

УДК 575.172.1+591.48.12

Г. Д. Бердышев, А. И. Масюк, В. И. Тюленев,
Н. Д. Опанасюк, Ю. В. Бездубный, А. Г. Минченко

ВЛИЯНИЕ РАЗДРАЖЕНИЯ ГИПОТАЛАМУСА НА СИНТЕЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РНК В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ КРЫС

Среди физиологических процессов, направленных на поддержание гомеостаза животного организма, особое значение имеет функциональная связь между гипоталамусом и печенью, т. е. между высшим интегративным центром нервной системы, регулирующим основные типы обмена веществ, и органом, функциональная деятельность которого неразрывно связана с интенсивностью обмена веществ в организме. О существовании функциональной связи между гипоталамусом и печенью свидетельствуют результаты многих исследований [3, 4, 6, 8, 12, 15, 17, 21]. Так, установлено участие нервных центров гипоталамуса в регуляции желчеобразовательной и желчеотделительной функций печени [3, 6, 11, 12]. Показано, что гипоталамическая регуляция белкового, липидного и углеводного обменов в организме осуществляется с участием печени [17]. Обнаружен ряд морфологических изменений в этом органе после раздражения различных структур гипоталамуса животных электрическим током [11, 17]. С другой стороны, при раздражении осморцептивной зоны печени у кошек обнаружено изменение биоэлектрической активности нейронов супраоптических и паравентрикулярных ядер гипоталамуса [13]. Таким образом, существование двусторонних связей между гипоталамусом и печенью является установленным фактом. Что касается механизмов реализации регулирующего влияния гипоталамуса на функциональную деятельность этого органа, то они до последнего времени остаются не выясненными. Следует заметить, что с развитием молекулярной биологии и генетики становится возможным изучение внутриклеточных молекулярных механизмов, с помощью которых осуществляется центральная, и, в частности, гипоталамическая регуляция физиологических процессов в организме.

Мы исследовали активность генетического аппарата клеток печени крыс при раздражении гипоталамуса животных электрическим током.

Методика исследований

Опыты проведены на самцах крыс линии Вистар весом 180—220 г. Биполярные нихромовые электроды стереотаксически погружали в область паравентрикулярного ядра гипоталамуса, рассчитывая координаты по атласу Пеллегрини и Кушмана [20]. При введении электродов и при раздражении гипоталамуса животные находились под наркотическим сном (60 мг/кг внутривенно). Раздражение гипоталамуса животных осуществляли прямоугольными импульсами тока от стимулятора ИСЭ-01. Параметры раздражения: длительность импульса — 1 мс, частота — 60 имп/с, сила тока — 0,2 мА. Раздражение проводили четыре раза по 60 с с интервалом между раздражениями 5 мин. Общее время после начала раздражения гипоталамуса до забоя животных составляло 30, 60, 180 и 300 мин. Животных забивали всегда в одно и то же время дня (в 14—16 часов дня). Контролем служили животные, у которых была проведена операция внедрения электродов без раздражения гипоталамуса. После опыта мозг животных фиксиро-

вали в 10% нейтральном растворе электролитов [10]. Денатурацию гипоталамуса по методу Криса проводили за шесть часов. РНК (рибосомальную) выделяли из печени крыс методом фенольного экстракта [5]. Радиоактивный метки из расчета 10 мкКи с условиями опыта. Радиоактивность РНК на фильтре определяли с помощью ультрафиолетового спектрометра. Удельную радиоактивность РНК определяли по формуле:

Рез

Согласно современным представлениям под контролем синтеза РНК понимается процесс, в котором РНК контролирует синтез белков и других биологических процессов. В настоящее время из объективных методов исследования генетического аппарата клетки наиболее распространены следующие:

Результаты исследования синтеза РНК при раздражении паравентрикулярного ядра гипоталамуса крыс электрическим током представлены на рис. 1.

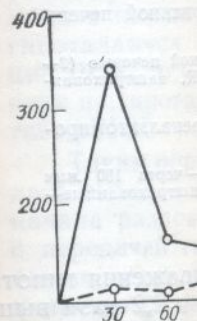


Рис. 1. Изменение синтеза РНК в печени крыс при раздражении гипоталамуса.

Контроль — 100%. По оси абсцисс — время после раздражения гипоталамуса (30, 60 мин).

Рис. 2. Удельная радиоактивность РНК в печени крыс при раздражении гипоталамуса.

печени крыс извлекали РНК (гяРНК), которую затем гидролизировали в клетках, и рибосомальную РНК. Максимальное количество РНК в печени крыс через 30 мин после раздражения гипоталамуса достигало 1,6 раза контрольного уровня, характерно для раздражения гипоталамуса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что раздражение гипоталамуса приводит к увеличению синтеза РНК в клетках печени.

вали в 10% нейтральном формалине и на срезах гипоталамуса определяли локализацию электродов [10]. Денервацию печени осуществляли за девять суток до раздражения гипоталамуса по методу Никитина и др. [14]. Двустороннее удаление надпочечников у крыс проводили за шесть суток до раздражения гипоталамуса. Различные виды ядерной РНК (рибосомальную и гетерогенную) и РНК цитоплазмы получали из клеток печени крыс методом фенольно-термического фракционирования при 40, 65 и 4°С соответственно [5]. Радиоактивный предшественник $2\text{-}^{14}\text{C}$ -оротовую кислоту вводили внутрибрюшинно из расчета 10 $\mu\text{ККи}$ на 100 г веса за 30 и 60 мин до забоя животных в соответствии с условиями опыта. Радиоактивность различных фракций РНК определяли после нанесения РНК на фильтры в жидкостном сцинтилляторе ЖС-107 на счетчике ISOCAP-300. Удельную радиоактивность полученных фракций РНК выражали в имп/мин/мг РНК . Количество РНК определяли спектрофотометрически.

Результаты исследований и их обсуждение

Согласно современным представлениям, все функции клетки находятся под контролем генной регуляторной системы (ГРС), основным элементом которой является ядерный генетический аппарат. ГРС с помощью РНК контролирует биосинтез белков, в том числе ферментов, а также других соединений и тем самым регулирует биохимические и физиологические процессы в клетке. Изменение синтеза РНК является одним из объективных показателей, отражающих изменение активности генетического аппарата клеток.

Результаты проведенных исследований показали (рис. 1), что при раздражении паравентрикулярного ядра гипоталамуса в ядрах клеток

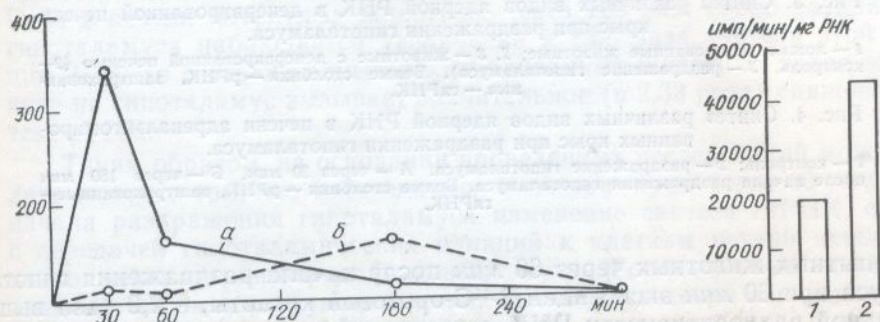


Рис. 1. Изменение синтеза ядерных гетерогенной (а) и рибосомальной (б) РНК в печени крыс при раздражении гипоталамуса.

Контроль — 100%. По вертикали — удельная радиоактивность ядерных РНК, в % к контролю. По горизонтали — время в мин.

Рис. 2. Удельная радиоактивность цитоплазматической РНК печени крыс при раздражении гипоталамуса.

1 — контроль; 2 — раздражение гипоталамуса.

печени крыс изменяется синтез двух видов клеточной РНК — гетерогенной (гяРНК), содержащей предшественники информационной РНК клетки, и рибосомальной (рРНК), содержащей предшественники РНК рибосом. Максимальное увеличение синтеза гяРНК наблюдается в печени крыс через 30 мин после начала раздражения гипоталамуса, превышая к этому времени уровень контроля в 3,4 раза, а усиление синтеза рРНК достигает максимальной величины, превышая уровень контроля в 1,6 раза через 180 мин после начала воздействия на гипоталамус. К уровню, характерному для контрольных животных, синтез гяРНК возвращается через 180 мин, а синтез рРНК — через 300 мин после начала раздражения гипоталамуса.

Полученные результаты дают основание считать, что генетический аппарат клеток печени крыс находится под контролем гипоталамуса

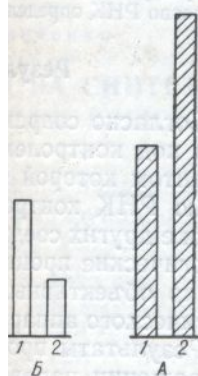
А НА СИНТЕЗ ЧЕНИ КРЫС

их на поддержание имеет функциональ-жду высшим инте-дим основные типы ьность которого не-в организме. О су-ламусом и печенью 3, 4, 6, 8, 12, 15, 17, оталамуса в регуля-ункций печени [3, 6, а белкового, липид-ется с участием пе-ений в этом органе уса животных элек-аздражении осморе-ение биоэлектриче-ентрикулярных ядер двусторонних связей енным фактом. Что нияния гипоталамуса и до последнего вре-что с развитием мо-кным изучение внут-ю которых осуществ-ая регуляция физио-

арата клеток печени ктрическим током.

180—220 г. Биполярные паравентрикулярного ядра и Кушмана [20]. При ные находились под нем-е гипоталамуса животных гора ИСЭ-01. Параметры $\mu\text{А}$, сила тока — 0,2 мА . кду раздражениями 5 мин. бою животных составляло же время дня (в 14—16 оведена операция внедре-мозг животных фиксиро-

нных видов РНК в меченных предшест- РНК, а затем метка-гом удельной радио-ей синтезированных ужили, что удельная-ой из клеток печени



ированной печени

занной печенью (2— РНК, заштрихован-

адреналэктомиро- за.

Б — через 180 мин, заштрихованные—

издражения гипота- вы, в 2,2 раза выше-плазмы клеток пе- нию, свидетельству- тате влияния гипо-

ти передачи влия- нии роли нервного- тивность генетиче- ражения гипотала- м перерезки ниже- аления солнечного- перерезки печено- ченные нами при- печенью (рис. 3),- раняет повышение- таламуса в печени- ней изменение син- и в 1,75 раза пре- их животных. При- крыс синтез рРНК- ся в 1,67 раза, или- синтез рРНК, изме-

нившийся в печени крыс в результате ее денервации, возвращается к уровню, характерному для ложнооперированных животных. Такое изменение синтеза рРНК в денервированной печени крыс при раздражении гипоталамуса связано, по-видимому, с повышенной чувствительностью ее клеток к действию различных биологически активных веществ (медиаторов, гормонов и др. [7]). Ранее нами было показано [10], что через 30 мин после начала раздражения гипоталамуса в крови крыс концентрация одного из гормонов коры надпочечников — кортикостерона — увеличивается. Известно, что в зависимости от функционального состояния организма кортикостероиды могут как повышать, так и угнетать синтез нуклеиновых кислот в печени животных [18].

В исследованиях, проведенных на адреналэктомированных животных, нами изучена роль гормонального звена в передаче гипоталамических влияний на клетки печени. Эти исследования показали (рис. 4), что двустороннее удаление надпочечников, проведенное у крыс за шесть суток до раздражения гипоталамуса, хотя и искажает, но полностью не устраняет повышение синтеза гяРНК, наблюдаемое в печени intactных животных при раздражении гипоталамуса. Синтез гяРНК через 30 мин после раздражения гипоталамуса адреналэктомированных крыс в 1,69 раза выше в печени подопытных животных, по сравнению с соответствующим контролем. В процессах, вызывающих в печени крыс при раздражении гипоталамуса изменение синтеза ядерной рРНК, как свидетельствуют наши данные, гормональное звено играет важную роль. Если в печени intactных животных через 180 мин после раздражения гипоталамуса наблюдается увеличение в 1,58 раза синтеза этой фракции РНК, то в печени адреналэктомированных животных такое же влияние на гипоталамус вызывает значительное (в 2,33 раза) снижение синтеза рРНК.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что наблюдаемое в печени крыс через 30 мин после начала раздражения гипоталамуса изменение синтеза гяРНК, связано с передачей гипоталамических влияний к клеткам печени непосредственно через нервно-проводниковые пути. Гормональные механизмы включаются на последующих этапах гипоталамической регуляции функций генетического аппарата клеток печени.

В соответствии с полученными данными, можно следующим образом представить механизмы реализации регулирующих влияний гипоталамуса на функции печени. Гипоталамические сигналы, достигнув клеток печени, вызывают изменение активности их генетического аппарата, что выражается в усилении синтеза РНК. При этом синтезируется избыток гяРНК, богатой предшественниками матричной РНК (мРНК) для различных ферментов и других белков, синтезируемых в печени; гяРНК превращается в мРНК и мигрирует из ядра в цитоплазму. Усиленный синтез рРНК, необходимой для построения рибосом клетки, коррелирует с усиленным синтезом мРНК, а также с другими внутриклеточными процессами, направленными на обеспечение реализации информации вновь синтезированных молекул мРНК в соответствующие белки.

О том, что гипоталамус действует через генетический аппарат клеток, свидетельствуют также данные других наших исследований, в которых показано, что в печени животных при изменении функционального состояния гипоталамуса изменяется концентрация РНК и отношение РНК/ДНК [9], повышается активность РНК-полимеразы II [10], изменяется химический состав хроматина за счет увеличения в нем количества негистоновых белков и РНК [1, 2].

Наше представление о гипоталамической регуляции функций печени и полученные экспериментальные данные подтверждаются исследованиями других авторов. Так, установлено резкое повышение активности некоторых ферментов [15—17,21] и количества альбуминов, глобулинов и общего белка [4] в печени крыс через 3—6 ч после раздражения гипоталамуса электрическим током. Опыты с ингибитором синтеза РНК актиномицином Д позволили сделать заключение о том, что увеличение активности ферментов в печени крыс при раздражении гипоталамуса обусловлено изменением активности генетического аппарата клеток [15].

Таким образом, проведенное исследование синтеза ядерных РНК, а также другие наши и литературные данные свидетельствуют о том, что гипоталамическая регуляция функциональной деятельности печени может осуществляться через генетический аппарат клеток. О тонких механизмах такой регуляции к настоящему времени ничего не известно. Возможно, что эти механизмы связаны с изменением функционального состояния клеточных и ядерных мембран, с химической модификацией гистонов и негистоновых белков хроматина, или изменением их структуры. Некоторые из этих процессов нами в настоящее время изучаются, что позволит понять тонкие молекулярно-генетические механизмы регулирующего влияния центральной нервной системы на функции висцеральных органов.

Литература

1. Бердышев Г. Д., Тюленев В. И., Масюк А. И., Слободян М. М. Нервная система и генетический аппарат клеток.— Цитология и генетика, 1975, 9, № 2, с. 138—141.
2. Бердышев Г. Д., Тюленев В. И., Масюк А. И. Изменение структуры и функции хроматина под воздействием возраста и нейро-эндокринных влияний.— Материалы III Всесоюз. симпозиума «Молекулярные механизмы генетических процессов», М., 1976, с. 41.
3. Богач П. Г., Лященко П. С. Изменения желчеотделения при электрическом раздражении гипоталамуса. Вып. 8. К., 1974, с. 56—64.
4. Бордюшков Ю. Н., Иванова Е. Н. Изменение белковых фракций сыворотки тканей животных в зависимости от силы и длительности воздействия на гипоталамус.— Клинические и экспериментальные исследования в онкологии. Ростов-на-Дону, 1968, ч. I, с. 22—23.
5. Георгиев Г. П. Методы определения, выделения и фракционирования нуклеиновых кислот.— В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот. М., «Медицина», 1968, с. 74—120.
6. Есипенко Б. Е., Эндреци Е. О роли гипоталамуса в регуляции желчеотделительной и диуретической функций.— Проблемы физиологии гипоталамуса. Вып. 10. К., 1976, с. 51—57.
7. Кеннон В., Розенблюм А. Повышение чувствительности денервированных структур. Закон денервации. М., ИЛ, 1951. 263 с.
8. Макаренко А. Ф., Динабург А. Д., Лаута А. Д., Пилипенко В. А., Ройтуб Б. А. О взаимоотношениях гипоталамуса и печени.— Проблемы физиологии гипоталамуса. Вып. 9. К., 1975, с. 41—49.
9. Масюк А. И., Бердышев Г. Д., Тюленев В. И. Синтез РНК в печени крыс при раздражении гипоталамуса.— Молекулярная генетика и биофизика. Вып. 1, К., 1976, с. 99—104.
10. Масюк А. И., Тюленев В. И., Бердышев Г. Д., Бездробный Ю. В., Тронько Н. Д., Слободян М. М., Перетятко Т. И. Изменение активности генетического аппарата клеток печени крыс при раздражении гипоталамуса.— Цитология и генетика, 1977, 2, № 1, с. 34—37.
11. Марченко Л. И., Гиновкер А. Г. Морфологические и функциональные изменения в печени после раздражения гипоталамуса.— Физиол. журн. СССР, 1974, 60, № 6, с. 989—992.
12. Марченко Л. И., Гиновкер А. Г. О механизме влияния гипоталамуса на желчеобразование.— Бюл. эксперим. биол. и мед., 1975, 79, № 6, с. 11—13.
13. Матвеева М. Б., Осипович В. В. Биоэлектрическая активность нейронов супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса при раздражении осморорецептивной зоны печени у кошек.— Физиол. журн. СССР, 1970, 56, № 3, с. 324—331.

14. Никитин В. И. Изменения биохимических показателей при раздражении гипоталамуса. Харьков. ун-т, 1975, 21, № 4, с. 153.
15. Фролькис В. Изменение активности ферментов при раздражении гипоталамуса. Физиол. журн. СССР, 1975, 61, № 4, с. 275—291.
16. Шаныгина К. Изменение активности ферментов при раздражении гипоталамуса. Физиол. журн. СССР, 1976, 62, № 4, с. 275—291.
17. Ban T. The effect of electrical stimulation of the hypothalamus on the synthesis of thymic nucleic acids. J. Neurochem., 1966, 11, p. 153.
18. Naora H. Nuclear changes in the liver of rabbits after electrical stimulation of the hypothalamus. J. Neurochem., 1966, 11, p. 153.
19. Pellegrino L. D. The effect of electrical stimulation of the hypothalamus on the synthesis of thymic nucleic acids. J. Neurochem., 1966, 11, p. 153.
20. Shimazu T. R. The effect of electrical stimulation of the hypothalamus on the synthesis of thymic nucleic acids in rabbit liver. J. Neurochem., 1966, 11, p. 153.

Институт физико-математических наук
Киевского университета

N. D.

Synthesis of nucleic acids in the liver of rabbits after electrical stimulation of the hypothalamus. J. Neurochem., 1966, 11, p. 153.

Institute of Physics
State University

функций печени исследованы активности ов, глобулинов, раздражения ги- синтеза РНК, что увеличение гипоталамуса та клеток [15]. ядерных РНК, ствуют о том, ьности печени . О тонких ме- о не известно. нкционального модификацией ием их струк- емя изучаются, ханизмы регу- ункции висце-

ервная система и 2, с. 138—141.

ы и функции хро- — Материалы III цессов», М., 1976,

рическом раздра- сыворотки тканей гипоталамус.— Кли- а-Дону, 1968, ч. 1,

ния нуклеиновых Медицина», 1968,

длечительной ып 10 К., 1976,

ванных структур.

1., Ройтуб Б. А. ни гипоталамуса.

ни крыс при раз- Вып. 1, К., 1976,

, Тронько Н. Д., го аппарата кле- генетика, 1977, 2,

ые изменения в , 1974, 60, № 6,

са на желчеобра-

ронов супраопти- ни осморцептив- 324—331.

14. Никитин В. Н., Голубицкая Р. И., Силин О. П., Ставицкая Л. П. Возрастные изменения биохимизма денервированных органов. II. Возрастные изменения некоторых биохимических показателей печени при ее денервации.— Труды Ин-та биол. и биол. фак. Харьк. ун-та. 1956, 24, с. 101—116.
15. Фролькис В. В., Безруков В. В., Мурадян Х. К. Возрастные особенности индуктивного синтеза глюкозо-6-фосфатазы, фруктозо-1,6-дифосфатазы, тирозин-аминотрансферазы и триптофан-пирролазы при стимуляции гипоталамуса.— Вопр. мед. химии, 1975, 21, № 4, с. 400—406.
16. Шаныгина К. И., Парфенова Н. С. Участие гипоталамуса в регуляции активности ферментов энергетического обмена печени крысы.— Журн. эволюц. биохимии и физиол., 1976, 12, № 5, с. 405—409.
17. Ban T. The hypothalamus and liver metabolism.— Med. J. Osaka Univ., 1965, 15, N 4, p. 275—291.
18. Nakagawa S., White A. Response of aggregate and solubilised RNA polymerase of rat thymic nuclei to cortisol injection.— Abstracts 7-th Intern. Congr. Biochem., Tokyo, 1966, p. 153.
19. Naora H. Nuclear RNA.— Ribonucleic Acids, N Y., 1973, p. 37—58.
20. Pellegrino L. J., Cushman A. G. A stereotaxis atlas of the rat brain. New York, 1967, 72 p.
21. Shimazu T. Role of the hypothalamus in the induction of tryptophan pyrrolase activity in rabbit liver.— J. Biochem. (Tokyo), 1964, 55, N 2, p. 163—171.

Институт физиологии
Киевского университета

Поступила в редакцию
11.VII 1977 г.

G. D. Berdyshev, A. I. Masjuk, V. I. Tjulenev.
N. D. Opanasjuk, Ju. V. Bezdrobnyj, A. G. Minchenko

EFFECT OF HYPOTHALAMUS STIMULATION ON SYNTHESIS OF DIFFERENT TYPES OF RNA IN RAT LIVER CELLS

Summary

Synthesis of pro-mRNA and pro-rRNA in the rat liver increases considerably during stimulation of the paraventricular area of hypothalamus. A conclusion is drawn that the hypothalamic influence on the liver function may occur through the genetic apparatus of cells.

Institute of Physiology of the
State University, Kiev