

УДК 612.67.8.264:615.272.6

В. В. Фролькис, В. В. Безруков, Х. К. Мурадян

ГИПОТАЛАМИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА
РНК И БЕЛКА ПРИ СТАРЕНИИ

Гипоталамусу отводится важное место в регуляции обмена и функций, в становлении деятельности целостного организма [1, 2, 4, 5, 7, 10]. В то же время явно недостаточное внимание уделяется одному из основополагающих вопросов проблемы — возможности гипоталамической регуляции генетического аппарата, процессов биосинтеза белка. Среди исследований этого направления можно сослаться на работы А. Ф. Макаренко и сотр., посвященные связи между функциональным состоянием гипоталамуса и конформацией белков крови [4, 5], работы Г. Д. Бердышева и сотр. [1], наши публикации о влиянии стимуляции гипоталамуса на синтез РНК и индуцибельных ферментов [6—9].

В последние годы формулировалось представление о том, что возрастные изменения в гипоталамусе играют существенную роль в старении организма [2, 7, 10, 11]. Есть основание полагать, что темп и направленность старения организма определяются не только нарушениями в генетическом аппарате тканей-мишеней, но и в вышележащих уровнях регуляции активности, особенно гипоталамо-гипофизарной системой.

Мы изучали возрастные особенности активности генетического аппарата тканей системы гипоталамус — гипофиз — надпочечники — печень (ГГНП) в исходном состоянии; а также возрастные изменения влияния активации различных звеньев этой системы на биосинтез РНК и белка-фермента в тканях-мишенях.

Методика исследований

Опыты проведены на взрослых (8—12 мес) и старых (24—28 мес) крысах. Биоплярные никромовые электроды вживляли в область вентромедиальных ядер гипоталамуса по координатам атласа Фифковой и Маршала [12] с собственными поправками на возраст и вес животных. В большинстве опытов интервал между вживлением электродов и раздражением гипоталамуса составлял 2—3 нед. Гипоталамус раздражали в условиях свободного поведения животных прямоугольными импульсами электрического тока частотой 100 Гц и длительностью 1 мс. Продолжительность всего периода раздражения 10—15 мин, смена полярности раздражающего тока — каждые 30 с. Сила раздражающего тока, которую подбирали до появления четких поведенческих реакций (настораживание, обнюхивание, беспокойство), составляла в среднем 50—120 мкА для взрослых и 80—160 мкА для старых крыс. Контроль локализации электродов осуществляли на поперечных срезах мозга после электрокоагуляционной маркировки кончиков электродов и фиксации мозга в формалине.

Гидрокортизон (Венгрия) вводили внутрибрюшинно в дозе 35 мг/кг.

В серии опытов с длительной стимуляцией раздражение гипоталамуса или введение гидрокортизона осуществляли ежедневно один раз в сутки в течение, соответственно, 6 и 15 дней. В этой серии животных умертвляли через 5 ч после последней стимуляции гипоталамуса или введения гормона.

О скорости синтеза суммарной РНК и белка в тканях системы ГГНП судили по относительной удельной радиоактивности (ОУР) препаратов РНК и белка, выделенных на нитроцеллюлозных фильтрах (Oxoid, Англия) и меченых ^{14}C -оротовой кислотой (0,5 мКи/кг) и ^3H -глицином (1 мКи/кг), соответственно. Меченые предшественники вводили внутрибрюшинно за 30 мин до забоя. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике SC-30 (Франция). Условия мечения и фенольного фракционирования РНК печени крыс приведены ранее [9].

Результаты исследований и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что синтез РНК и белка в разных звеньях системы гипоталамус — гипофиз — надпочечники — печень подвергается значительным возрастным изменениям. Судя по относительной удельной радиоактивности (ОУР), скорость синтеза РНК и белка в гипоталамусе, гипофизе, надпочечниках и печени старых крыс заметно снижается (рис. 1). Так, по сравнению со взрослыми животными, у старых крыс интенсивность синтеза РНК и белка в гипоталамусе

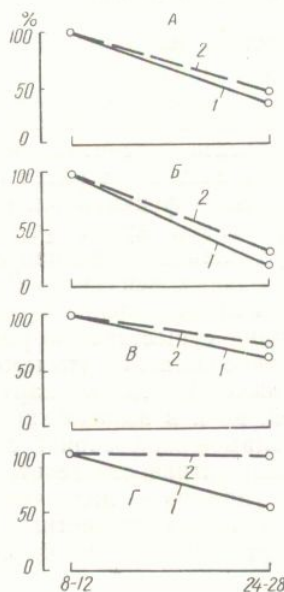


Рис. 1. Возрастные изменения ОУР РНК (1) и белка (2) в гипоталамусе (А), гипофизе (Б), надпочечниках (В) и печени (Г) крыс.

По вертикали — сдвиги ОУР, в %; по горизонтали — возрастная группа, в месяцах.

Рис. 2. Влияние однократного раздражения гипоталамуса на УР пре-рРНК (А), пре-иРНК (Б) и гя-РНК (В) в печени взрослых (1) и старых (2) крыс.

По вертикали — сдвиги УР, в %; по горизонтали — время, в часах.

падает почти вдвое, а в гипофизе — в три-четыре раза. Следует отметить, что при этом снижение синтеза РНК выражено в несколько большей степени, чем синтеза белка. Особенно отчетливо это выявляется в печени. Так, ОУР белка в печени 8—12 и 24—28-месячных крыс примерно одинакова, тогда как ОУР РНК у старых животных почти вдвое меньше.

Итак, в процессе старения снижается интенсивность биосинтеза РНК и белка в разных звеньях системы ГГНП. По-видимому, эти сдвиги в немалой степени определяют и функциональные возможности указанных образований. Снижение синтеза РНК и белка в гипоталамусе и гипофизе старых крыс может быть в какой-то мере показателем ослабления их функциональной активности. С этим коррелируют данные о снижении нейросекреторной функции ядер гипоталамуса при старении. Однако необходимо учитывать, что в проведенных опытах синтез РНК и белка определялся во всем гипоталамусе, во всем гипофизе. Между

тем в различных структурах эти изменения активности аппарата свидетельствуют и данные наш старении возбудимость отдельных не только неодинаково,

Влияние однократного и многократного радиоактивности разных клас

Фракции РНК	Статистические показатели	Контроль
Пре-рРНК	n	14
	M	13 269
	± m	2 016
Пре-иРНК	n	14
	M	66 377
	± m	9 225
Гя-РНК	n	14
	M	49 515
	± m	10 017
Пре-рРНК	n	8
	M	16 594
	± m	3 458
Пре-иРНК	n	8
	M	68 321
	± m	11 261
Гя-РНК	n	8
	M	50 301
	± m	9 611

Примечание. * — сдвиги по сравнению с контролем.

Значительные возрастные изменения активности аппарата гипоталамус — гипофиз — РНК и белка-фермента в печени — отличиями влияния стимулов более растянутый скрытый тельно быстрое наступление стимуляции у старых животных. Основания опытов, в которых изучались структуры гипоталамуса и ядерных предшественников РНК (пре-иРНК) однократным введением гипоталамуса у взрослых крыс (см. таб. 1) были обнаружены при однократном введении гипоталамуса.

тем в различных структурах этой системы могут скрываться неодинаковые изменения активности аппарата биосинтеза РНК и белка. Об этом свидетельствуют и данные наших прежних опытов, показавших, что при старении возбудимость отдельных структур гипоталамуса может изменяться не только неодинаково, но и разнонаправленно [7].

Влияние однократного и многократного введения гидрокортизона на удельную радиоактивность разных классов РНК печени взрослых и старых крыс

Фракции РНК	Статистические показатели	Контроль	Время после однократного введения гидрокортизона (часы)			Время после многократного введения гидрокортизона (дни)		
			2	4	6	3	6	15
Пре-рРНК	<i>n</i>	14	Взрослые					
	<i>M</i>	13 269	5	6	6	6 6	6 6	6
	$\pm m$	2 016	26 439*	36 002*	37 673*	28 929*	29 477*	23 162
Пре-иРНК	<i>n</i>	14	6	6	6	6	5	8
	<i>M</i>	66 377	187 088*	159 962*	186 629*	182 681*	134 371	32 436*
	$\pm m$	9 225	23 731	30 448	51 567	19 199	44 933	3 581
Гя-РНК	<i>n</i>	14	6	6	6	6	5	8
	<i>M</i>	49 515	166 723*	128 073*	137 195*	78 061	146 775*	89 445*
	$\pm m$	10 017	16 163	18 037	26 403	17 296	16 081	7 173
Пре-рРНК	<i>n</i>	8	Старые					
	<i>M</i>	16 594	8	8	6	6	6	10
	$\pm m$	3 458	42 288*	27 942*	36 105*	21 273	8 922*	10 857
Пре-иРНК	<i>n</i>	8	8	8	8	6	6	10
	<i>M</i>	68 329	80 371	73 849	51 437	35 299*	48 033	26 405*
	$\pm m$	11 268	2 866	14 222	4 247	1 535	5 508	3 868
Гя-РНК	<i>n</i>	8	8	8	8	6	6	10
	<i>M</i>	50 303	109 771	88 702*	60 119	132 102*	27 256*	30 559
	$\pm m$	9 612	32 910	2 349	4 353	20 175	2 538	4 342

Примечание. *—сдвиги по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Значительные возрастные изменения наблюдаются и во влиянии однократной и многократной стимуляции отдельных звеньев системы гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников на синтез разных классов РНК и белка-фермента в печени. Наиболее характерными возрастными отличиями влияния стимуляции разных звеньев системы ГГНП является более растянутый скрытый период, меньший эффект активации и сравнительно быстрое наступление феномена «истощения» при многократной стимуляции у старых животных. Эти выводы могут быть сделаны как на основании опытов, в которых вводили гидрокортизон, так и при стимуляции структур гипоталамуса. Так, удельная радиоактивность (УР) ядерных предшественников рибосомальной РНК (пре-рРНК), информационной РНК (пре-иРНК) и гетерогенной ядерной РНК (гя-РНК) при однократном введении гидрокортизона растет в большей степени, а при многократном введении гормона дольше сохраняется на высоком уровне у взрослых крыс (см. таблицу). Примерно такие же возрастные отличия были обнаружены при однократном и многократном введении адренокортикотропного гормона гипофиза [6].

В следующей серии опытов было изучено влияние однократного и многократного раздражения гипоталамуса на синтез разных классов РНК печени взрослых и старых крыс (рис. 2). Значительные возрастные отличия обнаруживаются при сравнении динамики УР отдельных фракций РНК. При этом у старых крыс отмечается более растянутый скрытый период стимуляции и меньший рост УР ряда фракций РНК по сравнению со взрослыми животными. Так, у взрослых крыс УР пре-рРНК и пре-иРНК растет уже через 1,5 ч после раздражения гипоталамуса, тогда как у старых животных подобный рост обнаруживается только через 3 ч.

Следует отметить, что существенные возрастные отличия влияния раздражения гипоталамуса на синтез фракций РНК обнаружены не для всех фракций РНК. Так, через 1,5 ч после раздражения гипоталамуса в печени крыс обеих возрастных групп наблюдается одинаковый рост УР цитоплазматической РНК (150% у взрослых и 148% у старых крыс), который сохраняется до конца исследуемого срока. Если учесть, что УР цитоплазматической РНК определяется скоростью посттранскрипционного процессинга и транспорта РНК из ядра в цитоплазму, то примерно одинаковая динамика УР этой фракции РНК печени взрослых и старых крыс позволяет предположить, что возрастные изменения стимулирующего влияния гипоталамуса на транскрипцию, по крайней мере частично могут быть компенсированы на других уровнях регуляции биосинтеза белка. С возрастом наступают не только количественные, но и качественные сдвиги в регуляторных воздействиях гипоталамуса на синтез фракций РНК. В старости изменяется соотношение скорости синтеза отдельных классов РНК, изменяется спектр новосинтезируемой РНК. Достаточно указать, что ни для одной из ядерных фракций РНК у взрослых и старых крыс не обнаружены однотипные сдвиги УР. Так, если принять в каждом случае УР пре-рРНК за единицу, то у 8—12-месячных контрольных крыс соотношение УР пре-рРНК, пре-иРНК и гРНК составляло 1 : 3 : 2. Через 1,5 ч после раздражения гипоталамуса наряду с ростом УР ядерных фракций РНК соотношение этих величин изменилось и составило 1 : 4 : 6, через 3 ч — 1 : 2 : 2, а через 7 ч — 1 : 1 : 1. С возрастом влияние раздражения гипоталамуса на синтез фракций РНК подвергается значительным изменениям. У старых контрольных животных соотношение синтеза отдельных ядерных и цитоплазматических классов РНК тканей-мишеней 1 : 10 : 4, через 3 ч после раздражения — 1 : 7 : 5, а через 5 ч — 1 : 2 : 1.

Таким образом, стимуляция гипоталамуса оказывает неодинаковое влияние на синтез разных классов РНК печени. При старении стимулирующее влияние гипоталамуса на транскрипционный аппарат подвергается заметным изменениям, что может привести к определенным сдвигам в соотношении синтеза отдельных ядерных и цитоплазматических классов РНК тканей-мишеней.

В естественных условиях существования организма нередки ситуации повторной и длительной активации гипоталамуса. По мнению некоторых авторов, частые повторные стрессы, неизбежные в процессе жизни и реализуемые через гипоталамические пути, являются одной из ведущих причин старения целостного организма [13]. В следующей серии опытов изучали влияние длительного (в течение 6 сут) раздражения гипоталамуса на синтез фракций РНК в печени крыс разного возраста. Следует отметить, что возрастные изменения гипоталамической регуляции биосинтеза РНК особенно отчетливо проявляются именно при многократном раздражении. У старых крыс при повторных раздражениях быстрее развивается подавление синтеза фракций РНК и белка-фермента (рис. 3 и 4). Для разных классов РНК эти возрастные отличия выра-

жены неодинаково. Так, УР пре-иРНК после стимуляции гипоталамуса возвращается к исходному уровню к шестому дню, УР пре-рРНК уже в первый день возвращается к исходному уровню и сохраняется на низком уровне.

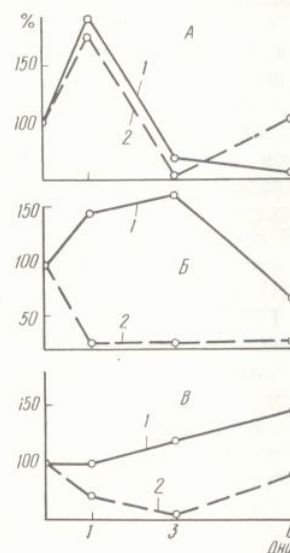


Рис. 3. Влияние многократного раздражения гипоталамуса на синтез фракций РНК (А), пре-иРНК (Б) и гРНК (В) в печени взрослых (1) и старых (2) крыс.

По вертикали — сдвиги УР, в горизонтальном направлении — время. Рис. 4. Влияние многократного раздражения гипоталамуса на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Б) в печени взрослых (1) и старых (2) крыс. По вертикали — сдвиги активности, в горизонтальном направлении — время.

срока. При многократном раздражении гипоталамуса возрастные отличия наблюдаются и на более высоком уровне — на уровне синтеза фракции пре-рРНК и цитоплазматической РНК.

При раздражении гипоталамуса система нейрогуморальной регуляции биосинтеза, что описываемые сдвиги в синтезе РНК связаны с изменениями, наступающими в регуляторном аппарате, во-первых, то, что стимуляция или АКТГ снижает синтез РНК, а во-вторых, синтез РНК наступает значительно позже, чем при однократном раздражении. Так, при многократном раздражении гипоталамуса синтез РНК возвращается к третьему — шестому дню к исходному уровню, а синтез РНК возвращается к исходному уровню к шестому дню. Во-вторых, нами обнаружено, что синтез РНК возвращается к исходному уровню к шестому дню.

жены неодинаково. Так, УР пре-иРНК печени взрослых крыс на третий день стимуляции гипоталамуса значительно растет (163%) и возвращается к исходному уровню к шестому дню раздражения. У старых крыс УР пре-иРНК уже в первый день раздражения падает ниже исходного уровня и сохраняется на низком уровне в течение всего исследуемого

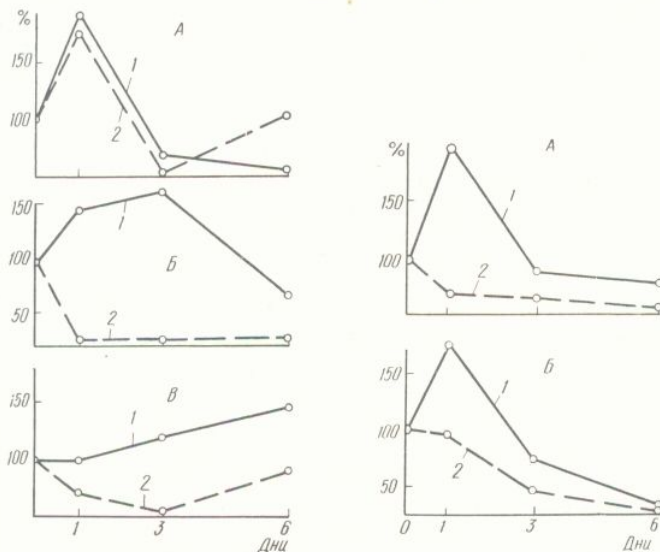


Рис. 3. Влияние многократного раздражения гипоталамуса на УР пре-рРНК (А), пре-иРНК (Б) и гя-РНК (Б) в печени взрослых (1) и старых (2) крыс.

По вертикали — сдвиги УР, в %; по горизонтали — время, в днях.

Рис. 4. Влияние многократного раздражения гипоталамуса на активность глюкозо-6-фосфатазы (А) и фруктозо-1,6-дифосфатазы (Б) в печени взрослых (1) и старых (2) крыс.

По вертикали — сдвиги активности ферментов, в %; по горизонтали — время, в днях.

срока. При многократном раздражении гипоталамуса значительные возрастные отличия наблюдаются и во фракции гя-РНК, УР которой сохраняется на более высоком уровне у взрослых животных. В то же время во фракции пре-рРНК и цитоплазматической РНК подобные различия не обнаружены.

При раздражении гипоталамуса в реакцию вовлекается сложная система нейрогуморальной регуляции. У нас есть основания полагать, что описываемые сдвиги в синтезе РНК при раздражении гипоталамуса связаны с изменениями, наступающими именно в этом звене. Об этом свидетельствует, во-первых, то, что при длительном введении гидрокортизона или АКТГ снижение интенсивности синтеза РНК, индукции ферментов наступает значительно позже, чем при раздражении гипоталамуса. Так, при многократном раздражении гипоталамуса синтез разных классов РНК и индуцибельных ферментов уменьшается ниже исходного уровня к третьему — шестому дню, тогда как при многократной стимуляции генетического аппарата печеночных клеток введением гидрокортизона или АКТГ высокий уровень его функционирования продолжается до 10—15 дня. Во-вторых, нами было показано, что у взрослых животных после раздражения гипоталамуса отмечается уменьшение содержа-

ния кортикостерона, аскорбиновой кислоты и холестерина в надпочечниках. У старых крыс эти показатели оставались практически неизменными. Следовательно, у старых животных «истощение» эффекта стимуляции гипоталамуса возникало в условиях достаточно высокого функционального состояния других звеньев системы ГГНП. Следует иметь в виду и возможные влияния стимуляции гипоталамуса на биосинтез белка в тканях-мишенях через холинэргические и адренэргические нервные механизмы. Ослабление нервного контроля, показанное нашими сотрудниками на различных объектах, быть может, играет определенную роль в механизмах описываемых изменений гипоталамической регуляции.

Приведенные в настоящей работе данные свидетельствуют об участии гипоталамуса в регуляции процессов синтеза разных классов РНК в тканях-мишенях. При старении изменяется гипоталамическая регуляция этих процессов, что во многом может быть обусловлено, как нами показано, изменениями биосинтеза РНК и белка в самом гипоталамусе и тканях, участвующих в передаче гипоталамических влияний. Сопоставление динамики УР разных классов РНК и индукции ферментов при стимуляции отдельных звеньев системы ГГНП позволяет предположить, что потенциальные возможности механизмов длительной гипоталамической стимуляции синтеза РНК и белка ниже, чем способность тканей-мишеней поддерживать длительную стимуляцию генетического аппарата. Иными словами, возможны ситуации, когда эффекторные ткани еще могут отвечать адекватным усилением биосинтеза белка, а центральные механизмы регуляции уже не в состоянии поддержать этот уровень приспособительных реакций. Учитывая, что повторная активация гипоталамуса в естественных условиях существования встречается постоянно, можно заключить, что описанное возрастное ослабление гипоталамического контроля над генетическим аппаратом играет важную роль в изменении приспособительных реакций в старости и является важным механизмом старения целостного организма. Возрастные изменения гипоталамической регуляции могут стать одной из причин изменений биосинтеза белка в ряде тканей-мишеней при старении.

Л и т е р а т у р а

1. Бердышев Г. Д., Масюк А. И., Тюленев В. И., Опанасюк Н. Д., Бездробный Ю. В., Минченко А. Г. Влияние раздражения гипоталамуса на синтез различных видов РНК в клетках печени крыс.— *Физиол. журн.*, 1978, 24, № 2, с. 214—219.
2. Дильман В. М. Эндокринологическая онкология. Л., «Медицина», 1974. 200 с.
3. Кеннед Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка.— В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., «Мир», 1970, с. 138—144.
4. Макаренко А. Ф., Динабург А. Д. Межуточный мозг и вегетативная нервная система. Киев, «Наукова думка», 1977. 323 с.
5. Макаренко А. Ф., Гуревич М. И., Ройтуб Б. А., Златин Р. С., Карцева А. Г., Демченко А. П., Костюк О. И., Плесская Т. Н. О направленности гемодинамических реакций и конформационных изменений в белках крови при раздражении гипоталамических структур.— *ДАН СССР*, 1975, 221, № 6, с. 1473—1476.
6. Мурадян Х. К. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая регуляция активности глюкозо-6-фосфатазы, фруктозо-1,6-дифосфатазы и синтеза фракций РНК в печени крыс разного возраста. Автореф. канд. дис., Киев, 1977. 23 с.
7. Фролькис В. В. Регулирование, приспособление и старение. Л., «Медицина», 1970, 325 с.
8. 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.
9. Фролькис В. В., Безруков В. В., Мурадян Х. К. Синтез фракций РНК печени крыс при однократном и многократном раздражении гипоталамуса.— *Вопр. мед. химии*, 1978, 24, № 1, с. 12—17.

10. Everitt A. Conclusion: Aging and its stem.— In: Hypothalamus, pituitary and the quaterly review of biology, 1976, 51.
11. Finch C. E. The regulation of physiology. The quaterly review of biology, 1976, 51.
12. Fijikova E., Maršala I. Stereotaxie podk Praha, 1960. 400 s.
13. Selye H., Tuchweber B. Stress in relation to pituitary and aging. Springfield, Ill., 1977.

Институт геронтологии
АН СССР, Киев

V. V. Frolikis, V. V. Bezrukov

HYPOTHALAMIC REGULATION OF RNA SYNTHESIS WITH AGING

The rate of ^{14}C -orotic acid and ^3H -glutamine incorporation into RNA of intact old animals the rate of RNA and protein synthesis with adults. The hydrocortisone administration stimulated the liver genetic apparatus, the stimulating effect and its earlier effect of age changes in the RNA synthesis hypothesis that primary hypothalamic changes may determine the changes in the target tissues during aging.

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences, USSR, Kiev

10. Everitt A. Conclusion: Aging and its hypothalamic-pituitary-peripheral endocrine system.— In: Hypothalamus, pituitary and aging. Springfield, Ill., 1976, p. 676—702.
11. Finch C. E. The regulation of physiological changes during mammalian aging.— The quarterly review of biology, 1976, 51, p. 49—83.
12. Fijikova E., Maršala I. Stereotaxie podkorových struktur mozku krysy, kralika a kočky. Praha, 1960. 400 s.
13. Selye H., Tuckweber B. Stress in relation to aging and disease.— In: Hypothalamus, pituitary and aging. Springfield, Ill., 1976, p. 553—569.

Институт геронтологии
АМН СССР, Киев

Поступила в редакцию
24.IV 1978 г.

V. V. Frol'kis, V. V. Bezrukov, Kh. K. Muradjan

HYPOTHALAMIC REGULATION OF RNA AND PROTEIN BIOSYNTHESIS WITH AGING

Summary

The rate of ^{14}C -orotic acid and ^3H -glycine incorporation into total RNA and protein was studied in tissues of the hypothalamic-pituitary — adrenal-hepatic system. In tissues of intact old animals the rate of RNA and protein biosynthesis decreased in comparison with adults. The hydrocortisone administration or hypothalamus stimulation induce an activation of the liver genetic apparatus. An increase of the lag period, decrease in the stimulating effect and its earlier «exhaustion» are the most characteristic features of age changes in the RNA synthesis hypothalamic regulation. An assumption is advanced that primary hypothalamic changes may determine shifts in the genetic apparatus of target tissues during aging.

Institute of Gerontology, Academy of
Medical Sciences, USSR, Kiev