суспензии. Максимум специфического связывания дн-РНК достигался в течение 6—10 мин. Присутствие 20-кратного избытка рибонуклеотидов, «холодной» ДНК тимуса телят, разрушенной ультразвуком до мол. массы $1-5 \times 10^6$ Д, не оказывало влияния на связывание дн-РНК с мембраной клеток костного мозга.

Энзиматическая обработка клеток в суспензии оказывала разные эффекты на сорбцию дн-РНК клетками.

Влияние энзиматической обработки на связывание дн-РНК клетками костного мозга

| Обработка | Связывание ^3H дн-РНК, мкг/ 10^3 клеток |
|--|--|
| Суспензия костного мозга, полученная сразу после воздействия трипсина (250 мкг/мл) | 0,002 |
| Суспензия клеток костного мозга через 3 суток культивирования | 0,46 |
| Суспензия клеток костного мозга после обработки трипсином (0,5) мкг/мл | 0,0015 |
| Суспензия клеток костного мозга после обработки ДНК-азой (100 мкг/мл) | 0,46 |
| Суспензия клеток костного мозга после обработки РНК-азой (50 мкг/мл) | 0,5 |

Очевидно, что фактор связывания дн-РНК на поверхности клеток представлен протенинами. Полученные данные свидетельствуют о том, что процесс сорбции дн-РНК на плазматической мембране клеток костного мозга носит высокоспецифический характер.

В связи с вышесказанным было изучено влияние дн-РНК на адсорбцию вируса MuLV на клетках костного мозга мышей. Полученные данные показывают, что адсорбция дн-РНК на поверхностной мембране клеток костного мозга подавляет адсорбцию вируса на 80—90% (в течение 18—24 ч наблюдения). В то же время использованная в тех же концентрациях дн-РНК, гидролизованная до моно- ди- и тетра-нуклеотидов, практически не оказывала влияния на сорбцию вируса.

Если относительно «поздний» эффект дн-РНК (8—24 ч) по подавлению адсорбции вируса может быть объяснен в конечном итоге индукцией интерферона, то «ранние» эффекты дн-РНК (15, 30, 60 мин) предполагают наличие и других механизмов, в частности, индуцируемые дн-РНК в плазматической мембране изменения в фосфорилировании протенинов и в обмене фосфолипидов, связанных с активацией фосфолипазы A_2 , повышением текучести мембраны и изменением сродства рецептора к вирусу.

Можно заключить, что подавление активности фермента ревертазы и сорбции ретровируса MuLV на поверхностной мембране клеток мишеней является одним из механизмов ингибирования процесса ретровирусной инфекции эритроидной лейкемии препаратами Са-РНК. Это позволяет рекомендовать использованные препараты и при других формах ретровирусного инфицирования клеток костного мозга.

НИИ проктологии МЗ Армянской ССР
Ереванский зооветеринарный институт
Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ա. Ս. ԱՂԱՐԱՎՅԱՆ, Լ. Ա. ԻՌԻՆԿՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

MuLV ռետրովիրուսի բազմացման ճնշումը Са-երկրելի ԻՆՔ-ի և դրոժներից ստացված Са-ցածրամոլեկուլյար ԻՆՔ պրեպարատներով

Са-երկրելիանի ԻՆՔ-ն ինդուկցում է բջջում ինտերֆերոն, բարձրացնում է սպիտակուցի պլազմատիկ թաղանթների ֆոսֆորիլացման մակարդակը, բարձրացնում է A_2 ֆոսֆորիլազայի ակտիվությունը, որը առաջ է բերում մեմբրանում լիզոֆորմ ֆոսֆոլիպիդների և իմունոմոդուլացված հատկանիշներով օժտված շահագեցած ճարպաթթուների կուտակումներ:

Ստացվել են տվյալներ, որոնք ցույց են տալիս, որ երկրելի ԻՆՔ-ի սորբցիոն պրոպերտի ոսկրուղեղի բջջի պլազմատիկ մեմբրանի վրա կրում է բարձր սպեցիֆիկ բնույթ: Երկրելի ԻՆՔ-ի սորբցիան մեմբրանի վրա ճնշում է վիրուսի ադսորբցիան բջջի վրա 80—90%-ով: Միաժամանակ Са-երկրելի ԻՆՔ-ն և

դրոժներից ստացված Ca-ցածրամուկուլյար ՌնԹ-ն ճնշում են MuLV ունի-
տազայի ակտիվությունը:

Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս հրաշխամորել օգտագործած
պրեպարատները նաև այլ ձևերով ոսկրուղեղի բջիջների պետրոլիբուսային
ինֆիցիրացիան:

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ W. K. Roberts, A. Hovanessian, R. E. Broion e. a., Nature. v. 264, p. 477—
482 (1976). ² E. Lebleu, G. C. Sen, B. Gahrer e. a., Proc. Natl Acad Sci USA, v.
73, p. 3107--3111 (1976). ³ С. Н. Айрапетян, Р. А. Захарян и др., ДАН СССР, т.
264, № 6, с. 1499—1502 (1985). ⁴ Р. А. Захарян, Г. Е. Рычков, С. С. Дадалян и
др., Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 239—247 (1986). ⁵ К. Г. Карагезян, Р. А. Захарян,
С. С. Овакимян. Биол. журн. Армении, т. 40 № 12, с. 985—992 (1987). ⁶ Л. А.
Гухкян, Р. А. Захарян, С. Н. Айрапетян, ДАН АрмССР, т. 83, № 1, с. 40—44
(1986). ⁷ О. К. Гаврилов, Г. Козиниц, Н. Б. Черняк, Клетки костного мозга и пе-
риферической крови, Медицина, М., 1985.