А.М. БЕЛОУС
В.П. ГОДИН
Е.Я. ПАНКОВ

ЭКЗОГЕННЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

КОНТРОЛЬНЫЙ ЭКЗЕМПЛЯР

А. М. БЕЛОУС,
В. П. ГОДИН,
Е. Я. ПАНКОВ

ЭКЗОГЕННЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Москва «Медицина» 1974

УДК 612.398.145.1

ИЗДАНИЕ ОДОБРЕНО И РЕКОМЕНДОВАНО К ПЕЧАТИ
РЕДАКЦИОННО-ИЗДАТЕЛЬСКИМ СОВЕТОМ
ПРИ ПРЕЗИДИУМЕ АМН СССР

Представлены данные по механизму действия экзогенных тканеспецифических РНК на морфологические и метаболические особенности восстановительных процессов. Показана возможность управления этими процессами при помощи введения определенных фракций РНК. Выделение этих фракций в чистом виде и установление механизма их действия на клетку имеют большое значение для практической биологии и медицины, особенно для изучения регуляции восстановительных процессов, направленной их стимуляции, а также при трансплантации органов и тканей.

Монография представляет несомненный интерес для биологов, биофизиков, физиологов и медиков, занимающихся проблемами регенерации тканей и восстановительной хирургии.

GODIN V. P., BELOUS A. M., PANKOV E. Ya. **Exogenous Nucleic acids and Reductive Processes.**

The book comprises data on the mechanism of action of exogenous tissue—specific RNA on morphological and metabolic characteristics of reductive processes. A possibility is shown to regulate these processes by administrating definitte fractions of RNA. Isolation of these fractions in pure form and ascertaining of the mechanism of their action on the cell is of very great importance for practical biology and medicine, especially for studies into the regulation of reductive processes, their aimed stimulation, as well as in transplantation of organs and tissues.

The monograph will be of real interest to biologists, biophysicists, physiologists and medical specialists concerned with the problems of regeneration of tissues and restorative surgery.

Д4
33252

Гос. публичная
научно-техн[illegible]
библиоте[illegible]
ЭНЕ[illegible]
ЧИТАЛЬНОГО ЗАЛА

74-27019

Б $\frac{50100-255}{039(01)-74}$ 44—74

© Издательство «Медицина» Москва 1974

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее существенных вопросов современной биологии человека и животных является проблема раскрытия механизмов дифференцировки клеток, органов и тканей, обеспечивающих в конечном итоге интегрирующие функции организма в целом. Хотя биохимические механизмы, контролирующие процесс дифференциации клеток, до настоящего времени исследованы недостаточно, эта проблема благодаря успехам в области молекулярной биологии в последнее время плодотворно изучается. Успехи в этом направлении были также достигнуты благодаря обширным исследованиям эмбриональной индукции[1], установлению химической природы индукторов, изучению механизмов влияния индукторов на зрелые соматические и половые клетки (Waddigton, 1957; Б. П. Токин, 1959; Brachet e. a., 1961, и др.).

Одним из существенных открытий, которое значительно пополнило наши знания о механизме дифференциации клеток, было открытие Jacob и Monod (1961) регулирующей системы синтеза белков в клетке. По данным этих авторов, начало синтеза новых информационных РНК связано с блокированием соответствующего репрессора, который ранее тормозил считывание информации с гена.

Информационная РНК, проникая в цитоплазму, достигает полисом, на которых и «считывается» как слепок-матрица с ДНК, в результате чего синтезируются соответствующие белки. Такое представление о матричной роли иРНК, способной осуществлять непосредственный синтез белка на полисомах, позволило Nirenberg

---

[1] Под термином «эмбриональный индуктор» следует понимать комплекс разнообразных агентов белковой или нуклеиновой природы. Однако сущность этого процесса и имеющего сходные с ним черты процесса дифференциации оставалась изученной в общих чертах и то лишь с морфологической точки зрения.

и Mattnaei (1961) впервые осуществить реставрацию затухающего синтеза белка в бесклеточной системе E. coli путем внесения в среду экзогенных суммарных РНК. Аналогичный эффект оказывали полирибонуклеотиды, синтезированные in vitro на ДНК или однотяжевые ДНК, выделенные из культур клеток млекопитающих.

Положительные результаты были получены также при индукции специфических белков в бесклеточных системах при помощи информационных и других видов РНК, полученных из клеток животного происхождения: ядер печени, ретикулоцитов и т. д. (Shaeffer e. a., 1964; Kruh e. a., 1964; Тодоров И. Н. и др., 1967). В бесклеточных системах удалось получить стимуляцию включения аминокислот и осуществить биосинтез специфических белков из самых различных полирибонуклеотидов животного и бактериального происхождения, вирусных и искусственных.

При использовании рибонуклеиновых кислот бактериального и вирусного происхождения (почти чистый препарат иРНК) иРНК служит непосредственной матрицей, которая считывается полисомами клеток либо оказывает эффект по типу механизма трансформации экзогенных РНК у бактерий. Остается открытым вопрос о взаимоотношениях клетка — экзогенная РНК у высших организмов. Клетки высших организмов отличаются от бактериальных исключительным разнообразием регуляторных механизмов. До настоящего времени не совсем ясны природа и механизм действия репрессоров и депрессоров генетической системы клетки, обеспечивающих и контролирующих биосинтез белков.

Одним из возможных претендентов на роль таких регуляторов генной активности могут быть экзогенные РНК, которые, проникнув в клетку, вызывают в ней фенотипические превращения. По этому вопросу имеется ряд сообщений, свидетельствующих о возможности «наведения» или стимуляции биосинтеза специфических белков и ферментов в клетках-мишенях.

Выяснению такой возможности были посвящены эксперименты, проведенные Niu с сотрудниками, а затем и в других лабораториях. Показано, что малые концентрации суммарной РНК стимулировали размножение клеток в тканевых культурах в том случае, если в культивируемую среду прибавлялось небольшое количество эмбрионального экстракта (Chevrement e. a., 1952). Niu

и Twitty (1953) описали дифференцировку in vitro презумптивных эктодермальных клеток тритона в нервные в среде, содержащей клетки организатора. Дальнейшие опыты с Triturus torosus или Amblystoma mexicanum показали, что организатор выделяет в среду рибонуклеопротеидные вещества, которые оказывают индуцирующий эффект на дифференцировку клеток. Обработка этих веществ РНК-азой не снимала этот эффект. В опытах с Triturus rivularis индукционный эффект снимался не рибонуклеазой, а протеазой. Niu (1958) показал, что в культурах эктодермы гаструлы Ablystoma tigrium in vitro РНК, полученная из тимуса теленка, способна индуцировать образование различных структур. При обработке препарата РНК рибонуклеазой в культуре ткани обнаруживалось образование только одних структур ткани, в то время как развитие других тормозилось. РНК, выделенная из почек или печени теленка, индуцировала формирование в эктодерме тритона соответствующих гомологичных структур (Niu, 1959).

На основании данных, полученных в этих опытах, Niu предположил, что эмбриональным индуктором может служить экзогенная РНК, которая, очевидно, действует по типу генетического материала подобно действию вирусной РНК или трансформирующей ДНК.

Параллельно с этими исследованиями изучались механизмы действия РНК и ее способность индуцировать синтез специфических ферментов и полипептидов.

В 1961 г. Niu с сотрудниками показали, что РНК, экстрагированная из клеток печени млекопитающих in vitro (мышей), «наводит» интрацеллюлярный биосинтез одного из специфических белков печени — сывороточного альбумина. Кроме того, эти клетки, обработанные РНК, были способны синтезировать такие специфические ферменты, как триптофанпирролазу и глюкозо-6-фосфатазу (Niu, Cordova e. a., 1962), аргиназу, орнитранскарбамилазу, фруктозо-1,6-дифосфатазу (Niu, 1964). Под влиянием РНК увеличивалась продукция амилазы из поджелудочной железы до 250—300%.

Затем Niu (1963) доказал, что под влиянием экзогенной печеночной РНК в клетках млекопитающих можно вызвать повышенный синтез таких ферментов, как аминокислая оксидаза и лейцинкислая пептидаза. При этом интерес представляет то обстоятельство, что наведенный при помощи РНК специфический синтез фермен-

тов (например, глюкозо-6-фосфатазы), не свойственный в обычных условиях для данной клетки, был удивительно стабильным и сохранялся в 244-й генерации асцитных клеток, т. е. приобретенная биосинтетическая активность поддерживалась через 21—29 пассажей.

В дальнейшем были получены положительные результаты в опытах in vitro по изучению цефалогенеза у 19—22-часового эмбриона цыпленка (в среду добавляли суммарную РНК, выделенную из хорды, мозга, печени, а также цельного 11—13-дневного зародыша).

Sanyal и Niu (1966), проводя опыты с куриными эмбрионами на стадии дефинитивной первичной полоски, показали, что обработанные РНК из различных источников изоляты, вырезанные из участка первичной полоски, приобретали способность к самодифференциации либо индуцировались в ту ткань, из которой была получена РНК. Так, при обработке кусочков тканей РНК, выделенной из почек и сердца, резко индуцировалось развитие нейтральных тканей, а РНК из мозга индуцировала развитие бластодермы нервной ткани.

РНК из печени куриных зародышей и телят стимулировала развитие нейральной и мезодермальной тканей, а также благоприятствовала росту мезенхимы. По мнению авторов, корреляция между источником тканевых РНК и образующимися специфическими структурами позволяет предположить, что при этом воздействии происходит перенос органной специфичности РНК в клетки-мишени, т. е. таким образом осуществляется гомогенетическая индукция. Помимо экспериментов in vitro с эмбриональными тканями, Niu с сотрудниками проверяли влияние различных РНК на организм животных. Например, половозрелым кастрированным самкам мышей вводили в матки РНК, выделенную из матки или печени половозрелых мышей и семенных пузырьков свиньи. Введение органоспецифичной РНК вызывало повышение синтеза щелочной фосфатазы и предотвращало инволюцию матки, вызываемую удалением яичников. РНК из печени и РНК-азный или кислотный гидролизат РНК подобным действием не обладали (Monsoar, Maher, Niu, 1965). Продолжая исследования по взаимосвязи между гормональной активностью и биологической ролью РНК в этих процессах, Niu и Niu (1966) исследовали влияние РНК, выделенной из матки здоровых мышей, на кастрированных мышей. Было

установлено, что при добавлении гомологичной РНК в гомогенатах матки активность щелочной фосфатазы увеличивается на 20—50%. Аналогичный эффект оказывала гетерологичная РНК из яичников и матки теленка. Подтверждалось, что любые гидролизаты РНК не эффективны, а в условиях актиномицинового блока добавка РНК способствовала частичному восстановлению синтеза фермента.

Параллельно с этими опытами проводились и другие исследования по выяснению характера действия экзогенных РНК на морфогенез, дифференциацию и белковый синтез в различных клетках.

При исследовании стимулирующего действия экзогенной РНК на морфогенез 16—18-часового эмбриона в культуре ткани было показано, что после инкубации с экзогенной РНК в эмбрионах наблюдались выраженная дифференцировка, повышение митотической активности клеток и рост тех участков ткани, откуда была выделена РНК (Emanuelson, 1960).

В дальнейшем подтвердилось, что экзогенные РНК при внесении их в инкубационную среду или организм животного оказывают индуцирующий эффект на дифференциацию и белковый синтез в клетках-мишенях.

Культивирование in vitro фрагментов бластодермы первичной полоски в среде с недостаточным количеством белков, но с добавлением полимерных РНК, полученных из поджелудочной железы и сердца взрослых животных, оказывало положительный эффект на дифференцировку гомологичных участков бластодермы, а использование РНК из эмбрионов и печени, наоборот, отрицательный (Butros, 1963). Затем было показано, что РНК, полученная из сердца и печени 8—12-дневных куриных эмбрионов, оказывает органоспецифическое действие на эксплантаты зародышевой полоски в культуре ткани.

Опыты Niu по индуцирующему влиянию экзогенных РНК, кроме того, проверялись в лаборатории Браше Malpoix (1964). Она исследовала влияние экзогенных РНК на синтез гемоглобина в сосудистом поле эксплантированных ранних зародышей цыпленка, добавляя к среде РНК, выделенную из ретикулоцитов курицы или кролика. При этом синтез гемоглобина ретикулоцитами часто интенсифицировался (18% в контроле и 75% в опыте).

Усиление синтеза гемоглобина в клетках костного мозга под влиянием экзогенной гомологичной РНК было описано также Weisberger (1962).

Esposito (1964) наблюдал увеличение содержания гемоглобина в клетках эритробластического типа у 2 людей с болезнью Кули, которым вводилась в костный мозг грудины гомологичная ДНК-подобная экзогенная РНК.

Eisenberg с сотрудниками (1964) сообщили, что полимерная РНК, экстрагированная из хрусталика глаза взрослого цыпленка, способствует дифференциации эктодермы эмбриона цыпленка на стадии образования 4—7 сегментов. В случае применения печеночной и дрожжевой РНК признаков дифференциации не наблюдалось.

Amos с сотрудниками (1961, 1963, 1964) доказали, что животные клетки могут инкорпорировать макромолекулы РНК, которые функционируют в клетке-реципиенте несколько часов.

При помощи меченной P^{32} РНК было показано, что после проникновения РНК в фибробласты ее основная масса обнаруживается в кислотонерастворимой фракции.

Для начала синтеза белков был достаточен контакт клеток с РНК в течение 3 часов, причем в фибробластах куриных эмбрионов синтезировались только те полипептиды или ферменты, которые были характерны для тех клеток, из которых получена РНК. Стимулирующий эффект не снимался в случае применения ДНК-азы или трипсина и полностью исчезал в случае добавления в среду РНК-азы.

Rollins с сотрудниками (1966), инкубируя кусочки ранних гаструл зародыша лягушки с РНК, выделенной из печени взрослой лягушки, показали, что в них синтез белка увеличивается на 46%. Дрожжевая РНК и РНК, синтезированная in vitro на ДНК печени лягушки, стимулировали синтез белка в очень малой степени, а РНК из вилочковой железы теленка и поли-У эффекта не дали.

Decken (1965) также подтвердил, что под влиянием гомологичной РНК из печени крысы происходило повышенное включение меченых аминокислот в белки печени крысы in vitro.

Доказательства индуцирующего влияния экзогенных РНК на синтез специфических белков были представ-

лены также в ряде экспериментов по изучению иммунитета.

Fishman с сотрудниками (1963), Mannick (1962, 1966) рассматривают РНК как полимеры, способные влиять на трансплантационный иммунитет, изменяя синтез специфических белков в лимфоидных клетках.

На основании работ по изучению трансплантационного иммунитета были сделаны выводы о возможности переноса соответствующей информации на иммунные лимфоидные клетки с помощью РНК, выделенной из лимфоидных клеток сенсибилизированного животного. Реакция переноса не наблюдалась, если в среду вводилась РНК-аза или если компетентная РНК вводилась внутривенно животным без добавления соответствующих лимфоидных клеток.

Учитывая способность различных РНК вызывать индукционные эффекты, а также то, что в механизме запоминания принимает участие РНК, некоторые авторы исследовали возможности «транспорта памяти» при помощи нуклеиновых кислот (Corning e. a., 1961; Cook e. a., 1963; Luttges, 1966; Carney e. a., 1965). Используя РНК-P^{32}, было показано, что внутрибрюшинно введенная РНК не проникала в мозг, а ее интравентрикулярное введение необлученным животным было неэффективным. Был сделан вывод, что если «транспорт памяти» и существует, то он очень трудно воспроизводится. Так, Cameron с сотрудниками (1964) показали, что инъекции людям РНК существенным образом не изменяют способность запоминать.

Таким образом, большое число экспериментов показывает, что индукционными свойствами обладают только полимерные органоспецифические РНК, которые усиливают пролиферацию и биосинтез белка в клетках-мишенях. Однако гетерологичные РНК (т. е. выделенные не из индуцируемого органа) такими свойствами не обладают. Это подтвердили Finnegan и Biggin (1966). Авторы установили, что полученные из селезенки теленка фракции РНК (27S; 18S и 7—8S) не оказывают индукционного действия на гистогенез эктодермы гаструлы у амфибий.

Экзогенные РНК проникают в клетки, вызывая в них соответствующие индукционные явления. Этот процесс зависит от внешних и внутренних условий, хотя до настоящего времени отсутствуют доказательства того, в

каком структурном виде должна попасть РНК в клетку, чтобы вызвать в ней эту трансформацию. Результаты опытов Houlobek, Fanshier и Grocker (1966) убеждают в том, что экзогенные РНК очень быстро проникают в клетку, хотя в больших дозах подавляют синтез ядерной РНК на 60%. Кроме того, авторы показали, что экзогенная РНК полностью проникает в клетку и локализуется в ДНК до 4% введенного количества. Эти данные подкрепляются сообщением Galand, Remy и Ledoux (1966), которые методом авторадиографии и хроматографического фракционирования доказали, что при включении в клетки асцитной опухоли сохраняются состав оснований экзогенной РНК и присущие ей хроматографические свойства.

Способность экзогенных РНК проникать в клетки-мишени и «запускать» в них гомологичный биосинтез белков была использована для «нормализации» обмена опухолевой клетки. Так, было установлено, что асцитные клетки мыши после контакта с РНК, экстрагированной из печени, приобретали способность синтезировать новые белки, присущие только печеночным клеткам. После обработки печеночных клеток РНК, выделенной из опухолей, и последующей трансплантации таких клеток животным развитие опухолей наблюдалось в 70—100% случаев.

Если имплантировались клетки, инкубированные с РНК печени, то частота прививаемости снижалась до 15—40%. De Carvalho с сотрудниками (1961, 1962) также установили, что клетки печени, обработанные РНК, выделенной из опухоли, очень быстро малигнизировались и проявляли большую агрессивность в организме. Если малигнизированные клетки обрабатывали РНК, выделенной из печени, то они теряли способность к злокачественному росту и после их пересадки давали очень низкий процент прививок.

Н. Н. Аксенова и др. (1962, 1963) также установили, что опухолевые клетки, обработанные РНК, выделенной из печени, теряют способность к неопластическому росту после их пересадки животным на 93,6—95,5%.

Аналогичные результаты получили Н. Н. Артамонова и др. (1964). Авторам удалось подавить рост клеток крысиной гепатомы с помощью препарата суммарной РНК, экстрагированной из нормальной печени (инъекции до 100 мг на одно животное).

З. А. Бутенко и др. (1966) показали, что РНК, выделенная из лейкозной ткани крыс, при введении крысятам вызывает у них через 4—8 мес развитие миелоидного лейкоза или ретикулогемоцитобластоза и способствует появлению в крови аномальных псевдопельгеровских лейкоцитов.

Таким образом, результаты этих опытов как будто свидетельствовали о том, что экзогенные РНК из различных источников могут индуцировать либо неопластический рост, либо «нормализовать» обмен опухолевой клетки.

Однако ряд экспериментов, проведенных с экзогенным полирибонуклеотидным материалом, показывает, что способностью тормозить рост опухолей обладают не только РНК, но и РНП. По данным Weisberger (1962), под влиянием РНП, выделенных из костного мозга больных серповидной анемией, нормальные незрелые эритроциты начинали синтезировать гемоглобин как нормального состава, так и по составу близкий к гемоглобину при серповидной анемии. Д. К. Белявский и др. (1966) показали, что введение РНП, выделенных из нормальных тканей мышей низкораковой линии, тормозило развитие клеток спонтанных опухолей молочной железы, а иногда (14%) приводило к их некрозу и отторжению. Напротив, введение РНП из тканей мышей высокораковой линии способствовало более быстрому и интенсивному росту опухолей.

Результаты экспериментов Niu и других авторов по изучению особенностей действия экзогенных РНК на клеточные элементы убеждают в том, что эти РНК могут выступать в роли генетического индуктора и являться, вероятно, одним из регуляторных факторов, влияющих на процессы клеточной дифференциации. Полученные данные позволяют признать, что под влиянием введения в клетку чужеродного генетического материала происходит немедленное изменение свойств клеток и метаболических черт. Такого рода явление, по-видимому, свидетельствует о том, что в состав экстрагированной РНК (кроме иРНК) входят какие-то соединения, обладающие дерепрессорной или индукторной активностью по отношению к генному аппарату клетки.

Экзогенные РНК способны изменить процессы метаболизма клеток реципиента в довольно широких мас-

штабах. Подобное воздействие экзогенных РНК зависит от концентрации препарата, способности клеток поглощать макромолекулы ДНК и реализовать в соответствующий эффект.

Одним из интересных действий экзогенных РНК является способность в определенных дозировках оказывать стимулирующий эффект на рост, развитие и дифференцировку клеток тканей. Результаты проведенных в этом направлении исследований показывают, что экзогенные нуклеиновые кислоты могут быть отнесены к веществам информационного действия, обладающим значительной биологической активностью, которые по силе эффекта могут превосходить известные соединения типа витаминов и антибиотиков (В. А. Кордюм и др., 1965).

Использование экзогенного генетического материала оказалось весьма эффективным при восстановительных процессах, наступающих после механических, лучевых и других патологических повреждений органов и тканей. Так, введение соответствующих иРНК в организм больных людей способствует регенерации затухающего синтеза специфических белков (Esposito, 1964). В настоящей книге затронуты именно эти вопросы, которые, по мнению авторов, могут иметь не только общетеоретическое значение, но и дать практические рекомендации по использованию результатов экспериментальных исследований в этом направлении. Молекулярная биология стоит перед реальным фактом фенотипического влияния РНК и ДНК на клетки животных тканей. Изучение этого влияния может существенным образом изменить наши представления о регуляции процессов восстановления неопластического роста и по-иному подойти к проявлениям другой патологии на различных уровнях организации живых систем [1].

Авторы приносят искреннюю благодарность проф. Л. В. Полежаеву, член-корр. АМН СССР А. М. Чернуху, Е. Д. Вышепан, докт. мед. наук В. А. Конышеву, канд. мед. наук Б. А. Алексееву и многим другим за предоставление материалов и помощь при подготовке настоящей монографии.

---

[1] Авторы стремились показать исследования в этом направлении главным образом отечественных ученых.

СОКРАЩЕНИЯ, ПРИНЯТЫЕ В КНИГЕ

АД	— актиномицин D
АТФ	— аденозинтрифосфорная кислота
АЭТ	— β-аминоэтилизотиурониум
БСА	— бычий сывороточный альбумин
ГФТ	— гуанозинтрифосфат
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
н-ДНК	— ДНК из нормальной ткани
р-ДНК	— ДНК из регенерирующей ткани
ДНП (ДРНП)	— дезоксирибонуклеопротеид
н-ДНП	— ДНП из нормальной ткани
р-ДНП	— ДНП из регенерирующей ткани
ИТФ	— инозинтрифосфат
МИ	— митотический индекс
МЭА	— β-меркаптоэтиламин
РНК	— рибонуклеиновая кислота
иРНК (мРНК)	— информационная (матричная) РНК
рРНК-ХЯ	— рибосомальная хромосомно-ядрышковая РНК
РНП	— рибонуклеопротеид

Глава I

ИНДУКЦИЯ ПРОЦЕССОВ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТИ ЭКЗОГЕННЫМИ ГОМОЛОГИЧНЫМИ РНК

ВВОДНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Репаративная регенерация кости — одна из основных теоретических проблем ортопедии и травматологии. Изучение этой проблемы проводилось в нескольких направлениях. С одной стороны, накапливались экспериментальные и клинические данные по морфологии, физиологии и биохимии костеобразовательного процесса, а с другой — на основе полученных данных делались попытки активного вмешательства в процесс заживления перелома. Успехи, достигнутые в изучении структурно-морфологических особенностей репаративного остеогенеза (И. Л. Зайченко, 1958; А. В. Русаков, 1959; Т. П. Виноградова, 1961; А. Н. Студитский, 1965; Н. А. Воробьев, 1959, 1967; Küntscher, 1967, и др.), позволили сформулировать общетеоретические положения о биологических свойствах и реактивности костной ткани, стадийности и зональности в развитии регенерата кости, а также определили основные виды посттравматической регенерации костной ткани. Эти исследования в последующем позволили разработать схему биологического управления репаративного остеогенеза с учетом стадийности процесса. Однако отсутствие хорошо аргументированных биохимических данных по остеогенезу не позволяло получить ощутимых результатов в плане ускорения регенерационного процесса.

В настоящее время накопился значительный арсенал различных средств и методов, в большей или меньшей степени ускоряющих скорость репарационного процесса. Анализ весьма обширной литературы показыва-

ет, что большинство из применяемых в экспериментах средств было мало обоснованным и оказывало непродолжительный, нестойкий эффект на консолидацию переломов; механизмы их конкретного действия на клетку и организм в целом подчас оставались невыясненными. Часть препаратов, применение которых в клинике дало обнадеживающие результаты (оссопан, румалон), обладали одним существенным недостатком — необходимостью внесения в организм реципиента смеси белков, которые могли впоследствии вызывать иммунологический ответ, а возможно и способствовать развитию псевдоартрозов. Важно и то, что используемые для регуляции регенераторного процесса препараты применялись без учета особенностей течения той или иной биохимической фазы регенераторного процесса и, кроме того, оказывали действие на второстепенные метаболические звенья процесса регенерации.

Последние достижения биологических наук в области молекулярной и прикладной биохимии позволили получить в настоящее время ряд новых сведений о закономерностях и механизмах физиологического и репаративного остеогенеза (Neuman и Neuman, 1958; М. Ф. Мережинский, 1959; Glimcher, 1961; Aowell, 1963; Fleisch, 1963; Zambotti, 1967; Л. И. Слуцкий, 1964; В. П. Торбенко, 1967). Новые данные позволяют, с одной стороны, более точно обосновать активную биологическую регуляцию заживления костных переломов, а с другой — понять механизм регуляции наиболее существенных, узловых процессов, вмешательство в ход которых вызывает заметное ускорение процесса регенерации. Сейчас точно установлено, что травма и заживление кости сопровождаются развитием дефицита минеральных, энергетических и, особенно, белковых ресурсов.

Необходимость мобилизации резервных сил для восстановления целости поврежденного органа вызывает перераспределение веществ из внутренних органов и скелета, которые нуждаются в дополнительном «подвозе» этих веществ. Следовательно, искусственное введение веществ в организм обеспечит не только покрытие возникшего дефицита, но и более быстрое восстановление нарушенного биохимического равновесия в организме, что создаст оптимальные метаболические условия для течения процесса регенерации. Эти оптимальные условия для течения локальных процессов в зоне

перелома в первую очередь обеспечиваются биосинтезом белка.

Биохимический анализ веществ, возникающих на отдельных фазах репарационного процесса, совершенно четко показывает, что биосинтез белковой основы формирующегося регенерата является ведущим, центральным звеном в репарационном процессе, определяющим темпы минерализации и, следовательно, скорость образования зрелых пластинчатых структур.

Сразу же после травмы кости нейро-гуморальные механизмы включают в реакцию адаптации различные регуляторные системы организма, направленные как на выравнивание гомеостаза, так и на обеспечение репродукции и пролиферации клеточных элементов в зоне повреждения. Последнее обстоятельство обеспечивается за счет тканевых продуктов распада, которые, проникая в клетки, оказывают воздействие на генетические локусы как специфических, так и неспецифических клеточных элементов, коренным образом изменяя их метаболическую и функциональную характеристику.

Какова природа этих факторов? Holtzer (1964) установил, что одним из индуктивных факторов, влияющих на те части сомитов, которые трансформируются в хондроциты, являются не только РНК или белок, но и некоторые метаболиты цитоплазмы, мембраны клеток и др. Moos (1958) указывает, что таким индуктором может быть хондроитинсерная кислота А или С.

Niu с сотрудниками (1958, 1962) доказывают, что индукторами специфических белков в эмбриогенезе являются вещества нуклеиновой природы, которые влияют на дифференцировку и биосинтез белка в клетке (при внесении в инкубационную среду при введении в организм животного).

Таким образом, фаза восстановительного процесса в кости, морфологически характеризующаяся некробиозом и некрозом клеток и их дедифференцировкой, обеспечивает очень важный этап регенерации — с одной стороны, проникновение и действие в клетках генетических индукторов и, с другой,— включение во всю нейро-гуморальную систему, которая обеспечивает перестройку белкового и энергетического обменов в организме. Одновременная реакция всей костной системы на травму обеспечивает восполнение дефицита минеральных веществ и электролитов.

Все это способствует прохождению синтетических процессов в регенерате, усиливает пролиферацию специфических остеогенных клеток и их дифференциацию. Такое количественное наращивание специализированных клеток является очень существенным моментом в регенерации кости, так как оно ведет в последующем к новому качественному состоянию регенерата кости. Зона дефекта выполняется органической основой, состоящей главным образом из коллагена и гликозаминогликанов.

Процесс синтеза коллагена и гликозаминогликанов — весьма важный момент в регенерации костной ткани, поскольку синтезируемые остеобластами белковые комплексы способствуют минерализации органических матриц и образованию остеогенных структур. Детали синтеза белков в клетках костной ткани изучены более подробно в последнее время благодаря применению новейших достижений физики и химии (электронная микроскопия, инфракрасная и ультрафиолетовая спектроскопии, рентгеноструктурный анализ, ультрацентрифугирование и т. д.). Оказалось, что матричная РНК, программирующая синтез коллагена, является весьма стабильной матрицей и длительное время не ингибируется актиномицином D (В. И. Мазуров, 1966), а полисомы, на которых происходит биосинтез белков, имеют большой молекулярный вес — константа седиментации молекул 400—405S.

В остеобластах в отличие от других высокодифференцированных клеточных элементов содержатся специальные ферменты, которые катализируют не только синтез структурных белков костного регенерата, но и их минерализацию.

Гликозаминогликаны костной ткани так же, как и коллагены, играют очень важную роль в регуляции репаративного остеогенеза. Адсорбируя ряд катионов (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} и др.), гликозаминогликаны как бы подготавливают их преципитацию на коллагеновых фибриллах. Эти белки способствуют «созреванию» и агрегации коллагеновых макромолекул до фибрилл, несущих на себе реакционноспособные группы, на которых при участии компонента гликозаминогликанов — хондроитинсульфата образуются комплексы типа «коллаген—пирофосфат—кальций—хондроитинсульфат». Эти комплексы способствуют образованию первичных ядер

Гос. ... я
науч... ...ая
биб... ...

минерализации. Их образование и ориентированный рост кристаллов оксиапатита возможны только на веществах, имеющих кристаллическую структуру. Данные кристаллографии показывают, что таким субстратом являются именно коллагеновые волокна, а дальнейшие исследования in vitro подтвердили, что реконструированные коллагеновые волокна могут вызывать образование минеральных кристаллов в устойчивых при других условиях растворах ионов кальция и фосфора. Известно, что минерализация коллагенового волокна, протекающая в зоне, окруженной остеобластами, весьма сложный метаболический процесс. Для протекания этого процесса необходимы участие деполимеризующих кислые гликозаминогликаны ферментов, а также повышенная секреция остеокластами лизосомальных ферментов, гидролизующих избыточные протеины и ингибиторы кальцификации.

Для непосредственного ферментативного образования кристаллов оксиапатита необходимо наличие микроэлементов, а также фосфорилированных богатых энергией предшественников нуклеиновых кислот типа АТФ, ГТФ, УТФ, ИТФ и т. д.

Анализ специфики отдельных фаз регенераторного процесса убеждает, что успех восстановительного процесса в костной ткани в первую очередь зависит от биосинтеза белка, сопряженного с темпами дифференциации клеточных элементов. Очевидно, что белки образуют не только органическую основу регенерата, но и являются «затравкой» для последующего процесса минерализации. Следовательно, можно рассчитывать, что в случае ускорения темпов биосинтеза специфических белков матриц остеобластами тотальная скорость процесса регенерации кости повысится за счет более быстрой упаковки зоны повреждения коллагеном и гликозаминогликанами и последующего эпитактического роста минералов, что обеспечит формирование остеонов. Каким образом можно повысить функциональную активность отдельных оперонов ДНК остеобласта и тем самым регулировать синтез специфических белков регенерата кости — проблема большой теоретической и практической важности. Сегодня еще рано давать обоснованные рекомендации, экспериментальные подходы в этом направлении могут быть разные.

Совокупность современных достижений молекулярной биологии в области биосинтеза белка показывает, что белковый синтез контролируется и регулируется нуклеиновыми кислотами.

Роль экзогенных рибонуклеиновых кислот в биосинтезе белка была наглядно показана в классических опытах с бактериальными бесклеточными системами (Nirenberg e. a., 1961, 1962): угасающий биосинтез белка полностью реставрировался после прибавления в систему экзогенных рибонуклеиновых кислот. Поскольку в этих опытах использовались рибонуклеиновые кислоты вирусов, представляющие собой препарат чистой иРНК, считали, что экзогенные РНК, введенные в реакционную смесь, усиливают биосинтез белка за счет непосредственного «считывания» их как готовых матриц на полисомах.

В дальнейшем опыты, проведенные на животных клетках, показали, что экзогенные РНК, проникая в клетки, могут «наводить» комплементарный этой РНК биосинтез белков в гомологичных клетках-мишенях. Полученные результаты убеждали в том, что экзогенные нуклеиновые кислоты каким-то образом включаются в метаболический цикл клетки и вызывают специфический синтез белка. Правда, образование новых белков подавлялось ингибиторами синтеза РНК, в том числе актиномицином D, что указывало на необходимость синтеза РНК на ДНК-матрице реципиентной клетки при индукции этих белков. Следовательно, внесенную извне РНК рассматривали не как непосредственную матрицу для биосинтеза белков, а лишь как специфический индуктор, вызывающий синтез иРНК. Конечно, это не исключает возможности того, что часть макромолекул экзогенной РНК используется на гомологичных полисомах в качестве гомологичных матриц.

Таким образом, было установлено, что экзогенные рибонуклеиновые кислоты путем индукции белкового синтеза усиливали их дифференциацию клеток. Это в свою очередь вело к повышению количественного титра специализированных клеток и более быстрому появлению специфических белков.

Таким образом, биосинтез белков остеогенными клеточными элементами и дифференциация могли быть усилены при помощи дополнительного потока информации в цепи ДНК—РНК — белок путем искусственного вве-

дения в организм животного экзогенной гомологичной РНК.

Приведенные выше предположения о характере и особенностях действия экзогенных РНК на репаративный остеогенез явились предпосылкой для проведения экспериментов, в которых были предприняты попытки ускорить процесс заживления кости путем парентерального введения гомологичных экзогенных РНК.

При испытании различных видов экзогенных РНК в качестве стимулирующих процесс регенерации соединений как in vivo, так и in vitro большое значение имеет определение эффективной дозировки препарата.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЭКЗОГЕННОЙ РНК В ОПЫТАХ IN VITRO И IN VIVO

Поглощение экзогенных РНК и ДНК клетками различных тканей и органов описаны многими авторами (Kay, 1961; Bensch e. a., 1961; Hill e. a., 1962, и др.). В исследованиях трансформации бактерий было установлено, что появление трансформаторов в среде происходит уже при добавлении 10^{-8} мкг ДНК, т. е. около 400 молекул ДНК с молекулярным весом 15×10^6. По данным Gart-

Таблица 1

Поглощение меченной P^{32} РНК клетками селезенки в зависимости от концентрации РНК в среде и времени инкубации (по Bischop e. a., 1965)

Содержание РНК-P^{32}, γ	Время инкубации, мин	Инкорпорированная радиоактивность, имп/мин	Радиоактивность в осаждаемой фракции при пересчете на 5×10^6 клеток
100	10	5580	14,7
100	20	5580	35,4
100	40	5580	14,9
100	60	5580	16,7
150	10	8390	10,6
150	20	8390	20,4
150	40	8390	—
150	60	8390	101,3
200	10	11190	66,8
200	20	11190	48,1
200	40	11190	107,0
200	60	11190	305,7

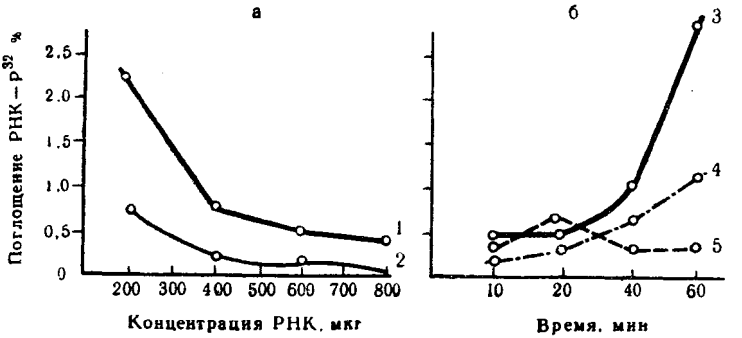


Рис. 1. Поглощение РНК-P^{32}: а — в зависимости от ее концентрации в среде и б — от времени экспозиции.

1 — поглощение полимерной РНК; *2* — поглощение полимерной РНК в присутствии 0,3 мг/мл панкреатической РНК-азы; динамика поглощения РНК-P^{32} в среде в концентрации; *3* — 200 мкг; *4* — 150 мкг; *5* — 100 (по Bischop e. a., 1965).

ler (1960), клетки Эрлиха из общего количества добавленной экзогенной ДНК поглощают только от 0,5 до 3% этой ДНК. Клетки селезенки инкорпорируют гомологичную экзогенную РНК, меченную P^{32}, в количестве около 2,4%, т. е. 0,137 γ на 5×10^6 клеток за определенное время (табл. 1).

Данные табл. 1 показывают, что поглощение клетками экзогенной РНК, а следовательно, ее эффективность во многом зависят от концентрации (рис. 1), продолжительности инкубации РНК с клетками и, очевидно, состава среды, в которой происходит контакт РНК с клеткой. Наконец, большое значение имеет физиологическое состояние клетки в момент такого контакта, т. е. ее компетентность.

Исследование зависимости стимуляции биосинтеза белка от дозы применяемого препарата экзогенной РНК показывает, что как цитоплазматические, так и ядерные препараты РНК при добавлении их к костным эксплантатам в определенных дозировках вызывали значительное повышение включения C^{14}-пролина в суммарные белки исследуемой ткани. Максимальная стимуляция наблюдалась при дозе 50 и 25 γ РНК цитоплазматических и ядерных препаратов соответственно (рис. 2). Цитоплазматические препараты в дозе 50 γ на 1 мл среды стимулировали включение C^{14}-пролина на 50,7%

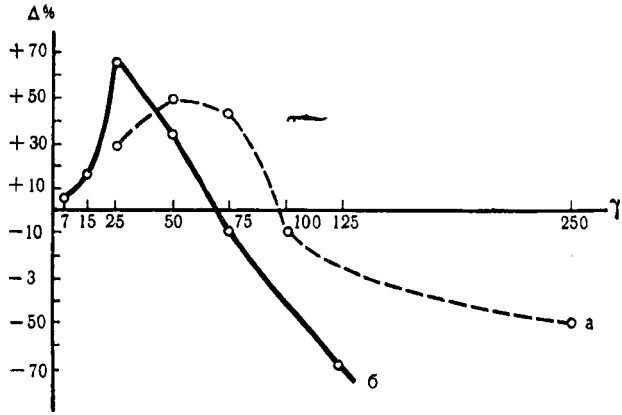


Рис. 2. Концентрационная зависимость активности:
а — цитоплазматической (0—10°) РНК и *б* — ядерной (45—65°) РНК в опытах in vitro.

($p<0,01$), а при добавлении 25 γ ядерных РНК — на 66,5% ($p<0,01$) по сравнению с контролем. Остальные дозировки оказывали более слабый эффект. Характерным являлось также то, что оба препарата в более высоких дозировках не только обладали меньшим стимулирующим эффектом, но и ингибировали включение C^{14}-пролина по сравнению с контролем. Доза цитоплазматических РНК 100 γ уже оказывала легкое тормозящее действие на включение метки, а 250 γ подавляла биосинтез на 50% ($p<0,01$). В случае использования ядерной РНК ингибирующий эффект этой фракции проявлялся и при более низких дозировках, чем при добавлении суммарного препарата РНК.

Возможно, что ингибирование поглощения макромолекул при больших концентрациях экзогенных РНК связано с ее деградацией до кислоторастворимых продуктов, которые более легко проникают в клетку, конкурентно связывая специфические переносчики мембран.

Опыты in vivo, проведенные на животных с поврежденными костями, показали, что оптимальная дозировка экзогенной РНК для различных животных неодинакова, наибольший эффект оказывает гомологичная полимерная экзогенная РНК.

РЕНТГЕНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЗОНЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ КОСТИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ РНК РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Регенеративный процесс у животных, получавших инъекции полимерных гомологичных РНК, гомологичных РНК, деградированных под влиянием РНК-аз, или гетерологичных препаратов РНК, экстрагированных из печени, протекает различно. Уже через 2 нед после перелома у животных, которым вводили полимерный гомологичный препарат РНК, в зоне повреждения появлялись более обширные тени обызвествления по сравнению с животными, получавшими РНК из печени, рибонуклеазный гидролизат или физиологический раствор.

Из рис. 3 и данных табл. 2 видно, что площади регенерата кости у подопытных животных после введения полимерных гомологичных РНК в 2,1 раза больше, чем у контрольных ($p<0,01$).

Место повреждения кости у этих животных было заполнено регенерационной тканью, состоящей в основном из обширных полей хондроидной ткани, превышающей контрольную площадь в 1,8 раза ($p<0,01$). Местами хондроидная ткань перестраивалась в грубопучковую кость, чего не отмечалось у контрольных кроликов. В то же время количество фиброретикулярной ткани в

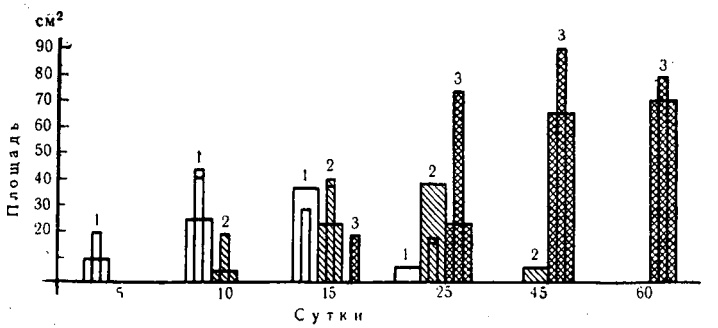


Рис. 3. Характер распределения остеогенных структур у крыс в зоне перелома после введения полимерной гомологичной цитоплазматической РНК (по данным планиграмм).

Узкие столбики — опыт; широкие — контроль (введение физиологического раствора).

1 — фиброретикулярная ткань; *2* — хондроидная ткань; *3* — остеоидная ткань.

Таблица 2

Количественное содержание тканевых компонентов в зоне дефекта кости у кроликов

Животные	Время после перелома кости, сут	Фиброретикулярная ткань, см²	Хондроидная ткань, см²	Остеоидная ткань, см²	Средняя площадь регенерата по рентгенограммам, см²
Подопытные	5	20,8±1,3	—	—	—
	10	42,3±2,1	20,7±1,5	—	17,3±1,4
	15	27,6±1,8	40,3±2,7	19,3±1,6	49,4±2,5
	25	—	18,9±1,4	75,9±2,4	70,1±3,5
	45	—	—	89,4±2,9	90,5±3,2
	60	—	—	89,1±3,1	82,6±2,7
Контрольные	5	9,1±1,0	—	—	—
	10	25,4±2,8	5,8±0,6	—	10,0±1,2
	15	35,7±2,9	22,3±1,8	—	22,9±1,6
	25	7,2±9,8	40,9±2,4	22,3±1,3	50,4±2,9
	45	—	7,5±0,5	65,2±2,7	65,2±1,8
	60	—	—	80,3±3,2	70,6±3,1

зоне дефекта у контрольных животных превышало таковую у подопытных на 30% ($p<0,01$).

Через месяц еще более заметной была разница в заживлении переломов у различных животных. Через 2 мес у подопытных кроликов в зоне дефекта кости наблюдалось формирование кортикального слоя, в то время как у контрольных животных регенерат губчатого строителя состоял из костной ткани различной степени зрелости: остеоидной, грубопучковой, пластинчатой и частично хондроидной (рис. 4).

Очевидно следует считать, что более ускоренная дифференцировка и смена морфологических структур являются результатом изменения функционального состояния остеогенных клеточных элементов и в первую очередь результатом изменения их биосинтетических возможностей.

Изменение функционального состояния остеогенных клеток и их биосинтетических возможностей подтверждается гистохимическими исследованиями белково-полисахаридных комплексов. Было показано, что через 2 нед после операции в клетках и в межклеточном веществе хондроидной и грубопучковой костной ткани регенерата

Рис. 4а. Восстановление кортикального слоя у кроликов после введения гомологичной полимерной РНК к 60 сут после операции.

Рис. 4б. Формирование кортикального слоя из остеонизированной костной ткани у кролика после введения гомологичной полимерной РНК на 60 сут в зоне дефекта кости.

Рис. 4в. Перестраивающийся периостально-эндостальный регенерат в области дефекта к 60 сут после введения полимерной РНК из печени (образование кортикального слоя только начинается).

у подопытных кроликов отмечалось значительное количество гликозаминогликанов. В этот срок отмечалась максимальная интенсивность окрашивания кислых гликозаминогликанов. Метахроматическое окрашивание кислых гликозаминогликанов. Метахроматическое окрашивание отмечалось в цитоплазме клеток и в основном веществе хондроидной ткани. Метахромазия незначительно уменьшалась при снижении pH красителя до 1,5 и 0,5. У кроликов контрольной группы кислые гликозаминогликаны обнаруживались в клетках и основном веществе хондроидной ткани, а также в фибробластах и коллагеновых волокнах фиброретикулярной ткани в значительно меньшем количестве.

Нейтральные гликозаминогликаны в регенерационной ткани подопытных животных определялись в этот срок в большем количестве, чем у контрольных. Это выражалось ярко-малиновым ШИК-окрашиванием грубопучковых и остеоидных балочек регенерата у подопытных животных, чего не было у контрольных.

Через 2 мес после резекции окраска клеток и межклеточного вещества регенерата кости пластинчатого строения у подопытных животных приближалась к окраске нормальной кости. Выявлялось несколько увеличенное количество нейтральных гликозаминогликанов в центральных участках регенерата кости и почти не выявлялись кислые. У животных контрольной группы регенерат кости все еще содержал значительное количество нейтральных и кислых гликозаминогликанов.

Результаты гистохимического анализа тканевых структур в месте заживления раны кости в определенные сроки после операции показали, что нейтральные и кислые гликозаминогликаны постоянно выявляются в этих структурах. В процессе репаративной регенерации кости у подопытных и контрольных животных происходит резкое увеличение содержания нейтральных и кислых гликозаминогликанов на ранних стадиях заживления раны кости. До развития процессов кальцификации остеоидных балочек это увеличение было преимущественно за счет кислых форм. В местах же оссификации костного матрикса преобладали гликозаминогликаны нейтрального характера. Аналогичную закономерность качественных изменений гликозаминогликанов в процессе заживления перелома кости наблюдал Б. П. Модяев (1966).

Инъекции препарата экзогенной РНК не вызывали каких-либо изменений в общих закономерностях обмена гликозаминогликанов, которые бы отличали эти процессы от обычного заживления кости. Однако скорость обмена гликозаминогликанов у подопытных и контрольных животных была различной. Так, во время организации гематомы и пролиферации клеточных элементов в зоне травмы кости накапливалась гиалуроновая кислота как у подопытных, так и у контрольных животных, хотя процесс организации гематомы и начало формирования хондроидной ткани у подопытных животных протекал быстрее, чем у контрольных. Увеличение количества гиалуроновой кислоты сопровождалось интенсификацией синтеза и хондроитинсульфатов, максимальное количество которых у подопытных животных гистохимически выявлялось значительно раньше, чем у контрольных. С началом оссификации количество кислых форм гликозаминогликанов в регенератах животных обеих групп резко уменьшалось. Но у подопытных кроликов участки грубопучковой кости выявлялись уже на 15-е сут, а у контрольных животных опять-таки значительно позже — почти на 25-е сут. ШИК-положительное окрашивание нейтральных гликозаминогликанов у кроликов, получавших препарат РНК, было выражено также более интенсивно, но максимальное окрашивание отмечалось у животных как опытных, так и контрольных групп в основном во время оссификации балочек. Видно, что под влиянием органоспецифической РНК интенсифицировалось накопление не одного какого-либо компонента, а всего комплекса гликозаминогликанов, выявляющихся на всех стадиях развития регенерата.

Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что введение полимерной гомологичной РНК вызывало значительное ускорение процесса костеобразования. Фактически уже к 45-м сут у животных дефект костной ткани полностью исчезал, происходило замещение новообразованной костной тканью преимущественно пластинчатого характера, а к 60-м сут образовывался кортикальный слой.

Структурно-морфологические исследования зоны регенерации показывают, что заживление костной ткани у животных, получавших инъекции гомологичной РНК, опережает аналогичный процесс у контрольных живот-

ных на месяц, а иногда и более. Оценивая эффект действия различных видов РНК, можно было предположить, что ускорение костеобразовательного процесса связано главным образом со стимулированием белкового синтеза в зоне регенерации полимерными молекулами гомологичной РНК. Отсутствие ясно выраженного стимулирующего действия РНК, выделенной из печени, указывало на органную специфичность описанного выше действия гомологичной РНК, экстрагированной из регенерата кости. Отсутствие эффекта при введении рибонуклеазного гидролизата гомологичной РНК свидетельствовало о том, что фактором, стимулирующим репаративный процесс, являются именно полимерные молекулы РНК.

Проведенные эксперименты с использованием органной культуры костной ткани показали практическую возможность динамического прижизненного и гистологического наблюдения за жизнеспособностью эмбриональных зачатков костей и хрящевой ткани после добавок экзогенной РНК.

Прижизненные и гистологические исследования процесса регенерации в области микродефекта эксплантата куриного эмбриона под влиянием экзогенных цитоплазматических и ядерных препаратов РНК показали, что на 3, 5, 16-е сут в них можно отчетливо проследить динамику замещения зоны дефекта ориентированными пучками коллагеновых волокон и клеточными элементами.

В контроле костные балочки в области дефекта только на 1—3-и сут содержали окрашивающиеся остеоциты, однако в дальнейшем обнаруживались уже остатки их и пустые ложа.

По характеру тинкториальных свойств куриных эксплантатов можно сказать, что костные балочки в контроле довольно быстро теряли минеральный компонент путем пассивной осмотической декальцинации, хотя их органический матрикс в этот период изменялся в малой степени (рис. 5, а, б).

Специализированные клеточные элементы в межбалочных пространствах в контрольных эксплантатах (остеобласты, клетки костного мозга) на 1—3-и сут свободно располагались в просвете, и большая часть из них была с дистрофическими изменениями. В более поздние сроки явления дистрофии в контрольных эксплантатах довольно быстро прогрессировали — к 15—16-м

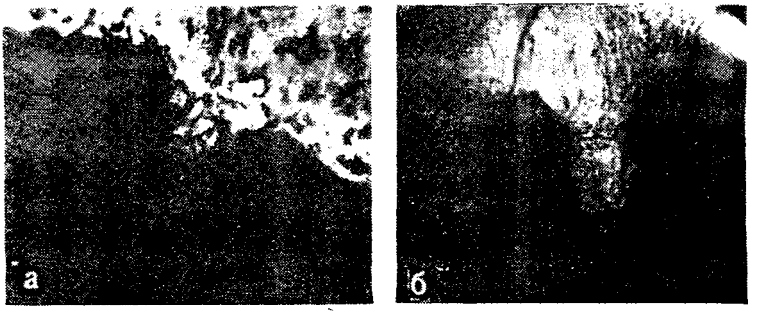


Рис. 5. Прижизненное наблюдение за регенерацией костных эксплантатов 18-дневных куриных эмбрионов:

а — после добавки на 1 мл инкубационной среды 50 мкг ядерной РНК и культивирования в органной культуре ткани по методу Sevasticoglou (1962) *б* — в контроле на 3 сут (в опыте — появление отдельных мигрирующих клеток в зоне дефекта).

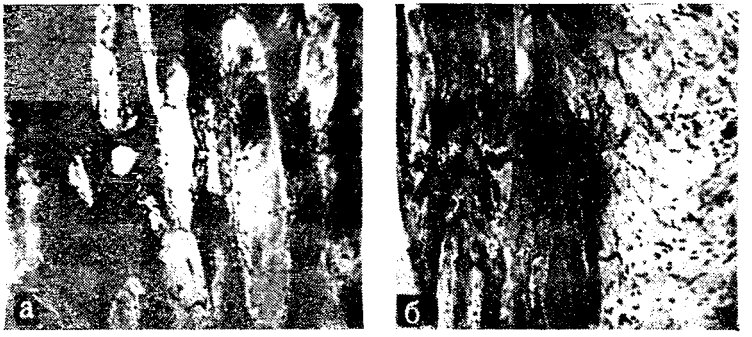


Рис. 6. Дегенеративные изменения эксплантатов на 16-е сутки культивирования после прибавления РНК-азного гидролизата гомологичной РНК (по 50 γ/мл среды).

сут наблюдалась гибель структур кости (рис. 6, а, б).

В опытных эксплантатах после прибавления в инкубационную среду экзогенной РНК, особенно ядерных фракций, на ранних этапах их жизнеспособности была значительно выше, чем в контроле. Это выражалось в более интенсивном высеве клеточных элементов в зону дефекта и образовании провизорной соединительнотканной спайки.

На 15—16-е сут у подопытных животных в межбалочных пространствах обнаруживались преимущест-

венно фибробластические элементы с отростчатой протоплазмой. В дальнейшем наблюдалась пролиферация фибробластических клеточных элементов, которые заполняют дефект эксплантата. В контроле подобных изменений не наблюдалось.

Таким образом, в процессе культивирования костных эксплантатов куриных эмбрионов происходят дистрофические изменения специализированных клеточных элементов, нарушение процессов их дифференцировки и пролиферации. Под влиянием добавок эффективных концентраций ядерных фракций экзогенной РНК жизнеспособность костных эксплантатов в органной культуре костной ткани повышается.

Результаты этих опытов свидетельствовали также о том, что в зоне костного повреждения пролиферационная активность клеточных элементов была гораздо выше в случае систематического внесения в среду полимерной гомологичной РНК, чем в контрольных эксплантатах (Р. Г. Хицан, 1971). В опытных культурах более продолжительное время, чем в контрольных, поддерживался уровень дифференциации клеточных элементов [1].

Биохимическими опытами in vitro также было подтверждено, что эффективностью обладают именно по-

Таблица 3

Включение C^{14}-пролина в суммарные белки костных эксплантатов куриных эмбрионов в зависимости от вида экзогенной РНК

Препараты РНК и их концентрация, γ/мл	Активность пролина, имп/мин/мг белка			p
	опыт	контроль	разница опыт—контроль M±м	
Цитоплазматическая РНК, 50	16540	8982	+7558 ± 981	0,01
Ядерная РНК, 25	7023	4218	+2806 ± 391	0,01
Цитоплазматическая РНК из печени, 50	8788	13071	—4282 ± 938	0,02
Щелочной гидролизат цитоплазматической РНК, 50	3087	4841	—1754 ± 418	0,05

[1] О способности повышать жизнеспособность культивируемых эксплантатов под влиянием гомологичных РНК свидетельствуют работы Emanuelson (1960), Butros e. a. (1963), Malpoix (1964).

лимерные экзогенные РНК, в то время как продукты ее деполимеризации не способны индуцировать биосинтез белков.

Как видно из данных табл. 3, препараты цитоплазматической и ядерной РНК в полимерном состоянии оказывали заметный стимулирующий эффект на включение C^{14}-пролина в суммарные белки костной ткани, в то время как РНК из печени и щелочной гидролизат гомологичной цитоплазматической РНК в дозировках 50γ на 1 мл среды тормозили биосинтез на 60,1, 56,8%' соответственно.

ИНДУКЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВ РЕГЕНЕРАТА КОСТИ ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ЭКЗОГЕННЫХ РНК

Надежными критериями скорости накопления белков в зоне репарации кости должны служить количественные методы определения специфических компонентов регенерата кости — коллагена (оксипролина) и гликозаминогликанов (аминосахаров, различных фракций) в сочетании с изучением интенсивности включения меченых предшественников в указанные выше компоненты.

Проведенные в этом направлении исследования показали, что количество оксипролина в регенерате кости животных зависит от вида вводимого препарата РНК. Из рис. 7 видно, что в случае введения суммарной цитоплазматической РНК, экстрагированной из печени, или рибонуклеазного гидролизата гомологичной РНК динамика количественного содержания коллагена в регенерате очень мало отличалась от таковой у контрольных животных. Вместе с тем введение полимерной гомологичной РНК повышало уже на ранних этапах количество оксипролина на 38—75%' ($p<0,05$ и 0,01). Максимум содержания оксипролина у этих животных также наступал быстрее.

Обращает на себя внимание также то обстоятельство, что эффектом подобного действия обладают только полимерные экзогенные РНК, выделенные из тканей данного вида животных (табл. 4). Введение животным гомологичной цитоплазматической РНК, выделенной из костной ткани куриных эмбрионов (т. е. межвидовой цитоплазматической РНК), не вызывает у

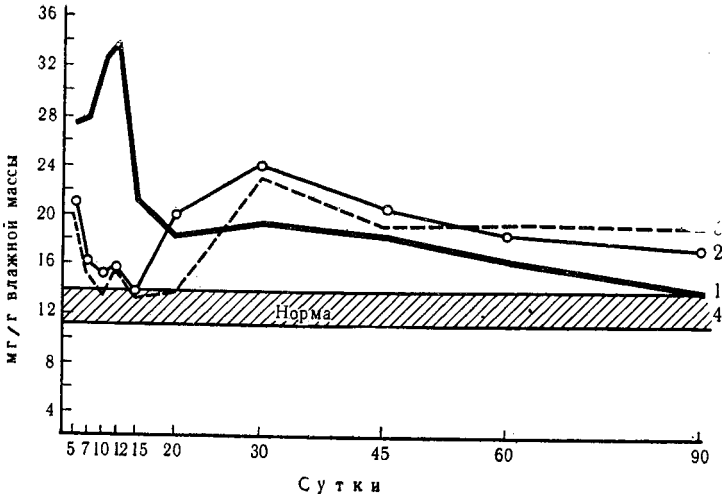


Рис. 7. Содержание оксипролина в регенерате кости.

1 — под влиянием полимерной гомологичной цитоплазматической РНК; *2* — цитоплазматической РНК из печени; *3* — рибонуклеазного гидролизата гомологичной цитоплазматической РНК; *4* — контроль (введение 0,85% NaCl).

этих животных изменения динамики накопления оксипролина по сравнению с контрольными животными.

Таблица 4

Динамика содержания оксипролина в костном регенерате крыс под влиянием цитоплазматической РНК различного происхождения (мг/100 мг сырой ткани)

Время после перелома, сут	Контрольные животные	Подопытные животные	
		инъекции РНК из костной ткани	
	инъекции физиологического раствора	крыс	куриных эмбрионов
До опыта	2,4±0,85	—	—
6	2,45±0,45	5,60±0,48	3,00±0,59
12	3,56±0,55	8,15±0,52	4,20±1,88
15	4,30±0,30	7,10±0,46	3,20±0,72
20	5,34±0,73	4,80±1,07	5,62±0,76
25	7,26±0,93	2,90±0,52	7,85±1,25
30	4,50±0,75	3,0 ±0,78	5,62±0,41
45	3,31±0,10	3,10±0,48	2,85±0,12
60	3,10±0,67	3,23±0,54	3,15±0,34
90	2,90±0,53	3,4 ±0,74	4,30±0,54

Отсутствие стимулирующего эффекта в случае введения межвидовой гомологичной цитоплазматической РНК во многом остается неясным и может быть объяснено с помощью дополнительных экспериментов. Таким образом, предварительные данные показали, что введение препарата гомологичной цитоплазматической РНК повышает количество коллагена в костном регенерате в большей степени, чем введение экстрагированной из печени или межвидовой РНК. Продукты деградации гомологичной РНК оказались также неэффективными. Однако введение экзогенных РНК животным повышало не только уровень коллагена, но способствовало синтезу и других белков, играющих важную роль в минерализации регенерата.

Биохимические исследования суммарных гликозаминогликанов в регенерате кости у животных, получавших препарат РНК, показали, что количество этих веществ в опыте повышается значительно быстрее, чем в контроле.

Известно, что в процессе восстановления кости в течение первых 2—3 нед резко увеличивается количество суммарных гексозаминов. Как видно из данных табл. 5, у крыс накопление гексозаминов продолжается в течение 2 нед, а максимальное их накопление превышает норму в 8 раз ($p<0{,}01$). У кроликов этот процесс продолжался в течение 3 нед и превышал норму в 10 раз. Нормализация количества суммарных гексозаминов у крыс происходила к 45-м сут, у кроликов — к 60-м сут.

Различия в скорости накопления гликозаминогликанов у кроликов крыс можно объяснить различным течением обменных процессов. Однако в целом характер изменения содержания суммарных гексозаминов у обеих групп животных был одинаковый.

Через 2 мес после введения животным препарата РНК, выделенной из костей крыс и кроликов, наблюдались восстановление кости в областях дефекта и нормализация содержания гликозаминогликанов. У контрольных животных в это же время количество гликозаминогликанов было еще повышенным (рис. 8). Эти данные соответствуют гистохимическим исследованиям и свидетельствуют о регулирующем влиянии РНК на нормализацию образования гликозаминогликанов при регенерации кости.

Таблица 5

Динамика содержания гликозаминогликанов и активности гиалуронидазы в регенерате кости животных

Объект исследования	Время в сутках	Количество гликозаминогликанов, мг/г сухой ткани		Активность гиалуронидазы, ед. акт./100 мг сырой ткани	
		опыт	контроль	опыт	контроль
До опыта		1,26±0,22	—	1,4±0,12	—
Кролики	5	5,17±0,47	2,39±0,18	3,1±0,28	1,9±0,19
	10	9,53±0,73	5,54±0,74	6,4±0,24	2,9±0,41
	15	14,49±0,97	10,16±0,45	8,6±0,55	5,6±0,72
	25	8,15±0,64	13,11±0,56	5,2±0,38	7,7±0,84
	45	2,77±0,26	10,50±0,88	3,6±0,31	6,3±0,57
	60	1,63±0,24	4,64±0,65	1,5±0,12	2,5±0,36
До опыта		1,41±0,39	—	1,5±0,12	—
Крысы	3	5,46±0,52	4,34±0,64	4,3±0,30	2,7±0,28
	6	11,76±0,73	6,02±0,97	6,5±0,47	5,0±0,42
	12	7,42±0,64	10,92±1,25	3,9±0,44	5,2±0,65
	20	6,04±0,77	7,84±1,00	1,8±0,13	4,0±0,38
	25	3,66±0,58	5,60±0,73	1,7±0,19	2,4±0,71
	45	1,41±0,15	2,64±0,36	1,5±0,13	1,6±0,37
	60	1,41±0,12	1,56±0,20	1,5±0,13	1,5±0,25

Для дальнейшего изучения механизма влияния РНК на синтез гликозаминогликанов использовали радиоактивную серу (S^{35}) и фракционное разделение гликозаминогликанов, выделенных из ткани регенерата. Препаративное разделение гликозаминогликанов позволило выделить 3 фракции: гиалуроновую кислоту, хондроитинсульфаты и гепарин. Показано, что количество гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфатов у подопытных животных превышало таковое у контрольных. Так, в опыте определялось на 8% ($p<0,05$) меньше гиалуроновой кислоты и на 14% ($p<0,05$) больше хондроитинсульфатов, чем в контроле. Различия в количественном содержании фракции гепарина опытной и контрольной серий статистически незначимы ($p<0,05$).

Результаты исследования удельной активности инкорпорировавшего S^{35} сульфата во фракции гликозаминогликанов в условиях нормального заживления перелома кости и под влиянием инъекций препарата РНК (табл. 6) показали, что удельная активность включив-

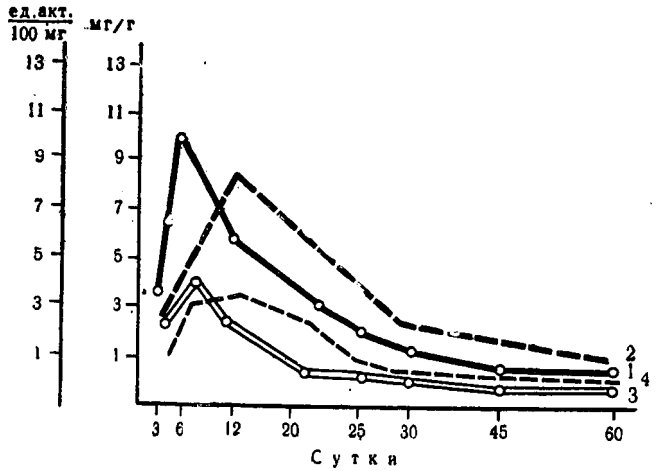


Рис. 8. Содержание гликозаминогликанов и гиалуронидазная активность в регенерате кости животных.

Гликозаминогликаны: *1* — опыт; *2* — контроль; гиалуронидазы; *3* — опыт; *4* — контроль.

шейся S^{35} в гликозаминогликаны регенерата опытной группы превышала удельную активность контрольной группы исследований. Присутствие S^{35} во фракции гиалуроновой кислоты объясняется, очевидно, тем, что в ее составе содержатся какие-то сульфатированные формы гиалуроновой кислоты. Так, есть указания, что фибробласты наряду с хондроитинсульфатами могут продуцировать частично сульфатированные формы гиалуроновой кислоты (Slack, 1959). Удельная активность фракции гепарина подопытных животных была меньше, чем у контрольных.

Таблица 6

Изменение удельной активности S^{35} во фракциях кислых гликозаминогликанов при введении гомологичной РНК (имп.мин/мг глюкуроновой кислоты)

Фракции гликозаминогликанов	Введение гомологичного препарата РНК	Введение физиологического раствора
Гиалуроновая кислота	163±4,1	96±2,2
Хондроитинсульфаты	270±6,2	149±3,3
Гепарин	58±1,4	78±2,1

Таким образом, при введении препарата гомологичной РНК удельная активность S^{35} в гликозаминогликанах тканей регенерата кости увеличивается более чем в 1,5 раза. Исключением является фракция гепарина, в которой под влиянием препарата РНК интенсивность инкорпорации S^{35} уменьшается. Это свидетельствует о том, что под влиянием парентерального введения препарата повышается синтез не только суммарных белков регенерата кости, но и гликозаминогликанов.

Известно, что течение репаративных процессов в кости находится в тесной связи с общим состоянием нейро-гуморальной системы организма и наличием в тканях и сыворотке крови необходимых для восстановительных процессов веществ.

Так как гликозаминогликаны играют важную роль в процессах заживления кости, то исследования содержания их в сыворотке крови при заживлении кости в норме и при введении препаратов РНК могут показать, в какой мере инъекции препарата влияют на содержание гексозаминов. При изучении динамики содержания суммарных гексозаминов в сыворотке подопытных животных как в норме, так и при индукции репаративной регенерации кости препаратами экзогенных РНК было установлено, что у контрольных животных уровень суммарных гексозаминов резко повышался вслед за травмой кости. Количество сывороточных аминосахаров было увеличено по сравнению с нормой на 5-е сут у кроликов на 67% ($p<0,01$), у крыс на 3-е сут на 60% ($p<0,01$). Это повышение продолжалось у крыс до 6 сут, а у кроликов — до 25 сут, причем максимальное количество этих веществ в крови как у тех, так и у других животных превышало норму в 2 раза. По сравнению с накоплением гликозаминогликанов в тканях регенерата в сыворотке крови накопление и нормализация их количества происходили в меньшей степени и более плавно, хотя в общих чертах повторяли закономерности изменения содержания гликозаминогликанов в регенерате. Установлено, что между накоплением суммарных гликозаминов в сыворотке крови и ткани регенерата существует определенная связь. По мере заживления и оссификации регенерационной ткани количество сывороточных гликозаминогликанов нормализовалось. Прямую зависимость между накоплением полисаха-

ридных комплексов сыворотки крови и выраженностью патологического процесса в тканях при травмах опорно-двигательного аппарата отмечали Р. В. Мерькурьева, Т. Я. Балаба (1968). Можно согласиться с тем, что динамика накопления и сроки нормализации уровня гликозаминогликанов в сыворотке крови отражают темпы восстановительных процессов костной ткани.

Определение в сыворотке крови содержания гексозаминов и состояния системы гиалуронидазы — гликозаминогликаны может явиться прогностическим тестом в повседневной работе врача ортопеда-травматолога, поскольку на ранних стадиях регенерации кости этим веществам принадлежит ведущая роль.

У животных, получавших препарат органоспецифической РНК, выделенной из ткани костей крыс и кроликов, накопление и нормализация содержания сывороточных гликозаминогликанов протекали быстрее, чем у контрольных, хотя общие закономерности этих процессов сохранялись. Это, очевидно, объясняется более быстрым заживлением перелома. Возможно, что появление в большем количестве гексозамина в крови объясняется индуцирующим действием РНК на другие «негомологичные» клетки, в которых интенсифицируется биосинтез гликозаминогликанов. Такое действие препарата объясняется тем, что он содержит набор других органоспецифических РНК.

Изучение тканевых и сывороточных гиалуронидаз показало, что, как и при других биологических процессах, постоянно наблюдается оптимальное соотношение фермент-субстратной системы гиалуронидазы — гликозаминогликаны. По мере прогрессирования репаративных процессов и оссификации предкостной ткани соответственно накоплению и нормализации гексозаминов с небольшим отставанием по времени увеличивалась и нормализовалась активность действия гиалуронидазы. Таким образом, наши экспериментальные данные показывают, что гиалуронидазы принимают участие в процессах минерализации регенерата кости.

Согласно литературным данным, гликозаминогликаны с коллагеном составляют единые комплексы, причем первые защищают активные группы коллагена, которые в дальнейшем участвуют в образовании первичных центров минерализации. При обызвествлении происходят определенные изменения отдельных компонен-

тов гликозаминогликанов. Б. Б. Фукс, Б. И. Фукс (1968) считают, что эти изменения заключаются в деполимеризации гликозаминогликанов под действием гиалуронидаз, в результате чего реактивноспособные группы открываются для взаимодействия с $Ca_3(PO_4)_2$. Увеличение активности гиалуронидазы во время процессов оссификации, по нашим данным, свидетельствует о непосредственном участии гиалуронидаз в образовании зародышевых кристаллов. В то же время инъекции препарата органоспецифических гомологичных РНК ускоряют проявление максимальной активности гиалуронидазы и ее нормализацию, что выражалось в сокращении сроков восстановления дефекта.

Таким образом, механизмы регулирующего действия РНК на синтез гликозаминогликанов сложные и подлежат дальнейшему изучению. Из литературных данных (Spiro, 1963) известно, что все основные компоненты углеводной части гликозаминогликанов являются продуктами различных превращений глюкозы, происходящих в присутствии нуклеотидов, в частности нуклеозиддифосфатов, которые играют важную роль в обмене углеводов. Следовательно, в синтезе гликозаминогликанов предшественники нуклеиновых кислот — нуклеотиды, рассматриваются как основной элемент.

Экзогенные РНК, обладая способностью проникать в соответствующие клетки гомологичного органа, повышают скорость репаративного процесса в костной ткани за счет усиления синтеза собственных РНК (А. М. Белоус, 1968). Возможно, что в результате проникновения экзогенных РНК в клетки и усиленного синтеза собственных РНК усиливается синтез гликозаминогликанов. Кроме того, синтез полисахаридов из глюкозы или галактозы осуществляется через ряд промежуточных этапов, которые катализируются рядом ферментов: альдолазоредуктазой, сорбитдегидрогеназой и др. Возможно, что РНК при попадании в клетку стимулирует синтез и этих ферментов (А. А. Алов, 1968). Имеются данные (А. Н. Петрова, 1967), свидетельствующие, что ферменты, катализирующие образование связей ветвления в полисахаридах, содержат прочно связанную с белком РНК. Следовательно, в клетках, где интенсифицируется синтез собственных нуклеиновых кислот, включающихся в

состав ферментов, или синтез специфических белков, происходит интенсификация синтеза гликозаминогликанов. В свете этих фактов возможен генетический контроль за синтезом белково-полисахаридных комплексов. Учитывая химические особенности гликозаминогликанов, можно думать, что непосредственный контроль ДНК биосинтеза этих комплексов может осуществляться на уровне регуляции синтеза ферментов или белков, принимающих участие в обмене полисахаридов и их метаболитов.

Б. Б. Фукс, Б. И. Фукс (1968) считают, что синтез гликозаминогликанов состоит из таких этапов, на которых можно активно воздействовать, изменяя скорость синтеза и их качественный состав. Данное положение подтверждают результаты проведенных нами исследований.

Об интенсификации биосинтеза белков в костном регенерате под влиянием экзогенных цитоплазматических РНК свидетельствует включение C^{14}-лейцина в суммарные белки костной ткани и внутренних органов (табл. 7).

Таблица 7

Влияние экзогенной РНК на включение C^{14}-лейцина в суммарные белки костной ткани и внутренних органов (имп.мин/мг белка)

Объект исследования	Опыт	Контроль
Регенерат кости	1095±40,56	570±29,79
Бедренная кость	873±71,11	448±71,60
Мышца бедра	156±23,71	163±28,12
Мышца сердца	249±12,10	227±19,16
Паренхима печени	648±20,62	572±44,17

Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что экзогенные цитоплазматические РНК вызывают индукцию биосинтеза белков главным образом в гомологичном органе, т. е. обладают органной специфичностью.

Стимуляцию биосинтеза вызывали не только цитоплазматическая РНК, но и отдельные фракции клеточной РНК, полученные методом солевого разделения цитоплазматической РНК на низко- и высокополимер-

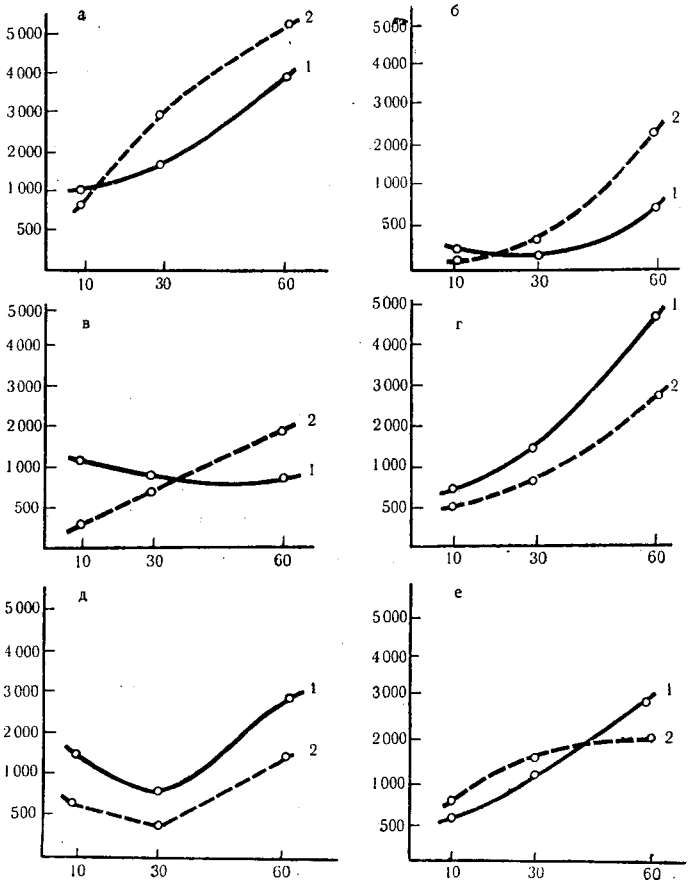


Рис. 9. Влияние различных фракций на синтез суммарных белков костных эксплантатов in vitro (по Р. Г. Хицану, 1971).

По оси абсцисс — время в мин, по оси ординат — имп.мин/мг белка: *а* — низкополимерная цитоплазматическая РНК; *б* — высокополимерная цитоплазматическая РНК $_{0-10°}$; *в* — РНК; *г* — РНК$_{55°}$; *д* — РНК$_{65°}$; *е* — РНК$_{85°}$. *1* — опыт; *2* — контроль.

ную фракции, а также ядерные РНК, экстрагированные методом фенольного термического фракционирования в интервале температур 45°; 55°; 65° и 85°С (рис. 9).

Низкополимерный компонент суммарной цитоплазматической РНК способствовал включению меченых

аминокислот только в первые 10 мин, а затем отмечается подавление процесса ($p<0,05$), т. е. данная фракция экзогенной РНК практически не влияла на биосинтез белка в костных эксплантатах. Высокополимерный компонент РНК, представляющий собой рибосомальную РНК с небольшой примесью иРНК, только через 10 мин вызывал статистически значимое повышение скорости биосинтеза белка. К 60 мин эта фракция РНК даже тормозила включение радиоактивного материала на 68% ($p<0,05$).

Фракция ядерной рибосомальной $РНК_{45°}$ оказалась неэффективной, а полученная при 55° С РНК (комплекс ядерных рибосомальных и информационных РНК) проявляла в клетках костных эксплантатов большую активность. Хотя через 10 мин инкубации данная фракция и тормозила биосинтез белка, однако в дальнейшем интенсивность биосинтеза увеличивалась в 2 раза ($p<0,01$).

Наиболее четкое стимулирующее биосинтез белка действие было выявлено в случае использования $иРНК_{65°}$. Во время инкубации сохраняется высокая стимулирующая активность данной фракции, увеличивающая включение предшественников на 200—216% ($p<0,05$).

Ядерные рибонуклеиновые кислоты, экстрагированные при 85° С, так же как и фракция, полученная из ядер при 45° С, значительно тормозили включение радиоактивного материала в белки костных эксплантатов на всем протяжении опыта.

Результаты этих исследований свидетельствовали о том, что в суммарном препарате цитоплазматической РНК ответствен за эффект индукции ее высокополимерный компонент, а из ядерных экзогенных РНК наибольшей активностью обладают только фракции, полученные из ядер при 55° и 65° С, т. е. практически активное начало сосредоточено в каких-то классах информационных РНК, которые, будучи экстрагированными из ядер либо цитоплазмы клетки, вызывают соответствующий эффект.

Стимулирование биосинтеза белков в остеогенных клетках регенерата под влиянием экзогенных РНК давало основание предполагать, что этот процесс связан с усилением синтеза собственных рибонуклеиновых кислот, программирующих биосинтез белков.

СТИМУЛИРОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА СОБСТВЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ КЛЕТОК ГОМОЛОГИЧНОГО ОРГАНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОЙ РНК

Проведенные нами исследования показали, что под влиянием инъекций гомологичной цитоплазматической РНК основная масса радиоактивности сосредоточивается во фракции РНК и ДНК клеток костного регенерата и костной ткани подопытных животных (табл. 8). Вместе с тем стимуляции синтеза РНК и ДНК в клетках других органов под влиянием этих инъекций не происходило, о чем свидетельствовало отсутствие значимой разницы во включении P^{32} в РНК и ДНК клеток тканей и органов у подопытных и контрольных животных ($p<0,05$).

Таблица 8

Влияние экзогенной РНК на включение P^{32} в РНК и ДНК клеток органов и тканей (имп.мин/мг РНК)

Органы и ткани	Опыт	Контроль
Включение в РНК		
Костный регенерат	6600±1105	2732±480,7
Бедренная кость	7658±1056	3536±515,6
Печень	12711±3082	10133±2310
Мышца бедра	1540±393,8	1466±378,2
Сердце	2697±213,7	2623±150,4
Включение в ДНК		
Костный регенерат	3556±212,9	1288±150,7
Бедренная кость	4674±665,7	2243±333,2
Печень	581±128,4	549±133,4
Мышца бедра	1659±287,0	1429±183,0
Сердце	906±45,5	852±51,05

Из данных табл. 8 видно, что хромосомный аппарат клеток регенерата кости животных, получивших инъекции экзогенной РНК, инкорпорировал P^{32} на 174,5% больше ($p<0,001$), чем контрольных животных. Аналогичная картина выявлялась и при исследовании метки

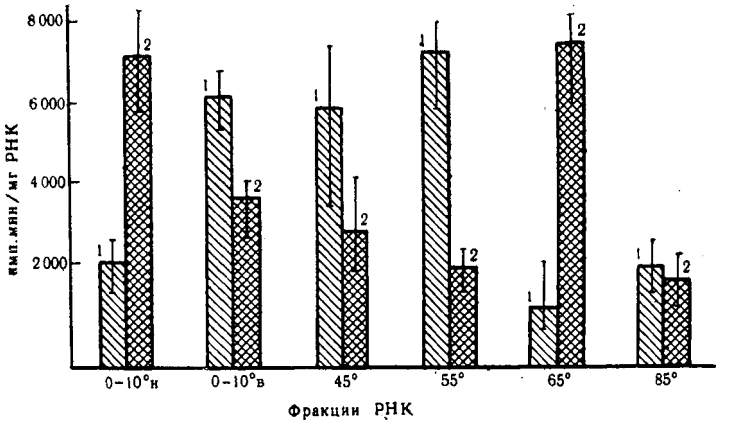


Рис. 10. Синтез рибонуклеиновых кислот в клетках регенерата кости под влиянием экзогенной РНК (по Р. Г. Хицану, 1971).
1 — контроль; *2* — опыт.

в ДНК клеток бедренной кости. В клетках других органов и тканей стимуляция биосинтетических процессов под влиянием инъекций экзогенных $РНК_{0-10°}$ в такой степени не отмечалась. Проникновение в клетку экзогенного полирибонуклеотидного материала сопряжено не только с усиленным синтезом суммарных РНК клетки, но и повышенным включением метки в ядерную субстанцию, что свидетельствует об активизации генетических локусов ДНК, ответственных за синтез различных видов РНК клетки.

Для выяснения этого вопроса из регенерата кости методом термического фенольного фракционирования в интервале 10—85° С экстрагировали нуклеиновые кислоты, меченные P^{32}, и определяли их радиоактивность (рис. 10). В клетках регенерата кости животных, которым вводили экзогенную РНК, синтез повышается в основном в двух фракциях РНК — низкополимерной цитоплазматической и информационной. Вместе с тем повышения радиоактивности в других рибонуклеиновых кислотах не отмечалось. Очевидно, экзогенные РНК проникают в клетку в полимерном состоянии, поскольку добавление в инкубационную среду продуктов ее деградации, даже если они органоспецифического происхождения, не стимулировало синтез рибонуклеиновых кислот в костной ткани. Из данных, приведенных

ниже, видно, что под влиянием рибонуклеазного гидролизата гомологичной цитоплазматической РНК наблюдалось торможение включения меченного предшественника C^{14}-урацила в суммарную РНК костной ткани (имп.мин/мг РНК) на 53,3—109,4% по сравнению с контролем.

Рибонуклеазный гидролизат, 50 γ/мл	*Контроль*
191	400
450	690
730	1320

Результаты этих исследований показывают, что экзогенный полирибонуклеотидный материал при контакте с клетками реципиента способен значительно активировать синтез собственных РНК клеток. Однако большая часть синтезируемых клеток РНК при таком способе индукции относится, очевидно, к группе быстрометящихся РНК, о чем свидетельствовала высокая концентрация радиоактивной метки в ДНК-подобной РНК.

Активация синтетических процессов, выявленная со стороны хромосомного аппарата клеток, указывала на то, что под действием экзогенных РНК на клетку в процесс вовлекается центральный генетический аппарат. Niu с сотрудниками (1964) также установили, что экзогенные РНК при проникновении в клетку усиливают синтез собственных цитоплазматических РНК всех видов, что обусловливает ДНК-зависимый синтез информационных РНК. Все эти данные также четко указывали на органную специфичность действия РНК, что можно было объяснить, допустив транспорт и проникновение этой РНК в соответствующие «органы-мишени». Эта возможность была исследована с помощью введения животным P^{32}-РНК, выделенной из костной и печеночной тканей, и последующего исследования органной локализации радиоактивности.

ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ И МЕЖВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ДЕЙСТВИИ ЭКЗОГЕННЫХ РНК

В настоящее время вопрос о тканеспецифичном характере действия экзогенных РНК можно считать решенным. Большинство исследователей в различных опытах

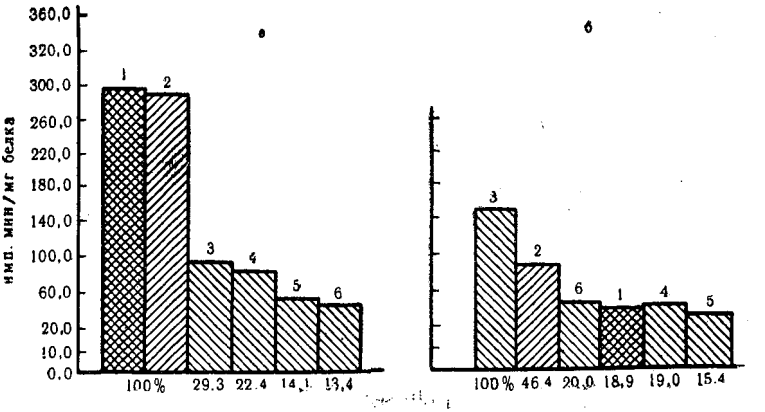


Рис. 11. Распределение меченной P^{32} экзогенной РНК по органам и тканям:

а — РНК-P^{32} из костной ткани; *б* — РНК-P^{32} из печени.
1 — регенерат кости; *2* — бедренная кость; *3* — паренхима печени; *4* — кортикальный слой почки; *5* — мышца сердца; *6* — мышца бедра.

in vivo и in vitro наблюдали эффект в случае использования гомологичных РНК. Исключение в этом отношении составляет лимфоидная система, клетки которой в силу присущих им барьерно-фагоцитарных функций неспецифически поглощают макромолекулы экзогенных РНК и ДНК. Иначе обстоит дело с активностью экзогенных РНК, полученных из тканей различных животных. В этом вопросе полной ясности нет и до настоящего времени.

Были проведены эксперименты с костной тканью, в которых была показана стимуляция биосинтеза рибонуклеиновых кислот и белков в гомологичной ткани или органе под действием соответствующей экзогенной цитоплазматической РНК. Действие экзогенных РНК носит органоспецифический характер, т. е. направлено главным образом на усиление биосинтетических процессов в гомологичном органе. Органоспецифические свойства экзогенных РНК были выявлены и при изучении распределения различных видов меченной P^{32} РНК в костной ткани и внутренних органах. В случае введения РНК-P^{32} из костного регенерата подавляющая масса радиоактивности определялась в костном регенерате и костной ткани бедра, в то время как остальные органы и ткани включали гораздо меньше P^{32} (рис. 11).

В случае введения цитоплазматической РНК-P^{32}, полученной из печени, основное количество радиоактивности выявлялось также в гомологичном органе. В этом случае в печени было на 210% больше ($p < 0{,}001$) радиоактивности, чем в регенерате и бедренной кости животных.

Полученные результаты подтверждались также данными, полученными в несколько иначе поставленных экспериментах. Рибонуклеиновые кислоты препаративно извлекали из костного регенерата и печени. В них исследовали распределение радиоактивности в зависимости от вида вводимой РНК-P^{32} — из печени или кости (табл. 9).

Таблица 9

Распределение P^{32} во фракциях РНК в зависимости от вида вводимой экзогенной РНК (имп.мин/г)

Орган, из которого экстрагирована РНК	РНК из костного регенерата			РНК из печени		
	цитоплазматическая		ядерная, обогащенная иРНК	цитоплазматическая		ядерная, обогащенная иРНК
	высокополимерная	низкополимерная		высокополимерная	низкополимерная	
Печень	360	1410	1780	1030	3300	3500
Костный регенерат	3400	7000	4100	320	1420	1200

Как видно из данных табл. 9, в случае введения РНК-P^{32} из регенерата кости или печени радиоактивность сосредоточивалась в рибонуклеиновых кислотах гомологичного органа. Хотя эти данные и указывают на органоспецифическое сродство введенной РНК к гомологичным тканям, однако при их трактовке следует проявлять определенную осторожность.

Во-первых, нельзя исключить возможности частичной деградации препарата РНК до момента ее проникновения в соответствующие клетки и неспецифической утилизации продуктов этой деградации. Во-вторых, распределение радиоактивности в костном регенерате может отражать не только специфическое проникновение гомологичной РНК, но и преимущественную по сравнению с другими органами утилизацию продуктов дегра-

дации экзогенного материала в результате интенсивно идущего в этой ткани процесса регенерации.

Однако при введении печеночной РНК-P^{32} не наблюдалось неспецифического повышения радиоактивности в костном регенерате. Так или иначе значительная доля локализованной в «органе-мишени» радиоактивности, очевидно, связана со специфическим проникновением в него гомологичной экзогенной РНК. Вопрос о судьбе введенной в организм животного макромолекулы нуклеиновой кислоты в настоящее время окончательно не решен. По мнению Паолетти и соавторов (1963), мало вероятно, чтобы введенная внутрь макромолекула оставалась недеполимеризованной. Хотя в этих опытах не удалось обнаружить увеличения концентрации кислоторастворимых олиго- или мононуклеотидов в плазме крови после инъекции полимерного материала, однако активность специфических ферментов в плазме крови после инъекции полимерной ДНК несколько увеличивалась. Это говорит о том, что скорость деградации нуклеиновой кислоты гораздо меньше, чем скорость ее поступления в межклеточные пространства и диффузия в клетки. Vorbrodt с сотрудниками (1964) наблюдали быструю деполимеризацию ДНК-H^3 после ее внутрибрюшинного введения. Свободные нуклеотиды использовались быстрорастущими клетками для синтеза собственных ДНК, а большие макромолекулы поглощались главным образом лимфоцитами. Однако данные большинства исследований убеждают, что введенные внутрь нуклеиновые кислоты могут быть доставлены к клетке, не деградируясь (Hill, 1961; Ricke, 1962; Niu, 1964; Houlobek e. a., 1966; Bischop, 1966; Ledoux e. a., 1967). Состав оснований и хроматографические свойства проникшей в клетку РНК сохраняются полностью (Ledoux e. a., 1966). Более того, высказывается мнение о том, что в клетку проникает именно полимерный материал, а продукты его деградации адсорбируются лишь на поверхности клеток (Postel и Goodall, 1966). Таким образом, этот вопрос окончательно не выяснен и подлежит специальному изучению.

Большой интерес представляет вопрос о том, каким образом макромолекулы с такими размерами, как молекулы РНК, проникают через мембрану клеток. Большинство исследователей склонны думать, что такое проникновение в клетки осуществляется путем пиноци-

тоза[1]. Существует также мнение, что этот процесс в основном физико-химической природы (А. Р. Цыганков, 1964).

Рассматриваемое выше специфическое сродство экзогенной гомологичной РНК к соответствующим органам было установлено также и при других постановках опытов. Фракции нуклеиновых кислот препаративно извлекали из костного регенерата и печени после введения животным либо костной, либо печеночной P^{32}-РНК. Было отчетливо видно, что удельная радиоактивность трех изученных фракций РНК костного регенерата была значительно выше таковой соответствующих фракций РНК печени при введении P^{32}-РНК из костной ткани. При введении P^{32}-РНК из печени наблюдалась противоположная картина.

То, что экзогенная РНК органоспецифически поглощается в полимерном состоянии соответствующими «клетками-мишенями», подтверждается авторадиографическими исследованиями проникновения меченой РНК-H^3 в клетки регенерата кости и внутренних органов (рис. 12, а, б, в, г). Изучение кинетики проникновения H^3-РНК в остеогенные клетки показало, что меченый препарат РНК уже через 10 мин после инъекции достигает клетки и проникает в цитоплазму. В последующие 30 мин наблюдается переход РНК в ядро, а через 32 ч РНК остается в клетке, накапливаясь в цитоплазме. Вместе с тем экзогенная РНК-H^3 из костной ткани во внутренние органы (печень, почки, скелетные мышцы) почти не проникает (наблюдаются лишь единичные зерна, расположенные в экстрацеллюлярном пространстве). Считают, что у гомологичных РНК, проникших в клетки в полимерном состоянии, некоторое время не изменяется хроматографический профиль (Galand e. a., 1966; Houlobek e. a., 1966). Авторадиографические данные свидетельствуют о том, что экзогенная РНК-H^3, экстрагированная из кости, не утилизируется клетками других органов. Таким образом, гипотеза о возможности специфического узнавания «клетками-мишенями» гомологичных макромолекул становится правдоподобной (Niu e. a., 1963; А. М. Белоус, 1968; В. А. Конышев, 1969; А. Б. Алексеев, 1970).

[1] Пиноцитоз рассматривается как способ упаковки молекул биополимера в специальные пакеты мембран, которые могут проникать в клетку без разрывов плазматической мембраны.

Большой интерес представляет выяснение возможности ускорения регенеративного процесса под влиянием экзогенных гомологичных РНК, также выделенных из костной ткани, но другого класса животных. Цитоплазматическая РНК, экстрагированная из костной ткани куриных эмбрионов, не оказала такого выраженного стимулирующего влияния на количественное содержание коллагена и состояние минерализации костного регенерата у крыс, как это было в случае введения цитоплазматической РНК, экстрагированной из костной ткани крысят (рис. 13). Кроме того, цитоплазматическая и ядерная РНК независимо от концентрации не повышали включения C^{14}-пролина в костную ткань эксплантатов крысят.

В опытах in vitro с C^{14}-пролином подтвердилось ранее установленное in vivo отсутствие стимулирования регенерации костной ткани при использовании межвидовой экзогенной РНК. Из данных табл. 10 видно, что применение различных дозировок обоих видов РНК, экстрагированных из костной ткани куриных эмбрионов, ведет к торможению включения C^{14}-пролина в костные эксплантаты крысят, причем величина торможения прямо пропорциональна увеличению концентрации прибавляемой РНК. Так, если прибавляли в среду ядерную РНК в дозе 7γ, включение метки тормозилось на 28%, а в дозе 25γ — на 92%. Тотальная цитоплазматическая РНК также тормозила процесс включения C^{14}-пролина на 76—215% по сравнению с контролем.

Таблица 10

Включение C^{14}-пролина в суммарные белки костной ткани крысят под влиянием РНК, выделенной из костной ткани куриных эмбрионов (имп.мин/мг белка)

Концентрация РНК в инкубационной среде, γ/мл	Цитоплазматическая РНК (0—10°)		Ядерная РНК (45—65°)	
	опыт	контроль	опыт	контроль
7	—	—	1167	1606
15	—	—	684	1075
25	1747	5505	389	4099
50	837	1479	—	—
75	877	2530	—	—

Следовательно, в опытах in vitro также подтверждается, что межвидовые гомологичные РНК не обладают способностью стимулировать биосинтез белка в «чужеродной» костной ткани, а, наоборот, оказывают в этом случае ингибирующий эффект. Однако такие межвидовые РНК слабо стимулируют процесс регенерации. Это было показано при изучении механической прочности регенерата и динамики распределения в нем микроэлементов, хотя эти процессы были выражены в значительно меньшей степени, чем у животных после

Рис. 12. Кинетика включения РНК-H^3 в клетки регенерата кости по данным авторадиографии.

а — на клеточных мембранах; *б* — в цитоплазме; *в* — на ядерной мембране; *г* — общее распределение.

парентерального введения внутривидовой цитоплазматической РНК (рис. 14, 15).

Как видно из результатов опытов на костной ткани in vivo и in vitro, получить выраженного стимулирующего эффекта при использовании гомологичных, но

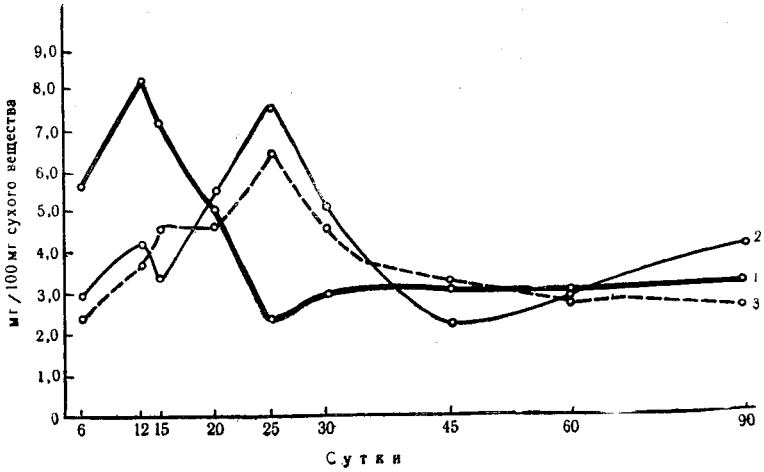


Рис. 13. Содержание оксипролина в регенерате кости крыс под влиянием полимерной цитоплазматической РНК из тканей.

1 — крысят; *2* — куриных эмбрионов; *3* — контроль — введение физиологического раствора.

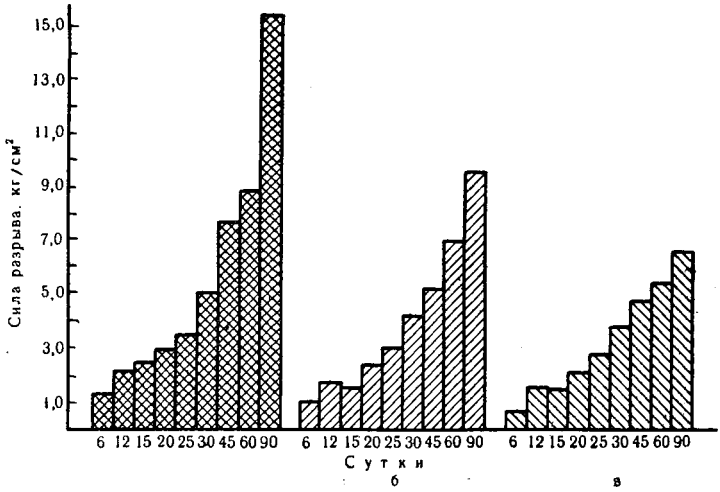


Рис. 14. Механическая прочность регенерата кости крыс после введения различных в видовом отношении экзогенных РНК:

а — тотально-клеточная РНК 0—65° из костной ткани крысят; *б* — РНК из костной ткани куриных эмбрионов; *в* — контроль — 0,85% раствор NaCl.

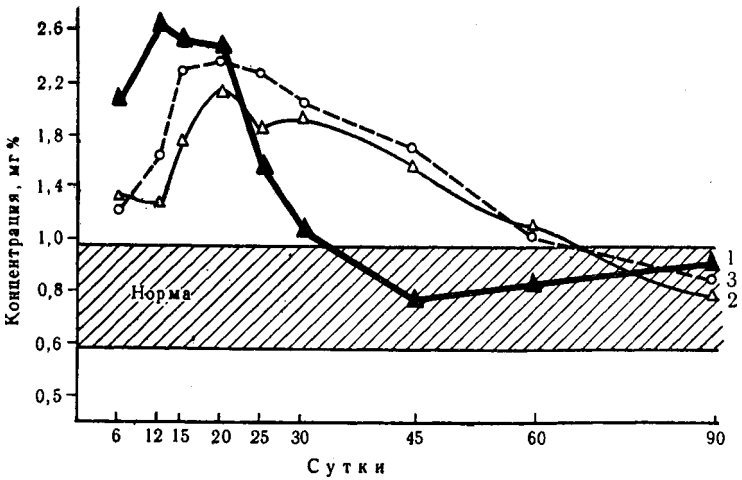


Рис. 15. Распределение алюминия в цельном регенерате кости крыс под влиянием различных РНК из костной ткани.
1 — крыс; *2* — РНК куриных эмбрионов; *3* — контроль — 0,85% раствор NaCl.

различных в видовом отношении экзогенных РНК не удается. Проведенные в этом плане эксперименты на печени показывают, что in vivo эффект экзогенных межвидовых РНК не проявляется. Примером могут служить опыты на 10—11-дневных куриных эмбрионах, которым вводили тотальную или информационную экзогенную РНК, выделенную из печени крыс. При этом были сделаны попытки установить возможность синтеза органоспецифических белков под влиянием гетерологичного препарата РНК при помощи иммунологической оценки ткани синтеза. С этой целью после введения РНК в эмбрион из последнего извлекали печень, гомогенизировали и готовили антиген выявления крысиного белка с помощью реакции преципитации.

Показано, что экзогенные РНК: иРНК, тРНК и РНК ГЦ-типа, выделенные из печени крыс, не вызывают синтез специфических белков в печени куриных эмбрионов in vivo.

При постановке этих экспериментов исключалось внесение каких-либо посторонних примесей, поэтому полученные результаты можно объяснить по-разному. Очевидно, что появление чужеродных макромолекул вызывает активацию внутриклеточных РНК-аз, которые способствуют деградации экзогенного полимерного матери-

ала до предшественников, которые не способны вызвать индукцию синтеза специфических белков в «органах-мишенях». Является ли это результатом наблюдаемой и в наших опытах «несовместимости» гетерологичных макромолекул РНК не ясно.

Однако при инкубации изолированных клеток печени куриных эмбрионов с тотально-клеточной РНК, выделенной из печени крыс in vitro, в 79,4% опытов получены положительные результаты. В этих опытах концентрация добавленной РНК колебалась в довольно широких пределах, поэтому какой-либо зависимости в этом отношении установлено не было. Характерным является то, что инкубация в течение 1 ч не дает вообще положительных результатов и эффект экзогенной РНК проявлялся несколько позже. Таким образом, в этих опытах хотя и наблюдался эффект действия межвидовой экзогенной РНК, однако никакой зависимости между способностью клеток печени куриных эмбрионов синтезировать специфические белки крыс под действием РНК и длительностью действия и концентрацией РНК в инкубационной среде выявлено не было.

Результаты указанных выше опытов in vitro отличаются от наших. Мы использовали косточки куриных эмбрионов и экзогенную РНК из костной ткани крысят; положительный эффект ни разу не наблюдался (по включению C^{14}-лейцина).

Результаты дальнейших экспериментов убеждают нас в том, что межвидовые экзогенные РНК (даже гомологичного происхождения) обладают либо очень низким эффектом, либо их влияние не проявляется.

Экзогенная РНК	*Включение C^{14}-лейцина в суммарные белки костной ткани плода человека* (имп.мин/мг) *под влиянием различных видов РНК*
Из кости человека	2222±305
» » теленка	807±85
» » собаки	1694±111
Контроль—0,85% раствор NaCl	965±92

На основании этих экспериментов можно предположить существование какого-то межвидового различия в действии экзогенных РНК. Однако причина и природа подобного «явления» остаются во многом неясными и требуют специальных исследований. Возможно, в дальнейшем путем подбора определенных условий уда-

ется вызвать стимуляцию синтетических процессов в остеогенных клетках и под влиянием гомологичной РНК от другого вида животных.

Вопрос о межвидовых различиях в действии гомологичных экзогенных РНК освещен в литературе недостаточно. Единичные исследования не дают возможности сделать соответствующие выводы о такого рода влиянии экзогенных РНК. Работа Niu с сотрудниками (1966) как будто свидетельствует о том, что биосинтетический эффект оказывали и межвидовые РНК, однако наши исследования не позволяют пока разделить эту точку зрения.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОЙ РНК В ОСТЕОГЕННЫХ КЛЕТКАХ

Значительное число исследований, проведенных Niu (1963, 1966) и Houlobek (1966) с сотрудниками, свидетельствует о том, что эффективность своего действия в клетке экзогенные РНК реализуют посредством контакта с центральным генетическим аппаратом клетки, каким-то образом вступают во взаимодействие с ним и индуцируют синтез информационных РНК. Вопрос о том, могут ли использоваться в животных клетках экзогенные РНК в качестве готовых матриц для считывания их на полирибосомах, не имеет однозначного ответа.

Первоначальное предположение о том, что экзогенные РНК при их проникновении в клетки гомологичного органа могут использоваться сразу на уровне трансляции, вызывает ряд возражений. Во-первых, стимулирующее действие на биосинтез белка оказывала более чем в 80% случаев тотальная цитоплазматическая $РНК_{0-10°}$, содержащая главным образом фракции рибосомальной и транспортной РНК и всего лишь 1—2% примесей информационных РНК. Такая низкая концентрация иРНК в растворе делала мало вероятной возможность влияния фракции на биосинтез на уровне трансляции хотя бы из-за возможности ее быстрой деградации во время транспорта к местам синтеза.

Во-вторых, наличие весьма разнообразных регуляторных механизмов в многоклеточных высших организмах могло накладывать существенный отпечаток на механизм действия экзогенных РНК. Поэтому первое

предположение заключалось в том, что действие экзогенных РНК реализуется через более сложные, возможно, центральные регуляторные механизмы биосинтеза белка.

Для выяснения этих сторон механизма органоспецифической стимуляции биосинтеза белка в костной ткани экзогенными гомологичными РНК были проведены эксперименты с костными эксплантатами куриных эмбрионов in vitro. В качестве активного материала в этих опытах использовалась как тотальная цитоплазматическая РНК, так и ядерная, обогащенная иРНК.

Для выяснения природы стимулирующего эффекта экзогенной РНК в опытах in vitro был использован актиномицин D — классический ингибитор процесса транскрипции генетической информации (Рейх и др., 1966).

Таблица 11

Влияние актиномицина D на включение C^{14}-гидролизата белка хлореллы в белки костной ткани куриного эмбриона (имп.мин/мг белка)

Номер опытов	Контроль	AD, 20 γ/мл	Вид и концентрация РНК		РНК+AD	
			$РНК_{10}°$, 50γ	$РНК_{65}°$, 50γ	$РНК_{10}°$, 50γ	$РНК_{65}°$, 25γ
1	40683	20717	147094	70959	22548	19496
	45715	19815	164915	81294	21728	18608
	44250	21300	119114	80304	19620	16100
2	24677	13281	196462	101391	11291	14706
	28285	16259	195847	149779	18457	14461
	24200	15900	185500	132410	12950	15430
3	38554	19715	45263	74910	19023	23533
	24114	19183	84054	48058	22347	20851
	31334	20803	88143	61408	33458	21505

Примечание. C^{14}-белковый гидролизат белка хлореллы добавлялся в инкубационную среду из расчета 2,5 мкКи на 1 мл среды. В опытах 1 и 2 актиномицин D (фирма Serva) прибавлен в инкубационную смесь сразу после начала опыта, спустя 3 ч — C^{14}-гидролизат белка хлореллы и РНК. Общее время инкубации 6 ч. В опыте 3 актиномицин D и C^{14}-гидролизат белка прибавлены сразу после начала опыта, а РНК — через 1 ч. Общее время инкубации 3 ч. $РНК_{10}°$ — тотальная цитоплазматическая РНК; $РНК_{65}°$ — фракция, обогащенная мРНК после термической обработки (65° С) фенолом неочищенных ядер клеток.

Как видно из данных табл. 11, в 1-м и 2-м опытах актиномицин D (AD) существенно подавлял синтез белка как в присутствии, так и в отсутствие экзогенной

РНК. Это, по-видимому, свидетельствует, во-первых, о том, что определенная часть белков в отличие от коллагена (В. И. Мазуров, 1966) синтезируется на информационных РНК, обладающих сравнительно невысокой стабильностью в цитоплазме (подавление актиномицином биосинтеза в контроле). Во-вторых, индуцирующий эффект введенной РНК опосредуется через центральный генетический аппарат клетки и связан, возможно, со стимуляцией биосинтеза собственных РНК. Действительно, актиномицин D не только снимал высокий стимулирующий эффект обоих видов РНК, но продолжал понижать уровень биосинтеза до наблюдаемого в эксплантатах без добавления экзогенной РНК. Возможно, актиномицин D, блокируя синтез иРНК, выключает одно из звеньев сложной реакции взаимодействия экзогенной РНК с регуляторными системами центрального генетического аппарата, в результате чего уровень подавленного им биосинтеза не менялся. Некоторое подтверждение этого предположения можно найти в результатах опыта 3.

Когда РНК добавляли в систему через значительно меньший промежуток времени, чем в опыте 1 и 2, актиномицин D хотя и снижал стимулирующий эффект, но уровень биосинтеза был все же несколько выше в присутствии РНК, чем без нее. Очевидно, за указанное время еще не происходило полного блокирования биосинтеза собственных РНК, что делало возможным частичное проявление стимулирующего действия экзогенной РНК.

Дополнением к описанным экспериментам явились опыты по изучению влияния хлорамфеникола (ингибитор биосинтеза белка на уровне трансляции генетической информации) на биосинтез белка в опыте и контроле. В присутствии хлорамфеникола в контроле наблюдалось резкое торможение внедрения C^{14}-аминокислот в кислотонерастворимый материал. Обе фракции экзогенной РНК (в особенности $РНК_{45-65°}$) не только полностью восстанавливали подавленный антибиотиком биосинтез белка, но и оказывали, кроме того, заметное стимулирующее действие (табл. 12).

Эти данные хорошо согласуются с предположением о влиянии экзогенной РНК на генетический аппарат клетки. В самом деле, если хлорамфеникол подавлял биосинтез белка в цитоплазме, а введенная РНК повы-

Таблица 12

Влияние хлорамфеникола на включение C^{14}-гидролизата белка хлореллы в суммарные белки костной ткани куриных эмбрионов

Контроль	Опыт (имп./мин/мг РНК)		
	хлорамфеникол, 100γ/мл	хлорамфеникол+РНК	
		$РНК_{0-10°}$, 50γ	$РНК_{45-65°}$, 25γ
24667	11055	32709	59314
28285	12055	49733	55089
19200	13305	59998	50140

Примечание. Хлорамфеникол прибавлен в инкубационную смесь сразу после начала опыта, спустя 3 ч прибавлены C^{14}-гидролизат белка и РНК.

шала биосинтез собственных РНК, то наличие в опыте некоторого стимулирующего эффекта связано прежде всего с переходом РНК в цитоплазму и образованием новых комплексов с рибосомами. При этом, вероятно, ингибирующее действие хлорамфеникола ослабляется.

Наконец, исследовалось прямое действие экзогенной РНК на синтез собственных РНК в клетках костных эксплантатов куриных эмбрионов in vitro и влияние актиномицина D на этот процесс (табл. 13).

Таблица 13

Влияние экзогенных РНК на включение C^{14}-урацила во фракцию РНК костных эксплантатов куриных эмбрионов в условиях актиномицинового блока (имп.мин/мг)

Контроль	Экзогенная РНК		AD, 20γ/мл	AD+РНК	
	0—10°, 50γ	45—65°, 25γ		0—10°, 50γ	45—65°, 25γ
690	1380	2030	180	650	250
1320	2009	2600	146	800	338
700	1280	1870	132	480	205

Примечание. C^{14}-урацил (удельная активность 4,37 мкКи/мкмоль) добавляли в среду по 1 мкКи на 1 мл. Условия инкубации, как в опыте 1 табл. 11.

Актиномицин D в контроле вызывал резкое понижение биосинтеза РНК, а в опыте стимулирующее действие экзогенной РНК подавлялось антибиотиком до уровня контроля или даже ниже. Эти данные коррелируют с данными по влиянию актиномицина D на биосинтез белка и его индукцию экзогенными РНК и еще раз под-

крепляют заключение о том, что стимуляция синтеза белка экзогенными РНК в костных эксплантатах происходит на уровне транскрипции через какое-то сложное (и неясное пока) взаимодействие экзогенной РНК с центральными регуляторными системами биосинтеза белка в ядрах клеток.

Это подтверждается некоторыми литературными данными, свидетельствующими о том, что, проникая в клетку, РНК взаимодействуют именно с генетическим аппаратом клетки. Из исследований Houlobek с сотрудниками (1967) следует, что проникшая в клетки экзогенная РНК локализуется главным образом в ДНП. После разделения ДНП на компоненты основная часть РНК оказалась связанной с белковой фракцией. В. Н. Томсонс и В. И. Рыкова (1966) показали, что экзогенные РНК стимулируют синтез гистонов в ядрах клеток. Если учесть, что гистонам приписывается роль гипотетических репрессоров, а экзогенная РНК влияет на их синтез, то, возможно, одним из путей реализации индуцирующего влияния экзогенных РНК является именно этот.

Niu с сотрудниками (1963—1964) считают, что экзогенная РНК действует главным образом на ядерную функцию, причем эта индукция чрезвычайно стабильная и поддерживается через 21 еженедельный пассаж, что соответствует сохранению индуцирующей способности в клетке примерно в 244 генерациях.

Хотя результаты наших экспериментов позволяли полагать, что гомологичная экзогенная РНК данного вида животного проникает в клетки в полимерном состоянии, они не дают возможности судить о дальнейшей судьбе проникшей в клетку РНК. Неясно, сохраняется ли полностью макромолекулярная структура активности фракции суммарного препарата и связана ли именно с этим их стимулирующая активность или она подвергается некоторой деградации до «блоков» (Гро и др., 1966), сохраняющих специфическую способность стимулировать биосинтез собственной РНК? Неясно также, функционируют ли эти РНК, которые, очевидно, проникают в ядро, в качестве матриц для ядерных белков, участвующих в регуляции ДНК-зависимого синтеза РНК, либо они непосредственно взаимодействуют с определенными участками ДНК, либо они имеют специфическое сродство к определенным группам репрессоров или депрес-

соров белковой природы, либо, наконец, они сами несут репрессорные или депрессорные функции. Выяснение всех этих вопросов требует специальных исследований.

Б. Б. Фукс с сотрудниками (1964) предполагают существование так называемых «каналов связи» в клетке, по которым происходит передача «сведений» с периферии клетки к ее центральному аппарату, в результате чего возникает «запуск» биосинтеза белков. Для реализации действия экзогенной РНК необходимо, чтобы в клетке она попала в этот гипотетический «канал связи». Во всяком случае, вся трактовка этих и ряда других вопросов, касающихся действия экзогенных РНК на молекулярном уровне, является в настоящее время во многом спекулятивной.

Niu с сотрудниками (1961—1964, 1966) удалось при помощи различных полимерных гомологичных экзогенных РНК индуцировать рост и дифференциацию специфических эмбриональных тканей, а также получить в клетках специфический синтез белков, которые в обычных условиях не синтезируются. Продукты деградации РНК (щелочные и рибонуклеазные гидролизаты РНК), а также гетерологические препараты РНК (неорганноспецифические) такой способностью не обладают.

Результаты проведенных исследований четко показали, что при попадании внутрь организма экзогенные гомологичные РНК устремляются главным образом в «клетки-мишени», проникают в них и, воздействуя на центральный генетический аппарат, интенсифицируют биосинтез белков. В этом, очевидно, и состоит основной эффект их действия.

В настоящее время существует предположение, что синтезируемые ядерные РНК представляют собой комплекс РНК+белок, значение компонентов которого в процессах роста и дифференцировки клеток еще недостаточно ясно (Huang e. a., 1969). Поэтому в дальнейших экспериментах были сделаны попытки изучить природу активного начала экзогенной РНК при помощи различных ферментативных и химических обработок. Результаты проведенных в этом направлении экспериментов свидетельствовали о том, что биосинтетическая активность экзогенной РНК проявлялась лишь в том случае, когда сохранялась полимерность полирибонуклеотидного компонента РНК. Установлено, что ни увеличение числа депротеинизаций, ни многократные очистки препарата эфиром не оказывали заметного влияния на эффективность действия экзогенной РНК.

В настоящее время в литературе дискутируется вопрос о том, какой из компонентов экзогенной РНК является активным началом, как влияют различного рода методические процедуры на активность препарата и т. д. Hillman с сотрудниками (1967) сообщили о том, что многократные отмывки эфиром препарата РНК снижают его активность и эффект клеточной индукции исчезает. Авторы связывают это с удалением из препарата так называемого Фолин-положительного вещества, которое является белком.

Для проверки этих данных мы отмывали препарат РНК 1—5 раз эфиром. Однако экзогенная РНК не снижала включение радиоактивного материала в суммарные белки костных эксплантатов. Более того, при однократной отмывке препарата, когда, казалось бы, количество Фолин-положительного материала в нем было больше, наблюдалось, наоборот, торможение биосинтеза суммарных белков в костных эксплантатах in vitro, т. е. сохранение в препарате большего количества белковых примесей подавляло активность препарата.

Таким образом, полученные данные не позволяют пока разделить точку зрения авторов о значении Фолин-положительного материала как фактора индукции препарата экзогенной РНК.

Аналогичная цель преследовалась также и в опытах in vitro, в которых испытывалось действие препарата РНК на белковый синтез в костных эксплантатах. Препарат подвергался многократным депротеинизациям. При десятикратной очистке РНК фенолом и додецилсульфатом натрия ее активность не меняется и сохранялась стимуляция белкового синтеза. Затем экзогенная РНК подвергалась ферментативным и химическим обработкам (табл. 14). Разрушение полирибонуклеотидного компонента экзогенной РНК рибонуклеазой (фирма Reanal) во всех случаях опытов устраняла ее биологическую активность.

Согласно некоторым исследованиям (Niu, 1959; Amos e. a., 1961; Monsoar e. a., 1965; Mannick, 1962, 1966), обработка рибонуклеазой полностью лишает активности препарат РНК в опытах in vivo и in vitro. В то же время другая группа исследователей утверждает, что активностью обладает именно какой-то белковый компонент, входящий в состав препарата (Yamada, 1960; Tiedemann, 1963). При обработке экзогенной РНК трипсином (фирма Serva) активность препарата не изменялась (А. Б. Алексеев, 1970, и др.).

Таблица 14

Влияние обработанной экзогенной РНК на включение C^{14}-аминокислот в суммарные белки костных эксплантатов куриных эмбрионов

Вид обработки препарата РНК	Включение C^{14}-аминокислот имп.мин/мг белка	
	$\bar{x}$	$\pm S\bar{x}$
Обработка трипсином без депротеинизации:		
контроль	1824,25	722,27
опыт	753,63	162,0
Обработка трипсином с депротеинизацией:		
контроль	1091,7	368,98
опыт	1796,0	649,36
Трипсин (без РНК):		
контроль	3446,7	646,52
опыт	4025,0	1036,7
РНК:		
контроль	1627,4	398,1
опыт	3152,2	296,3
Рибонуклеаза (без РНК):		
контроль	2240,4	551,1
опыт	4709,6	526,9
Щелочной гидролизат:		
контроль	1566,0	278,8
опыт	531,0	296,8

Несмотря на полученные результаты, вопрос о значении белка в составе полимерных молекул РНК остается открытым. Известно, что в составе синтезируемых молекул РНК содержится белок, который, очевидно, прочно связан с РНК и играет роль стабилизатора при проникновении РНК в клетку, защищая ее от действия эндогенных рибонуклеаз. При этом, возможно, белок отщепляется.

М. А. Губерниев и Е. М. Лейкина (1969), исследуя связь между биологической активностью препарата ДНК из регенерата печени крысы и свойствами его компонентов (ДНК, белок и РНК), показали, что биохимическая активность препарата ДНК связана с наличием примесей РНК и прочно связанного белка.

По данным Н. В. Белициной и др. (1964), информационная РНК, мигрирующая из ядра в цитоплазму,

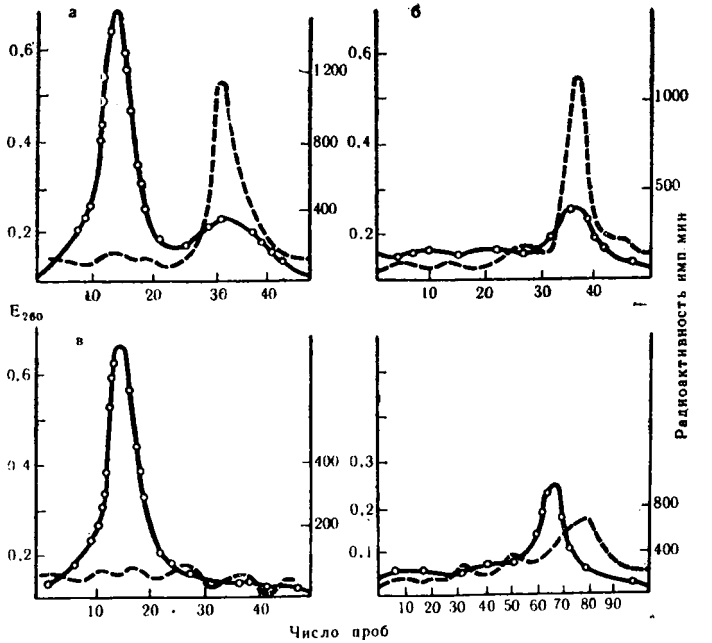


Рис. 16. Фракционирование цитоплазматической РНК-C^{14} на колонках с сефадексом G-200.

Сплошная линия — оптическая плотность, пунктирная — радиоактивность; *а* — суммарный препарат; *б* — низкополимерный компонент; *в* — высокополимерный компонент; *г* — рибонуклеазный гидролизат.

представляет собой комплекс с белком, хотя содержание последнего в РНК весьма незначительно (О. П. Самарина и др., 1967). Возможно, что в данном случае речь идет о соединениях типа информосом (А. С. Спирин, 1969). Для выяснения локализации этого белка во фракциях экзогенной РНК применяли разделение на колонках с сефадексом.

Мы фракционировали суммарную цитоплазматическую РНК-C^{14} на колонках с сефадексом G-200. Основная масса радиоактивности распределялась только в зоне низкополимерного компонента — тРНК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в составе препарата РНК присутствует, очевидно, комплекс типа пептидил — тРНК, в который включается основная масса радиоактивности, и показывают, что количество белка

в других фракциях РНК, очевидно, очень низкое (рис. 16).

С. Е. Бреслер с сотрудниками (1964) показали, что при диссоциации C^{14}-рибосом в трис-HCl-буфере в раствор переходит значительная часть недостроенного меченого белка, который по предположению авторов, связан с РНК и представляет собой полинуклеотидпептид. Было установлено, что в состав пептида входит рибосомная РНК, хотя авторы допускают возможность присутствия и тРНК. Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что в этом комплексе стимулирующую роль играет его полирибонуклеотидный компонент. Последний, очевидно, органоспецифически проникает в клетку, достигает ее ядра и стимулирует биосинтез белка.

Глава II

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ВОССТАНОВЛЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ

ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК И ДНП ПРИ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

Наиболее характерным признаком процессов репаративной регенерации и компенсаторной гипертрофии органов и тканей, в том числе и печени, является резко выраженная активация синтетических процессов в клетках под влиянием тканевых и гуморальных факторов. В этом отношении наиболее выраженный и ранний эффект наблюдается со стороны белоксинтезирующего аппарата клетки, первым этапом реакции которого является повышенный синтез РНК и ДНК.

Известно, что в процессе регенерации печени меняется активность многих ферментов, участвующих в синтезе ДНК и РНК. Эти изменения наблюдаются перед нарастанием синтеза ДНК и РНК или во время синтеза и продолжаются несколько дней. В период активного синтеза ДНК в регенерирующем органе, вероятно, меняются и свойства самой ДНК, поскольку было обнаружено, что в этот период ДНК обладает признаками денатурированности. Признаками денатурированности ДНК обладает только на ранних стадиях репликации, а ДНК, прошедшая этот цикл, по всей видимости, приобретает свойства, присущие нативной структуре (В. С. Дашкевич, 1965).

Поскольку в большинстве фаз митотического цикла ДНК в клетке представлена в виде комплекса с белками (ДНП), то выяснение различий в структуре и физико-химических свойствах этого комплекса в клетках

нормального и регенерирующего органа позволит понять особенности метаболической активности при тех или других состояниях.

В настоящее время установлено, что необходимым условием для синтеза новых РНК на ранее репрессированных генных локусах является изменение структуры конденсированной и диффузной фракции хроматина. При частичной гепатэктомии через 20 ч компактность упаковки (возможно, суперспирализация) макромолекул в системе диффузного хроматина значительно уменьшается, что проявляется в увеличении амплитуды плавления этой фракции с 55 (норма) до 67%. К этому времени количество РНК увеличивается с 17 (норма) до 24%. В более поздние сроки регенерации амплитуда плавления, наоборот, снижалась до 42%, что свидетельствует о более плотной упаковке диффузного хроматина. В этот период уровень РНК в клетках нормализуется. Такое изменение пространственной упаковки хроматина скорее всего свидетельствует об изменении стерической доступности матрицы при относительном постоянстве соотношения белка и ДНК в хроматине. Циклические изменения структуры аухроматина в процессе регенерации клеток печени указывают на то, что включение (либо выключение) функции генома обусловливается, кроме прочих причин, изменением стерической доступности матрицы вследствие модификации ее упаковки. Считают, что одним из регуляторов этих процессов может быть РНК, содержание и качественный состав которой в составе хроматина в ходе регенерации меняется (Е. М. Лейкина и др., 1971). Хотелось бы обратить внимание именно на последнее обстоятельство — на зависимость метаболического состояния ДНП от содержания в нем различных рибонуклеиновых кислот, поскольку далее мы укажем на значение «примесей» РНК в составе ДНК, который использовался в качестве экзогенного стимулятора. Появление «обогащенного» рибонуклеиновыми кислотами ДНП в зоне репарации в естественных условиях вполне реально. Источником этого материала могут быть разрушенные клетки регенерата поврежденной ткани.

Правда, если и предполагается участие компонентов ДНП погибших клеток в регуляции восстановительных процессов на тканевом уровне, то остается неясной доля вклада в этот процесс белковой и нуклеотидных

частей ДНП. Нуклеопротеиды регенерирующих тканей изучены недостаточно, что объясняется чрезвычайной гетерогенностью и сложностью строения ДНП. Белковый компонент комплекса представлен в животных тканях гистоновыми и негистоновыми белками. Гистоны, основные белки комплекса, отличаются высокой гетерогенностью и составляют его основную массу, а негистоновые белки составляют всего 18% от общего состава нуклеопротеида.

Если рассматривать подобные вопросы по отношению к экзогенным РНП как тканевым факторам регуляции, то в настоящее время довольно четко показано, что обработка этих препаратов РНК-азой ведет к 100% потери их активности (Niu, 1966; А. М. Белоус, 1968; А. В. Конышев, 1969; А. Б. Алексеев и др., 1969; Р. Г. Хицан, 1971, и др.). Поэтому большинство авторов приписывают стимулирующую роль именно полинуклеотидному компоненту препаратов РНП или РНК. В опытах с ДНП Е. М. Лейкина и др. (1968) получали этот препарат из регенерирующей печени подвергали его ступенчатой фенольной или протеолитической депротеинизации, затем вводили его частично гепатэктомированным крысам. Ранее было выяснено, что ДНК, выделенный из регенерирующей печени кроликов и введенный животным другого вида (мыши, головастики), через 24 ч после резекции $^1/_3$ печени вызывает увеличение концентрации РНК в регенерирующей печени реципиентов, а также повышает массу органа и способность печеночных клеток к компенсаторной гипертрофии за счет увеличения размеров их ядра и ядрышек, причем такой эффект ДНП оказывал как в нативном состоянии, так и после частичной депротеинизации.

Позднее было подтверждено, что активность таких препаратов сохраняется в том случае, если они выделяются именно из регенерирующих тканей и эта активность зависит от содержания белка. Из данных табл. 15 видно, что активность ДНП и ДНК сохраняется даже при депротеинизации до соотношения в препарате N/P=2.0. При более высокой очистке ДНК (N/P=1,65) эта активность исчезает, что отчетливо видно по уровню концентрации рРНК в регенерирующей ткани печени.

В связи с этим было высказано предположение, что активность этих препаратов связана с прочно связан-

ным с ДНК белком, либо она зависит от каких-то азотсодержащих веществ, обладающих специфической активностью в период регенерации (М. А. Губерниев и др., 1968).

Таблица 15

Содержание нуклеиновых кислот в регенерирующей печени крыс при введении препаратов с различным содержанием белка и полимерностью ДНК (М. А. Губерниев и др., 1968).

Используемый препарат (150 мкг на 200 мг массы тела)	Соотношение N/P	Концентрация нуклеиновых кислот в ткани регенерирующей печени (мкг/100 мг сухой ткани)	
		РНК	ДНК
ДНП	3,76	553,3	72,5
Полимерная р-ДНК	2,0	533,4	73,3
Деполимеризованная ДНК-азой р-ДНК	2,0	552,0	70,6
р-ДНК	1,65	382,0	72,5
Раствор ДНК-азы (контроль)	—	364,0	72,4

Такие же препараты, экстрагированные из нормальной печени (н-ДНП), не стимулировали накопление рибонуклеиновых кислот в клетках регенерирующей печени (рис. 17). Вместе с тем как р-ДНП, так и н-ДНП по своим физико-химическим свойствам существенно не отличаются друг от друга (табл. 16). Отличие в основном заключается в количестве РНК в них.

Таблица 16

Свойства ДНП и ДНК, выделенных из нормальной и регенерирующей печени крыс (М. А. Губерниев и др., 1967).

Препарат	N/P (среднее)	Концентрация РНК в препарате (% от количества ДНК)	E_p-260	нм [η] дл/2	Мол. вес×$\times 10^6$ ДНК и ДНК в ДНП
н-ДНП	3,75	7,60	7170	38,3	8,5
р-ДНП	3,76	10,44	6947	34,0	7,56
н-ДНК	1,65	4,90	6714	65,0	7,40
р-ДНК	1,87	7,03	6702	68,3	7,56

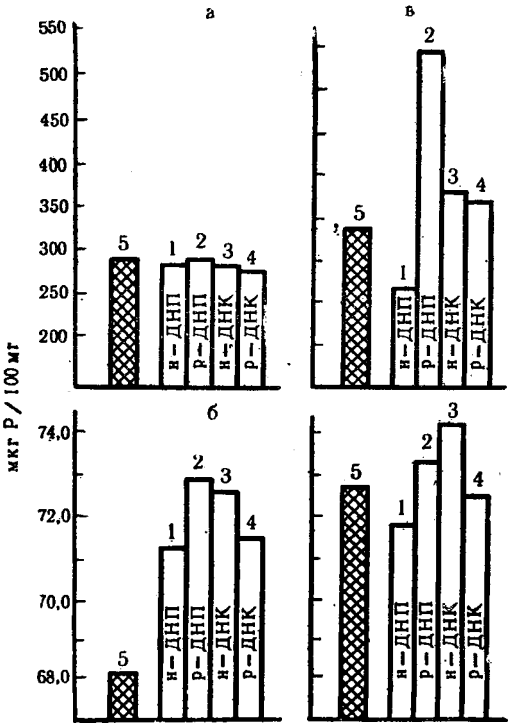


Рис. 17. Влияние внутривенного введения.

1 — н-ДНП; *2* — р-ДНП; *3* — н-ДНК; *4* — р-ДНК на концентрацию РНК и ДНК в ткани, *а*, *б* — нормальной и *в*, *г* — регенерирующей печени через 42 ч после удаления $^2/_3$ органа; *5* — контроль — 0,7 М NaCl. По оси ординат — концентрация, мкг Р/100 мг сухой массы ткани (по М. А. Губерниеву, Е. М. Лейкиной и др., 1967).

Препараты ДНП и р-ДНК по сравнению с аналогичными препаратами из нормальных тканей обогащены рибонуклеиновыми кислотами.

Данные этих экспериментов позволяют предположить, что рострегулирующей активностью обладают какие-то белки, очевидно, негистонового типа. Этот комплекс в составе ДНП обладает способностью специфически индуцировать биосинтез нуклеиновых кислот в клетках того или иного регенерирующего органа, а также изменять в них митотический индекс (табл. 17).

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что препарат ДНП, выделенный из регенерирующих тканей,

Таблица 17

Митотическая активность и количество гепатоцитов после введения препаратов

Препарат	Состояние печени крыс через 42—44 ч после резекции $^2/_3$ органа		Контроль	
	МИ, ‰	количество гепатоцитов (на одно поле зрения)	МИ %	количество гепатоцитов (на одно поле зрения)
0,7 М NaCl	12,56	13	—	—
н-ДНП	6,62	14	0,33	22
р-ДНП	8,31	14	0,75	20

способен повышать митотический индекс не только в клетках регенерирующей печени, но и в особенности в клетках печени интактных крыс в большей степени, чем н-ДНП, т. е. препарат, более обогащенный РНК, оказывает более выраженное влияние на редупликацию ДНК.

Очевидно, при дополнительной фенольной очистке препарата белки, содержащие примеси РНК, подвергаются элиминированию, в результате чего препараты р-ДНК или р-ДНП теряют свою активность.

Поскольку было установлено, что введение мышам на следующий день после частичной гепатэктомии препарата ДНП, выделенного из регенерирующей печени кроликов, способствует уже к 4-м сут после операции увеличению массы печени за счет увеличения размеров клеток и ядер (Е. М. Лейкина, В. С. Тонгур и др., 1960), то считали, что экзогенные ДНП не обладают видовой специфичностью.

Из данных табл. 18 видно, что экзогенная ДНК, выделенная из регенерирующей печени кролика и введенная мышам после частичной гепатэктомии, увеличивает не только массу печени, но и концентрацию собственных РНК в клетках паренхимы печени. В то же время ДНК, выделенная из нормальной печени, таким действием не обладала.

На основании этих данных было сделано заключение, что экзогенные ДНП, хотя и не обладают видовой специфичностью, однако проявляют четкую органо- или тканеспецифичность при парентеральном введении. Ос-

Таблица 18

Влияние внутривенного введения препаратов ДНК на массу печени мышей и концентрацию в ней нуклеиновых кислот (М. А. Губерниев и др., 1964).

Препарат	Средняя масса печени	Концентрация, мг/г		РНК/ДНК
		РНК	ДНК	
н-ДНК	4,67	10,0	4,0	2,5
р-ДНК	5,39	13,0	4,2	3,14
0,14 М раствор NaCl	4,26	8,8	3,7	2,54

новное действие проникших в клетку компонентов ДНП заключается в стимуляции биосинтеза нуклеиновых кислот в регенерирующих органах и тканях. Однако подобные явления в органах и тканях способны вызвать дезоксирибонуклеопротеиды, экстрагированные из обычных тканей. Оказалось, что ни ДНК, ни ДНП, выделенные, например, из нормальной или регенерирующей печени кроликов, не обладали способностью активировать синтетические процессы и, в частности, повышать концентрацию РНК в клетках печени интактных кроликов или мышей. Наоборот, ДНП, выделенный из регенерирующей ткани, обладает свойствами активатора. Более того, действие таких препаратов ДНП строго органоспецифично. Об этом свидетельствуют эксперименты, в которых крысам после пневмонэктомии вводили ДНП, выделенный из регенерирующей печени. При этом активации синтеза РНК в оставшемся легком не наблюдалось. Подобные результаты были получены при введении гепатэктомированным крысам ДНП, экстрагированного из гипертрофированных легких. Как видно из данных табл. 19, ни н-ДНП, ни р-ДНП из печени крыс не влияют на концентрацию нуклеиновых кислот в нормальных или гипертрофирующих легких. И, наоборот, введенный крысам р-ДНП из легких не вызывал увеличения концентрации РНК в регенерирующей печени крыс.

Более подробными исследованиями динамики синтеза нуклеиновых кислот в ткани легких при компенсаторной гипертрофии было установлено, что наиболее высокая концентрация ДНК и РНК в ткани такого лег-

кого в обычных (неиндуцированных внешними нуклеиновыми кислотами) условиях наблюдается к 4-м сут, а интенсивный митоз клеток — к 5-м сут. Если выделить из нормального ($ДНП_н$) и гипертрофированного легкого ДНП ($ДНП_г$) и ввести его другим животным в эти или другие сроки, то действуют эти препараты в организме реципиента по-разному (табл. 19).

Таблица 19

Концентрация РНК и ДНК при введении крысам ДНП из нормального и гипертрофирующегося легкого в мкг на 100 мг (Е. М. Лейкина и др., 1968)

Вид исследования	Вводимое вещество					
	$ДНК_н$		$ДНП_г$		0,7 М NaCl	
	РНК	ДНК	РНК	ДНК	РНК	ДНК
Контроль нормальное легкое	30,9	60,2	31,1	61,1	31,1	61,2
Удаление легкого (препараты введены на 4-е сут после операции)	39,2	61,6	54,2	62,3	40,2	62,0
нормальная печень	89,9	21,9	91,6	23,7	90,4	22,6
Удаление 66% печени (введение препаратов через 18—20 ч после операции)	109,7	22,5	114,5	23,4	112,2	23,6

Из данных табл. 19 видно, что $ДНП_г$, выделенный в период активного синтеза ДНК из легких, претерпевающих компенсаторную гипертрофию, является биологически активным препаратом, который вызывает в ткани гипертрофирующегося легкого активацию синтеза РНК. Вместе с тем ДНП, выделенный из ткани гипертрофирующегося легкого, не влияет на процессы обмена нуклеиновых кислот в нормальных легких, а также в нормальной и регенерирующей печени.

Эти данные подтверждают наличие тканеспецифических свойств у препарата ДНП и изменения в периоде регенерации свойств ДНП в направлении приобретения каких-то новых качеств, которые обеспечивают активность препарата. Очевидно, проникновения ДНП в клетку в неизмененном виде не происходит, препарат подвергается частичной деградации и его активные «блоки», достигнув ядра клетки реципиента, вызывают

активацию генетического аппарата, следствием чего является усиление тотального синтеза РНК. Сейчас трудно отдать предпочтение тому или иному компоненту, ответственному за эффект индукции, но скорее всего таким компонентом могут являться примеси информационных или регуляторных РНК, которые, как предполагают Frenster с сотрудниками (1965), способны модифицировать функцию гистонов ядра и способствовать синтезу соответствующих месенджеров.

Можно думать, что биологическая активность препаратов ДНП зависит от содержания в них белка и РНК. Как видно р-ДНП, очищенный до N/P=1,65, т. е. не содержащий практически белка, не обладает активностью. Поскольку уже при первой фенольной депротеинизации ДНП теряются полностью гистоны из комплекса, можно думать, что восстановительной активностью обладают какие-то другие регуляторные белки (глобулины, кислые белки), которые остаются в составе ДНП. Сейчас трудно сделать выводы о том, будут ли оказывать они стимулирующее действие на биосинтез белков и нуклеиновых кислот в клетках в виде экзогенного препарата. Более правдоподобным объяснением биологического действия различных видов экзогенных ДНП может служить факт присутствия в них разного количества «примесей» РНК. р-ДНП содержит больше таких «примесей», чем н-ДНП. Ранее было установлено, что в составе ядерных белков и, в частности, кислых белков постоянно содержатся РНК, хотя их концентрация невысока (Paul, 1969). Присутствие РНК в ядерных белках других классов в настоящее время доказано (Frenster e. a., 1965; Bonner, 1969). Очевидно, что активность экзогенных ДНП связана именно с наличием информационных или каких-то регуляторных РНК в их составе. Эти РНК утрачиваются при фенольной обработке вместе с белками. Можно думать, что такие РНК обладают высокой активностью именно в комплексе с белками (осуществляя свою регуляторную роль, согласно гипотезе Frenster, 1965).

Роль ядерных «чистых» белков как регуляторных факторов кажется мало вероятной еще и потому, что в процессе фенольной обработки они подвергаются быстрой денатурации.

Судя по данным Е. М. Лейкиной и др. (1967), критическим уровнем биологической активности препарата

ДНП является его очистка до соотношения в препарате N/P=1,8—2,01. Более тщательная депротеинизация (до 1,67) ведет к абсолютной потери активности независимо от полимерности ДНК.

При уточнении некоторых вопросов о механизме действия экзогенных РНК в нормальных и регенерирующих гепатоцитах несомненный интерес представляют данные о поглощении экзогенного материала и времени его локализации в клетке.

Было показано, что активно пролиферирующие ткани (костный мозг, эпителий тонкого кишечника, селезенка) интенсивно поглощают экзогенную ДНК (Г. Г. Русинова, 1969, 1971). Поскольку время включения экзогенного материала в бурно пролиферирующие клетки весьма непродолжительно, были проведены опыты на частично гепатэктомированных животных, которым вводили высокополимерную ДНК-H^3. Обмениваемость такой ДНК-H^3 в клетках печени много больше, чем в указанных выше тканях. Оказалось, что регенерирующая печень значительно активнее поглощает экзогенный материал, чем печень интактных животных. Через сутки после введения клетки паренхимы печени продолжают накапливать ДНК-H^3, спустя 2—3-е сут содержание метки в ДНК регенерирующей печени было соответственно в 5 и 8 раз выше, чем в печени интактных животных. С 6-х по 90-е сут содержание ДНК-H^3 было в клетках примерно на одном уровне и составляло 1% от введенного количества ДНК. Эти данные показывают, что время пребывания в клетках печени экзогенной ДНК или ее фрагментов сопоставимо с продолжительностью жизни клеток печени (Р. Е. Либинзон, Г. Г. Русинова, и др., 1971). При введении экзогенной ДНК-H^3 наблюдалось ее поглощение не только клетками регенерирующей печени, но и интенсивное внедрение в миелокариоциты. Так, спустя 1 и 3 сут после частичной гепатэктомии включение ДНК-H^3 в ядра клеток костного мозга повышалось по сравнению с контролем в 2—2,7 раза.

Как известно, у нормальных животных печень обеспечивает транспорт синтезируемых здесь пуриновых нуклеотидов в клетки костного мозга для синтеза в них собственных РНК и ДНК.

После частичной гепатэктомии, когда печень не может полностью обеспечить синтез ДНК, миелокариоци-

ты более активно используют экзогенный биополимер в качестве фрагментов для построения собственной ДНК.

Результаты этих исследований показывают, что поглощение экзогенных биополимеров будет происходить лучше в тех клетках тканей и органов, которые попадают в чрезвычайные стрессовые условия, обусловленные нарушением тканевого гомеостаза, например при репаративной регенерации, либо когда они испытывают острый дефицит в предшественниках для синтеза и обновления собственных нуклеиновых кислот.

ЛЕЧЕБНЫЙ ЭФФЕКТ ЭКЗОГЕННЫХ РНК ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

Большой интерес представляет возможность нормализации восстановительных процессов в печени под влиянием нуклеиновых кислот после экспериментально вызванного цирроза. Известно, что частичная гипатэктомия при циррозе печени, вызванном CCl_4, приводит к обратному развитию соединительной ткани, накопление которой регулируется рибонуклеиновыми кислотами. Поэтому воздействие на скорость этого процесса могло бы существенно изменить картину течения экспериментального цирроза и выживаемости животных. Были сделаны попытки воздействовать на новообразование собственных РНК клеток печени во время регенерации, спровоцированной гепатэктомией, при помощи полимерных гомологичных РНК.

Результаты опытов по изучению влияния экзогенных печеночных РНК на выживаемость животных и гистологическую картину клеток печени показали, что при внутрибрюшном введении мышам суммарной цитоплазматической РНК из печени крыс в процессе хронического отравления CCl_4 снижалось не только число летальных исходов, но и некротических изменений в печени. При этом увеличивалось количество междольковых соединительнотканных волокон, а также повышалась митотическая активность клеток печени (А. И. Чернух, Е. Д. Вышепан, и др., 1970). Из данных табл. 20 видно, что введение экзогенной РНК животным, отравленным CCl_4, способствовало выживанию почти 70% животных. Вместе с тем введение экзогенного материала не влияло на количество общих липидов в печени. У всех животных, отравленных CCl_4, содержание кол-

Таблица 20

Влияние экзогенной РНК на выживаемость и биохимические показатели при отравлении CCl_4 печени крыс в течение 2 мес. (А. М. Чернух, Е. Д. Вышепан и др., 1970)

Вид эксперимента	Выживаемость			Биохимические показатели				
	всего	выжило	погибло	использованы для анализа	липиды, % на сухую массу	P	коллаген, % на сухую массу	P
Контроль — по 0,04 мл CCl_4 2 раза в нед.	76	10	66	10	12±3,8	0,05	0,95±0,13	0,02
CCl_4+цитоплазматическая РНК	76	52	24	10	16±3,4	0,05	1,15±0,11	0,02
Инъекции РНК (без введения CCl_4)	16	16	0	5	18±3,0	0,05	0,45±0,21	0,02

лагена было повышено, однако в группе животных, которым вводили экзогенную РНК, это выражено более отчетливо.

Введение экзогенной РНК животным с циррозом печени увеличивало митотическую активность клеток печени только в том случае, когда использовали для этих целей полимерный материал. Денатурированные препараты РНК, наоборот, снижали митотический индекс (табл. 21).

Таблица 21

Влияние РНК на митотическую активность печеночных клеток мышей, отравленных CCl_4

Вид эксперимента	Количество животных	МИ, ‰	P $\frac{\text{опыт}}{\text{контроль}}$
Контроль CCl_4 (2 мес)	10	12,9±1,0	0,05
Опыт — CCl_4+РНК	10	23,0±3,9	0,05
Контроль CCl_4 (1 мес)	7	5,2±1,9	
Опыт — CCl_4+РНК	7	22,3±6,16	0,05
Опыт — CCl_4+денатурированная РНК	5	2,63±0,59	0,05

При гистологическом исследовании печени контрольных животных показаны развитие в ней дегенеративных изменений в виде пикноза ядер клеток, появления

оптически «пустых» и заполненных жиром клеток по периферии долек некротических изменений, а также значительное разрастание междольковой соединительной ткани. Наблюдались диффузное мелкокапельное ожирение и значительная пролиферация купферовских клеток. Характерным для этих опытов является то, что при введении CCl_4 в сочетании с препаратом экзогенной РНК, в печеночной ткани значительно увеличивалось количество междольковой соединительной ткани, а содержание и распределение жира существенно не отличалось от такового в печени контрольных животных. Как видно, экзогенная РНК оказывает влияние на синтез соединительнотканных белков, увеличивая их содержание в печени.

Влияние экзогенной РНК, выделенной из печени крыс, на выживаемость мышей, отравленных CCl_4, скорее всего связано с ее действием на пролиферативные способности тканей. Очевидно РНК способствует восстановительным процессам в малоповрежденных клетках печени, усиливая митотическую активность и биосинтез рибонуклеиновых кислот, которые программируют синтез коллагеновых белков в фибробластах. Последние, вероятно, более устойчивы к действию CCl_4, чем печеночные клетки. Такое ускорение замещения некротизирующихся печеночных клеток соединительнотканными белками могло уменьшить интоксикацию на той стадии отравления, когда она в основном вызывала гибель животных.

Экзогенная РНК из печени крыс (гетеропрепарат) оказалась в некоторой степени эффективной при лечении мышей после отравления CCl_4. Влияние экзогенной РНК на восстановительные процессы в печени в значительной степени зависит от времени введения препарата после отравления. Если вводить экзогенную гомологичную РНК крысам через сутки после 2-месячных инъекций CCl_4, то она не влияет на содержание коллагена и активность такого специфического фермента печени, как триптофанпирролаза, т. е. не предотвращает и не замедляет развития патологического процесса. Прекращение отравления и введение экзогенной РНК на протяжении 3 нед способствуют процессам регенерации печени. В этом случае в отличие от гетерологичного препарата РНК ее гомологичный препарат не повышал количество коллагеновых белков и не способствовал

соответствующему разрастанию соединительной ткани в печени, однако увеличивал активность триптофанпирролазы (табл. 22).

Таблица 22

Влияние сроков введения экзогенной РНК на восстановительные процессы в печени животных, отравляемых в течение двух месяцев CCl_4 (А. М. Чернух, Е. Д. Вышепан и др., 1971)

Вид эксперимента	Содержание коллагена, % к норме	Гистологические показатели	Активность триптофанпирролазы, % к норме
Контроль — CCl_4, затем 0,85% NaCl 1 раз	257	Резко выраженное разрастание соединительной ткани	75
Опыт — CCl_4, затем РНК 1 раз	228	Отличий от контроля нет	70
Контроль — CCl_4 3 нед	123	Резко выраженное разрастание соединительной ткани	76
Опыт — CCl_4, затем РНК 1 раз	93	Слабо выраженное разрастание соединительной ткани	94
Контроль — CCl_4 и одновременно 0,85% NaCl в течение 3 нед	183	Резко выраженное разрастание соединительной ткани	80
Опыт — CCl_4 и одновременно РНК в течение 3 нед	191	Отличий от контроля нет	74

Если вводить CCl_4 не прекращали, то инъекции РНК оказались совершенно не эффективными — ни один из изучаемых показателей значимо не изменялся, а активность триптофанпирролазы, наоборот, даже уменьшалась. Такое снижение активности фермента указывает на нарушение биосинтеза этого фермента.

Ранее было установлено, что экзогенные РНК (печеночная дрожжевая), а также смесь нуклеотидов в больших концентрациях способны стимулировать образование триптофанпирролазы (Diamondstone e. a., 1962) в клетках печени. Хотя механизм индукции фермента под влиянием экзогенной РНК не вполне ясен, однако известно, что наиболее интенсивное образование триптофанпирролазы наблюдается в случае введения полимерных препаратов РНК, экстрагированных из печени

животных, которым предварительно вводили гидрокортизон — гормон, индуцирующий синтез специфических иРНК. В этом отношении деградированные препараты РНК, а также полученные из тканей интактных животных оказались менее эффективными (He Yensen e. a., 1965). Поэтому регуляция синтеза триптофанпирролазы с помощью экзогенно введенных иРНК в случаях, когда ощущается недостаток в иРНК или при нарушении биосинтеза иРНК очень важна для нормализации патологических процессов в печени.

Однако для индукции синтеза триптофанпирролазы необходимо использовать только гомологичные классы экзогенных РНК. Так, когда мышам вводили РНК из печени интактных крыс ($РНК_н$) и крыс, предварительно получавших гидрокортизон ($РНК_{гк}$), то гетерологичный препарат вызывал у мышей не только общие токсические явления, но и понижал активность триптофанпирролазы в печени (табл. 23).

Таблица 23

Активность триптофанпирролазы (в % к контролю) в печени мышей и крыс после введения печеночной РНК крыс (А. М. Чернух, Е. Д. Вышепан и др., 1971)

Введение РНК, мг на 100 г	Мыши			Введение РНК, мг на 100 г	Крысы	
	активность триптофанпирролазы				активность триптофанпирролазы	
	$РНК_н$	$РНК_{гк}$	РНКгк деградированная		$РНК_н$	$РНК_{гк}$
30	—	109	112	15	175	157
28	—	138	148	30	165	220
20	—	76	124	15	150	132
20	—	84	61	13	110	145
15	65	100	—	10	100	126
20	101	72	—	15	190	117
Среднее	82	96	111	—	150	150

При введении препарата РНК крысам (т. е. гомологичных макромолекул) активность триптофанпирролазы всегда повышалась, хотя действие $РНК_н$ и $РНК_{гк}$ было почти одинаковым.

Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что лучший эффект для индукции синтеза специфического фермента оказывает соответствующая гомоло-

гичная тканеспецифическая РНК, в то время как гетерологичная РНК, наоборот, подавляет синтез фермента, а иногда даже вызывает летальные исходы при использовании в тех же концентрациях. Применение высоких доз препарата является также одной из причин отрицательного влияния РНК на физиологические функции животного. Препараты экзогенной $РНК_{гк}$, подвергнутые тепловой деградации, оказались малоэффективными.

Высокая эффективность действия экзогенных тканеспецифических РНК на индукцию триптофанпирролазы проявляется даже в случае отравления животных CCl_4. Оказалось, что если крысам, отравленным CCl_4 (по 0,12 мл на 100 г 2 раза в неделю в течение 2 мес), вводить длительное время экзогенную РНК малыми дозами с интервалами в 1—3 дня, то можно сохранить или даже повысить активность триптофанпирролазы в печени после прекращения отравления ядом (табл. 24).

Таблица 24

Влияние экзогенной гомологичной РНК на активность триптофанпирролазы печени крыс, отравленных CCl^4

Введение РНК (0,5 мг на 100 г)	Активность, в % к контролю	P опыт/контроль
В течение 20 дней после прекращения введения CCl_4:		
контроль	67	
опыт	94	0,001
В течение 15 дней после прекращения введения CCl_4:		
контроль	50	
опыт	80	0,02
Инъекции РНК прекращали за 20 дней окончания отравления CCl_4:		
контроль	80	
опыт	74	0,05
РНК+CCl_4 в течение 2 мес:		
контроль	75	
опыт	70	0,05

В тех случаях, когда на фоне введения РНК отравление продолжалось, РНК не оказывала никакого эффекта. Если РНК вводили тотчас после прекращения отравления, то наблюдалось статистически достоверное повышение активности триптофанпирролазы. Касаясь клеточных механизмов этих процессов, можно заметить, что прекращение введения яда прежде всего способствует восстановлению функции РНК-аз, поскольку известно, что лизосомальные ферменты освобождаются довольно быстро после внутрибрюшинного введения CCl_4 и вызывают некроз клеток. После прекращения поступления яда в клетку активность свободных нуклеаз снижается, соответственно чему уменьшается скорость деградации экзогенной РНК и РНК может функционировать в полимерном состоянии. Можно думать, что эффект полимерной экзогенной РНК тканеспецифичен и обусловлен скорее всего присутствием информационных классов РНК в препаратах цитоплазматической РНК, выделенных от крыс, у которых введение гидрокортизона иРНК, информирующей синтез триптофанпирролазы, было повышено. Это предположение подтверждается эффективностью действия малых доз РНК, а также тем, что повышение активности триптофанпирролазы удается наблюдать через сутки после последнего введения РНК. Как известно, действие нуклеотидов проявляется гораздо быстрее. Следовательно, эффект экзогенной РНК не обусловлен ее низкомолекулярными продуктами, а связан с какими-то иными, чем нуклеотиды, фрагментами РНК (Е. Д. Вышепан и др., 1971).

Не исключено, что под действием CCl_4 собственные иРНК клеток печени подвергались деградации до присоединения или после отхождения от рибосом, и последние в период регенерации (прекращение отравления) использовали в качестве готовых матриц именно экзогенные блоки иРНК.

Результаты описанных опытов по изучению действия гетерологичных и гомологичных экзогенных РНК показывают, что введение повышенных доз РНК из печени крыс вызывает у мышей токсические явления, сопровождающиеся обильным разрастанием соединительной ткани в печени после отравления CCl_4. Инъецирование же гомологичных препаратов РНК не вызывало побочных явлений в организме животных и снижало способность клеток печени синтезировать соединительные бел-

ки после введения яда. Более того, восстановительный эффект гомологичных РНК также тесно связан с их способностью стимулировать или сохранять синтез специфических ферментов печени, продукция которых нарушается при отравлении CCl_4.

Использование гомологичных препаратов РНК более целесообразно, чем препаратов РНК иного происхождения. У мышей экзогенная РНК из печени крыс в малых дозах довольно заметно активирует только синтез коллагена и это уменьшает интоксикацию на той стадии отравления, когда она в основном и определяет гибель мышей. При отравлении CCl_4 крыс у них быстро снижается коллагенолитическая активность ткани печени в отношении нерастворимого коллагена, а при регенерации и под влиянием экзогенной РНК эта активность восстанавливается. Поэтому введение экзогенных РНК сразу же после прекращения действия яда уменьшает бурное накопление соединительнотканных белков в клетках печени, благодаря ускорению синтеза коллагенолитического фермента.

Очевидно, что участие экзогенной РНК в восстановительных процессах, протекающих в печени после отравления CCl_4, подобно участию в тех процессах, которые описаны выше при обсуждении проблемы регенерации других тканей. Основным в этих процессах является способность экзогенных РНК нормализовать обменные процессы в клетке путем усиления регенерации функции генетического аппарата клетки за счет усиления синтеза собственных тотальных РНК клеток и восстановления продукции тканеспецифичных белков и ферментов.

Результаты изучения действия экзогенных РНК при восстановлении функции печени после хронического отравления CCl_4 свидетельствуют о практической возможности использования этих препаратов при лечении цирроза или других патологических процессов в печени.

Глава III
ЭКЗОГЕННЫЕ РНК КАК ФАКТОРЫ СТИМУЛЯЦИИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В МИОКАРДЕ

Использование экзогенных РНК для стимуляции восстановительного процесса в миокарде связано с экспериментальными исследованиями, проведенными Л. В. Полежаевым и его учениками Л. В. Ахабадзе, Н. А. Музлаевой и М. П. Явич с 1957 по 1965 г.

Исходя из теоретической концепции об утрате регенерационных способностей в процессе эволюции и онтогенеза и о возможности восстановления утраченной регенерационной способности за счет создания специфических условий среды, Л. В. Полежаевым и его учениками были проведены различные эксперименты, в том числе по использованию экзогенной РНК. Необходимость использования именно экзогенных РНК объяснялась тем, что «для восстановления утраченной регенерационной способности органов надо так изменить их метаболизм, чтобы восстановить редуцированную первую физиологическую стадию регенерации, т. е. усилить разрушение и дедифференцировку основных составляющих их тканей... вызвать разрушение тканей лучше всего продуктами ее разрушения... Другими словами, для того чтобы усилить явления разрушения и дедифференцировки и стимулировать регенерацию поврежденного миокарда, мы решили повлиять на него продуктами разрушения миокарда... Такой способ воздействия на поврежденный миокард мы назвали методом химической органоспецифической травматизации»[1].

К продуктам, освобождающимся при распаде тканей, относятся рибонуклеопротеиды; их используют в

[1] Полежаев Л. В. и др. Стимуляция регенерации мышцы сердца. М., 1965.

опытах по стимуляции восстановительного процесса в миокарде.

Способность тканей к регенерации и к образованию РНК находится в тесной связи, и динамика распределения РНК в ткани как в норме, так и в процессе регенерации отражает регенерационные способности данной ткани.

Мышца сердца в норме содержит незначительные количества РНК, которая выявляется в саркоплазме, ядрышках ядер волокон сердечной мышцы и в цитоплазме клеток соединительной ткани, сопровождающей мышечные волокна. Количество РНК в соединительнотканных элементах миокарда значительно меньше, чем в мышечных (Mandel, 1951). В саркоплазме мышечных клеток сердца РНК распределена равномерно, в клетках скелетных мышц она сосредоточена преимущественно в околоядерной зоне (Н. Ф. Баракина, 1952; Е. В. Дмитриева, 1954).

В миокарде (при окраске метиленовым+зеленым пиронином с контрольной обработкой рибонуклеазой) после поражения электродермокоагулятором показано существенное изменение содержания и распределения РНК (Л. В. Ахабадзе, 1960).

С этой целью были проведены опыты на 2120 белых крысах-самцах с массой 300—400 г, 140 кроликах и 41 собаке. С помощью дермокоагулятора в области верхушки сердца на передней стенке левого желудочка создавали очаг повреждения. В послеоперационном периоде животные получали различные стимуляторы восстановительного процесса (гидролизат миокарда, экстракт миокарда, витамин B_{12}, тиреоидин, пирогенал, препарат селезенки, трипсин, лейкоцитарную сыворотку). Несколько опытов было посвящено изучению действия РНК.

Высокополимерную РНК получали из печени крыс с помощью фенольного метода по Георгиеву. Разовая доза РНК на одну крысу составляла 3 мг на сырую массу. РНК в 1 мл физиологического раствора вводили внутримышечно 3 раза с интервалом в 3 дня за $1^1/_2$ мес до операции и затем еще 4 раза по одной инъекции в день после операции.

При исследовании места повреждения миокарда в контроле было установлено, что до 13-го дня происходит лизис некротизированных тканей и образование регенерационной соединительной ткани в очаге повреждения (I стадия), с 20-х по 25-е сут, в области рубца обнаруживаются новообразованные мышечные волокна (II стадия), а к 30—45-м сут происходит дальнейшее

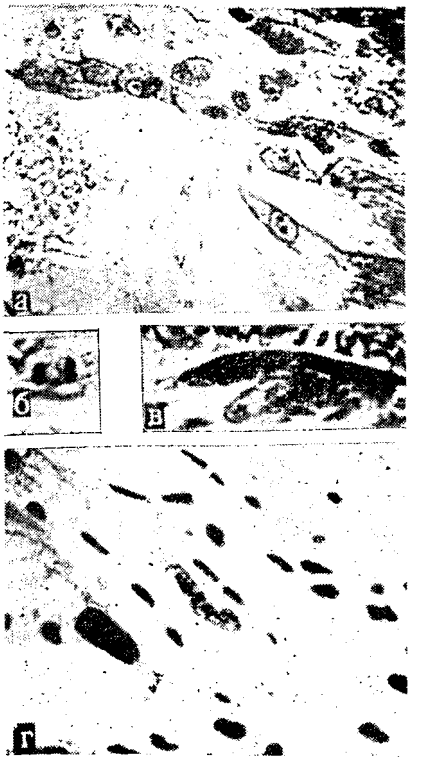


Рис. 18. Реакции клеток ткани на РНК через 4 дня после операции.

а — цепочки миобластов, образующихся от культей мышц; *б* — митоз в клетке соединительной ткани; *в* — миобласты; *г* — дедифференцировка культей мышц, амитоз ядра.

уплотнение соединительнотканного рубца и гибель новообразованных мышечных волокон (III стадия).

Через 1 день после операции в области повреждения определялись коагулированные мышцы в виде отдельных отрезков с грубо выраженной поперечной исчерченностью. В поврежденных мышечных волокнах пиронинофилия выражена очень ярко, однако это ложная реакция на РНК, так как она отражает не усиление биосинтетических процессов, а повышенное сродство поврежденных тканей к любым красителям (С. П. Романов, 1948; Д. Н. Насонов, 1951). Через 2 дня по границе с поврежденными тканями обнаруживается инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами. Некротические ткани дают более слабую ложную реакцию на РНК.

Через 4 дня обнаруживается изменение в выраженности реакции на РНК (рис. 18). Область повреждения обильно инфильтрирована нейтрофильными лейкоцитами, а также лимфоцитами и гистиоцитами. Коагулированные и подвергающиеся фагоцитозу фрагменты мышечных волокон дают слабо выраженную диффузную ложную реакцию на РНК. Расположенные между этими фрагментами соединительнотканные элементы характеризуются повышенной базофилией, что может свидетельствовать или о молодом возрасте этих клеток, или

о повышении биосинтетических процессов. Субэпикардиальный слой отличается повышенным содержанием РНК (П. П. Румянцев, 1954).

Через 7 дней после повреждения в соединительной ткани образуются мощные прослойки между остатками коагулированных мышечных волокон, отодвигая их друг от друга на значительное расстояние. Реакция на РНК в большинстве клеток соединительной ткани значительно слабее, чем в неповрежденных мышечных волокнах. Исключение составляют лимфоциты, цитоплазма которых яркая и несколько яснее базофильных полибластов. Среди множества клеток соединительной ткани определяются клетки, ядра которых похожи на ядра мышечных клеток, только несколько больше по размеру. Цитоплазма этих клеток слабо базофильна, по-видимому, это миобласты.

При использовании низкомолекулярной фракции РНК, выделенной по Керби—Георгиеву из миокарда эмбрионов и новорожденных крыс, Н. Д. Скуба (1969) заметил, что на 7-е сут в миобластах подопытных животных наблюдаются изменения, которые можно было расценивать как начало вторичной дифференцировки. Объем цитоплазмы миобластов был увеличен, базофилия более выражена. Местами миобласты сливались в цепочки, образуя симпластические структуры. Нередко отмечались лентовидные формы миобластов, причем иногда эти «ленты» достигали большой длины и напоминали молодые мышечные волокна. В отдельных участках грануляционной ткани отмечалось появление новообразованных миофибрилл с малой упорядоченностью дисков. Соответственно этим местам в грануляционной ткани формировались сарколеммные трубочки.

Через 10 дней грануляционный вал отделял зону повреждения от неизмененных тканей. В составе грануляционного вала, кроме клеток соединительной ткани (гистоциты и фибробласты), было много миобластов, расположенных отдельно или образующих целые цепочки. Цитоплазма миобластов несколько богаче РНК, чем цитоплазма клеток соединительной ткани. На концах «культей» мышечных волокон образовались колбообразные наплывы саркоплазмы, которые давали слабую реакцию на РНК. Мышечные волокна, заключенные в соединительную ткань в центре очага повреждения, давали интенсивную ложную реакцию на РНК.

Через 13 дней бо́льшая часть повреждения заполнялась соединительной тканью, клетки которой давали очень слабую реакцию на РНК. Отдельные миобласты и их цепочки в периферических отделах были также слабо пиронинофильны. В целом область повреждения характеризовалась более слабой реакцией на РНК. Через 17 дней наблюдалось дальнейшее ослабление реакции на РНК в клетках уплотняющейся соединительной ткани, заполняющей область повреждения. Такого же характера изменения происходили и в последующие сроки (20, 25, 30—45 дней).

Таким образом, при повреждении миокарда и заживлении раны следует различать ложную реакцию на РНК, которую дают коагулированные мышцы, и истинную реакцию, которую дают миобласты и молодые клетки соединительной ткани. Интенсивность реакции повышается к 10 и постепенно понижается к 30—45 дням.

РНК и ДНК в поврежденной мышце сердца исследовали также с помощью биохимических методов (М. П. Явич, 1962). Исследуемую ткань обрабатывали по Шмидту и Тангаузеру; РНК определяли при помощи цветной реакции на пентозу с орциновым реактивом (В. В. Мейбаум, 1945), ДНК — по Веббу и Леви (Webb, Levy, 1955). Количество нуклеиновых кислот рассчитывали на 100 мг массы сырой ткани.

При повреждении сердечной мышцы и ее последующем заживлении изменяется количество РНК в клетках (табл. 25).

Таблица 25

Влияние термического повреждения на содержание РНК в тканях миокарда крыс

РНК (мг/100 мг сырой массы)	Сутки после повреждения					
	1	5	10	20	30	60
В очаге повреждения	161±22	259±46	394±29	461±98	365±57	313±30
В отдельных тканях	235±11	234±12	262±17	241±30	250±2	252±39
Контроль	258±18					

Максимальное накопление РНК совпадает с периодом интенсивного развития соединительной ткани в очаге повреждения, возникновением миобластов и новообразованных мышечных волокон в периферических участках.

При сопоставлении полученных данных с результатами исследования синтеза белка (включение S^{35} цистеина и C^{14} тирозина) выявились некоторые расхождения (М. П. Явич, 1960): повышение интенсивности включения отмечается сразу после повреждения, высокая интенсивность включения меченых аминокислот сохраняется до 30 дня, после чего она снижается ниже исходных цифр. Таким образом, изменение биосинтеза белка по срокам опережает изменение количественного накопления РНК.

В отличие от изменений количества РНК содержание ДНК в ходе процесса заживления миокарда меняется незначительно (табл. 26).

Таблица 26

Влияние термического повреждения на содержание ДНК в тканях миокарда крыс

ДНК (мг/100 мг сырой массы)	Сутки после повреждения					
	1	5	10	20	30	60
В очаге повреждения	97±11	214±11,5	214±10,8	198±15,8	189±2,7	178±7,5
Контроль	210±18					

Гистологические исследования показывают, что через 5 дней очаг повреждения заполняется нейтрофильными лейкоцитами, лимфоцитами и гистиоцитами. В дальнейшем количество ДНК незначительно уменьшается, что можно связать с уплотнением соединительной ткани в очаге повреждения.

Если суммарное количество ДНК не претерпевает существенных изменений, то в отдельных ядрах оно колеблется. Так, существенно меняется распределение классов ядер, содержащих различное количество ДНК. Возрастает удельный вес ядер, содержащих большее количество ДНК, что является отражением усиления биосинтеза ДНК в очаге повреждения в связи с интенсивной пролиферативной реакцией «культей» мышечных волокон (Н. Д. Скуба, 1965).

Характерно, что после травмы миокарда взрослых мышей H^3-тимидин включается практически только в ядра клеток грануляционной ткани. Включение H^3-уридина в РНК ядер и саркоплазмы интактного и поврежденного миокарда протекает интенсивнее, чем в других

тканях. В поврежденном миокарде взрослой лягушки с помощью H^3-тимидина обнаруживается также интенсивный реактивный синтез мышечными ядрами ДНК (П. П. Румянцев, 1966).

В ядрах миокарда при повреждении электродермокоагулятором и при последующем заживлении раны ДНК распределяется по-разному в зависимости от сроков наблюдения (Л. В. Ахабадзе, 1959). Через 1 день в области очага повреждения ядра клеток можно разделить на 2 группы: с едва заметными остатками хроматина и с интенсивно окрашенными грубыми глыбками. Слабо выраженную диффузную реакцию по Фельгену дают все ткани очага повреждения. Через 2 дня обнаруживаются ядра полибластов с тонкой сетью слабо окрашенного хроматина. Многие ядра миоцитов характеризуются неравномерным распределением хроматина, который в некоторых ядрах образует уплотненные зубчатые полоски. Через 4 дня по Фельгену ядра миоцитов окрашиваются более равномерно; глыбки в клетках соединительной ткани имеют различный характер. Слабая интенсивность реакции отмечается в виде диффузного фона.

Затем (через 10, 13, 17, 25, 30 и 45 дней) ядра миоцитов неповрежденной мышцы окрашиваются равномерно. Ядра соединительной ткани, заполняющей рубец, характеризуются неравномерной глыбчатостью. В некоторых некротизирующихся мышечных клетках в хроматине различаются глыбки, они значительно уплотнены. Выявленные изменения свидетельствуют о различном состоянии ДНК на различных этапах заживления миокарда. Обращает внимание окрашивание (по Фельгену) межклеточных пространств, что может свидетельствовать или о выходе нуклеиновых кислот из клеток при повреждении, или о фиксации реактива на эластических волокнах стромы миокарда.

Учитывая данные по изучению распределения РНК в процессе заживления очага термического повреждения в миокарде, препарат экзогенной РНК использовали и в сочетании с пирогеналом как ингибитор процесса рубцевания для стимуляции регенерации миокарда (Л. В. Ахабадзе, 1962; Л. В. Полежаев и др., 1962).

Препарат РНК получали по модифицированному фенольному методу (Т. П. Георгиев, 1959). Животным (белые крысы) за 2 мес до операции внутримышечно вводили РНК (3 мг в 1 мл 0,55%

NaCl на 1 животное 3 раза в день). Затем создавали очаг термического повреждения, после операции и через день после нее вводили РНК. Пирогенал вводили внутримышечно (6 γ в 1 мл 0,85% NaCl на 1 животное) сразу после операции и ежедневно в течение месяца, затем 60 раз через день и 60 раз через 2 дня на протяжении 330 дней.

Уже в первые сутки после операции выявлялась разница в характере гистологических изменений и количестве РНК в клеточных элементах. Так, уже в первые сутки очаг поврежденных мышц был отграничен выраженным валом, содержащим нейтрофильные лейкоциты, фибробласты и полибласты. Цитоплазма полинуклеаров почти не содержала РНК, в цитоплазме фибробластов РНК было больше, чем в цитоплазме гистиоцитов. К 3—5 сут в грануляционном поясе оставались лишь фибробласты и гистиоциты. Вблизи распадающихся мышечных волокон и около их культей определялись одиночные и организованные в цепочки миобласты, характеризующиеся ярко выраженной пиронинофилией. РНК в миобластах распределялась или диффузно, или собрана в глыбки различной величины.

Через 13 дней после операции разрушение некротизированных мышц путем фагоцитоза заканчивалось. Новообразования мышечных волокон в центре зоны повреждения не происходило, и миобласты, постепенно теряя РНК, принимали участие в построении рубца. Содержание РНК в клетках соединительной ткани на протяжении всего опыта было ниже, чем в мышечной ткани, хотя также увеличивалось к 10—13 дням, а затем снижалось и с трудом определялось в тканях плотного рубца. Вместе с тем в отдельных клетках соединительной ткани количество РНК оставалось высоким длительное время.

Распределение РНК в культях мышечных волокон было неодинаковое, так как большая часть культей характеризовалась низким содержанием РНК на протяжении всего опыта. На некоторых культях в ранние сроки (5, 10 и 13 дни после повреждения) образовывались наплывы саркоплазмы, которые характеризовались повышенным содержанием РНК. С 13—17 дня после операции можно было наблюдать отрастание отдельных мышечных волокон от таких культей. В тех случаях, когда происходило смыкание отрастающих мышечных волокон в мосты, они стойко сохранялись до 200—309-го дня.

Таким образом, введение РНК способствовало усилению инфильтрации очага повреждения полинуклеарами (М. В. Черноруцкий, 1911), резорбции коагулированных мышц за счет фагоцитоза и раннему образованию миобластов, цитоплазма которых богата РНК.

Для подобных опытов использовали также сочетание препарата РНК и пирогенала. На ранних этапах после повреждения происходит обильная инфильтрация очага полинуклеарами, которые содержат мало РНК в цитоплазме. В поврежденном миокарде содержание РНК остается относительно постоянным в течение всего опыта (за исключением культей мышечных волокон). Характерно обогащение клеток соединительной ткани РНК. Высокое содержание РНК в клетках соединительной ткани сохранялось до 30—45-х сут.

В культях части мышечных волокон количество РНК возрастало до 10—13-го дня. Однако к 30—60-му дню содержание РНК уменьшалось и достигало количества РНК в неповрежденном миокарде. Регенерация мышечных волокон от культей была менее выражена. Сочетанное применение РНК и пирогенала не дало существенных преимуществ перед использованием изолированного препарата РНК.

Были обнаружены выраженный отек и геморрагическое воспаление, на фоне которых происходил лизис коагулированных мышечных волокон (преимущественно путем фагоцитоза). На 3-и сут участок некротически измененной ткани был ограничен широким валом, состоящим из гистоцитов, полибластов, лимфоцитов и свободных мышечных ядер. Концы мышечных волокон образовывали «культи». Из «культей» освобождалась часть ядер, которая внедрялась в грануляционный вал, а другая часть приобретала вид миоцитов.

На 5—10-е сут от дедифференцированных «культей» отщеплялись участки саркоплазмы с ядрами эмбрионального типа. Многие миобласты, амитотически делясь, образовывали цепочки, вдающиеся в зону грануляций. Цитоплазма таких клеток давала выраженную реакцию на РНК. На 13—17-е сут заканчивался фагоцитоз некротизированных мышц, и вся зона повреждения оказывалась заполненной новообразованной соединительной тканью. Участки регенерирующих мышечных «культей» обнаруживались в субэпикардиональной зоне по ходу крупных кровеносных сосудов. Регенериру-

ющие и растущие мышечные пучки обнаруживались и на 21—30—45-е сут, но к 200—309-м сут очаг повреждения оказывался заполненным плотной соединительной тканью.

Согласно Л. В. Полежаеву (1968), РНК вызывает стимуляцию митотического деления ядер клеток соединительной ткани и амитотического деления ядер в «культях» мышц, дедифференцировку последних, интенсивное образование от них миобластов и отростков мышц, растущих в глубь очага повреждения. Если процесс новообразования мышц в центре очага препарат РНК подавляет, то в краевой зоне РНК стимулирует регенерацию мышечных волокон из «культей» мышц. Такое же действие РНК отмечено и при использовании комплексов РНК+гидролизат мышцы, РНК+гидролизат+тиреоидин.

Э. В. Гусарова (1964, 1965) показала, что и дифференцированные мышечные волокна, отрастающие от «культей» мышц, и недифференцированные мышечные волокна в центре очага повреждения снабжаются нервными волокнами, прорастающими в очаг повреждения. Следовательно, отсутствие регенерации мышц в центре очага повреждения не связано с нервоснабжением.

Таким образом, гистологические исследования показали, что применение препарата РНК существенно не меняет течения восстановительного процесса, но отмечается выраженная регенерация в краевых отделах очага повреждения в области «культей» мышечных волокон.

Гистохимический анализ изменения содержания РНК в области регенерирующих «культей» показал, что именно в этих участках происходит увеличение количества РНК в цитоплазме клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что в области «культей» происходит регенерация мышечных волокон. Для более детального изучения особенностей восстановительного процесса в миокарде под влиянием различных стимуляторов был исследован характер изменения электрокардиографических показателей.

Установлено, что введение РНК неоперированным животным не изменяет характера электрокардиограммы

Коагуляционное повреждение миокарда вызывает характерные изменения на ЭКГ, которые протекают в виде трех стадий: острой, подострой и рубцовой, и выражаются в острой стадии (II и III отведение) в смещении интервала RS-T, резком увеличении зубца

T, углублении зубца S, урежении ритма до 310—340 ударов в 1 мин. (норма 360—500), замедлении предсердно-желудочковой проводимости (PQ=0,062—0,080 с, QT=0,100—0,137 с). В подострой стадии интервал RS=T опускается к изолинии, зубец C становится сглаженным, восстанавливается предсердно-желудочковая проводимость (PQ=0,50—0,062 с, QI=0,062—0,081 с). Подострая стадия длится 4—8 дней и переходит в стадию рубцевания, которая характеризуется постепенным восстановлением показателей ЭКГ, но с сохранением измененной формы зубцов T и R.

В опытах с введением РНК до и после коагуляционного повреждения миокарда данные ЭКГ по длительности и последовательности протекания трех стадий аналогичны таковым в контрольной серии. Вместе с тем рубцовая стадия регистрируется уже через 7—12 дней, зубец T, превращаясь в отрицательный, переходит в двухфазный и к 30 сут выравнивается до положительного. К 30 сут нормализация ЭКГ наблюдается у 30—50% животных.

Таким образом, согласно данным ЭКГ, регенерация мышц в очаге поражения если и происходит, то очень незначительно и в центральных участках очага. Такого же рода данные получены при комбинированном действии РНК и пирогенала и РНК и препарата селезенки. Все это позволяет сделать вывод о том, что препараты РНК, взятые отдельно и в комбинации с другими факторами, способствуют быстрому восстановлению электрокардиографических показателей поврежденного миокарда.

Эффективность сочетания РНК с другими биологическими активными веществами для стимуляции восстановительного процесса в миокарде показана С. С. Саидрасуловым (1963). Согласно данным А. Л. Андреева и его сотрудников (1959, 1960), хорошо стимулирующий регенерацию в миокарде оказался комплекс, состоящий из цианкобаламина, нуклеиновых кислот, пиридоксина, метионина и АТФ, этот комплекс улучшает репаративные процессы в миокарде.

С. С. Саидрасулов использовал комплекс, состоящий из витамина B_{12} — 50 мкг, пиридоксина — 1 мг, метионина — 30 мг, РНК — 30 мг, ДНК — 10 мг, АТФ — 5 мг для стимуляции заживления проникающих ран левого желудочка сердца кроликов. Материал исследовался гистологически (гемотоксилин-эозин и пикрофуксин) и гистохимически (нуклеиновые кислоты по Браше и Шабадашу). Комплексный препарат животные получали ежедневно до забоя. Забой производился на 5, 10, 12, 30-е сут после повреждения.

Было установлено, что уже с 5-х сут после повреждения у подопытных животных обнаруживались по краям раневого канала мышечные почки, имеющие пальцевидную форму и содержащие амитотически делящиеся

ядра. От мышечных почек отщеплялись вытянутые клетки с интенсивно пиронинофильной протоплазмой, содержащей большое количество РНК. Местами миобласты, смыкаясь, образовывали симпласты. На отдельных участках направление роста миосимпластов ориентировано к центру раневого канала.

В последующие сроки также обнаруживались существенные различия в структуре и размере раневого канала. По сравнению с контролем определялась повышенная базофилия цитоплазмы, в очаге повреждения можно видеть островки новообразованных мышечных волокон.

Влияние лечебного комплекса характеризовалось ускорением реактивного процесса и уменьшением размеров раневого канала. Заживление раневого канала происходило путем одновременного развития соединительной ткани и новообразованных мышечных волокон.

Препарат экзогенной РНК как стимулятор восстановительных процессов в миокарде был использован наряду с другими препаратами (гидролизат миокарда, гидролизат предсердий, витамин B_{12}), в опытах на кроликах с экспериментально вызванным дифтерийным миокардитом (С. П. Колчин, 1969). Преимущества какого-либо одного из изученных препаратов не выявлены, хотя в целом применение их ускоряло развитие функциональных компенсаторных процессов в миокарде. Так, быстрее, чем у контрольных животных ($0{,}05 > p > 0{,}02$), нормализовалось соотношение длительности распространения волны электровозбуждения по желудочкам сердца и длительности всего цикла электровозбуждения сердца. Величины параметров, характеризующих интенсивность сократительной функции миокарда, нормализовались на 10—15 дней раньше (по срокам $0{,}2 > p > 0{,}1$; по сократительной функции $0{,}1 > p > 0{,}05$).

При гистологическом исследовании (Л. В. Полежаев и др., 1967; Н. К. Латышева, 1968) обнаружено увеличение толщины мышечных волокон у кроликов, леченных препаратами, активация соединительной ткани миокарда, увеличение концентрации нуклеиновых кислот в ткани левого желудочка сердца. Отмечено также, что в диффузно расположенных мелких очагах повреждения мышцы сердца происходит новообразование мышечных волокон, появление клеток, классифицированных как миобласты (Л. В. Полежаев, 1965—1967).

Глава IV
ВЛИЯНИЕ РНК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ТКАНЕЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ВОЛОКНАХ

Характерной чертой регенерации нерва является очень медленный темп восстановления функционального состояния нервных волокон, периферические отделы которых после повреждения подвергаются дегенерации. Шванновские клетки, оставшиеся на месте дегенерировавших нервных волокон, дают точки роста вблизи места перерезки в проксимальном и дистальном направлениях. Волоконца, идущие в этих направлениях, растут в среднем со скоростью 0,5—4,5 мм в сутки до тех пор, пока не образуют нервные окончания. После этого начинает происходить восстановление функции и структуры иннервируемого органа, которое начинает проявляться, например, в мышце через 5—6 нед. Однако окончательное восстановление происходит много позднее, иногда через годы.

Поэтому естественно стремление исследователей стимулировать регенерацию нервных волокон путем ускорения синтетических процессов в клетках с помощью органоспецифических веществ.

Результаты гистологического изучения срезов седалищного нерва при экспериментальном повреждении показывают, что уже через 5 сут после сшивания отмечается прорастание основной массы регенерирующих нервных волокон в периферический отрезок нерва в среднем на 0,2—0,4 мм. Для ускорения процессов регенерации в области повреждения была использована экзогенная гомологичная РНК (И. Л. Разумова, Н. Н. Алексеева, 1970).

Различные варианты введения экзогенной цитоплазматической РНК, полученной из скелетных мышц интактных крыс, показали, что эффективность экзогенного материала во многом определяется методикой их введения.

Введение РНК уже через 3 ч после повреждения более чем в шесть раз увеличивает скорость роста нервных волокон по сравнению с контролем.

К 10 сут длина регенерирующих нервных волокон РНК была в 3 раза большей, чем в контроле (физиологический раствор не оказывал никакого влияния на репарацию нерва). На 15-е сут в икроножной мышце крыс, получавших РНК, уже обнаруживались новообразованные нервные волокна (36,0 в контроле). Если через месяц в икроножной мышце в составе крупных пучков нелеченых животных обнаруживалось всего 22±1,4% нервных волокон, то при введении РНК их количество достигало уже 50—80% от нормального. Весьма существенным моментом явилось и то, что к этому сроку инъекции РНК способствовали образованию нервно-мышечных веретен с большим количеством нервных волокон, а также единичные двигательные окончания, чего не наблюдалось в контроле.

Важность этого процесса заключается в том, что нервные волокна и их окончания способствуют восстановлению не только передачи импульсов, вызывающих мышечные сокращения, но и оказывают трофическое воздействие на мышцу, т. е. участвуют в регуляции ее метаболизма, который оказывается подавленным в результате прекращения функции нерва. Хотя конкретный механизм, с помощью которого двигательные нервные волокна и их окончания оказывают регулирующее влияние на метаболизм мышцы, полностью не выяснен, однако считают, что это опосредовано через медиаторы, например ацетилхолин и продукты его гидролиза (холин и уксусная кислота), адреналиноподобные вещества и т. д.

Освобождающиеся из нервных окончаний медиаторы, вызывая деполяризацию постсинаптической мембраны, способствуют возникновению миниатюрных потенциалов в мышцах и регулируют активность ферментов энергетического обмена — АТФ и некоторых других протеолитических ферментов, участвующих в катаболизме белков мышц. При денервации активность свободных

гидролаз довольно резко повышается. Поэтому более быстрое, чем в обычных условиях, восстановление указанных выше процессов под влиянием экзогенной РНК, вводимой на протяжении 40 сут, способствует лучшей регенерации денервированных мышц. Действительно, прекращение введения РНК с 15 сут оказывает отрицательное влияние на скорость регенерации нервных волокон, а инъецирование препарата по истечении 15 сут после операции оказывало незначительный стимулирующий эффект. Таким образом, именно раннее введение препарата может существенно изменить скорость репарации структуры и функции чувствительных и двигательных волокон нерва.

Через $1^1/_2$ мес в области повреждения обнаруживаются чувствительные и двигательные нервные волокна и в обычных условиях. Вместе с тем отчетливо видна разница в невротизации икроножных мышц у животных, получавших РНК. Гидролизат экзогенной РНК также оказывал стимулирующий эффект на регенерацию нерва. Однако он был гораздо ниже, чем при введении полимерного препарата. При этом в икроножной мышце изменялись соответственно виду вводимому препарату и обменные процессы (табл. 27).

Таблица 27

Содержание липидов и коллагена в денервированной мышце после введения различных препаратов экзогенной РНК из скелетных мышц крысы (в % на сухую массу мышцы)

Вид эксперимента	Липиды, %	Коллаген, %	$P \frac{\text{опыт}}{\text{контроль}}$
Контроль — физиологический раствор (интактные животные)	4,5±0,53	5,2±0,26	0,001 и 0,005
0,85% раствор NaCl	17,8±1,29	9,2±1,14	—
Экзогенная полимерная РНК	6,1±0,81	12,6±0,51	0,001 и 0,02
Щелочный гидролизат РНК	9,1±0,61	14,3±0,57	0,001 и 0,02

Из данных табл. 27 видно, что в условиях денервации после введения физиологического раствора в отрезках нервов накапливаются липиды и коллаген, свидетельствующие о дистрофических процессах волокон. Введение экзогенной полимерной РНК, выделенной из мышечной ткани и ее щелочного гидролизата, хотя и снижают количество липидов в нервных волокнах, но

повышают содержание коллагена, причем при одинаковой направленности их действия полимерный препарат в большей мере препятствует увеличению количества липидов по сравнению с действием нуклеотидов. Таким образом, полимерный препарат экзогенной гомологичной РНК является более адекватным стимулятором процессов регенерации нерва, чем нуклеотиды, и его применение на практике может оказаться существенным для восстановления функции денервированной мышцы (Н. Н. Алексеева, И. Л. Разумова и др., 1971).

СТИМУЛЯЦИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ КОРЫ МОЗГА ПРИ ПОМОЩИ ЭКЗОГЕННОЙ РНК

Некоторые эксперименты, проведенные на нервной ткани коры мозга, показывают, что в течение онтогенеза животных и человека происходит обновление нервных клеток. Было выяснено, что при введении в мозг экспериментальных животных некоторых биостимуляторов можно наблюдать амитотическое деление нейронов в коре больших полушарий. Этот процесс особенно четко выражен в случае воздействия на организм животного таких тканеспецифических стимуляторов как РНК, вве-

Таблица 28

Продолжительность наркотического сна крыс (в минутах) при введении в полость IV желудочка различных концентраций РНК

Дни опыта	Продолжительность наркотического сна при введении РНК в разведении			
	норма	6 мг/мл	3 мг/мл	150 мг/мл
1	51±6,9	41±7,0	56±4,2	41±10,1
3	55±3,0	77±4,2	45±2,3*	40±2,0*
5	54±1,6	42±1,3*	36±1,7*	36∓1,9*
7	43±2,8	43±2,9	41±2,0	33±3,1*
10	34±1,3	31±1,0	28±0,3*	35±6,0
13	41±13,5	43±1,9	39±8,5	41±5,3
17	58±9,9	46∓7,6	45±3,7	41±7,2
60	44±10,2	37±2,6	35±7,3	43±8,7

[1] P∠0,05.

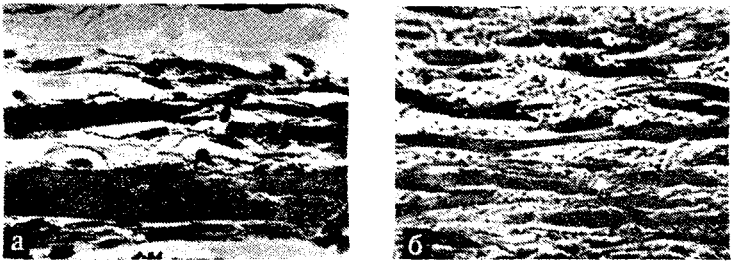


Рис. 19. Изменение численности двуядрышковых клеток при введении в мозг.
а — экзогенной гомологичной РНК; *б* — гомогената мозга.

денных в полость четвертого желудочка мозга (С. П. Колчин, К. Ю. Резников, 1964, 1966). В соответствии с пролиферацией нейронов изменялись процессы возбуждения и торможения, а также чувствительность крыс к наркотическому действию хлорангидрата (табл. 28).

Из данных табл. 28 видно, что под влиянием экзогенной гомологичной РНК наблюдается статистически достоверное уменьшение длительности наркотического сна по сравнению с интактными животными. Поскольку хлоралгидрат является наркотиком преимущественно коркового действия, то ослабление его наркотического эффекта можно трактовать как преобладание возбудительных процессов над тормозящими в коре головного мозга, т. е. у животных усиливаются процессы возбуждения. Эти процессы были наиболее выражены у тех животных, которым вводили РНК в концентрации 150 мг на 1 мл и диализат мозга в концентрации 0,06 мг на 1 мл раствора. Введение этих биостимуляторов в указанных разведениях вызывало изменения в нейронах в ранние сроки опыта (рис. 19).

Эти изменения, как видно из рис. 19, выражены слабее, чем при введении РНК и диализата мозга непосредственно в кору головного мозга и свидетельствуют о тенденции к увеличению численности амитотических фигур деления нейронов в ранние сроки опыта.

Однако увеличение числа таких двуядрышковых нейронов следует расценивать скорее всего как интенсификацию синтеза РНК в нейронах. Следовательно, наблюдающееся увеличение числа амитотически деля-

щихся (двуядерных — двуклеточных) групп нервных клеток свидетельствует об интенсификации процессов физиологической регенерации в коре головного мозга (табл. 29).

Таблица 29

Влияние экзогенной РНК на количество делящихся нервных клеток (Ю. К. Резников и др., 1966)

Время, в сут.	Группы клеток							
	введение РНК в IV желудочек мозга				введение РНК в кору мозга			
	одноядрышковые	двуядрышковые	двуядерные	двуклеточные	одноядрышковые	двуядрышковые	двуядерные	двуклеточные
1	787	191	21	26	801	171	28	40
3	772	195	33	43	734	225	41	68
5	766	200	34	47	757	200	43	65
7	795	194	31	48	786	176	38	55
10	826	151	23	40	816	150	34	51
13	799	172	29	39	817	150	33	45
17	835	150	15	23	828	145	27	31
21	837	143	20	34	843	132	25	34
25	849	134	17	24	861	119	20	32
30	843	140	17	25	825	153	22	21
60	851	135	14	22	841	141	18	26

Для получения более длительного эффекта стимуляции деления нейронов и изменения функционального состояния мозга экзогенную гомологичную РНК и диализат мозга вводили в ликвор полости IV желудочка несколько раз — на 1—6 и 11-й день в дозах 70 и 0,06 мг на 1 мл соответственно. Показано, что введение экзогенной РНК в ликвор увеличивает продолжительность засыпания и уменьшает период сна лишь с 10-го дня после введения препарата. Сравнение длительности засыпания подопытных животных после введения экзогенной РНК и диализата показывает, что при повторных инъекциях длительность действия диализата превышает таковое у РНК.

Увеличение продолжительности засыпания и уменьшение длительности наркотического сна у крыс под действием биостимуляторов свидетельствует о сдвиге в сторону преобладания возбудительных процессов над

тормозными в коре больших полушарий. Следовательно, повторные введения биостимуляторов в полость IV желудочка мозга позволяют получить длительное возбуждение в коре. При подсчете амитотических фигур нервных клеток в коре мозга выяснилось, что при повторных введениях биостимуляторов в ликвор полости IV желудочка наблюдается увеличение числа амитотически делящихся нейронов в течение значительного времени (до двух недель). Особой разницы в действии экзогенной РНК и диализата мозга в этом отношении не наблюдается.

Однако изучение гистологических препаратов мозга крыс показывает, что второе и особенно третье введение биостимуляторов в полость IV желудочка мозга вызывает резко выраженную дегенерацию многих нервных клеток. При этом амитотически делящиеся или разделившиеся нейроны необратимо дегенерируют. При однократном введении препаратов подобных явлений не отмечалось. Следовательно, повторные инъекции экзогенной РНК оказывают уже не стимулирующее, а токсическое действие на структуры головного мозга.

Глава V
ЭКЗОГЕННЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

Изучение природы веществ, регулирующих процессы дифференциации и роста, быстро развивается благодаря применению методов молекулярной биологии и биофизики. Это способствовало также углублению исследований механизма действия регуляторных тканевых факторов, определяющих само развитие (Саксен и Тойвонен, 1963; К. Уоддингтон, 1964). Однако если факт существования в тканях и биологических жидкостях веществ, участвующих в регуляции роста органов и тканей, признается широким кругом исследователей, то их химическая природа и место в системе регуляции роста остаются во многом дискуссионными, а литературные данные о природе этих веществ полностью еще не обобщены (В. А. Конышев, 1969).

Для изучения природы тканевых регуляторов использовалось несколько экспериментальных подходов, например химико-морфологический анализ, который во многом позволил конкретизировать материальные основы систем, регулирующих рост. Проблему химических регуляторов роста анализировали с позиций теории регулирования (Weiss, Kavanau, 1957). При исследовании действия гомогенатов и экстрактов тканей на рост органов эмбрионов, было обнаружено, что эти препараты специфически стимулировали или угнетали рост.

Математический анализ полученных результатов позволил создать теорию саморегулирующихся систем роста в организме, в основе действия которых лежит взаимодействие между присущими каждому органу стимуляторами («катализаторами») роста, так называемыми «шаблонами», и их антагонистами —«антишаблонами».

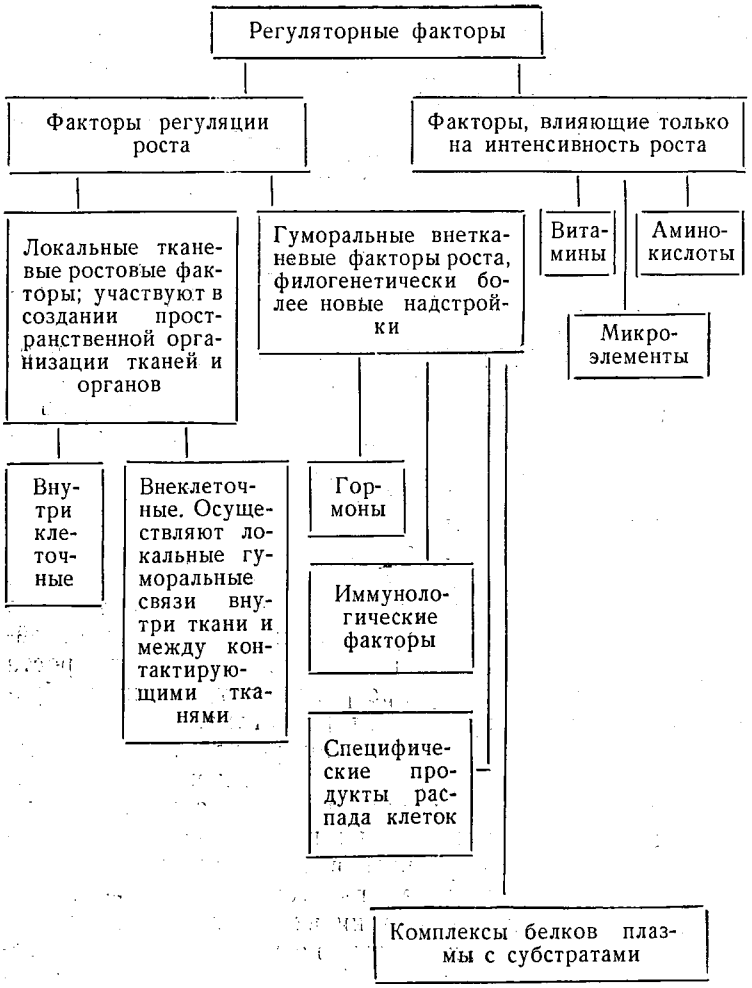
Скорость роста органа, согласно математической модели Weiss и Kavanau, зависит от соотношения концентраций «шаблонов» и «антишаблонов» и изменяется при нарушении этого соотношения. По Weiss с сотрудниками (1957), замедление роста органов в процессе развития зависит от ингибирующего действия антишаблонов, постепенно накапливающихся в процессе роста органа. Несмотря на некоторые важные положения этой теории, она не отражает какую-либо конкретную систему, реально контролирующую рост тканей, и не претендует на раскрытие природы специфических факторов регуляции роста.

Химическая природа веществ, участвующих в процессе роста, может быть рассмотрена по В. А. Конышеву (1969), согласно классификации которого предполагается существование факторов, участвующих в регуляции роста и низкомолекулярных веществ, влияющих на интенсивность роста, но не участвующих непосредственно в его регуляции.

Хотя тканевые и гуморальные факторы регуляции роста составляют единую систему, однако эти группы веществ отличаются как по химической природе, так и по характеру связей. Если гуморальные связи дальнодействующие, то сфера влияния тканевого фактора роста невелика, и этот фактор программирует, главным образом, пространственную структуру органа.

Тканевые факторы регуляции роста представляют собой группу пока еще мало изученных веществ, участвующих в регуляции прироста массы органов и клеточных миграций, приводящих к возникновению пространственной структуры органов. Известно, что условием нормального морфогенеза является увеличение массы органов за счет пролиферации входящих в них клеток. Считают, что в тканях имеется по крайней мере два вещества, регулирующих пролиферацию. Одно из них локализовано в цитоплазме и является стимулятором, другое — в ядре и обладает ингибирующими свойствами (Г. Д. Туманишвили, 1965, 1968). Существует гипотеза, согласно которой рост большинства тканей регулируется специфическим ингибитором — келоном, который становится активным при образовании комплекса с адреналином и кортикостероидами.

В тканях имеется большое количество веществ, более или менее специфично влияющих на пролиферацию



либо гипертрофию клеток и рост органа. Среди них претендентами на роль специфических ростстимулирующих веществ могут являться такие вещества, как биополимеры, образующие белоксинтезирующую систему (РНК и ДНК), специфические белки и продукты (гистоны, кислые белки, гликопротеины), освобождающиеся из клеток в процессе их отмирания.

Было показано, что введение различных компонен-

тов белоксинтезирующей системы в организм животных вызывает определенные именения в темпах роста органов и тканей. Например, введение частично гепатэктомированным крысам препаратов (ДНП) регенерирующей печени ускоряет процесс восстановительной гипертрофии печени, а ДНП, экстрагированные из ткани легких, оказывают стимулирующее влияние на рост легких (М. А. Губерниев, Е. М. Лейкина и др., 1967; Е. М. Лейкина и др., 1968, и др.).

На эмбрионах кур была испытана биологическая активность гомологичных и полимерных мРНК, рРНК и рРНК-ХЯ. Эти препараты стимулировали рост печени. Из данных табл. 30 видно, что используемые препараты РНК были высокополимерными и имели соотношение оснований, типичное для изучаемых фракций.

Таблица 30

Физико-химическая характеристика препаратов РНК (В. А. Конышев, 1968)

Препарат	Молекулярный вес	$\frac{Г+Ц}{А+У}$	N/P	$\frac{E_{260/250}}{E_{260/280}}$
мРНК	$0{,}66-0{,}8\times10^6$	0,84	1,66 1,81	2,2
рРНК-ХЯ	$0{,}9-1{,}2\times10^6$	1,38	1,75	2,2
рРНК	$0{,}9-1{,}2\times10^6$	1,52	1,72 1,81	2,2

При введении 7 мкг РНК эмбрионам кур на 8 сут развития наибольший ростстимулирующий эффект оказала мРНК, в то время как фракция рРНК в той же концентрации способствовала лишь увеличению относительной массы печени (рис. 20). Фракция мРНК вызывает органоспецифическую стимуляцию роста печени, начиная с введением 1,3 мкг на один эмбрион, а рРНК оказывает стимулирующее действие только в дозе 5—7 мкг. Введение более высоких концентраций экзогенных РНК сопровождается неспецифической стимуляцией нарастания массы эмбрионов, на фоне которого увеличение массы печени малозаметно.

Если вводить экзогенную РНК 12-дневным эмбрионам, то к этому времени эффект действия всех фракций РНК резко снижается, что свидетельствует

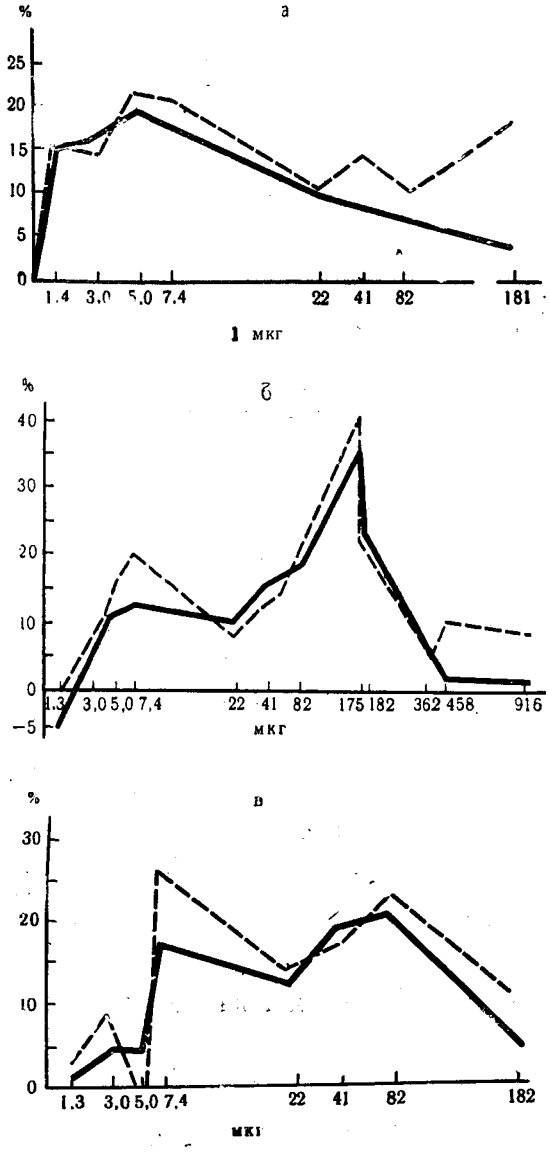


Рис. 20. Влияние введения фракции РНК на относительную и сырую массу печени.

а — иРНК; *б* — рРНК; *в* — рРНК-ХЯ; сплошная линия — относительная масса; пунктирная — сырая масса (по Б. А. Алексееву и др., 1960).

о непродолжительности действия экзогенных РНК (А. Б. Алексеев, В. И. Конышев, 1969). На 18 сут этот эффект исчезает полностью.

При введении фракций РНК 12-суточным эмбрионам, оказалось, что действие иРНК отличается от рРНК: ростстимулирующий эффект достигается при действии более низких доз мРНК, а зона специфического эффекта значительно короче, чем в случае введения рРНК. Действие рРНК-ХЯ оказалось промежуточным, что очевидно, объясняется примесью мРНК в препарате.

Введение животным фракций экзогенной РНК, выделенной из печени, сопровождается в ряде случаев повышением массы сухого остатка органа, свидетельствующее о том, что увеличение массы печени под действием РНК происходит не за счет накопления воды в тканях.

Из данных табл. 31 видно, что под влиянием фракций РНК происходит прирост массы органа, связанный с увеличением митотической активности паренхимы печени и, очевидно, усиления синтеза РНК.

Таблица 31

Влияние экзогенной РНК на рост печени эмбрионов (В. А. Конышев, 1969)

Параметры	Доза РНК, мкг	мРНК, мкг	рРНК, мкг	рРНК-ХЯ мкг	Контроль (0,85% раствор NaCl)
Масса печени, мг (абсолютная)	5	177,0±4,0	170,5±6,0	142,9±5,2	146,9±7,7
Митотический индекс, ‰	5	3,54±0,29	2,73±0,21	2,81±0,2	1,36±0,15
Количество ядер на 1000 мкм²	5	10±0,28	12±0,55	12,5±0,60	13,0±0,28
Включение P^{32} в РНК, %:					
через 3 ч		16,9±1,9	8,9±1,4	—	1,9±0,1
через 6 ч		14,7±1,1	7,4±1,6	—	4,8±0,8
через 12 ч		21,3±3,3	16,2±1,6	—	13,7±1,2

В то же время печеночная РНК в дозах, не вызывающих увеличения общей массы тела, не оказывала влияния на рост сердца. РНК, выделенные из селезенки и сердца петухов, при введении 12-суточным куриным эмбрионам в дозе 7 и 21 мкг не вызывали значительных

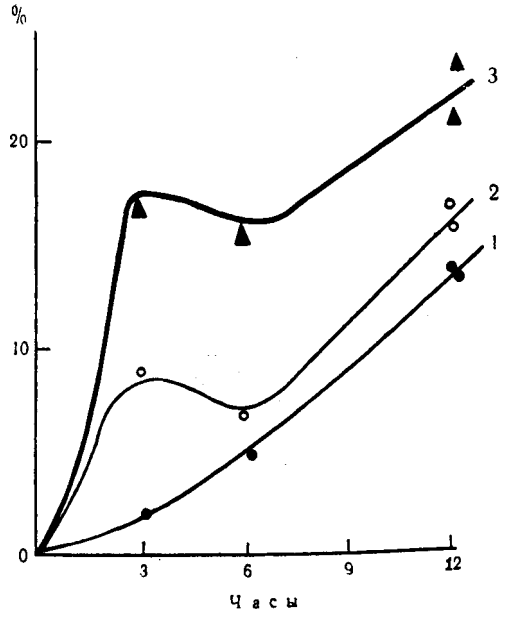


Рис. 21. Влияние введения фракций РНК на включение P^{32} в РНК печени куриных эмбрионов.

По оси абсцисс — время в часах, по оси ординат — относительная удельная радиоактивность в %.
1 — контроль — 0,85% раствор NaCl; *2* — рРНК; *3* — нРНК (по Б. А. Алексееву и В. А. Конышеву, 1969).

изменений массы печени. Эти данные свидетельствуют об органной специфичности действия РНК в определенном интервале вводимых доз. Под действием РНК у куриных эмбрионов не только увеличивается масса печени, но и повышается включение P^{32} в РНК печени, хотя не сказывается заметно на содержании в печени нуклеиновых кислот (рис. 21).

Как видно из рис. 21, относительная удельная активность РНК печени под действием мРНК повышается через 3 ч в 8,9 раза, через 6 ч — в 3,1 ($p=0,001$) и через 12 ч — в 1,4 раза ($p=0,04$). Другая фракция — рРНК — вызывала меньшее увеличение относительной удельной активности РНК. При введении обоих фракций (мРНК и рРНК) относительная удельная активность ДНК клеток превышала контроль во всех опытах соответственно

на 200—250 и 40—50%, однако радиоактивность фосфора ДНК была низкой, особенно через 3 и 6 ч после введения метки (Б. А. Алексеев, В. А. Конышев, 1969). Учитывая это, а также возможность загрязнения фракций ДНК рибонуклеиновыми кислотами, имеющими более высокую относительную удельную активность, следует с осторожностью интерпретировать данные о влиянии введенных веществ на включение P^{32} в ДНК. В этом случае лучше использовать H^3-тимидин. Усиление обновления РНК в ткани эмбриональной печени под влиянием экзогенных РНК может быть связано с тем, что РНК, проникая в клетку, вызывает интенсификацию белкового синтеза, что в свою очередь ведет к ускорению синтеза нуклеиновых кислот.

Кроме того, отсутствие повышения количества нуклеиновых кислот в ткани печени свидетельствует о том, что имеются различия в метаболических процессах при увеличении массы печени при регенерационной гипертрофии (Goss, 1964) и такого же процесса под действием ДНП в постнатальном периоде (М. А. Губерниев и др., 1964), когда отмечается, наоборот, повышение содержания РНК и ДНК в печени. Неизменность количества нуклеиновых кислот в печени, очевидно, связана с более высокими темпами роста эмбриональной печени, благодаря которым прирост РНК компенсируется увеличением массы. Возможно также, что стимуляция роста печени эмбрионов сопровождается усилением процессов дифференциации, для которой характерно постепенное снижение содержания нуклеиновых кислот в печени эмбрионов. Таким образом, содержание нуклеиновых кислот в печени эмбрионов не является таким же надежным критерием изменения роста данного органа, как в постнатальный период.

Суммарная фракция тРНК, полученная из печени петухов, вызывала угнетение развития печени при введении в дозе 7—180 мкг. Это позволяет предполагать, что способность препаратов информационных и рибосомальных РНК стимулировать рост не связана с примесью в них тРНК. Ростстимулирующее влияние РНК, по всей видимости, видоспецифично, поскольку введение эмбрионам экзогенной рРНК, полученной из печени крыс, мозга кроликов и высокополимерной бактериальной РНК из E. coli не вызывало стимуляции роста печени куриных эмбрионов (табл. 32).

Таблица 32

Влияние гетерологичных препаратов РНК на вес печени куриных эмбрионов (А. Б. Алексеев, В. А. Конышев, 1969)

Препарат	Вес печени	Δ %	p
рРНК, выделенная из печени	152,3±7,2	—7,2	0,23
рРНК, выделенная из мозга кроликов	162,0±4,8	—1,3	0,8
Тотальная РНК, выделенная из E. Coli, q 62	182,3±6,6	+11,1	0,28
Контроль (без введения препаратов РНК)	164,0±6,3	—	—

Экзогенные РНК более эффективны, очевидно, только в полимерном состоянии: смесь нуклеотидов, очевидно, обладает менее выраженные ростстимулирующим эффектом, т. е. усиление роста тканей в незначительной степени активируется дополнительным введением в клетку этих метаболитов. Об этом можно судить по исчезновению эффективности печеночной РНК после ее обработки РНК-азой (рис. 22) (А. Б. Алексеев и др., 1968), а также по характеру влияния низкополимерных коммерческих препаратов РНК из дрожжей (рис. 23). В пользу того, что активным началом в препарате является именно ее рибонуклеотидный компонент, служат данные, полученные в опытах по обработке полимерных РНК протеолитическими ферментами—проназой и трипсином. После обработки ростстимулирующий эффект РНК не снимается, т. е. присутствующие в препарате белковые примеси не обладают активностью. Тем не менее не исключается, что

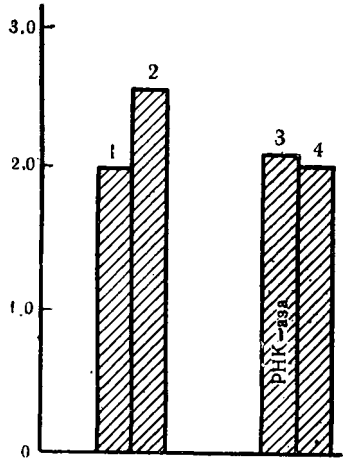


Рис. 22. Влияние обработки РНК-азой на стимулирующую активность РНК (по А. Б. Алексееву и В. А. Конышеву, 1969).

По оси ординат — относительная масса печени $\times 10^2$.
1 — контроль — 0,85% раствор NaCl; *2* — иРНК; *3* — РНК-аза; *4* — иРНК +РНК-аза.

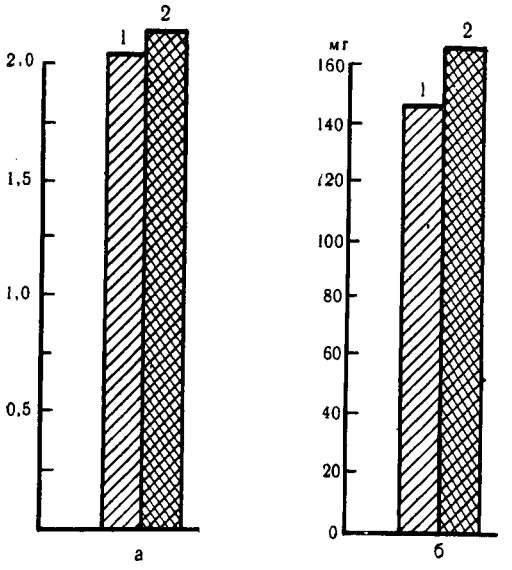


Рис. 23. Влияние низкополимерной коммерческой РНК из дрожжей. *а* — относительную (×10²) и *б* — абсолютную массу (в мг) печени куриных эмбрионов (по Б. А. Алексееву и др., 1960). *1* — контроль; *2* — РНК.

ростстимулирующий способностью могут обладать также и частично деполимеризованные препараты РНК.

В табл. 33 приведена характеристика препаратов ДНК и ДНП. Введение эмбрионам препаратов ДНК в количестве 35—400 мкг, выделенных из печени петухов, вызывало только тенденцию к увеличению массы печени и сердца. Относительная масса этих органов увеличивалась, что было связано с уменьшением массы эмбрионов под действием экзогенной ДНК (В. И. Коробейников, 1967).

ДНП из печени при введении 8-суточным эмбрионам в дозе 35 мкг вызывал на 12 сут после инъекции увеличение абсолютной массы печени на 15—26% и относительной массы — на 20—27% ($p=0{,}001$). Введение ДНК 12-суточным эмбрионам в дозе 100—300 мкг через сутки способствовало увеличению абсолютной массы печени ($p=0{,}01$—$0{,}09$), хотя относительная масса этого органа увеличивалась в большей степени — на 26—30% ($p=0{,}001$) за счет уменьшения массы эмбрионов.

Действие ДНП в этих опытах не связано с передачей информации, хранящейся в ДНК, поскольку после обработки его ДНК-азой ростстимулирующая способность ДНП сохраняется.

Таблица 33

Физико-химическая характеристика ДНК и ДНП (В. А. Конышев, 1969)

Препарат	N/P	Молекулярный вес (по характеристической вязкости)	N/P
ДНК	1,64—1,7	$5,3—9,7\times10^6$	6300—6400
ДНП	3,4—3,75	$13,2—25,0\times\times10^6$	6300—7100

Рассматривая механизм стимуляции роста под влиянием препаратов РНК, можно допустить несколько возможностей. Одна из них заключается в том, что экзогенная РНК при введении в организм образует комплексы с белками плазмы и в таком виде транспортируется в ткани органа, аналогичные тем, из которых они были экстрагированы и где могли вступать в процессы обмена веществ (Ebert, 1964). Можно также предполагать, что введенная РНК или продукт ее неглубокой деградации вызывает образование (или освобождение) некоторого гипотетического фактора, стимулирующего рост печени, подобно тому, как продукты распада эритроцитов вызывают образование эритропоэтина (В. А. Конышев, 1969; А. Б. Алексеевы и В. А. Конышев, 1969). Не исключено, что стимуляция роста печени, вызванная РНК, моделирует способность продуктов, выделяемых гибнущими клетками, косвенно влиять на размножение соседних клеток.

Непосредственное участие РНК в процессах биосинтеза макромолекул хотя и остается пока гипотетичным, однако факты последних лет заставляют пересмотреть наши взгляды на этот вопрос. Результаты экспериментальных исследований позволяют допустить пока единственную возможность, заключающуюся в том, что способность РНК печени стимулировать рост печени эмбрионов связана с действием этой РНК как «информационной» молекулы, хотя на данном этапе исследований еще нельзя сделать заключение о точном месте приложения эффекта экзогенного полимерного материала в клетке.

Глава VI
НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ДНК И РНК В КЛЕТКЕ ПОСЛЕ РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ЭКЗОГЕННЫМИ НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

Исследования механизма действия радиозащитных веществ в противолучевом эффекте с несомненностью показывают, что многие из защитных агентов оказывают благоприятное действие на выживаемость животных именно благодаря влиянию на процессы биосинтеза нуклеиновых кислот в органах и тканях облученных организмов.

Известно, что большинство метаболитов, принимающих участие в синтезе ДНК, белковой или нуклеотидной природы. Поэтому в последнее время было обращено внимание на то, что нормализацию метаболизма ДНК и РНК в облученной клетке можно достичь с помощью продуктов нуклеинового обмена (пуриновые и пиримидиновые производные, нуклеозиды и нуклеотиды) и полимерных экзогенных макромолекул РНК и ДНК, экстрагированных из клеток кроветворных тканей.

Поиски противолучевых протекторов биологического происхождения сопровождались испытанием разнообразных факторов, полученных из ядерных, митохондриальных, микросомальных, цитоплазматических фракций клетки. Наилучшими восстановительными свойствами среди них обладали ядерные вещества, прибавление которых к облученным клеткам in vitro способствовало лучшей выживаемости. На основе этих наблюдений было сделано заключение о том, что активное противолучевое вещество сосредоточено в ядре клетки или может являться ДНК (было показано, что возможность восстановления после радиационных повреждений у бакте-

рий и животных после облучения повышается в присутствии ДНК).

Было проведено множество экспериментов вначале in vitro, а затем in vivo по изучению влияния гомо- и гетерологичных ДНК на восстановительные процессы в суспензиях и тканях.

Исследователи сначала использовали главным образом изолированные клетки различных линий. Эти опыты показали, что при облучении клеток линии α рентгеновскими лучами в дозе 500 Р их выживаемость значительно снижается и составляет 5,5±3,3%. При этом количество клеток, способных к пролиферации, составляло всего 67±12%. После добавления в среду различных концентраций гомологичных высокополимерных ДНК, полученных из клеток, выживаемость заметно повышается (табл. 34).

Обращает на себя внимание отсутствие корреляции между восстановительными свойствами гомологичной ДНК и ее концентрацией в среде инкубации. Как видно из данных табл. 34, ДНК в концентрации от 0,005 до 0,015 мкг/мл из 8 опытов в 7 не оказывала эффекта на выживаемость (Miletič e. a., 1964).

Повышение выживаемости клеток после облучения начинает проявляться после увеличения концентрации ДНК до 0,5 мг/мл и выше. Однако в ряде экспериментов добавление ДНК не дает значимого эффекта. Интересно, что прибавление ДНК к необлученным клеткам не способствует их пролиферации и росту, т. е. интактные клетки отрицательно реагируют на экзогенную ДНК. Как видно, из данных табл. 34, из 27 опытов в 6 было установлено достоверное подавление роста клеток под влиянием ДНК, лишь в 2 случаях наблюдалась значимая стимуляция роста колоний. Не отмечалось также зависимости эффективности препарата ДНК от содержания в нем РНК или белка. Гетерологичная полимерная ДНК из тимуса теленка так же, как и гомологичный препарат, в различных концентрациях повышала выживаемость клеток в культуре ткани (табл. 35).

Результаты экспериментов по выяснению влияния концентрационной зависимости ДНК на среднюю летальную дозу облучения приведены на рис. 24. Видно, что кривая выживаемости клеток, необработанных ДНК, имеет типичную форму с начальным изгибом и экспоненциальной прямой, указывающей на среднюю леталь-

Таблица 34

Влияние высокополимерной гомологичной ДНК на выживаемость облученных и необлученных клеток (Milletic e. a., 1964)

Концентрация ДНК, мг/мл среды	Концентрация РНК и белка в препарате (Мкг)		Облучение 500Р		Необлученные клетки	
	РНК	белок	без ДНК, M±m	с добавлением ДНК, M±m	без ДНК, M±m	с добавлением ДНК, M±m
0,005	38,0	11,0	144±18,2	135±13,1	166±7,0	146±6,3[1]
0,010	38,0	11,0	144±18,2	133±20,1	166±7,0	146±9,4[1]
0,015	28,0	0,1	160±24,0	147±8,6	167±10,3	160±7,8
0,05	38,0	11,0	144±18,2	163±12,1[1]	166±7,0	146±18,3
0,09	38,0	11,0	144±18,2	168±21,8	166±7,0	150±18,5
0,10	14,0	14,2	36±10,8	52±13,0	122±10,3	106∓9,0[1]
0,15	28,0	0,1	160±24,5	141±13,0	167±10,3	163±14,3
0,40	16,0	6,1	101±22,8	97±14,8[1]	118±12,9	133±9,8[1]
0,50	38,0	11,0	144∓18,2	181±24,2[1]	166±7,0	148±13,4[1]
1,0	38,0	11,0	144±18,2	183±16,6[1]	166±7,0	144±5,0[1]
1,5	28,0	0,1	160±24,5	149±19,8	167±10,3	160±6,2
3,0	6,8	0,2	71±22,8	117±12,8[1]	121±13,0	107±16,4
4,0	16,0	6,1	101±22,8	122±28,8	118±12,9	129±6,5
5,0	38,0	11,0	122±18,2	170±27,2	166±7,0	164±4,3
10,0	38,0	11,0	144±18,2	205±17,7[1]	166±7,0	185±5,1[1]
13,0	23,7	0,1	155±18,1	176±5,8	154±24,7	158±17,5
14,0	6,8	0,2	71±22,8	120±22,6[1]	121±13,0	129±9,4
15,0	8,2	1,1	41±10,1	74±16,5[1]	117±5,0	128±4,2[1]
17,0	48,0	0,7	159±10,0	190±11,7[1]	178±9,0	180∓16,6
19,0	12,0	0,8	117±18,6	126±21,2	213±9,0	204±5,9
27,0	6,8	0,2	71±22,8	69±16,5	121±13,0	136±8,8
35,0	16,0	6,1	101±28,5	195±23,4[1]	113±13,0	131±12,9
43,0	13,7	—	64±10,4	84±13,0	136±17,5	136±9,6
55,0	6,8	0,2	71±22,8	97±16,1	121±13,0	135±14,4
78,0	12,0	0,0	34±4,3	51±6,6[1]	141±6,6	144±11,5
83,0	6,8	0,2	71±22,8	100±7,0[1]	121±13,0	135±11,0
157	2,0	0,4	67±16,3	73±23,7	115±12,0	113±3,8

[1] Значимая разница по тесту t.

ную дозу при 170 Р (экстрапелляционное число 2,2). Добавки экзогенной ДНК не влияют на наклон кривой выживаемости, и средняя летальная доза для обработанных клеток остается такой же, как и в контроле — 170 Р. Эти данные показывают, что экзогенные ДНК в полимерной форме независимо от видового происхождения способны после проникновения внутрь клетки ак-

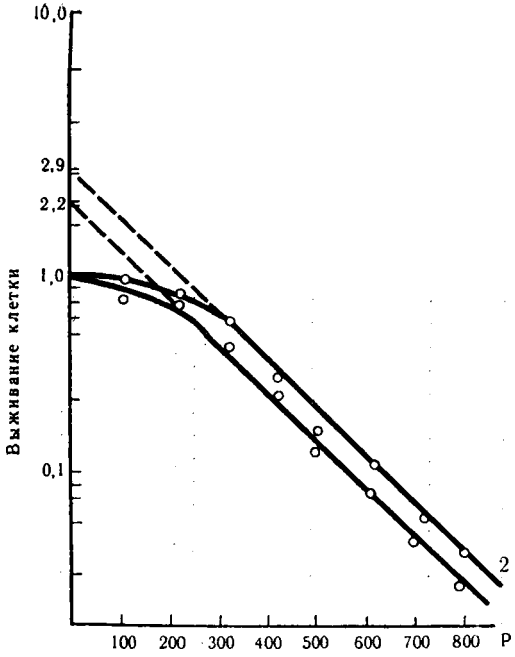


Рис. 24. Влияние изологичной ДНК на выживание α-клеток, облученных различными дозами (по Miletic e. a., 1963).

ДНК прибавляли немедленно после облучения, в контроль добавляли 0,15 NaCl. Выжившие α-клетки: *1* — в контроле, 170 Р; *2* — после добавления 13 мкг/мл ДНК, 170 Р.

тивировать в облученных клетках репарационные процессы (Miletič e. a., 1963).

Таблица 35

Влияние высокополимерной гомологичной ДНК из тимуса теленка на выживаемость клеток

Концентрация ДНК, мг на 1 мл среды	Облучение 500 Р		Необлученные клетки	
	без ДНК, M±m	с добавлением ДНК, M±m	без ДНК, M±m	с добавлением ДНК, M±m
3,0	53±4,2	68±4,1	116±15,4	11±10,1
3,0	92±15,2	114±9,9	154±5,6	158±10,0
6,0	51±4,0	69±9,2	141±10,6	143±5,0
15,0	53±4,2	79±6,4	116±15,3	118±19,1
15,0	92±15,2	117±11,7	154±5,6	155±6,4
30,0	51±4,0	70±3,6	141±10,6	152±5,0
30,0	92±10,2	114±8,6	154±5,6	145±9,8

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ

Заметно, что существует определенная зависимость между исходными изменениями синтеза ДНК и РНК и последующим развитием лучевой болезни. Поэтому нуклеопротеиды являются одним из важнейших субстратов действия ионизирующих излучений. Деструктивные изменения при этом происходят преимущественно именно в тех тканях, которые характеризуются относительно богатым содержанием нуклеиновых кислот, обладающих высокой скоростью обмена.

Кроветворные ткани млекопитающих наиболее чувствительны к действию радиации, поскольку клетки этих тканей характеризуются относительно повышенным содержанием нуклеиновых кислот и высоким темпом их обмена. При действии ионизирующего фактора радиации происходят заметные нарушения в селезенке и костном мозге, что сопровождается потерями ДНК из тканей, приводящими клетку к гибели. Такая потеря ядерных субстанций клеткой прежде всего выражается в снижении включения меченых предшественников в ДНК кроветворных тканей (Hevesy, 1949; Kelly, 1950; Abrams, 1951). Считают, что именно ДНК являются первичным локусом действия ионизирующей радиации на биологические системы (Errera, 1955; Butler, 1956; Cole e. a., 1956, и др.). Эти данные свидетельствуют о важной роли нуклеиновых кислот в постлучевой регенерации органов и тканей и говорят о целесообразности изучения ранних биохимических процессов в облученных клетках костного мозга и селезенки. На их основе разрабатываются эффективные методы, с помощью которых можно усилить регенерацию этих процессов. Одним из таких методов может явиться введение животным экзогенных нуклеиновых кислот или их предшественников.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДЕЙСТВИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В патогенезе лучевого поражения биологических структур большая роль принадлежит изменениям в обмене нуклеопротеидов, в состав которых входят пуриновые и пиримидиновые основания.

Поскольку пиримидиновые циклы нуклеиновых кислот характеризуются сравнительной неустойчивостью и быстро нарушаются при ионизирующем излучении (особенно урацил), то это послужило основанием для использования производных нуклеиновых кислот в качестве средств, повышающих регенерацию тканей при лучевой болезни.

Ранее было показано, что пурины и пиримидины стимулируют процессы регенерации в широких масштабах. Эти соединения обладают анаболизирующими свойствами, ускоряют синтез нуклеиновых кислот и белков (Н. В. Лазарев, Г. И. Фелистович, 1954, 1961).

Не являясь инициаторами клеточного размножения, они ускоряют его в присутствии других ростстимулирующих факторов, возникающих в процессе репаративной регенерации тканей. Хотя стимуляция процессов регенерации этими соединениями не является тканеспецифичной и ускоряет регенерацию самых разнообразных тканей, такие соединения, как метацил и пентоксил, нашли широкое применение для ускорения заживления ран и при онкологических заболеваниях, которые сопровождаются угнетением кроветворения под влиянием химических и лучевых факторов.

При изучении 21 препарата (производные пурина и пиримидина) И. Г. Красных и др. (1961) установили, что только 3 из них способны уменьшать на 20% тяжесть лучевого поражения. Препараты, оказавшиеся эффективными, содержали в молекуле аминоэтильную или аминометильную цепочку: $R—CH_2—CH_2—NH_2—$; и $R—CH_2—NH_2—$. Очевидно, именно эти радикалы обусловливают радиозащитный эффект этих соединений.

Испытание других типов пиримидиновых производных также показало, что некоторые из них способны оказывать радиозащитный эффект.

Белым мышам перед облучением рентгеновыми лучами 500, 600 и 800 Р вводили различные пиримидиновые производные из расчета 40 мг на 1 кг массы тела. Эти соединения, за исключением 2,6-диамино-5-нитро-4-метилпиримидина, обладали радиозащитным действием. Наибольший эффект оказали цитозин, пентоксил и метацил в зависимости от дозы облучения (И. Ф. Грех, 1958): до 30-го дня из 10 облученных в дозе 600 Р выживало в среднем от 50 до 100% животных.

Доказано, что вслед за облучением снижается содержание пиримидиновых нуклеотидных фрагментов и увеличивается количество свободных одиночных тимидиловых нуклеотидов в высокополимерной фракции ДНК. Снижение пиримидиновых нуклеотидов обусловлено ферментативной активностью специфических гидролаз

(РНК-азы), а увеличение количества свободных тимидиловых нуклеотидов — процессами распада. Эти возникающие в процессе облучения процессы представляют собой своеобразный физиологический механизм, который препятствует накоплению токсических продуктов и способствует удалению из организма поврежденных участков ДНК, обеспечивая тем самым возможность регенерационных процессов в ядре клетки (Г. А. Критский и др., 1969).

Пиримидиновые нуклеотиды обладают противолучевой эффективностью. Было замечено, что выделение естественных предшественников нуклеиновых кислот — дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов способствует более успешной регенерации клеток кроветворных систем. Изучение восстановительных свойств экзогенных предшественников ДНК и РНК были проведены в опытах in vivo и in vitro. Особенно четко было выявлено влияние тимидиндезоксирибонуклеотидов на репарационные процессы в клетках кроветворных тканей.

Известно, что тимидиннуклеотиды играют одну из ведущих ролей в процессах регенерации биосинтеза ДНК в организме.

В покоящихся клетках содержание этих нуклеотидов незначительно, поскольку темп их синтеза довольно низок. В случае введения в клетку экзогенных тимидиновых нуклеотидов наблюдается повышение их митотической активности in vivo, стимулируется процесс кроветворения.

Однако введение высоких доз тимидиновых нуклеотидов, наоборот, подавляет процессы регенерации.

Облучение мышей в дозе 800 Р, при которой погибает 90% животных, сопровождается повышенной (в $2^1/_2$—3 раза) экскрецией таких дезоксирибонуклеотидов и продуктов их метаболизма, как β-аминоизомасляная кислота, дезоксиуридин и особенно тимидин. Если сразу же после облучения животным ввести тимидин, то это обеспечивает высокий уровень их выживаемости (52,6% в контроле) и нормализует экскрецию предшественников ДНК (В. К. Мазурик и др., 1967).

Введение тимидиновых нуклеотидов облученным животным через 6 ч оказывало, наоборот, токсическое действие и способствовало активации катаболизма ДНК, о чем свидетельствует гиперэкскреция предшественников

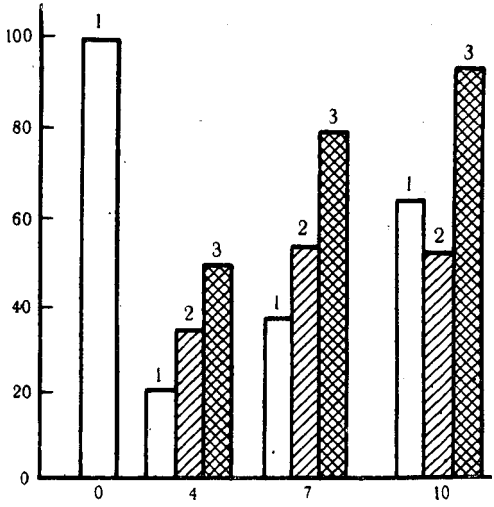


Рис. 25. Митотический индекс в клетках костного мозга мышей на 4, 7 и 10 сут после облучения и введения.

1 — физиологического раствора; *2* — 1,25 кг тимидина; *3* — 2 мг тимидилата кальция (по Karpfel e. a., 1959).

на 5 сут после облучения. Через 24 ч введение тимидиновых нуклеотидов не влияло на уровень выживаемости, хотя улучшало показатели экскреции предшественников.

Введение экзогенного тимидина сразу же после облучения восполняет дефицит этого предшественника и тем самым способствует регенерации макромолекулярной структуры ДНК в клетках. Применение дезоксирибонуклеотида в более поздние сроки после облучения хотя и стимулирует биосинтетическую активность ДНК в популяциях клеток, оставшихся живыми после облучения, однако не может реставрировать информационные качества ДНК. Высокие дозы тимидина ингибируют ферменты биосинтеза пиримидиновых предшественников ДНК, в результате чего подавляется пролиферация клеток и наступает генерализованная гибель клеток, сопровождающаяся гиперэкскрецией β-аминоизомасляной кислоты.

Затем было показано, что подобным действием обладают не только тимидиндезоксирибонуклеотиды.

При облучении мышей в дозе 500 Р можно добиться

восстановления функции клеток костного мозга путем введения дезоксицитидиловой и тимидиловой кислот.

Как видно из рис. 25 (см. также рис. 24), оба дезоксирибонуклеотида стимулируют восстановительные процессы в клетках костного мозга in vitro, что особенно четко выявляется на 4-й и 7-й день после облучения. Параллельно с изменением синтеза ДНК в селезенке изменяется также и митотический индекс (Karpfel e. a., 1959). В других исследованиях также было подтверждено, что дезоксицитидиловая и цитидиловая кислоты являются радиопротекторами (табл. 36).

Таблица 36

Влияние дезоксирибонуклеотидов на синтез ДНК в клетках костного мозга (Karpfel e. a., 1959)

Концентрация нуклеотидов, мг/мл	Синтез ДНК			
	дезоксицитидиловая кислота		цитидиловая кислота	
	облученные клетки	необлученные клетки	облученные клетки	необлученные клетки
0	100	100	100	100
3	126	—	—	—
10	141	100	106	140
30	191	104	111	87
90	101	83	—	—

Из данных табл. 36 видно, что дезоксицитидиловая кислота стимулирует синтез ДНК в облученном костном мозге в большей степени, чем цитидиловая. Цитидиловая кислота усиливает регенерацию ядерного материала в необлученных клетках.

Введение животным, облученным в дозе 500 Р, дезоксирибонуклеотидов способствовало более быстрой регенерации не только клеток костного мозга, но и элементов белой и красной крови (рис. 26). Особенно хороший эффект в этом отношении оказывали ежедневные инъекции тимидиловой кислоты в дозе 2 мг на протяжении первых пяти дней, которые способствовали снижению смертности облученных животных до 1—17% (при 12—33% в контроле). Если вводить дезоксицитидиловую кислоту дважды в день по 0,1 мг, на протяжении 10 дней, то это также способствует повышению резистентности животных к облучению (рис. 27).

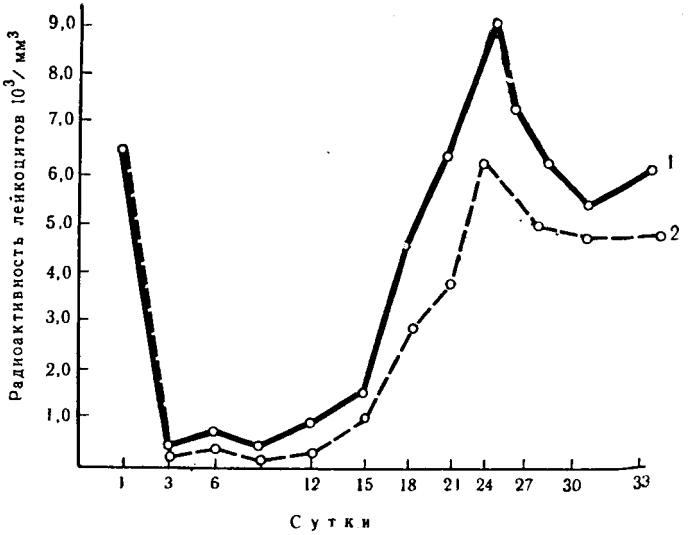


Рис. 26. Уровень лейкоцитов в крови животных после облучения и введения тимидиловой кислоты.

1 — в опыте и *2* — в контроле.

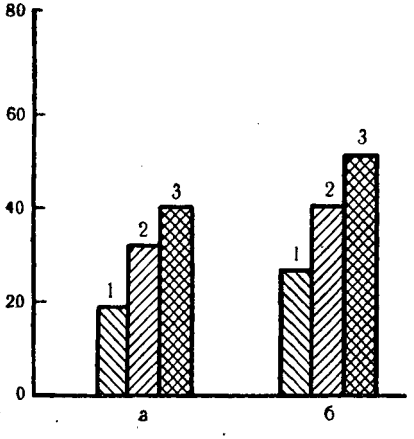


Рис. 27. Скорость синтеза ДНК селезенки (а) и митотический индекс в клетках костного мозга (б) на 7-й день после облучения и инъекции.

1 — физиологического раствора; *2* — 0,075 мг дезоксицитидила; *3* — 0,1 мг дезоксицитидиловой кислоты (по Karpfel e. a., 1959).

Следует отметить, что использование дезоксирибонуклеотидов в качестве восстанавливающих средств при облучении животных дает разные результаты — все зависит от частоты, продолжительности и способа введения. Например, если дезоксицитидиловую кислоту вводить 1 раз в больших дозах или очень часто в дозах,

превышающих 0,1 мг, то она оказывалась неэффективной. Поэтому необходима дальнейшая экспериментальная разработка схем введения дезоксирибонуклеотидов.

Если дезоксирибонуклеотиды оказывают в общем положительное действие на восстановительные процессы, то дезоксирибонуклеозиды, наоборот, угнетают синтез ДНК в клетках костного мозга и повышают смертность облученных животных (Drasil e. a., 1958).

Представляют интерес данные по лечению хронической лучевой болезни при помощи производных нуклеиновых кислот. С этой целью был использован нуклетон, который представляет собой продукт щелочного гидролиза дрожжевой РНК, содержащий в равных частях адениловую, гуаниловую, цитидиловую и уридиловую кислоты в виде 5′ и 3′-рибомононуклеотидов.

При еженедельном облучении 2-месячных мышей в дозе 365 Р γ-лучами Co^{60} (скоростью 65 Р/мин) в послерадиационном периоде вводили 2,5 мг раствора нуклетона или его компоненты, представляющие смесь пуриновых 3′-рибозомононуклеотидов либо 5′-рибозомононуклеотидов всех четырех компонентов. В качестве контроля вводили смесь пуриновых нуклеотидов также всех четырех оснований (Sugahara e. a., 1966).

Вид препарата	*Однократная доза в 0,1 мл, мг*
Нуклетон	0,5
Пуриновые 3′- (2′)-рибозомононуклеотиды	0,25
Пуриновые 5′-рибозомононуклеотиды	»
Пуриновые нуклеотиды:	»
3′(2′)-гуаниловая кислота	»
3′(2′)-цитидиловая кислота	»
3′(2′)-уридиловая кислота	»
3′(2′)-адениловая кислота	0,4

В этих опытах примерно к 45-м сут выживает 20% нелеченых животных. В группе, леченной нуклетоном, согласно Sugahara с сотрудниками (1966), процент выживших был значительно больше. Выживаемость животных зависит также от времени введения нуклетона, так как более высокий процент выживания можно получить в том случае, если животным вводить препарат перед облучением. Более ощутимый эффект наблюдается при введении нуклетона сразу же после облучения, а препарат, введенный через 24 ч, сокращает срок жизни примерно на один месяц.

Продолжительность жизни повторно облученных мышей, леченных компонентами нуклетона и нуклеотидами (препараты вводили 3 раза в неделю, доза аденилловой кислоты составляла $^1/_6$ от всех остальных — 0,25 мг)

Вид препарата	*Средняя продолжительность жизни в днях*
Нуклетон	74,9±5,0
3(2)-рибозомононуклеотиды	68,3±3,2
Пуриновые нуклеозиды	71,6±1,0
5(2)-рибозомононуклеотиды	42,6±2,8
3(2)-цитидиловая кислота	53,6±2,0
3(2)-уридиловая кислота	51,1±2,3
3-(2)-адениловая кислота	50,4±2,4
3(2)-гуаниловая кислота	54,8±2,2
Контроль (смесь нуклеотидов)	42,5±2,6

Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что наиболее высокий процент выживаемости наблюдается в случае лечения облученных животных тотальным препаратом — нуклетоном. 5′-Мононуклеотиды оказались совершенно неэффективными.

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить эффективность нуклетона — естественного препарата дрожжевой РНК, как радиопротектора именно при хроническом облучении. По литературным данным, при таком способе облучения (т. е. хронической лучевой болезни) химические радиопротекторы оказываются неэффективными из-за кумулятивного токсического действия и сравнительно низких дозировок, используемых при лечении. При хронической лучевой болезни оказались неэффективными такие радиопротекторы, как АЭТ, цистамин, цистеин. Поэтому использование предшественников нуклеиновых кислот в этом случае может явиться довольно эффективным терапевтическим противолучевым средством. Морфологический анализ клеток костного мозга показывает, что циклическое введение нуклетона или его компонентов (особенно перед облучением) способствует частично регенераторным и ростовым процессам в кроветворных клетках костного мозга и селезенки. Наиболее эффективны не только суммарный препарат — нуклетон, но и его компоненты, главным образом 3′ (2′)-рибомононуклеотиды (Sugahara e. a., 1965, 1966).

При использовании суммарной дозы в 2137 Р (по 365 Р в неделю) Sugahara с сотрудниками (1965, 1966) в контроле наблюдали 100% гибель животных, а в партии крыс, получавших 3′ (2′)-рибомононуклеотиды, погибло всего 30% животных. Кроме того, в

этой группе животных 100% гибель отмечена лишь спустя 30 дней, когда суммарная доза достигала 3906 Р. Вместе с тем 5′-рибонуклеотиды, легко вовлекаемые в нормальные синтетические процессы, должны, казалось, быть эффективными. Однако, наоборот, радиозащитный эффект проявляли только 3′-рибонуклеотиды.

Можно думать, что терапевтическая эффективность 3′-рибонуклеотидов связана с тем, что они не вовлекаются в нормальный обмен, накапливаются в клетках, перехватывая (связывая) хиноидные радиотоксины, что и приводит к меньшему поражению ядерной ДНК (А. М. Кузин, 1970).

Одним из возможных объяснений эффективности действия 3′- и 5′рибонуклеотидов при хронической лучевой болезни может служить их способность к дефосфорилированию. Клетки активнее используют те нуклеотиды, которые быстрее подвергаются в организме процессу дефосфорилирования. Этими способностями, очевидно, обладают именно 3′(2′)-рибомононуклеотиды. Однако все же остается до конца не ясной зависимость между дозой нуклеотидов и их восстановительными способностями. Sugahara с сотрудниками (1966) исследовали лишь эффективность одной дозы. Восстановительное действие нуклетона на поврежденный облучением синтез ДНК в регенерирующей печени был отмечен также Kido (1965). Автор предположил, что в основе механизма противолучевого действия нуклеотидов лежит их способность увеличивать число переживающих популяций клеток путем усиления в них репаративных, восстановительных процессов. Известно, что время послерадиационной смерти зависит от функциональной устойчивости дифференцированных клеток к облучению, поэтому возможно, что нуклеотиды, включаясь в биохимическую динамику клетки, способствуют репаративным процессам именно на уровне ДНК.

Результаты опытов свидетельствуют, что время переживания мышей, леченных одним из четырех нуклеотидов, существенно длиннее, чем в контроле, но короче по сравнению с таковым у животных, которым вводили смесь нуклеотидов — нуклетон, т. е. наблюдается синергический эффект отдельных мононуклеотидов. То, что эффект адениловой кислоты был сильнее выражен, чем остальных трех рибонуклеотидов, хотя доза ее была значительно ниже, указывает на высокую эффективность действия адениловой кислоты. К сожалению, адениловая кислота не может быть использована в более высоких дозах из-за ее плохой растворимости, но эти трудности могут быть преодолены путем использования соответствующих растворителей.

Эффективность препаратов ДНК как средств, способствующих регенерации клеток костного мозга облученных животных, показана в опытах, в которых использовали цельные суспензии клеток кроветворных органов и их гомогенаты. Оказалось, гомогенизированные клетки костного мозга не теряют способности к регенерации при пересадке животному с острой лучевой болезнью и обладают довольно высокой терапевтической эффективностью. Было установлено, что гомогенаты обладают эффективностью за счет ядерного материала, представляющего собой макромолекулярный ДРНП-комплекс (Cole e. a., 1954, 1965). Оказалось, что компонентом ДРНП, ответственным за противолучевой эффект, является полимерная ДНК или ее крупные фрагменты.

Наиболее всесторонние исследования противолучевой защиты животных при помощи экзогенных нуклеиновых кислот были проведены югославскими исследователями (Kanazir e. a., 1959) и подтверждены другими авторами. Первоначальное мнение о том, что эффект экзогенных РНК либо ДНК связан с действием низкомолекулярных дезокси- или рибонуклеотидов, в дальнейшем было пересмотрено, поскольку выяснилась эффективность именно полимерных макромолекул нуклеиновых кислот.

Внутрибрюшинное введение крысам нативной ДНК, полученной из печени крыс, при облучении их смертельной дозой рентгеновских лучей или после γ-облучения в ряде случаев дает возможность продления жизни либо повысить выживаемость на 40—50% по сравнению с 2—13% в контроле (табл. 37).

Вместе с тем эффект воздействия нативной ДНК не постоянен, а деградированные под влиянием теплового воздействия и растворения в воде препараты оказались неэффективными (табл. 38).

Существующие противоречивые данные об активности экзогенной ДНК как противолучевого фактора во многом объясняются методом получения препарата, дозой и сроками его ведения. Установлено, что защитные свойства ДНК зависят от возраста животных, из тканей которых выделяли материал. Очень хороший радиозащитный эффект оказывает двукратное введение малых

Таблица 37

Влияние однократного введения ДНК на выживаемость крыс при γ-облучении их в дозе 1000 Р (Р. Е. Либинзон и др., 1963)

Метод введения ДНК	Количество животных	Количество введенной ДНК, мг	Выжило к 30-му дню		Средняя продолжительность жизни погибших, дни
			количество	%	
Внутривенно	95	Контроль 0,85% раствор NaCl	2	2,1	10,3
	27	2,8	0	0	11,5
	11[2]	3,0	5	45,5[1]	15,0
	25	3,0	2	8	11,2
	34	3,0	5	14,7[1]	11,9
	10	4,0	4	40,0	8,1
	33	3,0	1	3,0	10,2
	6	3,6	6	50,0[1]	13,0
	5	3,0	0	0	17,6
Внутрибрюшинно	17	3,0	9	52,9[1]	11,8
	18	2,9	6	33,4[1]	14,4
	17	3,0	1	5,9	11,5
	13	3,0	4	30,4[1]	13,1
	6	5,0	0	0	12,0
	18	4,8	5	27,7[1]	13,5
	21	5,7	1	4,8	9,6
	14	5,0	0	0	8,6
	5	3,5	2	40,0[1]	14,0

[1] $p<0,05$.
[2] Препарат вводили внутривенно и внутрибрюшинно одновременно.

доз экзогенной ДНК мышам до облучения быстрыми нейтронами. Это способствует повышению выживаемости животных в ранние сроки после облучения и стимуляции кроветворения (Е. Е. Чеботарев и др., 1969). Однако такое профилактическое введение биополимера не предотвращает возникновения вторичных проявлений радиационного синдрома и смертности животных в более отдаленные периоды.

Наиболее выраженное терапевтическое действие ДНК проявляется при внутрибрюшинном введении препарата. По данным Panjenač (1958), выраженной противолучевой эффект экзогенного материала может быть достигнут при введении животному довольно больших

Таблица 38

Влияние обработки препаратов ДНК на терапевтическую эффективность высокополимерной ДНК при облучении крыс в дозе 1000 Р

Количество введенной ДНК, мг	количество животных	Выжило к 30-му дню		Средняя продолжительность жизни погибших, дни
		количество	%	
Тепловая денатурация				
3,0	13	4	30,4	13,0
3,0	13	0	0	13,0
5,0	8	4	50,0	17,0
5,0	8	0	0	12,2
5,2	9	2	22,2	11,6
5,2	9	0	0	12,0
Растворение в воде				
3,0	29	4	13,8	12,0
4,0	34	8	0	9,6
3,9	10	2	20,0	15,7
3,0	30	0	0	10,2
3,0	16	1	6,2	13,9
3,0	13	3	23,1	10,7

Таблица 39

Влияние однократного введения ДНК на выживаемость крыс при γ-облучении — 1000 Р (Р. Е. Либинзон и др., 1963)

Количество введенной ДНК, мг	Количество животных	Выжило к 30-му дню		Средняя продолжительность жизни погибших, дни
		количество	%	
Контроль—0,85% раствор NaCl	47	6	12,7	13,8
4,0	16	3	18,7	9,6
5,0	8	4	50,0[1]	17,0
4,8	14	5	35,7[1]	15,5
5,2	9	2	22,2	11,6
6,0	12	7	58,3[1]	12,6
5,5	13	4	30,8	18,3
6,2	30	10	34,3[1]	12,1

* Статистически достоверная разница $\frac{\text{опыт}}{\text{контроль}}$

доз раствора ДНК — 12—18 мг. Вместе с тем имеются наблюдения, что более низкие дозы ДНК также оказываются эффективными (табл. 39). Из данных табл. 39 видно, что средняя выживаемость крыс под влиянием экзогенной ДНК составляла 34,3%, а в отдельных случаях выживаемость достигала 50—58,3%. Эти опыты также отчетливо показали зависимость эффекта от дозы — при инъекции до 4,0 мг ДНК выживаемость не превышала 20%, а при введении до 6,0 мг препарата — 40—58%.

Сравнение данных по выживаемости крыс при внутривенном введении им суспензии клеток костного мозга и ДНК свидетельствует о том, что клетки костного мозга повышают выживаемость до 87,3%, в то время как ДНК способствует этому процессу в половину меньше. В качестве терапевтического средства ДНК из печени дает сравнительно невысокий эффект. Ранее было замечено, что более выраженной эффективностью обладают гомологичные экзогенные ДНК (Hudnik, Plevnik e. a., 1959) или ДНК, выделенные из близких по своей функции тканей. Действительно, введение животным гомологичных экзогенных ДНК (табл. 40) повышает выживаемость животных при острой лучевой болезни, вызванной γ-облучением Co^{60} в дозе 1000 Р (20 Р/мин).

Таблица 40

Влияние высокополимерной ДНК на выживаемость крыс при острой лучевой болезни (Р. Е. Либинзон и др., 1963)

Препарат, мг	Количество животных	Выжило к 30-му дню		Средняя продолжительность жизни погибших, дни
		количество	%	
Контроль 0,85% раствор NaCl	26	4	15,4	14,2
ДНК из печени, 5,0	40	17	42,5	12,5
ДНК из селезенки, 5,0	15	9	60,0	14,0

Как видно из данных табл. 40, ДНК из селезенки повышает не только выживаемость, но и продолжительность жизни облученных животных. Эффективность экзогенных ДНК, как установлено в последнее время, свя-

зана с сохранением их полимерности. Однако при парэнтеральном введении ДНК часть ее подвергается деградации, в результате чего терапевтический эффект препарата снижается.

В связи с этим были сделаны попытки предварительного предохранения ДНК от деградации, наступающей после парэнтерального введения. Радиозащитные свойства таких препаратов ДНК приведены в табл. 41.

Таблица 41

Влияние ДНК, выделенной из тимуса теленка, на выживаемость крыс, облученных в дозе 650 Р (В. К. Мазурик и др., 1967)

Вид препарата	Количество животных		% выживаемости
	общее	выживших	
Полимерная ДНК	5	0	0
ДНК, защищенная метилированным альбумином	5	1	20
ДНК в сочетании с общим УФ-облучением	5	3	60
Ферментативный гидролизат ДНК	5	5	100

Препараты вводили сразу же после облучения. Этот опыт отличается от ранее описанных тем, что экзогенная ДНК, введенная в полимерном состоянии животным с лучевой болезнью, совершенно не повышала их выживаемости. Хотя и трудно согласиться с этими данными, однако не исключено, что введенная ДНК была недостаточно полимерна, и парэнтеральное введение вызвало еще более глубокую деградацию молекул ДНК, которые оказались не эффективными. Это опять-таки противоречит данным опытов по действию ДНК-азного гидролизата. Странно, что продукты распада ДНК оказались более эффективными, чем полимерные молекулы, которые, согласно большинству исследователей, ответственны за противолучевой эффект. Указанная работа противоречит в этом отношении всем существующим. Можно, конечно, согласиться, что эффект гидролизата ДНК может быть связан с быстрой поставкой тимидиновых предшественников в пораженные клетки, где синтез довольно быстро нарушается при лучевой болезни.

Вместе с тем данные табл. 41 явно показывают, что такие дополнительные стабилизаторы и модификаторы,

как метилированный альбумин и особенно ультрафиолетовое облучение в сочетании с экзогенной ДНК обеспечивают от 20 до 60% выживаемости. Однако они оставляют открытым вопрос о механизме сочетанного действия УФ-облучения с экзогенной ДНК. В данном случае речь идет, очевидно, об измененной реактивности животных при лучевой болезни и какой-то перестройке в компетентности клеток в поглощении экзогенного материала.

Изучение распределения в организме облученных и контрольных животных меченной P^{32} ДНК показано, что уже через 6 ч после ее ведения радиоактивность обнаруживается в кислоторастворимой фракции ДНК и РНК печени, селезенки и костного мозга (рис. 28). Анализ динамики распределения радиоактивности свидетельствует о том, что активность ДНК печени в первые часы скорее всего связана с фагоцитированием высокополимерных блоков меченого материала, а снижение активности зависит от темпов распада ДНК. Как видно, удельная активность РНК была ниже, чем ДНК, а активность кислоторастворимой фракции нуклеиновых кислот через 12 и 24 ч превышала удельную активность ДНК и РНК уже в 10 раз. Считают, что для синтеза РНК используются именно кислоторастворимые продукты деградации ДНК (Р. Е. Либинзон, В. В. Константинова и др., 1963).

В селезенке и костном мозге динамика распределения радиоактивности ДНК и РНК несколько отличалась от таковой в печени. Совокупность этих данных показывает, что в кроветворных тканях количество ДНК-P^{32} через 6 и 12 ч (первый пик) после введения определяется, скорее всего, поглощением экзогенного материала в виде крупных блоков. Второй пик удельной активности связан уже с процессами ресинтеза распавшихся предшественников. Видно, что введенная в организм экзогенная ДНК наиболее активно используется клетками костного мозга, причем в организме облученных животных молекулы ДНК утилизируются в меньшей степени, чем здоровых животных. Представляет интерес то обстоятельство, что клетки костного мозга облученных животных довольно энергично поглощают ДНК селезенки, что способствует более высокому уровню регенерации этих клеток, чем, например, при введении ДНК печени. Это объясняется тем, что ДНК из селезенки

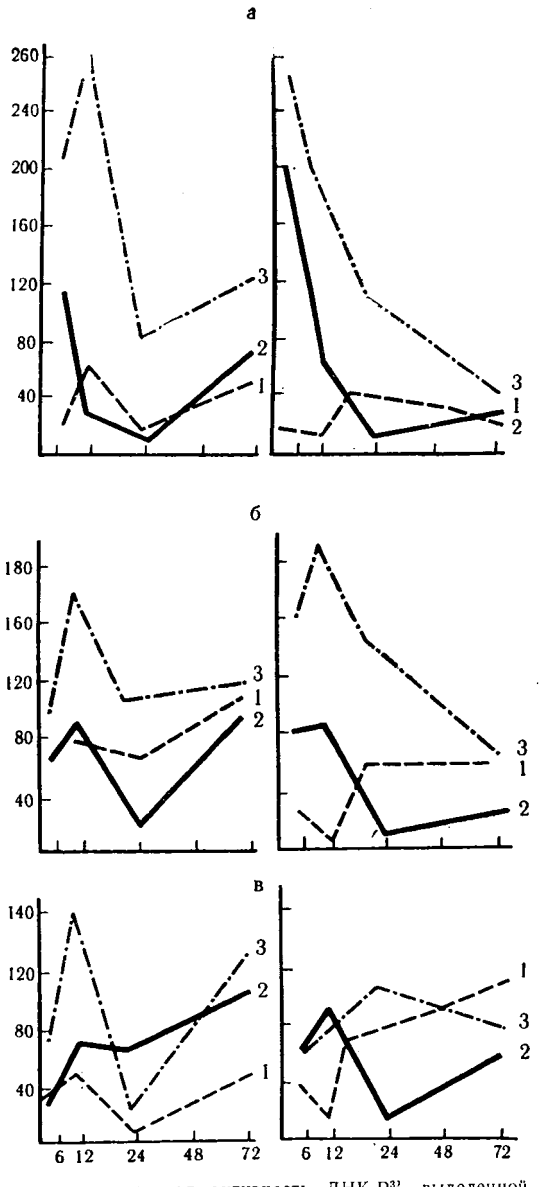


Рис. 28. Удельные активности.

1 — фосфора РНК; *2* — ДНК; *3* — кислоторастворимой фракции: *а* — печени; *б* — селезенки; *в* — костного мозга в различные часы после введения ДНР-P^{32}, выделенной из печени (по Р. Е. Либинзон и др., 1963). Слева — контроль; справа — облученные ткани; по оси абсцисс — время после облучения в часах, по оси ординат — удельная активность ДНК-P^{32}, выделенной из печени (по Р. Е. Лабинзон и др., 1963). Слева — контроль, справа — облученные ткани; по оси абсцисс — время после облучения в часах, по оси ординат — удельная активность ДНК-P^{32} в % от введенного количества на 1 кг массы тела.

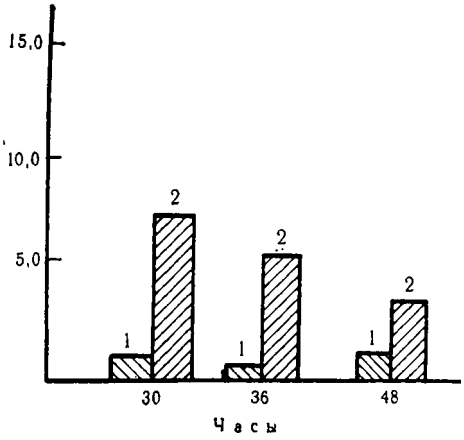


Рис. 29. Митотический индекс в клетках костного мозга животных: *1* — не леченных и *2* — леченных экзогенной ДНК (по Р. Е. Либинзон и др., 1963). По оси абсцисс — время после облучения в часах, по оси ординат — число митозов на 1000 клеток.

способствует сохранению большего числа содержащих ядра клеток костного мозга, чем препарат из печени (рис. 29), повышая митотический индекс у этих животных по сравнению с контрольными в 2—10 раз. Это свидетельствует о том, что эффект экзогенных ДНК тесно связан с их органной специфичностью и зависит от степени полимерности препарата (Р. Е. Либинзон и др., 1963). Олиго- или мононуклеотиды в этом отношении менее эффективны (Becarevič e. a., 1960; Panjevač e. a., 1962).

Доказательством эффективности действия экзогенного материала как средства, способствующего регенерации пораженных радиацией функций клеток, являются эксперименты, в которых крысам сразу же после общего облучения рентгеновскими лучами в дозе 600 Р вводили внутрибрюшинно от 0,9 до 1,3 мг ДНК, экстрагированной из половых желез. Оказалось, что это в значительной степени сохраняет репродуктивные способности животных (Savkovič, 1963, 1964). Как видно из рис. 30, количество 8- и 17-дневных крыс, сохранивших способность к оплодотворению после обработки их ДНК было выше, чем в группе нелеченых животных (51 и 14% соответственно — 8-дневные, 79 и 25% соответственно — 17-дневные). У крыс, леченных ДНК, поло-

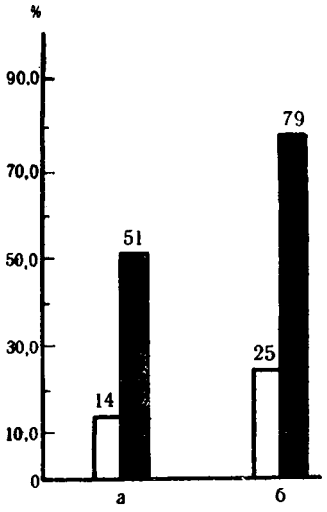


Рис. 30. Влияние тотального облучения и гомологичной РНК из яичка на репродуктивную способность крыс:

а — 8-дневных, *б* — 17-дневных; белые столбики — контроль, черные — опыт. По оси ординат — сохранение репродукционных способностей в % (по Savkovic, 1964).

вые органы повреждались в значительно меньшей степени, чем в контроле, а сперматогенез у леченых животных сохранялся на протяжении 5 мес после облучения, в то время как в контроле он угасал очень рано.

Было установлено, что введение животным с острой лучевой болезнью по 940—1300 мг ДНК в течение первых 48 ч увеличивает выживаемость 8-дневных крыс от 8±2,3 до 75±7% и 17-дневных — от 37±3,4 до 83%. В опытах на мышах также наблюдалось увеличение выживаемости от 60±7,3 до 95±4% и от 12±9 до 76±3% при ведении 1500 мг ДНК в течение того же периода лучевой болезни.

Эти опыты свидетельствуют о том, что нативная ДНК, экстрагированная из яичка, является эффективным репарирующим соединением, которое способствует сохранению нормального морфолого-цитологического и функционального состояния репродуктивных органов экспериментальных животных, облученных в период полового созревания. Было также установлено, что денатурированная ДНК не обладает лечебным действием, а ДНК, вводимая в водном растворе, менее эффективна, чем в неводных растворителях.

Детальное исследование влияния препаратов ДНК на метаболизм РНК в печени и кишечнике после облучения было проведено Becarevič (1962). Автор установил, что высокополимерная нативная ДНК из печени, введенная сразу же после облучения, влияла на включение меченного C^{14} муравьинокислого натрия в пурины и пиримидины РНК и ДНК. В течение первых четырех дней после облучения включение метки в пурины РНК увеличивалось по сравнению с контролем (облученными, но нелеченными). На 9-й день после облучения и ле-

чения включение меченого предшественника в пурины РНК печени и кишечника практически нормализовалось. Коммерческие препараты ДНК, РНК и их нуклеотиды благоприятного влияния на процессы нуклеинового метаболизма не оказывали. Изучение влияния гомологичной ДНК на метаболизм РНК различных субклеточных фракций показало (табл. 42), что введение экзогенной ДНК (4,6 мг) сразу после облучения крыс в дозе 850 Р восстанавливает состав некоторых фракций уже через 20 ч после облучения.

Таблица 42

Влияние гомологичной ДНК на метаболизм печеночных фракций РНК облученных крыс (Becarevic, 1962)

Фракции РНК	Время исследования	Состав мол %				Отношение	
		А	Г	Ц	У	пурины / пиримидины	6-амино / 6-оксо
Ядерная РНК	До облучения	18,1	39,9	25,1	23,6	1,06	0,76
	4 ч	21,6	31,4	22,8	25,0	1,11	0,80
	20 ч	15,3	34,0	16,4	34,4	1,01	0,46
	20 ч+ДНК	20,5	33,0	24,4	21,0	1,18	0,85
Цитоплазматическая РНК надосадочной жидкости (98 0000 g)	До облучения	18,6	33,8	26,8	15,9	1,09	0,83
	4 ч	18,5	33,4	26,4	16,1	1,08	0,81
	4 ч	18,4	33,5	26,9	16,4	1,08	0,84
	20 ч	2 ,5	31,8	27,0	16,0	1,10	1,09
	20 ч+ДНК	19,5	30,6	27,4	17,0	0,99	0,88
Суммарная РНК фракции микросом 98 000 g нерастворимой в 0,14 М NaCl)	До облучения	18,2	34,3	28,6	18,1	1,11	0,88
	20 ч	18,2	33,4	3 ,0	18,6	1,06	0,93
		18,4	34,2	28,8	18,8	1,10	0,85
Цитоплазматическая РНК части осадка 98 000 g (растворимой в 0,14 М NaCl)	До облучения	18,1	33,3	26,4	20,6	1,06	0,80
	4 ч	19,3	33,4	26,7	18,6	1,09	0,83
	4 ч	19,6	33,3	26,0	19,3	1,11	0,83
	20 ч	19,4	34,2	26,3	17,2	1,17	0,86
	20 ч+ДНК	19,9	31,6	27,9	19,4	1,05	0,91

Как видно из данных табл. 42, уже через 4 ч после облучения происходит изменение нуклеотидного состава РНК во фракциях ядерной и цитоплазматической РНК (микросомальной), вследствие увеличения количества

аденина и урацила во фракции ядерной РНК, а также повышении содержания аденина и небольшого уменьшения урацила, части осадка 98 000 g цитоплазматической РНК, растворимого в 0,14 M NaCl. Заметных изменений нуклеотидного состава других фракций клеточной РНК в это время еще не наблюдается. Более отчетливо изменения в составе оснований субклеточных фракций РНК выражены через 20 ч после облучения. Во фракции ядреной РНК значительно уменьшается относительное содержание аденина и цитозина и резко увеличивается количество урацила, тогда как во фракциях цитоплазматической РНК (осадка 98 000 g), надосадочной жидкости отмечается повышение относительного содержания аденина (Petrovič e. a., 1962). Введение 4,6 мг нативной ДНК весьма быстро нормализует нуклеотидный состав ядерных и цитоплазматических РНК. Как видно из данных табл. 43, удельная радиоактивность урацила и цитозина в составе РНК к 20 ч после облучения значительно приближается к контрольному уровню.

Таблица 43

Удельная радиоактивность пиримидинов в РНК субклеточных фракций печени крысы после тотального облучения (850 Р) (по Petrvic, 1962)

Время после облучения	Нуклеотиды	Суммарная РНК части осадка (9800g в 0,14 м NaCl)	Цитоплазмотическая РНК			Ядерная РНК		
			фракции наиболее тяжелых рибосом	части осадка (9800g в 0,14 м NaCl)	надосадочной жидкости (9800g)	экстрагированные 0,14 NaCl	экстрагированные 10% NaCl	нерастворимая фракция
Контроль	Ц	2520	2520	4740	3330	22500	18600	30000
	У	5340	5410	10500	6180	41600	32500	40000
	У/Ц	2,12	2,15	2,22	1,86	1,85	1,75	1,4
Через 20 ч.	Ц	534	462	1370	937	7910	—	—
	У	2140	1820	6400	3920	29200	—	—
	У/Ц	4,01	3,94	4,67	4,03	3,70	—	—
Через 20 ч. +ДНК	Ц	1190	1280	3600	2560	12700	8440	12700
	У	2920	3280	7250	4680	23300	13050	16800
	У/Ц	2,45	2,56	2,02	1,83	—	—	—

Примечание: гомологичный препарат ДНК введен крысам однократно сразу после облучения в дозе 5 мг.

Экзогенная ДНК оказывает защитный эффект не только при рентгеновском и γ-облучениях организма, но

и при воздействии на него быстрыми нейтронами. Опыты на дрожжевых клетках показывают, что обработка их экзогенным биополимерным материалом улучшает регенерационные свойства клеток только при определенных дозировках ДНК (табл. 44).

Таблица 44

Влияние экзогенной ДНК, выделенной из микробных клеток, на регенерацию дрожжевых колоний, облученных быстрыми нейтронами (в α Д-50—70%) (Е. Е. Чеботарев и др., 1969)

Вид эксперимента	Контроль (необлученные)	Контроль (облученные)	Облученные в растворе ДНК	Защита, %	Концентрация ДНК на клетку, мкг
Полимерная ДНК (высокие концентрации)	758	471	431	0	$1{,}8 \cdot 10^{-7}$
Полимерная ДНК (низкие концентрации)	509	250	403	79	$1{,}1 \cdot 10^{-7}$
Температурный гидролизат ДНК	482	214	390	81	—
Ферментативный гидролизат ДНК	666	303	526	79	—
Кислотный гидролизат ДНК	630	299	285	0	—

Гидролизаты ДНК, содержащие соединения типа олиго- или мононуклеотидов, также оказались эффективными, и лишь деградация препарата до азотистых оснований под влиянием сильных кислот полностью подавляет восстановительное действие ДНК.

При облучении животных быстрыми нейтронами при αД=50—70% эффект экзогенных ДНК был несколько ниже, чем в опытах in vitro, причем более активно действовала гомологичная ДНК (табл. 45).

Как видно из данных табл. 45, введение гетерологичной ДНК, как до, так и после облучения, оказывало значительно менее выраженный эффект, чем гомологичные биомакромолекулы.

При сравнении результатов опытов in vivo и in vitro можно отметить, что более низкоорганизованные организмы можно защитить от облучения различными ДНК, в том числе и межвидовыми. Однако в литературе в настоящее время отсутствуют точные сравнительные данные о действии гетеро-, гомо- и видоспецифичных нуклеиновых кислот или их производных как радиозащитных средств. Показано, например, что клеточно-свобод-

Таблица 45

Радиозащитное влияние различных видов ДНК на выживаемость крыс, облученных быстрыми нейтронами (Е. Е. Чеботарев и др., 1969)

Препарат	Количество животных		Выживаемость, %
	общее	выживших	
Контроль	70	16	23
ДНК из зобной железы теленка[1]			
до облучения[1]	37	11	29
после облучения	45	14	34
ДНК из слизистой тонкого кишечника крыс после облучения	20	13	65
ДНК из печени крыс после облучения	20	12	60
Контроль	20	9	45

* Гетерологичная ДНК из зобной железы теленка была частично деградирована под влиянием тепла.

ные солевые экстракты селезенки мышей не способны защитить морских свинок от действия облучения (Ellinger, 1966), т. е. селезеночный фактор является видоспецифичным. В такие солевые экстракты могут попадать рибонуклеотиды, РНК или низкомолекулярные белки, которые могут оказывать действие.

Эксперименты с Salmonella thyphimurium показали, что эти клетки могут быть защищены от облучения в дозе 12 000 Р с помощью препаратов гомологичных ДНК или РНК, выделенных из необлученных сальмонелл. Гетерологичные нуклеиновые кислоты в этом случае оказались не эффективными. С другой стороны, в некоторых экспериментах наблюдали радиозащитный эффект очищенного от белка экстракта селезенки теленка при тотальном облучении мышей (Goldfeder e. a., 1957). Дрожжевые клетки после облучения хорошо регенерируют после их обработки производными (дериватами) нуклеиновых кислот и витамина B_{12}.

Эти факты свидетельствуют о том, что радиорезистентность животных также может быть повышена с помощью препаратов полимерных нуклеиновых кислот или их аналогов.

Радиационное повреждение дрожжевых клеток с успехом предупреждалось с помощью гетерологичных эк-

зогенных ДНК, экстрагированных из микробных клеток. В случае лучевого поражения высокоорганизованных животных эффективными оказываются в основном гомологичные препараты из тканей млекопитающих, поскольку у этих животных уже существуют контролирующие системы мембран клетки, регулирующие проникновение ДНК того или иного вида животных. Все же анализ литературных данных не дает пока однозначного ответа на поставленный выше вопрос.

Очевидно, что если имеется возможность такого мембранного контроля в нормально метаболизирующих клетках, и они способны «узнавать» родственные макромолекулы, то эти способности клеток могут оказаться нарушенными после облучения — клетки начинают поглощать гетерологические экзогенные ДНК.

Было показано, что если мышей облучить в дозе 600 Р, то выживает всего 4% животных. Введение им. ДНК, экстрагированных из печени, почек, селезенки, вилочковой железы или семенников крыс, может повышать выживаемость до 54—37%.

Полагают, что объяснить такое защитное действие препаратов ДНК, экстрагированных из органов крыс, на организации облученных мышей можно тем, что такие гетерологичные ДНК более легко, чем в норме, проникают в клетку и замещают в ней собственную ДНК, поврежденную ионизирующим излучением (Savković, 1966).

Другие исследования по изучению влияния препаратов нуклеиновых кислот на выживаемость мышей, облученных в дозах 590—810 Р, показывают, что внутрибрюшное введение 2—5 мг как гомологичных, так и гетерологичных нуклеиновых кислот, выделенных из печени крыс и дрожжей, значительно повышало выживаемость облученных животных, если их вводили за 5—180 мин до облучения, либо через 3—24 ч после облучения. Наиболее активными были препараты, в которых сохранились нативная структура макромолекул (Ebel e. a., 1969). Таким образом, результаты указанных выше исследований свидетельствуют также о противолучевой активности межвидовых препаратов нуклеиновых кислот.

Вместе с тем в опытах Panjevač с сотрудниками (1958) гетерологичные препараты нуклеиновых кислот оказались совершенно не эффективными. Например, ДНК, выделенная из печени, селезенки и яичка кро-

лика и введенная облученным крысам (800 Р), не оказывает никакого эффекта. Все животные к 30-му дню после облучения погибли.

Такие противоречивые данные о действии экзогенных межвидовых нуклеиновых кислот во многом остаются не ясными и требуют специальных исследований. Возможно, что, кроме органной специфичности, связанной со структурно-химическими особенностями полимерной макромолекулы, в молекулу экзогенных нуклеиновых кислот входят некоторые примеси (например, прочно связанные белки), которые обусловливают наблюдаемое выше отличие в их действии. Эти данные могут найти некоторое объяснение в свете гипотезы Жакоба: клетки способны «узнавать» только свои внутриорганные биомакромолекулы, благодаря специфическому взаимодействию белка и гипотетического репрессора. Хотя ряд положений этой гипотезы во многом носит спекулятивный характер, однако они могут оказаться полезными для дальнейшей экспериментальной разработки этого важного и интересного вопроса.

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ КОМБИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПОЛИМЕРНЫХ РНК И ДНК

Хорошим защитным действием на ткани облученных крыс обладают комбинированные препараты полимерных РНК и ДНК, выделенных из селезенки (табл. 46).

Из данных табл. 46 видно, что наиболее эффективным оказалось сочетанное применение препаратов РНК и ДНК из селезенки, рибонуклеопротеиды из этой же ткани и тимуса не оказывали защитного действия. Введение только одной РНК из селезенки обеспечивало к 30-му дню выживаемость 40% животных, в то время как контрольные крысы погибали уже к 14-му дню.

Введение животным нуклеиновых кислот способствовало не только быстрой регенерации элементов костного мозга, но и других тканей, о чем свидетельствует динамика массы тела. Как видно из рис. 31, введение РНК и ДНК[1] из селезенки способствует более быстрой нормализации массы тела, чем другие препараты.

При более тяжелых формах лучевой болезни эффективными оказываются препараты нуклеиновых кислот, экстрагированных как из селезенки, так и печени. При

[1] Контроль — введение 0,85% раствора NaCl.

Таблица 46

Влияние изологичных нуклеиновых кислот на выживаемость крыс (облучение 700 Р) (Panjevac e. a., 1958)

Вид препарата	Доза, мг	Количество животных		Выживаемость, %
		общее	выживших к 30-му дню	
Селезеночный рибонуклеопротеид	10,3	10	1	10
Контроль	—	10	0	0
Селезеночная ДНК	0,38	8	2	25
Контроль ДНК из тимуса	—	8	0	0
	0,82	5	1	20
Контроль РНК из селезенки	—	5	0	0
	2,39	10	4	40
Контроль РНК из селезенки в сочетании с ДНК	—	10	0	0
	2,3±0,7	10	5	50
Контроль		10	1	10

более высоких энергиях облучения нуклеиновые кислоты также в значительной мере смягчают действие ради-

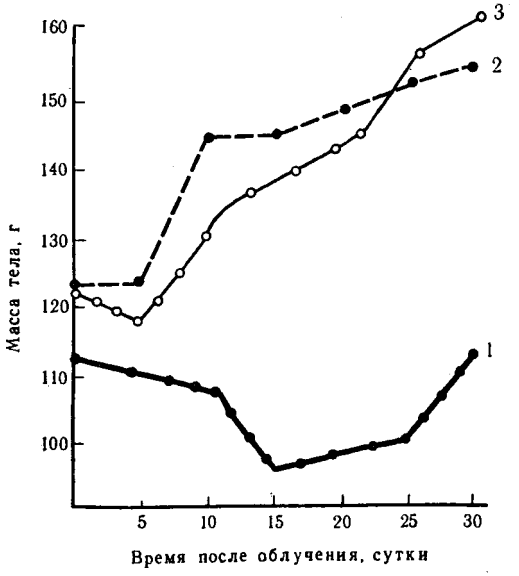


Рис. 31. Масса тела животных.

1 — облученных в дозе 600 Р; *2* — после введения РНК из селезенки; *3* — после комбинированного введения ДНК и РНК из селезенки (по Panjeva e. a.)

ации, способствуя регенерации пораженных органов (табл. 47).

Таблица 47

Влияние изологичных нуклеиновых кислот на выживаемость облученных крыс (800 Р)

Вид препарата	Доза	Общее число животных	Число выживших животных		
			на 30-й день	на 60-й день	на 90-й день
ДНК из печени	11 мг	10	6	6	6
Контроль [1]	3,5 мл	10	1	1	1
ДНК из печени	12,4 мг	8	4	4	—
Контроль	2 мл	10	1	1	—
РНК из печени	47,4 мг	10	2	2	2
Контроль	3,5 мл	10	1	1	1
РНК из печени	40,7 мг	10	7	7	—
Контроль	2 мл	10	1	1	—
РНК из селезенки	3,8 мг	10	2	2	2
Контроль	3,5 мл	10	1	1	1
ДНК из селезенки	14,2 мг	10	3	3	—
Контроль	2 мл	10	1	1	—
РНК из селезенки	5,4 мг	10	2	2	2
Контроль	2 мл	10	1	1	1
РНК из селезенки	12,6 мг	5	2	2	—
Контроль	2 мл	10	1	1	—
Селезеночные РНК+ДНК	3,8 мг 4,9 мг	10	2	2	2
Контроль	2 мл	10	1	1	1
ДНК из яичка	4.9 мг	7	0	—	—
Контроль	2 мл	10	1	—	—

[1] Контроль — введение 0,85% NaCl.

В этих опытах наиболее выраженный защитный эффект оказывала нативная ДНК, экстрагированная из печени. Аналогичное действие оказывала и РНК, выделенная из печени, однако ее необходимо было вводить в гораздо больших дозах (Panjevač e. a., 1958). При тех же условиях селезеночная ДНК и РНК, как индивидуально, так и в смеси, оказывали менее выраженное действие.

При облучении животных в дозе 850 Р, являющейся абсолютно летальной для крыс, нуклеиновые кислоты оказываются мало эффективными. Это связано главным

образом с развитием у животных необратимого, резко выраженного кишечного синдрома, геморрагии и других расстройств внутренних органов (табл. 48). Для лечения были использованы высокие дозировки нуклеиновых кислот. Не исключено, что сами по себе такие высокие дозировки препаратов могли оказаться токсичными. Отсутствие данных о влиянии более низких дозировок нуклеиновых кислот делает невозможным составить окончательное мнение по этому вопросу (тем более что воспроизведение подобных опытов без облучения показывает довольно высокую токсичность нуклеиновых кислот при их внутрибрюшном либо внутривенном введении).

Таблица 48

Влияние изологичных нуклеиновых кислот на выживаемость крыс после облучения

Вид препарата	Доза, мг	Общее количество животных	Количество выживших животных		
			на 30-й день	на 60-й день	на 90-й день
ДНК из печени	18,3	10	1/10	1/10	1/10
РНК » »	43,3	8	1/8	1/8	1/8
ДНК из селезенки	18,4	8	1/8	1/8	1/8
РНК » »	14,4	5	2/5	1/5	1/5

В группе нелеченых животных, которым вводили 4 мл физиологического раствора, наблюдалась 100% гибель уже к 17-му дню. Как видно, действие нуклеиновых кислот, выделенных из печени и селезенки, примерно одинаковое, обеспечивало до 17% выживаемости и предотвращало уменьшение массы тела животных на протяжении 3 мес наблюдений. У подопытных животных масса тела восстанавливалась к 10—20-му дню, а у контрольных — к 30-му дню. Доказательством более успешно протекающих восстановительных процессов в организме леченых животных при их облучении является быстрое увеличение количества ДНК и РНК в их селезенке (табл. 49).

Вопрос о том, оказывают ли противолучевой эффект только полимерные гомологичные РНК, остается открытым. Большинство исследователей склоняются к тому,

Таблица 49

Содержание ДНК и РНК в селезенке крыс после введения экзогенных нуклеиновых кислот и облучения в дозе 700 Р

Вид препарата	Содержание нуклеиновых кислот на 10 мг сухой массы селезенки (к 30-му дню), мг	
	ДНК	РНК
ДНК из селезенки	111,5	1120
Контроль	72,5	486
ДНК из вилочковой железы	142	986
Контроль	56	358
РНК в сочетании с ДНК из селезенки	110	857
Контроль	58	303
Ядра костного мозга крыс	106,3	1073
Контроль	24	120

Примечание: Контроль — 0,84% раствор NaCl.

что для реализации такого эффекта необходимы именно полимерные и тканеспецифические экзогенные РНК. Вместе с тем можно продемонстрировать результаты опытов, которые свидетельствуют о другом — возможность противолучевой защиты при помощи неспецифических и неполимерных нуклеиновых кислот.

Внутрибрюшинное введение крысам 80—100 мг натриевой соли дрожжевой РНК после облучения γ-лучами в дозе 450—500 Р оказывало восстановительный и защитный эффект, что выражалось в повышении выживаемости от 20 до 50% животных к 30-му дню после облучения. Если вводить РНК в дозе 100 мг перед облучением, то выживаемость составляла около 40% (табл. 50), т. е. эффективность экзогенной РНК проявлялась как перед, так и после облучения.

Из данных табл. 50 также видно, что дрожжевые РНК оказываются не эффективными уже при облучении крыс в дозе 550 Р. При щелочном гидролизе дрожжевых РНК до олиго- и мононуклеотидов эффективность вводимого препарата не теряется, что свидетельствует о возможной активности олиго- и мононуклеотидов (табл. 51). Следовательно, для обеспечения защитного эффекта сохранность полимерной структуры РНК, по данным Maisin с сотрудниками, не обязательна.

Таблица 50

Влияние дрожжевой РНК на смертность крыс

Вид эксперимента	Доза облучения, Р	Количество крыс	Смертность к 30-му дню,
Контроль (2 мл 0,85% раствора NaCl)	550	20	120
	500	184	81,5
	45)	62	69,4
	400	40	17,5
Инъекции РНК после 15-минутного облучения	550	44	90,0[1]
	(0)	68	51,5[1]
	450	48	20,0[1]
Инъекции РНК (перед 15-минутным облучением) го облучения	500	60	63,3[1]
Инъекции РНК после 15-минутного облучения	500	40	50,0[2]

Примечание. Препарат дрожжевой РНК содержал 72% чистой РНК, 2% ДНК и примеси белка.
[1] Вводили дозу 100 мг натриевой соли дрожжевой РНК в 2 мл раствора.
[2] 80 мг натриевой соли дрожжевой РНК в 2 мл раствора.

Таблица 51

Смертность крыс, облученных в дозе 500 Р, после введения 2 мл щелочного гидролизата РНК (Maisin e. a., 1960)

Состав гидролизата в %	Время введения	Общее число крыс	Смертность к 30-му дню, %
Олигонуклеотиды — 70 Мононуклеотиды — 28 РНК — 0	После 15 мин. облучения	40	30
То же	За 15 мин до облучения	40	45
Олигонуклеотиды — 5,7 Мононуклеотиды — 87,3	После 15 мин облучения	40	40
Контроль		184	91,5

Было установлено, что инъекции крысам с лучевой болезнью и переломом кости экзогенной РНК, экстрагированной из костной ткани крысят, в суммарной дозе 4,0 мг (по 1 мг через сутки) значительно улучшает общее состояние животных и способствуют нормализации некоторых физиологических процессов (А. Ш. Абайшвили, 1971). Продукты щелочного и ферментативного

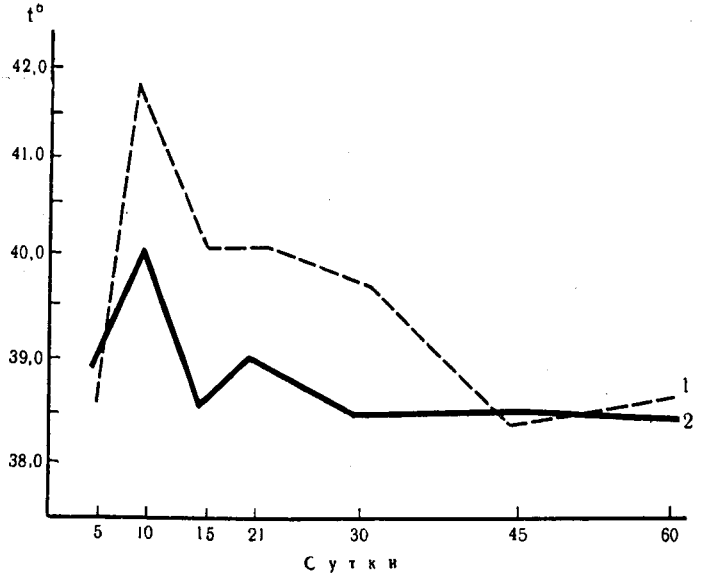


Рис. 32. Изменение температуры тела крыс с комбинированной травмой:
1 — не леченных РНК; *2* — леченных РНК (по А. Ш. Абайшвили, 1971).

гидролизов полимерной РНК при внутримышечном введении оказались не эффективными для лечения животных с комбинированной травмой.

Хотя в группе животных, которым вводили препарат полимерной РНК, период первичных реакций лучевой болезни протекал так же, как и у нелеченых животных, однако в разгар лучевой болезни животные, получавшие препарат РНК, были более активны, их масса и температура тела быстрее нормализовались (рис. 32).

Кроме того, под влиянием такого лечения улучшался качественный и количественный состав периферической крови, т. е. экзогенная РНК оказывала стимулирующее влияние на кроветворную систему. Такое действие препарата суммарной экзогенной РНК объясняется присутствием в нем специфических РНК. В этом случае в гомогенат попадают клетки костного мозга и лимфоидной ткани, из которых экстрагируются соответствующие гомологичные индукторы, которые стимулируют синтез гемоглобина и белков в «клетках-мишенях». Возмож-

но, что они наводят биосинтез белков именно в оставшихся здоровыми клетках костного мозга, либо вызывают в них явления дифференцировки (А. М. Белоус, 1968). Не исключается, что часть введенной РНК, подвергаясь деградации до низкомолекулярных фрагментов, используется как фонд свободных предшественников и тем самым также оказывает анаболический эффект.

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТИ У ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ РНК ПРИ КОМБИНИРОВАННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ

Несмотря на обширные литературные данные о действии радиации на заживление переломов костей, на обмен некоторых ферментов (В. П. Торбенко, 1967) и минеральных ингредиентов (В. А. Поляков, 1967), вопрос о динамике обмена в кости таких важных биополимеров, как нуклеиновые кислоты, при лучевой болезни остался не освещенным. Мало исследовались также обмен и содержание белковых комплексов регенерата кости при общем облучении организма. Между тем именно детальное исследование обмена этих компонентов кости на тканевом уровне и в особенности в клетке позволит изучить радиочувствительность костной ткани и характер обратимости радиационного поражения кости. Более того, изменение функционального состояния клеток регенерата кости в направлении стимуляции в них биосинтеза нуклеиновых кислот и белков облегчит течение лучевой болезни и будет способствовать репарации кости в месте перелома. Одним из эффективных средств, ускоряющих репарацию костной ткани, оказалась экзогенная РНК.

Экспериментально-теоретическим обоснованием проведения исследований послужили представления о том, что структурами, наиболее чувствительными к действию свободных радикалов, возникающих после тотального облучения, является ДНК хромосом клеток. В результате облучения в клетках нарушается биосинтез нуклеиновых кислот и, следовательно, белков, а также процессы биосинтеза и РНК и ресинтеза фонда свободных предшественников. Это происходит главным образом из-за повышенной чувствительности РНК- и ДНК-поли-

меразных систем к облучению. Поэтому естественно, что поиски протекционных средств при лучевом воздействии привели к испытанию соединений нуклеинового характера или их предшественников (Н. В. Лучник, 1958; Panjevač, 1958; Kanazir e. a., 1959; Becarevič e. a., 1960; Л. В. Полежаев и др., 1961; В. Е. Либензон и др., 1963).

Показано, что использование нуклеиновых кислот при лучевой болезни повышает выживаемость животных и улучшает течение местных восстановительных процессов в ряде висцеральных органов (печень, селезенка, костный мозг).

В проведенных ранее исследованиях in vivo и in vitro было показано, что гомологичная экзогенная РНК в полимерном состоянии оказывает благоприятный эффект на репарацию кости (А. М. Белоус и Е. Я. Панков, 1966; А. М. Белоус, 1967, 1968; В. Г. Хицан и др., 1969, и др.). Было также отмечено, что нарушенные общефизиологические параметры у животных после травмы восстанавливались значительно быстрее. На основании данных различных экспериментов было сделано заключение, что экзогенная РНК стимулирует процесс регенерации кости за счет органоспецифической индукции биосинтеза специфических белков и нуклеиновых кислот в «клетках-мишенях» и является источником фонда предшественников, возникающих при гидролизе полимерной молекулы РНК. Все эти результаты создавали предпосылки к использованию экзогенной РНК в качестве протекционного и органотропного средства при лучевой болезни. С одной стороны, экзогенные полирибонуклеотидные «блоки» РНК оказывали общезащитный эффект за счет захвата (связывания) радиотоксинов, а с другой — органоспецифически стимулировали биосинтетические процессы в сохранивших жизнеспособность остеогенных клетках зоны перелома. Таким образом, введение животным с лучевой болезнью экзогенной РНК предусматривало в конечном итоге более быструю консолидацию переломов костей после комбинированной травмы.

Костная ткань в отличие от других тканей характеризуется своеобразной реакцией на ионизирующее облучение. Сила этой реакции зависит от дозы облучения и времени его экспозиции, возраста животного и характера повреждения. Реакция характеризуется медлен-

ным скрытым течением патологического процесса. Поэтому в отдельных случаях можно наблюдать не сразу, а в отдаленные сроки после облучения самые разнообразные радиобиологические картины лучевого поражения скелета, особенно при репарации[1].

ЗАЖИВЛЕНИЕ ПЕРЕЛОМА КОСТИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ И ВВЕДЕНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ РНК

Биохимическая картина лучевого поражения чрезвычайно сложна. В острый период лучевой болезни трудно найти функцию в организме, не претерпевшую изменений. В реакцию организма на лучевое поражение уже на самых ранних этапах его развития включаются разнообразные регуляторные механизмы и через несколько минут после облучения можно уже обнаружить цитохимические и функциональные изменения клеток. Нарушаются основные виды обмена: белковый, углеводный, липидный, нуклеиновый.

Признаками нарушения белкового обмена в организме животных, подвергнутых действию общего облучения, являются изменения как белкового состава сыворотки крови — уменьшение концентрации альбумина и γ-глобулинов и увеличение концентрации α- и β-глобулинов, так и биосинтеза белков в тканях, о чем можно судить по включению C^{14}-аминокислот и S^{35} метионина в белки цитоплазмы ядер клетки.

Нарушения биосинтеза нуклеиновых кислот и белков под действием ионизирующей радиации и образования несвойственных организму продуктов обмена обсуждались неоднократно (Т. А. Федорова, 1960; Е. Ф. Романцев и др., 1966; А. М. Кузин, 1970). Было установлено, что синтез ДНК в большинстве исследованных тканей более устойчив к действию ионизирующей радиации по сравнению с процессами клеточного деления. Результаты исследований этих процессов в костной ткани косвенно подтверждают, что при лучевой болезни бластема регенерата кости очень обеднена клетками, последние гипертрофированы. При этом изменяется скорость синтеза ферментов.

[1] Особенности действия ионизирующего облучения на регенерацию кости в экспериментальных условиях были воспроизведены в Центральном институте ортопедии и травматологии (В. А. Поляков, В. П. Торбенко и др., 1967).

При общем облучении рентгеновскими лучами крыс (600 Р) активность щелочной фосфатазы и амилазы регенерата кости снижается и проявляется на 10—14 сут позже, чем при заживлении перелома у необлученных животных (В. П. Торбенко, 1958, 1967). Рентгеноструктивный анализ костной ткани обследованных животных показал, что уже через 3 дня после облучения наступают изменения в структуре коллагена, появляются новые волокна с неустойчивыми размерами цепей, а через 2 нед отмечаются изменения и со стороны кристаллитов гидроксиаппатита (В. П. Поляков, 1967). Это подтвердилось и в исследованиях по изучению гликогена и ферментов углеводного обмена (амилаза, альдолаза, щелочная фосфатаза), играющих, как известно, большую роль в метаболических процессах обызвествления органической ограниченной матрицы кости.

При облучении крыс с переломом костей предплечья рентгеновскими лучами (500 Р) были выявлены определенные изменения в морфологическом субстрате регенерата кости и функциональных потенциях остеогенных клеток. Структурно-морфологические изменения в зоне повреждения костей предплечья у контрольных облученных животных и облученных животных, получавших препарат РНК, свидетельствуют о том, что регенерация у этих двух групп животных протекала по-разному.

Так, если рентгенологически перестройка концов фрагментов и периостальные напластования у леченых животных четко определялись уже к 15-м сут, то такие же изменения у контрольных животных наступали только к 21-м сут. На протяжении длительного периода времени (до 45-х сут) у контрольных животных наблюдалась неравномерность структуры регенерата с участками просветления, что свидетельствовало о наличии в его составе хондроидной гкани, в то время как у леченых животных с 30-х сут плотность регенерата приближалась к плотности костной ткани. По состоянию костной ткани контрольных выживших животных (начиная с 45-х суток) можно было подразделить на две группы, в которых: изменения структур свидетельствовали о восстановлении после повреждения; развивались изменения, типичные для формирования ложного сустава.

Рентгенологическим изменениям соответствовали морфологические и гистохимические. Хотя течение процесса регенерации у животных обеих групп не имело

резких различий, у контрольных крыс в значительно большем количестве отмечались некротические участки и участки кровоизлияний, у этих же животных более длительно в костномозговом канале определялся атрофичный жировой костный мозг, что свидетельствовало о подавлении кроветворной функции костного мозга. В связи с этим дифференцировка и перестройка структур в костной ткани контрольных животных происходили с запозданием на 2—3 нед по сравнению с леченными животными. Так, если на 15-е сут в контроле преобладала хондроидная ткань в регенерате, то в опыте (введение экзогенной РНК) мелкопетлистая перестройка тканей у животных после инъекций РНК наблюдалась к 21-м сут (рис. 33 а, б). В дальнейшем у животных, которым вводили 0,85% раствор NaCl до 45-х сут в межотломковой зоне определялись участки хондроидной ткани, к 60-м сут формирование кортикального слоя не отмечалось. Введение экзогенной РНК обеспечивало уже к 45 сут соединение фрагментов поврежденных костей зрелой костной тканью, в которой прослеживались уже первые признаки образования кортикального слоя пластинчатого характера (рис. 34 а, б).

Гистохимически через 2 нед после введения препарата РНК выявлялась более интенсивная метахромазия в хондроидных клетках, чем в контроле, что свидетельствовало о более быстром накоплении в зоне регенерации кислых форм мукопротеинов. В дальнейшем у этих животных быстрее происходила смена других форм различных мукопротеинов в регенерате кости (к 3-й нед например, интенсивность ШИК-реакции была значительно выше, чем в контроле).

Структурно-морфологические исследования, свидетельствуют о том, что под влиянием экзогенной гомологичной РНК происходит более быстрое образование дифференцированных остеогенных структур, смена различных форм мукопротеинов и их оссификация. Если проследить динамику количественного содержания специфических белков и нуклеиновых кислот регенерата кости, то можно убедиться в том, что хотя общая закономерность динамики процессов как у леченых, так и нелеченых животных сохраняется, препарат РНК в значительной мере интенсифицирует как темп накопления, так и биосинтез указанных выше ингредиентов органического матрикса регенерата.

Рис. 33. Развитие хондроидной и остеоидной тканей у крыс после комбинированной травмы на 21-е сут: а — леченных РНК;

Как видно из данных табл. 52, имеется статистически достоверная разница ($P<0,05$) в содержании РНК на 5, 10 и 15-е сут в регенерате кости облученных животных после инъекции экзогенного полимерного материала. Содержание РНК (по Schmidt-Thannhauser, 1945) в обычной кости крыс $19,2 \pm 2,6$ мг%.

Исследование биосинтеза РНК в регенерате кости при помощи радиоактивной метки четко показало, что экзогенная РНК стимулирует процесс синтеза рибонуклеиновых кислот при обычном переломе. Вместе с тем у животных после комбинированной травмы и не леченых эк-

Рис. 33. б — не леченных РНК.

зогенной РНК, а также у животных после обычного перелома без облучения интенсивность биосинтеза была одинакова (P=0,05). Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что внешнее облучение в дозе 500 Р не вызывает существенных изменений в биосинтезе суммарных рибонуклеиновых кислот регенерата кости (табл. 53).

Хотя эти данные и указывают на радиорезистентность обмена рибонуклеиновых кислот регенерата кости к облучению в указанной дозировке, однако они оставляют открытыми вопросы, касающиеся биохимического

Рис. 34. Развитие мелкопетлистой сети костной ткани крыс после комбинированной травмы в регенерате на 45-е сут: а — леченных РНК;

состояния других метаболических систем, более чувствительных к рентгеновскому облучению (ферментных систем ядра и цитоплазмы, митохондрий и т. д.).

По литературным данным, процесс новообразования РНК является более радиорезистентным, чем процесс биосинтеза макромолекул ДНК (Е. В. Дмитриева, 1959, 1962; Е. Ф. Романцев и др., 1968, и др.). Это было выявлено при помощи включения радиоактивной метки в ДНК при лучевой болезни; в период разгара включе-

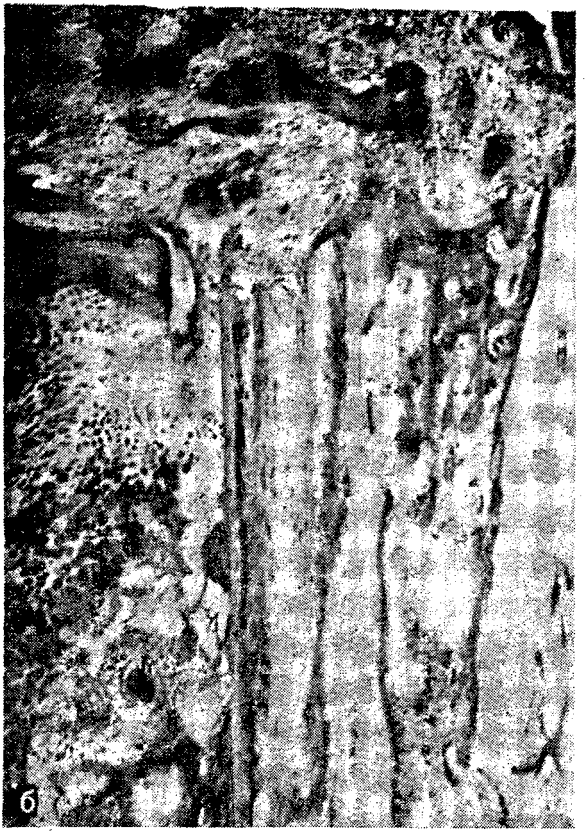


Рис. 34. б — не леченных РНК.

ние радиоактивных предшественников заметно подавлялось. В этих экспериментах уровень ДНК в контроле был в течение 2 нед. более низким, чем в опыте (содержание ДНК в костях крыс в норме 7,3±0,52 мг%), а затем отмечалось повышение количества ДНК в клетках регенерата, особенно у крыс, получавших инъекции РНК (табл. 54).

Полученные данные указывают на некоторое подавление процессов пролиферации клеток в зоне перелома, вызванное облучением животных, и стимуляцию этих процессов с помощью экзогенной РНК.

Таблица 52

Содержание РНК в регенерате кости в различные сроки после облучения (мг% Р)

Сутки после травмы	Опыт (инъекции эзогенной РНК), M±m	Контроль (инъекции 0,85% раствора NaCl), M±m
5	75,5±2,2[1]	61,5±3,5[1]
10	65,8∓2,8[1]	41,1±2,3[1]
15	32,3±4,4[1]	20,7±3,1[1]
21	22,8±1,2	22,4±1,3
30	15,4±0,9	18,3±1,3
45	39,8±5,2	39,6±1,2
60	20,4±1,1	18,0±0,8

[1] Статистически достоверная разница $P<0,05$.

Таблица 53

Включение C^{14}-оротовой кислоты в суммарные РНК клеток регенерата (имп. мин/мг РНК)

Сутки после травмы	Комбинированная травма+инъекции РНК, M±m	Комбинированная травма без введения РНК, M±m	Переломы кости без облучения
8	10266±2241	6055±826	6282±738
12	8319±2075	6025±283	6816±682
15	3513±262	6803±386	6600±603

Примечание. C^{14}-оротовую кислоту вводили крысам внутрибрюшинно в количестве 15 мкКи на 100 г массы тела за 6 ч до забоя. Материал после забоя объединяли и фракционировали РНК и ДНК по Schmidt—Thanhhouser (1945).

Таблица 54

Содержание ДНК в регенерате кости в различные сроки после облучения (мг% Р)

Сутки после облучения	Опыт (инъекции РНК), M∓m	Контроль (инъекции 0,85% раствора NaCl, M±m),
5	11,3±2,7	10,2±1,8
10	8,4±0,5[1]	6,15±0,8[1]
15	18,7±1,3[1]	11,4±1,2[1]
21	20,3±0,2[1]	14,8±1,5[1]
30	16,1±1,9	17,6±4,3
45	19,3±3,1	17,8±1,1
60	8,8±1,5	11,4±0,9

[1] Статистически значимое различие ($P\angle 0,05$). Определение количественного содержания РНК и ДНК в регенерате кости вели по методу Schmidt—Thannhauser (1945) с конечным определением их концентрации по А. С. Спирину (1958).

Изучение распределения радиоактивности в ДНК показывает, что инъекции экзогенной РНК способствуют стимуляции синтеза ДНК в организме облученных животных (табл. 55).

Таблица 55

Включение C^{14}-оротовой кислоты в суммарные ДНК клеток регенерата (имп. мин/мг ДНК)

Сутки после травмы	Комбинированная травма+инъекции РНК, M±m	Комбинированная травма без введения РНК, M±m	Переломы кости без облучения, M±m
7	78±5,42	34±2,83	39±3,86
12	40±10,52	20±7,48	31±8,26
15	20±7,31	31±2,62	35±5,44

Примечание. P<0,05 только на самых ранних этапах процесса регенерации.

Обращает внимание то обстоятельство, что облучение в дозе 500 Р не вызывает каких-либо существенных сдвигов в нуклеиновом обмене регенерата кости. Поскольку и скорость биосинтеза ДНК свидетельствует о ее редупликации, то по изменениям в этих процессах можно судить также и о скорости митозов клеточных элементов. Очевидно на ранних этапах лучевого поражения (500 Р) в костной ткани облученных животных с переломом кости не так уж резко снижается скорость митозов, как это наблюдается при облучении более высокими дозировками.

Инъекции экзогенной РНК оказывают некоторое влияние на митотическую активность клеток, подавленную облучением, повышая уровень биосинтеза ДНК на протяжении первой недели даже выше контроля. Это сопровождается также стимуляцией биосинтеза собственных рибонуклеиновых кислот клеток регенерата кости облученных животных, в результате чего в облученной клетке сохраняется способность к биосинтезу белков. Это можно очевидно объяснить тем, что сохранившиеся после облучения остеогенные клетки регенерата способны под влиянием экзогенного материала с большей скоростью и в большем количестве синтезировать молекулы РНК, чем это происходит в норме.

Следовательно, облучение в дозе 500 Р не вызывает в регенерате кости животных существенного подавления процессов пролиферации, и биосинтез валовых РНК при этом особенно не страдает, т. е. цитоплазматиче-

ские матрицы РНК, программирующие биосинтез белков в остеогенных клетках отличаются, очевидно, определенной радиорезистентностью к данной дозе.

Такая резистентность матриц РНК обеспечивает беспрерывность процесса биосинтеза белков регенерата кости. В регенерате кости животных, получавших инъекции РНК, наблюдается более высокий уровень оксипролина, что коррелирует с представлениями о влиянии экзогенной гомологичной РНК на стимуляцию биосинтеза собственных РНК клеток (А. М. Белоус, 1968), об устойчивости этого процесса при общем облучении.

Это подтверждалось при изучении распределения радиоактивной метки в суммарных белках регенерата кости различных групп животных (табл. 56). Из данных табл. 56 видно, что инъекции экзогенной гомологичной РНК стимулируют биосинтез белков регенерата кости так же, как РНК, только на ранних этапах формирования регенерата.

Таблица 56

Включение C^{14}-гидролизата белков хлореллы в суммарные белки костного регенерата (имп. мин/мг белка)

Сутки после травмы	Комбинированная травма+инъекции РНК, M±m	Комбинированная травма без введения РНК, M±m	Переломы кости без облучения, M±m
7	621±153	484±54	524±88
12	865±170	897±220	342±147
15	816±201	969±151	764±111

Примечание. C^{14}-гидролизат белков хлореллы 10 крысам вводили внутрибрюшинно по 15 мкКи за 3 ч до забоя. После объединения материал подвергали обработке по Siekevitz (1952).

Эти данные не дают ответа на вопросы, какие именно в структурном отношении белки синтезируются под влиянием РНК, способствует ли сохранению макромолекулярной структуры белков экзогенная РНК и т. д. По мнению В. А. Полякова, В. П. Горбенко и др. (1967), уже через 3 дня после облучения в дозе 600 Р можно выявить изменения в структуре коллагена. Рентгеноструктурный анализ показывает, что на волокнах коллагена с нормальными размерами ячеек накладываются какие-то новые, характеризующиеся неустойчивыми размерами цепей. Только к 40-му дню после облучения происходит некоторая стабилизация белковой матрицы кости, хотя еще по-прежнему выявляются нарушения в

структуре коллагена. Следовательно, можно предположить, что количественно биосинтез белков в остеогенных клетках нарушается в незначительной степени. Однако происходят какие-то последующие изменения синтезированного белка вне клетки (нарушается формирование третичной и четвертичной структуры и т. д.). Это может быть связано в первую очередь с изменением активности ферментов, катализирующих эти процессы и весьма чувствительных к облучению. Согласно Kolar с сотрудниками (1962) и Э. М. Гендлеру (1969), органическая основа костной ткани при облучении в высоких дозах повреждается. Это, в частности, выражается в том, что снижается включение S^{35} в матрицу на ранних этапах, а позже — Ca^{45} и P^{32} (А. Г. Земляной, 1956, и др.).

Исследования показывают, что валовое количество белково-полисахаридных комплексов в кости сохраняется, но меняется их соотношение: в регенерате кости происходит интенсивное и быстрое накопление кислых гликозаминогликанов, которые сохраняются в регенерате кости более длительный срок у тех животных, которым не вводили экзогенную РНК. Замещение этих соединений на нейтральные формы происходит в отдаленные сроки. Это свидетельствует, во-первых, о нарушениях в системах генерирующих макроэрги и предшественников нуклеиновых кислот, участвующих в сборке углеводных комплексов на уровне митохондрий, и, во-вторых, о подавлении транспорта ДНК тех матриц, которые программируют биосинтез белков, входящих в состав белково-полисахаридного комплекса.

При облучении в дозе 500 Р на ранних этапах заживления перелома в регенерате кости животных, не леченных препаратом РНК, количество аминосахаров было несколько выше, чем у животных после введения РНК ($P<0,05$), причем у этих животных преобладали кислые формы глюкозаминогликанов. О том, что накапливаются именно кислые формы гликозаминогликанов свидетельствовало и то, что у нелеченых животных наблюдалась временная задержка минерализации костного регенерата (эти явления были резче выражены у нелеченых жвотных). Как известно (Berger и Eger, 1965, и др.), кислые гликозаминогликаны адсорбируют главным образом такие катионы, как Ca^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+} и др., т. е. легко образуют с различными элементами комплек-

сы (Ondrecka, 1966). Эти соединения на ранних этапах регенерации как бы препятствуют каталитическому соединению Ca^{2+} и PO_4^{3-} при образовании первичных зародышевых кристаллов в процессе замены в регенерате кислых гликозаминогликанов на другие формы фосфорилированных гликозаминогликанов (нейтральных), которые способствуют появлению центров кристаллизации на коллагеновых фибриллах.

Процесс кристаллизации при общем облучении, как правило, сопровождается появлением дезориентированных кристаллов (вместе с кристалликами размером $0{,}2\times10^{-4}$ мм появляются кристаллики $0{,}2\times10^{-5}$ и $0{,}2\times10^{-6}$ мм). Это свидетельствует о нарушении равновесия процессов кристаллизации в костной ткани в результате облучения (В. А. Поляков и др., 1967). Изменения в процессах минерализации регенерата кости являются, очевидно, следствием нарушения экстрацеллюлярного обмена белков и гликозаминогликанов под влиянием облучения. В регенерате при этом начинают накапливаться в избытке микроэлементы. Например, накапливается алюминий, который, очевидно, замещает в кристаллической решетке кальций. При этом динамика нарушения такого остеотропного микроэлемента, как ванадий (Rygh, 1949, и др.), явно нарушается. Его количество в регенерате кости нелеченых животных весьма низкое. Количество ванадия в кости крыс в норме 1,38 мг% (на сухую массу). Микроэлементы определяли методом спектрального анализа на спектрографе ИСП-28 (А. М. Белоус, А. П. Скоблин, 1963) (табл. 57).

Таблица 57

Содержание ванадия в регенерате кости облученных животных, в миллиграмм-процентах на сухую массу

Сутки после перелома	Опыт—инъекции РНК, M±m	Контроль—инъекции 0,85% раствора NaCl, M±m
5	1,10±0,37	1,40±0,32
10	1,73±0,05	1,36±0,07[1]
15	2,78±0,13	1,59±0,20[1]
21	2,23±0,09	1,52±0,11[1]
30	1,81±0,62	1,70±0,09
45	2,02±0,31	1,82±0,52
60	1,41±0,61	1,73±0,47

[1] $P<0{,}05$.

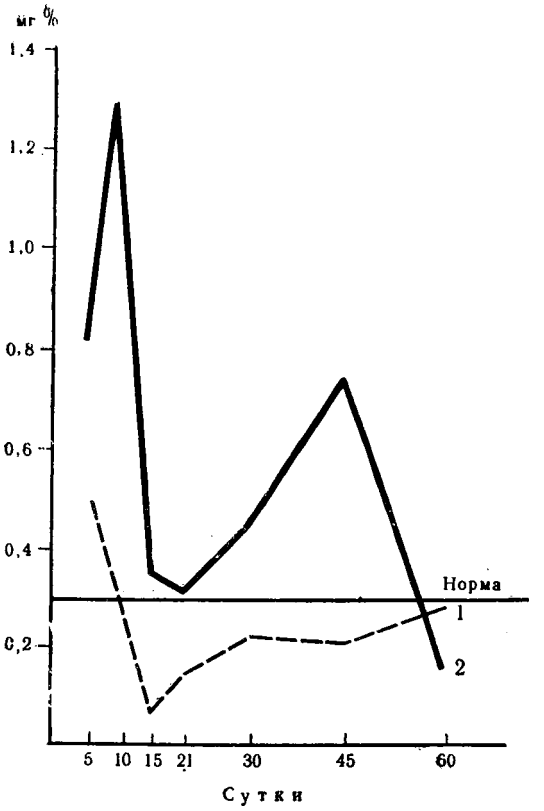


Рис. 35. Содержание меди в регенерате кости у животных после комбинированной травмы:
1 — облученных; *2* — контрольных

Как видно из данных табл. 57, инъекции экзогенной РНК способствуют нормализации динамики количественного содержания ванадия в регенерате кости. Экзогенный материал также нормализует обмен в регенерате кости и такого микроэлемента, как медь (рис. 35). У нелеченых животных уровень меди в регенерате кости был не только более низким, но и отличался характером распределения по срокам. Поскольку медь является микроэлементом, активирующим в кости активность ферментов цепи транспорта электронов в митохондриях.

Можно думать, что уменьшение количества этого микроэлемента в регенерате кости может быть связано со снижением активности ферментов.

Митохондрии являются весьма радиочувствительными системами в живой клетке. Наиболее существенным моментом лучевого поражения является потеря ими ряда ферментов. Уже при малых дозах облучения (50 рад) через 1 мин можно выявить резкое снижение содержания и активности каталазы в митохондриях и соответствующее повышение ее концентрации в клеточном соке. Добавление к облученным митохондриям цитохрома способствует быстрому нарастанию потребления ими кислорода и фосфора, не наблюдаемому у контрольных митохондрий. Это свидетельствует о потере митохондриями цитохромов (Maxwell e. a., 1953). После облучения крыс в дозе 700 Р через 2 ч в митохондриях селезенки резко возрастает цитохромный эффект — добавление цитохрома стимулирует потребление фосфора на 360%, а кислорода на 172% (Ван-Беккум, 1958). Облучение крыс в дозе 500 Р также вызывает какие-то сдвиги в системе этих ферментов. Медь влияет на активность и ряда других ферментных систем, например, цикла гликолиза и др. Возможность повреждения после облучения этих ферментов показана при исследовании некоторых ферментов, регулирующих обмен углеводов.

В. П. Торбенко (1967) показал, что при облучении крыс в дозе 600 Р, в регенерате кости активность таких ферментов, как амилазы, щелочной фосфатазы и в некоторых случаях альдолазы, значительно нарушается. По данным А. О. Войнара (1960), медь может в некоторых случаях неспецифически активировать эти ферменты и быть связанной с ними в обмене непосредственно. Из этого следует, что при облучении изменяется, очевидно, не только органическая основа костного регенерата, но и активность ряда ферментов, принимающих участие в минерализации кости.

Результаты исследований свидетельствуют о различной радиочувствительности биосинтетических процессов в остеогенных клетках. Важным является то, что после инъекции животным, облученным в дозе 500 Р, экзогенной гомологичной РНК значительно повышается жизнеспособность остеогенных клеток регенерата кости и более быстро восстанавливаются биосинтетические

процессы. Однако, как видно, процессы биосинтеза суммарных белков и нуклеиновых кислот регенерата кости при таких дозах облучения существенно не изменяются, хотя экзогенная РНК стимулирует эти процессы. Такая высокая приспособительная и компенсационная возможность остеогенных клеток является, очевидно, их отличительной чертой и по своему метаболическому профилю сближает эти клетки по характеру обмена РНК и ДНК при лучевой болезни с клетками печени. Это также подтверждается и тем, что характер обмена и количественного накопления белков органической основы кости особенно не изменяется у животных, облученных в дозе 500 Р. Однако, несмотря на сохранность общего валового содержания этих ингредиентов, вовсе не исключается возможность возникновения нарушений в их структуре, конфигурации, упаковке и т. д. Это, очевидно, может иметь место, поскольку в дальнейшем у животных, не леченных препаратами РНК, нарушается минерализация костного регенерата.

Совокупность полученных данных показывает, что препарат экзогенной гомологичной РНК является хорошим терапевтическим средством для стимуляции (и, возможно, защиты) процессов репарации при лучевой болезни костной ткани.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ РНК НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ТКАНЕЙ АКСОЛОТЛЯ ПРИ МЕСТНОМ И ОБЩЕМ РЕНТГЕНОВСКОМ ОБЛУЧЕНИИ

Местное облучение тканей и органов способствует развитию в них двух процессов: лучевого поражения и, как следствие, снижению способности к репаративной регенерации органов и тканей. В связи с этим возникло мнение, что местное лучевое повреждение обусловлено именно подавлением регенерационной способности облученных тканей (Л. В. Полежаев, 1959; Л. В. Полежаев и др., 1960; Г. С. Стрелин, 1960; А. Н. Студитский, 1961, и др.). Это повреждение может быть восстановлено путем использования различных биопрепаратов (гомогенаты тканей, ядра клеток, кислые белки, полимерные РНК и ДНК), способствующих восстановлению функции облученной клетки (Л. В. Полежаев, 1968).

Значительный интерес представляют опыты Л. В. По-

лежаева и его сотрудников по восстановлению регенерационной способности тканей облученных местно аксолотлей с помощью экзогенных РНК и ДНК, экстрагированных из печени крыс.

Облучали задние конечности аксолотлей в дозе 7000, 8000 и 10 000 Р. Затем через 15—30 дней ампутировали ступни облученных конечностей. ДНК вводили однократно ежедневно или через день в дозе 85 мкг в течение 4—7 дней, полимерную рибосомальную РНК — в дозе 125 мкг, коммерческую РНК — в дозе 250 мкг по той же схеме, что и ДНК.

В некоторых случаях введение экзогенной ДНК эффекта не давало, несмотря на различные варианты инъекций. Во всех случаях, когда ДНК вводили аксолотлям спустя 20 дней после облучения и тут же или через $2^1/_2$ мес ампутировали конечности, восстановления регенерационной способности тканей не наблюдалось. Однако регенерацию конечностей у 25% животных можно было наблюдать, если экзогенную ДНК водили сразу же после облучения, а конечности ампутировали через 20 дней или 3 мес. Это вполне согласуется с представлениями и результатами других авторов. Именно коррекция ранних лучевых поражений компонентов центрального генетического аппарата способствует внутриклеточной регенерации структур ядра и цитоплазмы и, следовательно, функции клетки (Е. Ф. Романцев и др., 1966).

Более позднее введение препаратов не оказывает эффект в связи с тем, что нарушения физико-химической структуры и функции хроматина ядра облученных клеток происходят очень быстро и приводят (в зависимости от дозы облучения) иногда к необратимым изменениям. Поэтому доставка экзогенного полимерного материала к клетке должна произойти как можно раньше — только в этом случае можно рассчитывать на положительный исход.

При использовании полимерной рибосомальной РНК, выделенной из печени крыс, были получены несколько лучшие результаты, чем при инъекции ядерного материала. При ежедневном введении препаратов РНК в течение 5 дней даже через 20 дней после облучения и ампутации наблюдалась регенерация конечностей в 30—33% случаев. Введение аксолотлям экзогенной РНК перед облучением и ампутацией эффекта не давало. На этом основании был сделан вывод, что экзогенная РНК

при парентеральном введении действует как лечебный, но не профилактический, фактор. Активностью обладала лишь свежеприготовленная РНК. Коммерческий препарат дрожжевой РНК и препарат, хранившийся при 4°С $1^1/_2$—2 мес, оказались не эффективными.

Для изучения регенерационных способностей тканей аксолотлей животных подвергали повторной ампутации после развития лучевого поражения клеток тканей. Оказалось, что операция сама по себе улучшает процессы регенерации: количество животных с регенерировавшейся тканью увеличилось с 7 до 17% при облучении в дозе 7000—10 000 Р. После инъекций животным препаратов РНК этот процент возрастал до 70—100. Таким образом, введение РНК после облучения сопровождается резким повышением регенерационных свойств облученных тканей. Однако сама по себе реампутация, видимо, не способствует подобной перестройке в тканях — количество животных с выраженной регенерацией после облучения, которым не вводили биостимуляторы, довольно низко. Следовательно, повышение регенерационной способности тканей связано с действием введенной РНК, в результате чего в клетках происходит перестройка метаболических циклов таким образом, что это вызывает непрерывное усиление регенерационных способностей тканей, которое по определению Л. В. Полежаева может быть названо нарастающим эффектом. Полученные в этом отношении данные указывают на то, что для получения максимального эффекта экзогенную РНК лучше всего вводить заранее, до облучения и операции.

Конечности аксолотлей облучали в дозе 10 000 Р и через 20 дней ежедневно вводили РНК на протяжении недели. У животных первой группы конечности ампутировали сразу же после одной инъекции РНК, а у аксолотлей второй группы — через 2 мес после инъекции. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 36, из которого видно, что имеется четкая зависимость между эффективностью действия РНК и временем ее введения, дозой облучения и временем проведения операции.

Гистологические и гистохимические исследования тканей конечностей облученных и оперированных аксолотлей после введения экзогенной РНК показали, что в клетках эпителия и бластомы митотический индекс довольно быстро нормализуется, а число атипичных митозов уменьшается (С. Я. Тучкова, 1967). Под влия-

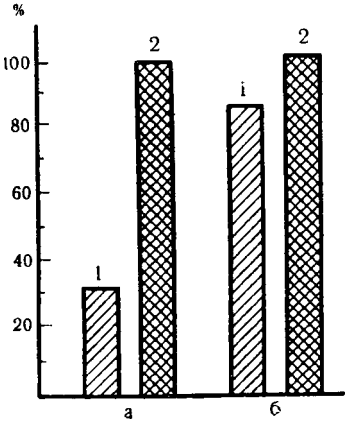


Рис. 36. Явление нарастающего эффекта. У аксолотлей обе задние конечности до основания (местно) облучают в дозе 10 000 Р. По оси ординат — регенерировавшие конечности в %
а — через 20 дней после облучения ступни ампутируют: *1* — контроль; *2* — после облучения и амплутации вводят РНК; *б* — через 2 мес после первой ампутации облученные конечности повторно ампутируют: *1* — контроль; *2* — через 2 мес после первой ампутации и введения РНК конечности повторно ампутируют.

нием препаратов РНК изменяется не только морфологическая картина регенерата, но и метаболические процессы и, в частности, метаболизм нуклеиновых кислот в тканях облученных оперированных и неоперированных животных. Спустя 3 мес после облучения и ампутации конечности у аксолотлей содержание в тканях конечности РНК очень сильно понижается — с 400 до 230 мкг, а ДНК — с 240 до 190 мкг (на 100 мкг сырой массы), а при введении экзогенной РНК концентрация РНК и ДНК в тканях приближается к норме (Н. А. Теплиц, 1964).

Следовательно, инъекции экзогенного материала способствуют стабилизации обмена нуклеиновых кислот в клетках облученных тканей, что является существенным моментом для восстановления их регенерационных свойств, подавленных рентгеновским излучением.

При высоких дозах облучения, кроме снижения регенерационных потенций тканей, очень часто наблюдалось образование язв на поверхности из-за некроза тканей. Они возникали как после облучения, так и после облучения и последующего введения животным различных биостимуляторов. Хотя повторная ампутация способствовала заметному уменьшению количества язв, однако такие биостимуляторы, как ДНК, кислая и дрожжевая РНК, оказались совершенно не эффективными. Противоположное действие оказывала полимерная РНК из печени крыс — при ее введении образования язв ни в одном случае не наблюдалось. В клинических условиях Р. Цанев и др. (1967) наблюдали положительное влия-

ние аппликаций гидролизата РНК на заживление язв. Следовательно, использование полимерной экзогенной РНК как профилактического и лечебного средства при развитии рентгеновских язв является весьма целесообразным.

В ряде опытов при местном облучении конечностей животные погибали в течение 6—8 мес после ионизирующего поражения. Животные, которых облучали и одновременно вводили экзогенную РНК, не погибали и выглядели вполне здоровыми.

Экзогенные полимерные РНК оказались эффективными не только при местном, но и общем облучении аксолотлей.

Через месяц после облучения в дозе 100 Р все животные погибали. Аксолотлям стали вводить гомогенаты клеток кроветворных тканей, кислые белки, полимерную ДНК и РНК. Во многих опытах полимерная ДНК и гомогенаты оказались не эффективными. Увеличить продолжительность жизни облученных аксолотлей на $1^1/_2$—2 мес (в 2 раза) удалось лишь с помощью полимерной РНК из печени крыс и кислого белка, введенных до облучения или сразу же после него. Улучшилось общее состояние животных. Одна—две инъекции полимерной РНК за $1^1/_2$ мес до облучения способствовали еще большему возрастанию выживаемости животных.

Остаются не ясными причины отсутствия эффекта при введении полимерной ДНК. Как уже упоминалось, инъецирование экзогенной ДНК явно влияет положительно на продолжительность жизни и выживаемость различных животных. Возможно, что аксолотли не отвечают такой же реакцией, как другие животные, на введение гетерологичной ДНК или в схему инъекций надо вводить какие-то коррективы.

В описанных выше опытах доза облучения была очень высокой (7000—8000—10 000 Р), которая вела к подавлению регенерационной способности тканей в 93% случаев. Результаты опытов свидетельствуют о том, что после введения некоторых биостимуляторов (и особенно полимерной РНК) наблюдается истинное восстановление регенерационной способности клеток (С. Я. Тучкова, Л. В. Полежаев, 1968).

Результаты описанных экспериментов свидетельствуют о том, что первично наступают изменения в биохимической динамике клетки, ее макромолекулярных

структурах, а затем нарушается ее морфологическая целостность. Введение экзогенной РНК либо продуктов распада клеток восстанавливает нарушенный облучением нуклеиновый обмен, синтез белка, нормализует митотическую активность клеток и сохраняет их способность к дифференцировке и формообразованию.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКАХ ТКАНЕЙ ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Известно, что радиация нарушает обмен, изменяет структуру и физико-химические свойства нуклеиновых кислот различных органов и тканей животных (Becarevič e. a., 1956; Errera, 1957; Kanazir, 1959, и др.). Эти повреждения рассматриваются как следствие ранних и поздних влияний на организм ионизирующего излучения, приводящих к гибели облученных организмов.

Можно думать, что процесс выживания облученных клеток, т. е. процесс их восстановления, зависит от нормализации метаболизма, структуры и биологической функции нуклеиновых кислот. Многие экспериментальные данные, полученные в опытах на бактериях (Kanazir, Simič, 1959), изолированных клетках (А. Н. Лучник, 1958; Karazir e. a., 1959; Чеботарев Е. Е. и соавторы, 1967) и организмах (Panjevač, 1958; Maisin, 1958; Ellinger, 1958) показывают, что такой репарационной способностью по отношению к летально облученным объектам обладают именно нативные, биологически активные нуклеиновые кислоты.

Радиозащитный эффект экзогенных нуклеиновых кислот, наблюдаемых в экспериментальных условиях, разумнее объяснить с позиций гуморальной гипотезы медиации, предложенной Jacobson (1952) и Cole и Ellis (1954). Суть этой гипотезы заключается в признании существования специфического фактора защиты, локализующегося в ядрах клеток селезенки и представляющего собой дезоксирибонуклеопротеин, связанный с нуклеиновыми кислотами клетки. Многочисленные экспериментальные данные югославских исследователей (Savcovič e. a., 1956; Kanazir e. a., 1958, и др.) прямо указывают, что радиозащитным эффектом обладают не только ДНК, но и РНК клеток селезенки. Более того, по данным этих авторов, эффективностью об-

ладают также нуклеиновые кислоты, выделенные из печени, в составе которых было очень мало белка (менее 0,5%).

Инъекции животным только чистого костного мозга и селезеночных гомогенатов при высоких уровнях облучения оказываются не всегда эффективными. Лишь в случаях, когда таким животным перед облучением вводится МЭА, гомогенаты костного мозга и селезенки повышают более чем в 50% случаев выживаемость животных. Аналогичным эффектом обладают выделенные из селезенки и печени ДНК и РНК.

В настоящее время окончательно не выяснен механизм радиозащитного действия экзогенных ДНК и РНК. Является ли это защитное действие результатом макромолекулярной, т. е. структурной, специфичности нуклеиновых кислот или они подвергаются деполимеризации и более мелкие блоки оказывают какое-то действие на ядерно-цитоплазматические поля, способствуя регенерации внутриклеточных органов, остается не ясным. Действительно, продукты гидролитического распада ядерного материала оказываются эффективными при лечении главным образом хронической лучевой болезни, а эффект предшественников нуклеиновых кислот при остром лучевом поражении не постоянен.

Для изучения степени полимерности ДНК, попадающей в клетки органов и тканей, уровня ее деградации при внутрибрюшинном введении и всасывание в кровь, ДНК из селезенки метили P^{32} и исследовали ее утилизацию органами и тканями (печень, селезенка, кровь, яичко и др.).

Внутрибрюшинно вводили 2,8 меченой ДНК сразу же после облучения. Радиоактивность измеряли в цельных и кислоторастворимых фракциях органов и тканей. В течение первых 12 ч около 10% введенной радиоактивности обнаруживалось в крови, в упомянутых органах радиоактивность также была минимальной. В основном радиоактивная метка локализовалась в кислоторастворимых фракциях. Около 50% радиоактивности в это время регистрировалось в брюшине и весьма незначительное — в кислотонерастворимых фракциях.

В интервале 12—33 ч после инъекции уровни радиоактивности в кислоторастворимых фракциях не изменялись, за исключением небольшого увеличения общей радиоактивности и снижения ее в кислотонерастворимых фракциях. В интервале 36—72 ч в крови отмечался повторный пик подъема радиоактивности. Аналогичное увеличение наблюдалось в экстрактах из селезенки, печени и яичка. Общая радиоактивность в этот период в органах необлученных жи-

вотных распределялась следующим образом: 50% — в печени, 8% — в яичке, 4% — в селезенке. В органах облученных животных радиоактивность была гораздо ниже: 13% — в печени, около 3% — в яичке, в селезенке число импульсов было очень низким. Изучение распределения радиоактивности в кислоторастворимых и кислотонерастворимых фракциях показало, что в печени необлученных крыс оно составляло 1 : 1, селезенке — 2 : 3, яичке — 3 : 1. При облучении животных эти соотношения в органах изменялись: в печени — 2 : 1, селезенке — 1 : 3, яичке — было такой же. Радиоактивность собственной ДНК клеток селезенки составляла на 3-й день лишь 3% от общей радиоактивности. В остальных органах радиоактивность отсутствовала.

Поскольку 30—40% введенной меченой ДНК были обнаружены в экстрактах органов в виде фрагментов, осажденных $HClO_4$ или ТХУ, и поскольку ДНК в сравнительно короткий срок метилась главным образом в селезенке, предполагают, что деградированные до размеров пента- или тетрануклеотидов фрагменты экзогенной ДНК могут использоваться в биосинтезе ДНК селезенки. Эти данные также свидетельствуют о том, что высокомолекулярные фрагменты экзогенной ДНК обладают органной специфичностью.

Если сравнить включение меченого неорганического фосфата в ДНК селезенки и экзогенной ДНК-P^{32}, то последняя примерно в 300 раз активнее включается в ядро клетки, чем органический P^{32}. Имеются доказательства того, что экзогенные ДНК различных органов поразному распадаются на фрагменты при парентеральном введении. Например, экзогенная ДНК печени при внутрибрюшинном введении расщепляется на более низкомолекулярные фрагменты по сравнению, например, с селезеночной ДНК. Причины этого до настоящего времени не совсем ясны. Очевидно, это явление связано с физико-химической и структурной упаковкой макромолекул разноорганных ДНК (Hudnik-Plevhik e. a., 1962).

Более детальное изучение распределения высокополимерной ДНК, меченной P^{32}, в организме облученных животных показало, что полимерная ДНК распадается после внутрибрюшинного введения на фрагменты более низкого молекулярного веса, которые проникают в облученные клетки и служат «строительными блоками» в процессе восстановления ядерных систем, пораженных радиацией (Kanazir e. a., 1959).

Введение облученным животным ДНК-P^{32} в дозе 3,42 мг увеличивало тотальную радиоактивность крови

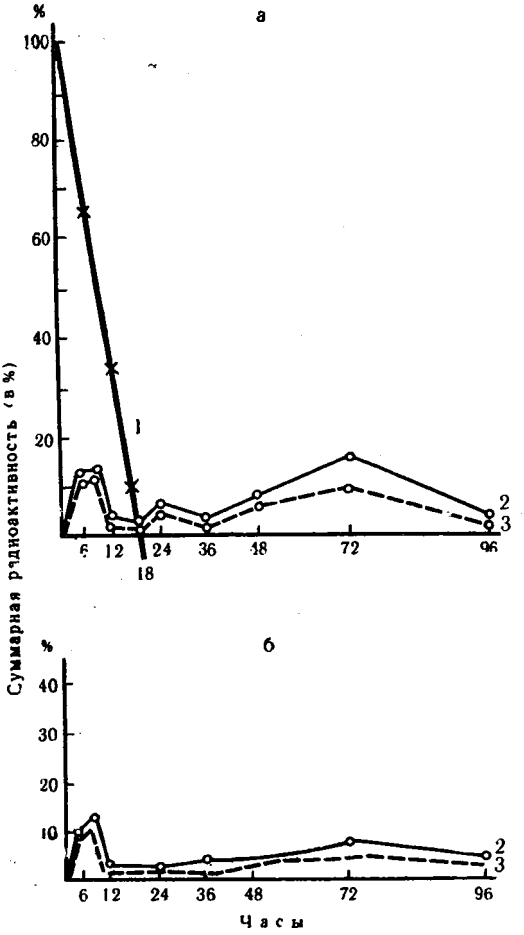


Рис. 37. Радиоактивность крови после инъекции экзогенной ДНК-P^{32}:

а — необлученным и *б* — облученным крысам. По оси абсцисс — время после инъекции в часах, по оси ординат — суммарная радиоактивность в %; радиоактивность: *1* — брюшины; *2* — общая; *3* — кислоторастворимой фракции (по Hudnik-Pleonik e. a., 1959).

в первые 12 ч, причем у облученных животных она была ниже, чем у здоровых (рис. 37). Рис. 37 демонстрирует то, что в плазме крови радиоактивность значительно ниже, чем в цельной крови. Это свидетельствует о захвате радиоактивных фрагментов ДНК клетками крови,

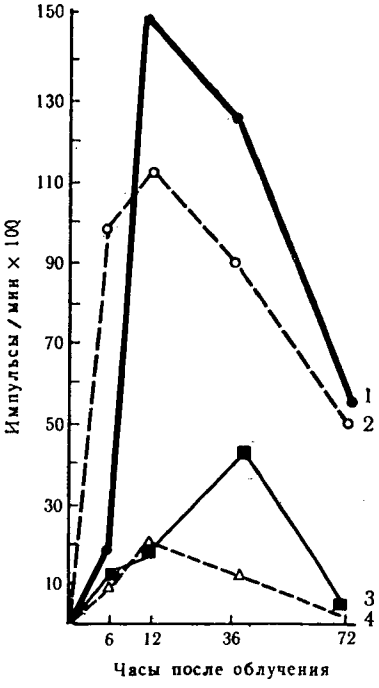


Рис. 38. Радиоактивность крови крыс после внутрибрюшинного введения высокополимерной печеночной ДНК-P^{32}.

1 — цельная кровь необлученных; *2* — цельная кровь облученных; *3* — плазма необлученных; *4* — плазма облученных (по Becarevic e. a., 1959).

т. е. действительно ДНК могут проникать в клетки крови. Если вводить частично деградированную ДНК-P^{32}, то радиоактивность форменных элементов крови проявляется очень медленно. Все же остается не ясным, в каких именно по размеру блоках транспортируется ДНК кровью к клеткам и какие из них генетически активны. Выяснение этого вопроса представляет исключительный интерес, поскольку он может разрешить проблему доставки в клетку активных фрагментов для монтажа или замены радиационно пораженных участков ДНК.

Результаты опытов с меченной P^{32} ДНК показали, что после инъекции высокополимерного материала в организм животного около 50% ДНК, деградируется до тетрануклеотидов. Однако 30—40% ДНК-P^{32} сохраняется в полимерном состоянии в крови и в экстракте из органов (Hudnik-Plevnik e. a., 1960). На основании этих данных можно предположить, что такие крупные фрагменты ДНК могут использоваться в биосинтезе собственных ДНК. Крупные полимерные макромолекулы локализуются главным образом в гомологичных органах, что свидетельствует об органоспецифическом свойстве ДНК.

Результаты исследований показывают, что некоторые специфические продукты распада ДНК также могут оказывать радиозащитное действие только при том ус-

ловии, если они будут введены сразу же после облучения и в определенных дозировках.

Транспорт таких фрагментов осуществляется скорее всего форменными элементами крови, которые могут частично их поглощать или частично адсорбировать макромолекулы на своей поверхности. Из рис. 38 видно, что после инъекции ДНК-P^{32} радиоактивность форменных элементов крови в течение 12 ч гораздо выше, чем в плазме. Считают, что деградация печеночных нуклеиновых кислот после инъекции наступает довольно быстро, хотя количество деградированных продуктов, транспортируемых кровью, точно не установлено.

В настоящее время можно считать доказанным, что более выраженной активностью обладают (после парентерального введения) именно полимерные нуклеиновые кислоты, хотя мало вероятно, чтобы такие гигантские макромолекулы, транспортируясь к клеткам тканей и органов, поглощались ими без каких-либо изменений структуры макромолекул. Показано, что после инъекции ДНК-H^3 авторадиографически зерна ДНК выявляются в ядрах селезенки, печени, кишечнике и клетках других органов (Becarevič e. a., 1964). В этих исследованиях предусматривалась возможность восстановления генетических повреждений облученных клеток, допуская, что фрагменты ДНК после проникновения в клетку сохраняют свою биологическую активность и могут встраиваться в геном клетки.

Вместе с тем механизмы, при помощи которых введенный внутрь экзогенный материал влияет на выживание животных и регенерацию поврежденных органов, изучены мало. Существуют различные схемы возможного воздействия экзогенных РНК и ДНК на восстановительные процессы. Возможно, что парентерально введенная нативная нуклеиновая кислота восстанавливает структуру собственных РНК облученных клеток и таким образом нормализует в них процессы метаболизма (Becarevič e. a., 1962).

Было установлено, что в тканях и органах животных с лучевой болезнью сразу после лечения экзогенными нуклеиновыми кислотами резко изменяется обмен собственных РНК и ДНК по сравнению с органами и тканями нелеченых животных. Эти данные были получены прежде всего в опытах на клетках кроветворных тканей. Было показано, что экзогенная ДНК спо-

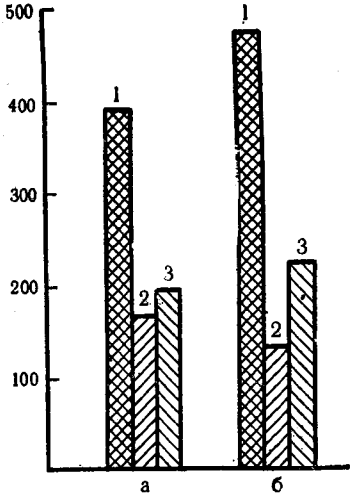


Рис. 39. Специфическая активность: а — аденина и б — гуанина ДНК печени крыс на 4-й день после облучения. По оси ординат — удельная активность 10^{-3}/мкмоль основы.

1 — облучение, лечение ДНК; *2* — облучение без лечения; *3* — необлученные животные (по Becarevic e. a., 1962).

собна стимулировать пролиферацию клеток костного мозга облученных животных и дрожжей (Socka, 1959), повышая их митотический индекс (Лучник, 1958; Kargfel, 1962).

Четырехмесячных крыс тотально облучали в дозе 700 Р, затем вводили в течение 3 дней по 10,34 мг экзогенной ДНК, экстрагированной из печени одномесячных крысят. Оказалось, что сразу после облучения и введения экзогенного материала наблюдается изменение удельной активности аденина и гуанина печеночной РНК (рис. 39). В адениновые и гуаниновые остатки РНК печени облученных крыс C^{14} включался хуже, чем в остатки РНК печени леченых животных. В пурины печеночной и селезеночной РНК метка включалась аналогичным образом.

Обращает внимание более интенсивное включение метки в предшественники РНК печени и селезенки облученных животных после введения экзогенных ДНК (Becarevič e. a., 1962). Эти данные показывают, что нативная печеночная ДНК, инъецированная облученным животным, влияет на метаболизм печеночной и селезеночной РНК или, вернее, на способность клеток этих органов включать метку в пуриновые и гуаниновые остатки РНК, что свидетельствует о нормализующем влиянии инъекций ДНК на нуклеиновый обмен в облученной клетке.

При изучении срезов органов животных, подвергнутых действию ионизирующего излучения, доказано, что в процессе лечения их препаратами нуклеиновых кислот способность тканей к регенерации, выживаемость и переживаемость животных прогрессивно увеличиваются

(Pantič, 1962). Повышение общей резистентности организма к действию высоких доз облучения демонстрируется также фактами быстрой нормализации синтеза антител (Simič e. a., 1959) и других нарушенных физиологических параметров.

Касаясь механизма радиозащитного действия нуклеиновых кислот, можно думать, что они могут оказывать радиозащитный эффект несколькими путями. Либо ДНК, выделенная из селезенки, действует как специфический полимер, стимулирующий синтез собственных ДНК в клетках селезенки, поврежденных облучением, либо ДНК подвергается внутриклеточной деполимеризации под влиянием ДНК-азы, активность которой увеличивается в селезенке (Mantič, 1957) и сыворотке крови (Jovanovič, 1957) после облучения, что способствует увеличению фонда свободных предшественников для «сборки» ядерного дезоксирибонуклеопротеида.

Интерпретируя механизм действия вводимых веществ, считают, что высокополимерная ДНК может включаться в клетки культуры тканей и in vivo посредством фагоцитоза или пиноцитоза (Р. Е. Либинзон и др., 1963). По Trowell и Hill (1957, 1959, 1960, 1961), ретикулярные клетки реципиента способны фагоцитировать меченую ДНК из лимфоцитов донора. Фагоцитированная ДНК может влиять на генетический аппарат ретикулярных клеток путем включения в ДНК клеток реципиентов, вызывая модификации или трансформации генного материала (по аналогии с процессами трансформации у микроорганизмов).

Не исключено, что клетки используют ферментативно деградированные фрагменты ДНК для метаболизма собственной ДНК. Встраивание таких фрагментов в ДНК реципиента может способствовать замене поврежденных участков ДНК, т. е. регенерации генного материала.

Нельзя отрицать то, что ДНК подвергается ферментативному гидролизу до свободных предшественников, которые оказывают также благоприятное влияние на ДНК реципиента, способствуя повышению регенерации клеток и тканей.

Экзогенные РНК из селезенки могут оказывать радиозащитный эффект за счет активации внутриклеточных ДНК-аз, так как известно, что РНК in vitro могут влиять на активность этого фермента (Hudnik, 1968).

Экзогенная РНК также может включаться в системы синтеза белка и влиять на радиорезистентность клетки.

Суммируя данные о механизме действия экзогенных нуклеиновых кислот, можно предположить несколько вариантов объяснения их радиозащитного действия в клетках организма животных или человека, пораженных ионизирующим излучением.

1. Экзогенные нуклеиновые кислоты, проникая в клетку, могут активировать общий метаболизм клетки и, в частности, стимулировать биосинтез белка в популяциях клеток, выживших после радиационного воздействия.

2. Полимерные нуклеиновые кислоты, подвергаясь внутриклеточной деградации до каких-то активных фрагментов, могут способствовать восстановлению либо активации биосинтеза собственных нуклеиновых кислот клетки за счет утилизации в этих процессах имеющихся экзогенных олиго- или полинуклеотидов.

3. Деполимеризация полимерной нуклеиновой кислоты до моно- и олигонуклеотидов может способствовать повышению пула предшественников нуклеиновой кислоты в клетке и тем самым способствовать восстановительным процессам в ядре.

4. Полимерная нуклеиновая кислота или продукты ее гидролиза могут активно связывать освободившуюся в результате облучения нуклеазу, способствуя предотвращению потенцирования радиохимического распада нуклеиновой кислоты.

5. Поглощение энергии ионизации полимерными молекулами нуклеиновой кислоты или продуктами их распада, а также связывание образующихся в процессе распада активных макро- и микрорадикалов уменьшают радиохимический эффект облучения.

Глава VII

ИНДУКЦИЯ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОЙ РНК

Принципиальная возможность антителообразования под влиянием экзогенной РНК была экспериментально установлена чешскими исследователями (Steřzl, Hrubešova, 1955). Было показано, что введение нуклеопротеида, полученного из органов иммунизированных животных, способствует медленному появлению в крови антител в отдаленные сроки после инъекции (Nester e. a., 1957). Когда Konda с сотрудниками (1965) вводили смесь РНК из микросомной фракции иммунных клеток с антителом, довольно резко повышался выход антител, которые появлялись в течение первых суток после внутривенной инъекции смеси. РНК, выделенная из «неиммунных» клеток и обработанная РНК-азой, оказалась неэффективной. Установлено, что если выделить РНК из клеток лимфатического узла области тела, на которую предварительно подсаживали кожный гомотрансплантат, и затем инкубировать с ней неиммунные клетки и ввести их донору кожного трансплантата, то у донора возникает кожная реакция туберкулинового типа (Mannick e. a., 1963).

Эксперименты в этом направлении в дальнейшем стали проводить, используя диффузионные камеры. Было показано, что РНК, выделенная из макрофагов, которые были в контакте с фагом Т2, индуцирует образование антител нормальными лимфоцитами, находящимися в диффузионной камере. Однако при других вариантах опытов, в которых РНК, выделенная из нормальных макрофагов, помещалась в диффузионную камеру с нормальными лимфоцитами и фагом Т2, образования антител не происходило (Fishmann e. a., 1963). В некоторых экспериментах авторы вводили иммунные препараты ДНК и РНК, однако антителообразования также выявить не удалось.

Б. Б. Фукс и другие (1964) вводили кроликам взвесь клеток, обработанных РНК. РНК были выделены из лимфатических узлов и селезенки кроликов, иммунизированных против бычьего сывороточного альбумина (см. схему опыта). Оказалось, что уже через 12 ч в сыворотке животных появляются антитела к бычьему сывороточному альбумину в разведении 1 : 20, количество которых нарастает к концу суток.

Условия опытов	Дозировка РНК
Иммунизация кроликов в течение одного месяца (4 инъекции по 20 мг бычьего сывороточного альбумина). РНК из селезенки вводили в подошвенную подушечку задней лапы	10—20 мг
Клеточную взвесь из подколенных лимфатических узлов кролика обрабатывали РНК 10—18 ч при +4° С. Взвесь вводили внутрибрюшинно тому же кролику	3—5 мг/мл на $0{,}85\times10^6$—80×10^6, клеток в 1 мл инкубационной среды
Клетки из лимфатических узлов кроликов обрабатывали РНК, выделенной от животных, иммунных к бычьему сывороточному альбумину	То же
Контроль (схема экспериментов такая же, как и в предыдущих вариантах, но РНК обрабатывали РНК-азой или ее получали из лимфатических узлов селезенки неиммунных кроликов)	» »

Через сутки антитела в крови определялись у всех животных при титре 1 : 10—1 : 40. При введении РНК в подошвенную подушечку задней лапы антитела у 4 животных появлялись через 12 ч (1 : 20—1 : 80), а у 5 — через 24 ч (1 : 20—1 : 40). В случае использования РНК от неиммунных животных образования антител ни в одном случае не наблюдалось. Обработка препарата РНК-азой в подавляющем большинстве случаев снимала эффект антителообразования, за исключением 2 животных, у которых наблюдалось образование антител к бычьему сывороточному альбумину через 12—72 ч (1 : 20). Внутриклеточные антитела в этих опытах об-

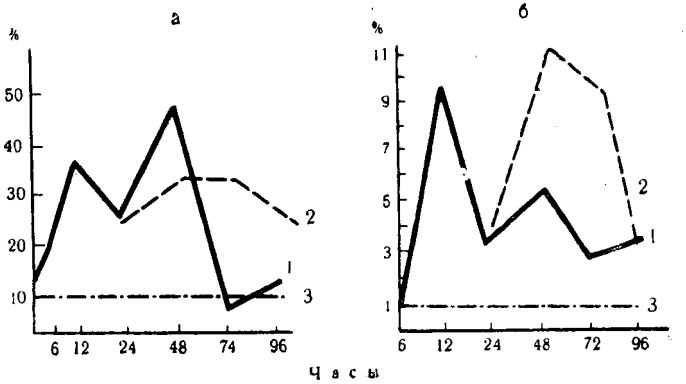


Рис. 40. Изменение содержания: а — лимфоцитов и б — бластов в регионарном лимфоузле кролика. По оси ординат — количество клеток в %.

1 — введение РНК; *2* — вторичное введение БСА; *3* — введение РНК, обработанной РНК-азой (по Б. Б. Фуксу, 1964).

наруживались в регионарных лимфатических узлах и селезенке через 12 ч после введения РНК, выделенной от иммунизированных животных. Как видно, в большинстве случаев получены довольно отчетливые данные по образованию антител к бычьему сывороточному альбумину. Это было связано главным образом с тем, что методически в этих опытах использовали препараты РНК, достаточно обогащенные информационными (матричными) РНК.

Из рис. 40 видно, что после инкубации клеток, либо введения экзогенной РНК достоверно увеличиваются как количество клеток, содержащих РНК в цитоплазме, так и фракция больших лимфоцитов в группе бластов. Через 12 ч после введения РНК их количество в 4 раза превышало контроль. На основании этого можно сделать заключение, что реакция лимфатического узла на введение РНК проявляется в довольно ранних изменениях в группе больших лимфоцитов и бластов при отсутствии достоверного повышения числа плазмоцитов и учащения митозов. Результаты этих опытов показывают, что экзогенная РНК, выделенная из разных тканей (иммунной лимфоткани печени) и введенная в подошвенную подушечку лапы кролика, переносится в лимфатический узел, где она вызывает синтез специфических белков. Однако до настоящего времени остается не вы-

ясненным, индуцируется ли синтез антител именно РНК или ее комплексом с активными детерминантами антигена.

В опытах Б. Б. Фукс и др. (1964) были сделаны попытки обнаружить примеси антигена и антител в препаратах РНК, для чего РНК (20 мг/мл) адсорбировали на поверхности бараньих эритроцитов, а затем к этим клеткам добавляли сыворотку с титром антител против бычьего сывороточного альбумина (1 : 160 000), либо на поверхности эритроцитов адсорбировали бычий сывороточный альбумин, такие сенсибилизированные клетки добавляли к последовательным разведениям РНК. Учитывая то, что в препарате РНК могут находиться связанные антитела, его обрабатывали прогретой РНК-азой (10 мкг на 100 мкг РНК) и затем диализовали против 0,15 М раствора NaCl при 37° и 4° С до полного удаления деградированной РНК. С белком, оставшимся после диализа, проводили реакцию пассивной гемагглютинации.

Ни в одном из этих опытов антитела против бычьего сывороточного альбумина или сам бычий сывороточный альбумин в препаратах РНК не были обнаружены. Все же считают, что РНК при введении in vitro может образовывать комплекс с антигеном, способствуя его сохранению в организме и проявлению иммуногенности. Такой стойкий к протеолитическим ферментам антиген в комплексе как будто сохраняется в лизосомах и обусловливает длительный процесс антителообразования (Franzl, 1962; Fishman e. a., 1963; Де-Дюв, 1964).

В настоящее время уже имеются доказательства того, что лизосомальные фракции, выделенные из селезенки животных, предварительно иммунизированных эритроцитами, и введенные реципиентам, вызывают первичные и вторичные иммунологические ответы (И. Я. Учитель и др., 1966). Все же этот вопрос не может считаться до конца выясненным. Этот вопрос в настоящее время дискутируется по двум направлениям: признание индуцирующих свойств у комплексного соединения РНК с антигеном или его остатком, включающим детерминантную группу, и признание способности РНК, продуцируемой под влиянием антигенного воздействия, оказывать самостоятельное индуцирующее действие.

Выясняя участие РНК в образовании антител, было установлено, что РНК, выделенная из клеток доноров, получавших при иммунизации актиномицин D, так же, как и РНК из иммунных клеток, обработанных РНК-азой, не способна индуцировать образование антител (Friedman, 1964). Было высказано предположение, что

синтез специфических иммуноглобулинов обусловлен антигеном, находящимся в комплексе с РНК, причем в этом комплексе активным началом в образовании антител является антиген, а РНК играет роль стимулятора.

То, что в препарате РНК присутствует антиген, было доказано путем авторадиографического исследования распределения I^{131} в препарате, выделенном из макрофагов, имевших контакт с антигеном (Askonas e. a., 1965). Однако, как оказалось, при введении такого меченого комплекса в брюшную полость (после инкубации макрофагов in vitro с гемоцианином-I^{131}) в течение первых 5 ч теряется около 90% антигена. Однако индуцирующая активность препаратов РНК, выделенной сразу же после изъятия клеток из брюшной полости и через 21 ч культивирования in vitro, полностью сохранялась.

Хотя результаты этих опытов указывают на содержание антигена в комплексе РНК, однако остаются не ясными причины отсутствия зависимости силы иммунологического ответа от дозы антигена. Тем более что не выяснено, с какой именно фракцией РНК связан антиген, без чего трудно предполагать функциональную роль комплекса РНК—антиген в индукции антителообразования.

Вторая точка зрения на характер участия РНК в антителообразовании предусматривает передачу соответствующей информации не с помощью антигена, а путем передачи информации о самом антигене. В связи с этим высказываются мнения, что активные фракции РНК по скорости их синтеза и по ряду других физико-химических свойств не могут содержать антиген даже в следовых количествах (Bishop e. a., 1967). Обработка препаратов РНК протеолитическими ферментами (в том числе проназой) не влияла на индуцирующие свойства РНК. Более того, установлено, что антитела, продуцируемые лимфоцитами, содержат антигенные маркеры, характерные для макрофагов, из которых экстрагировали РНК (Adler e. a., 1966; Jacherts, 1968).

Наиболее четкие доказательства ведущей роли РНК как фактора индукции были получены в опытах Pinchuck с сотрудниками (1968). В эксперименте использовали мышей особой линии, которые ареактивны к синтетическому полипептиду с последовательностью $глу^{60}$—$ала^{30}$—$тир^{10}$ и не продуцируют антитела даже по типу вторичного ответа. Если этим животным ввести РНК, выделенную из макрофагов мышей другой линии, обра-

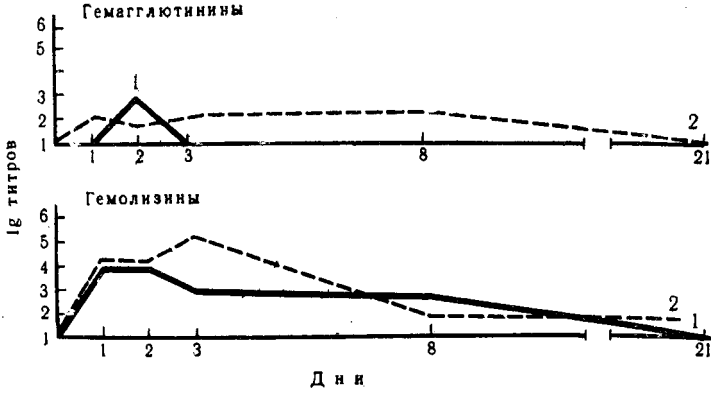


Рис. 41. Иммуногенность РНК:

1 — из селезенки и *2* — печени по максимальным титрам. Органы получены в различные сроки от животных, которым вводили эритроциты барана (первичный ответ). Титры антител представлены в логарифмах с основанием 2 (И. Я. Учитель и др., 1969).

зующих антитела к этому полипептиду, то у нечувствительных мышей наблюдается образование антител к синтетическому полипептиду. Следовательно, присутствие антигена не могло определить индуцирующие свойства препарата РНК.

Доказательствами возможности наведения синтеза антител под влиянием РНК, выделенной из лимфоидной ткани иммунизированных животных, служили также опыты, в которых фракции РНК, выделенные из обломков клеток, ядер и митохондрий печени и селезенки иммунизированных животных, вводили несколькими группами кроликов по следующей схеме (И. Я. Учитель и др., 1969).

1. Введение РНК внутрибрюшинно иммунизированным кроликам-реципиентам, в крови которых нет нормальных антител к эритроцитам барана.
2. Внутрибрюшинное введение РНК кроликам, предварительно иммунизированным эритроцитами барана в момент снижения у них титра гемагглютининов до 1 : 40.

   Иммунизация — внутрибрюшинное введение 2,0 мл 20% взвеси эритроцитов барана.

После введения экзогенной РНК исследовали титры гемагглютининов и гемолизинов. Как видно из рис. 41, введение РНК вызывало антителообразование у кроликов 1-й группы. Наибольшей иммуногенностью обладали

фракции, выделенные в первые 3 дня после введения донорам эритроцитов барана. РНК, выделенные на 21-й день, ни в одном случае не вызывали антителообразования у неподготовленных животных. При определении вторичного ответа РНК, выделенную из печени и селезенки доноров, вводили ранее иммунизированным животным после снижения у них титров антител в крови.

Введение экзогенной РНК из печени и селезенки сенсибилизированным животным вызывает образование антител в любой срок их выделения за исключением гемолизинов, продукция которых после введения антигена в течение первых двух суток отсутствует. Более низкая активность экзогенной РНК, выделенной из печени, и селезенки, при индукции первичного ответа объясняется, очевидно, меньшей чувствительностью нормальных кроликов к антигену. Однако вторичный ответ оба вида РНК вызывали во всех случаях. По данным Friedman (1963), рибонуклеопротеины, выделенные из селезенки мышей через 3 нед после введения им антигена, вызывают антителообразование у реципиентов, а РНК из печени оказалась неиммуногенной. Примерно равная иммуногенность РНК, выделенных из селезенки и печени иммунизированных животных, по мнению И. Я. Учитель и др. (1969), обусловлена присутствием в препарате антигенного материала.

Несмотря на ряд успехов, полученных в опытах по изучению индукции антителообразования под влиянием экзогенных РНК, выделенных из тканей иммунизированных животных, эксперименты в этом направлении не всегда воспроизводимы. Например, Hrubesova с сотрудниками (1959, 1961) не наблюдали антителообразования при введении нуклеопротеина, выделенного из селезенки взрослых кроликов, иммунизированных антигеном Br. suis. Рибонуклеопротеин, выделенный из селезенки кур, предварительно иммунизированных человеческим γ-глобулином, и введенный цыплятам и курам, также оказался неэффективным (Jankovič e. a., 1959; Hrubesova e. a., 1961). В использованных авторами препаратах рибонуклеопротеина содержалось, как правило, 85% белка и других примесей, в которых было выявлено значительное количество антигена (Friedman, 1963) или антител (Feldman e. a.,1960; Susdorf, 1961). Таким образом, вопрос о роли РНК в индукции антителообразования оставался до конца не ясным.

Некоторую ясность в эту проблему внес Fishman (1961, 1963), который установил, что при перенесении макрофагов, фагоцитировавших фаг T2 in vitro, в культуру лимфоцитов, последние приобретали способность продуцировать антитела. Перенос этой информации может осуществляться не обязательно целыми клетками, но и экстрактом макрофагов, а добавление РНК-азы в инкубационную среду лишает экстракты информационных свойств. В других опытах также было показано, что применение экстрактов из макрофагов давало более выраженный результат, чем смесь цельных клеток, а добавление РНК-азы ликвидирует эффект (Cochen e. a., 1964; Friedman, 1964; Jerne e. a., 1964; И. Н. Моргунов и др., 1971). Считают, что естественный фактор антигенной информации связан с РНК и передается не только через цитоплазматические мостики, но и при выходе во внеклеточную среду.

Установлено, что индукция антителообразования с помощью иммунной РНК требует определенного времени. В экспериментах in vitro можно наблюдать, что внесение во взвесь клеток селезенки иммунной РНК (1 мг на 10^8 клеток) увеличивает число антителообразующих клеток: в первые 6 ч. после внесения препарата число активных клеток не увеличивается, через 18 ч — достигает максимума, а к 24 ч — уменьшается. Видно, что в отличие от образования антител под влиянием антигена, включение клеток в синтез специфических белков под влиянием экзогенной РНК требует меньшего времени, хотя эта реакция угасает в более короткие сроки. В последнее время изучение этой проблемы продвинуло наши представления о том, какой из типов РНК ответствен за синтез иммуноглобулинов. Большинство исследователей склонно считать, что наиболее активными в этом отношении являются фракции РНК, выделенные при температуре около 65° С, т. е. ДНК-подобная м/РНК. Менее активной оказалась фракция, выделенная из фенольных ядер при 45° С, а цитоплазматическая РНК совершенно лишена активности (Mach e. a., 1965; Cochen, 1969).

Все приведенные выше факты свидетельствуют о том, что индуцировать синтез антител может также и собственно РНК, которая, проникая в лимфоидные клетки, вызывает какую-то перестройку на уровне генетического аппарата (возможно по типу трансформации,

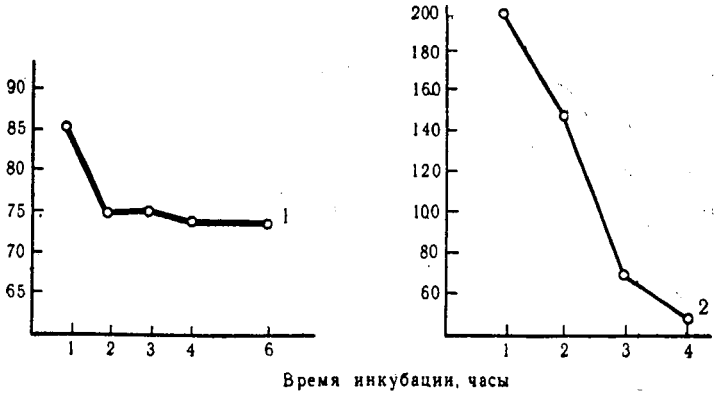


Рис. 42. Динамика проникновения экзогенной РНК в лимфоидные клетки:

1 — инкубация при температуре 2° С; *2* — учет по массе.

преобразуя клетки в антителообразующие). Доказательством того, что экзогенная РНК проникает действительно в лимфоидные клетки, служат данные многочисленных опытов in vitro и in vivo по изучению транспорта и судьбы введенной РНК. Например, показано, что при парентеральном введении экзогенная РНК довольно быстро проникает в цитоплазму лимфоидных клеток всех типов и к 14 ч после введения накапливается в синусах регионарного лимфатического узла, откуда исчезает на 3—4-е сут (Б. Б. Фукс и др., 1964).

Проникновение РНК в клетки происходило, как правило, равномерно и в течение 6 ч достигало максимума. За 6 ч при 37° в каждую клетку проникает в среднем 27×10^{-12} г РНК, т. е. примерно 2,7% от массы клетки. Инкубация лимфоидных клеток с РНК при 2° С изменяла это соотношение — в течение первого часа поглощалось 40×10^{-12} г РНК, т. е. 4% от массы клетки. Однако дальнейшая инкубация при 2° С способствовала обратному транспорту экзогенного материала из клетки, причем в ядро при такой температуре РНК не проникает. Schwarz с сотрудниками (1962) показали, что РНК способна проникать в большие, малые и средние лимфоциты. В первую очередь РНК обнаруживалась в ядре, через несколько часов — в цитоплазме. Такая динамика характерна для проникновения экзогенной РНК при 37° С. При инкубации на холоду картина несколько изменяется (рис. 42, 43). Как видно из рис. 42, 43, на

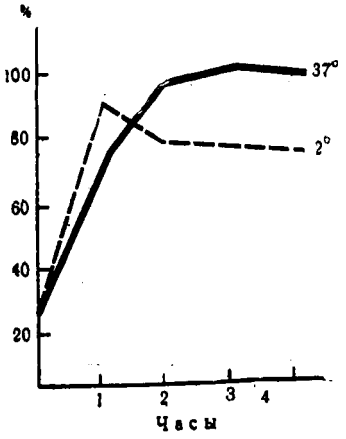


Рис. 43. Увеличение количества клеток, содержащих РНК, в цитоплазме после их инкубации в растворе экзогенной РНК при различной температуре (по Б. Б. Фуксу, 1964).

протяжении только первого часа происходило существенное поглощение экзогенной РНК, а в дальнейшем оно не изменялось.

На основании полученных данных был сделан вывод о том, что процесс проникновения РНК в клетки носит в основном физико-химический характер, а не является активным «захватом» клетками РНК. Это подтверждается и тем, что РНК проникает в клетку и выходит из нее в условиях, исключающих активный метаболизм. Очевидно, что в этих процессах играет большую роль состояние проницаемости и сорбционные свойства клеточных мембран, которые контролируют и регулируют проникновение различных макромолекул внутрь клетки.

Несмотря на точно установленные факты проникновения экзогенной РНК в лимфоидные клетки, механизм ее действия на антителообразование остается до конца не ясным. Можно себе представить по крайней мере два механизма. Первый: экзогенная РНК, выделенная из тканей предварительно иммунизированных животных, используется непосредственно в клетке как матрица (для синтеза антител). В пользу этого свидетельствует очень быстрый синтез антител под влиянием экзогенной РНК по сравнению с индукцией его при помощи антигена. Второй: проникшая в клетку экзогенная «иммунная» РНК, действуя на генетический аппарат, способствует синтезу новых молекул РНК, т. е. синтез антител осуществляется опосредованно путем преобразования экзогенной РНК в часть генома.

Возможны и другие варианты взаимодействия экзогенного материала с органеллами клетки, однако о них пока ничего не известно. Очевидно, односторонние представления о природе индуцирующего начала могут ока-

заться ошибочными, поэтому лучше говорить о нескольких возможных путях реализации эффекта экзогенной РНК.

Признают возможным существование двух типов РНК — ядерной и цитоплазматической, обладающих высокой индуцирующей активностью (Habac e. a., 1964; Lazda e. a., 1968). Показано, что небольшая доза антигена, введенная в организм животного, способствует синтезу РНК, которая индуцирует образование IgM-антител, а большая доза — синтезу РНК, индуцирующей образование IgG-антител. РНК, индуцирующая образование антител типа IgM, чувствительна к РНК-азе, а препарат, активирующий образование IgG, оказался чувствительным и к проназе, т. е. разрушение в составе экзогенной РНК каких-то белковых примесей лишает ее способности активировать синтез определенных видов антител (Adler e. a., 1966). Кроме синтеза антител под влиянием фракций экзогенной РНК активируется синтез особых антителоподобных веществ, которые идентичны гуморальным антителам (19S-α-глобулины). Индукция синтеза этих антител подавляется ДНК-азой, а синтез самых антител — актиномицином D и пуромицином (Jacherts, 1966). Следовательно, образование антител индуцируется экзогенной РНК, точнее,— различными ее фракциями, одна из которых связана с антигеном (Fishman e. a., 1967).

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении проблемы индукции антителообразования под влиянием экзогенных РНК, многие данные нуждаются еще в дальнейшей экспериментальной проверке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Восстановительные процессы, развивающиеся в организме после действия эстремальных факторов, сопровождаются изменениями, происходящими на различных уровнях организации — от молекулярного до целого организма. Решение проблемы регенерации в целом требует исследования процессов, которые происходят на всех уровнях организации, и искусственное исключение любого из них неизбежно приводит к неудачам при разработке проблемы управления регенерацией. Построение единой теории управления процессом регенерации в каждом конкретном случае сейчас еще не возможно из-за отсутствия фундаментальных разработок по теории биологических систем, объединяющей молекулярные, клеточные и физиологические механизмы регуляции, и математического моделирования этих процессов.

Мы остановились только на одном из видов регуляции — клеточном, в котором принимают участие тканевые факторы, представляющие собой биомакромолекулы — РНК и ДНК. Сейчас, когда уже имеется большое число экспериментальных данных о влиянии экзогенных нуклеиновых кислот на метаболические процессы, на нормальные и патологически измененные популяции клеток in vivo и in vitro, становится ясным, что изучение участия компонентов белоксинтезирующей системы в процессах дифференцировки, роста и развития тканей и органов очень перспективно. Развитие исследований переноса информации у бактерий и вирусов (трансформация) и у растений (трансдукция) дает уже определенные практические результаты.

Однако применительно к клеткам высших животных и человека проблема использования экзогенных нуклеиновых кислот не может считаться решенной. Чрезвычайно сложная и устойчивая система регуляции актив-

ности генов в ядре клетки животных и человека сводит часто на нет усилия экспериментаторов оказать длительное воздействие в нужном направлении на эти регуляторные системы.

При введении экзогенных нуклеиновых кислот часто не учитывается целый ряд факторов тканевого и системного порядка, оказывающих влияние на характер их действия в клетке (митотическое состояние клетки, гормональный фон, суточные ритмы и т. д.). Поэтому попытки вызвать индукцию внешним фактором в состоянии некомпетентности клетки, как правило, оканчивались неудачей.

При радиационном поражении положительный эффект оказывают, по мнению одних авторов, только полимерные биомакромолекулы, по мнению других — продукты распада типа нуклеотидов и даже более мелких фрагментов. Такое противоречие существует потому, что до настоящего времени не выяснены генетические механизмы регуляции процессами внутриклеточной и внутриорганной регенерации, отсутствуют четкие экспериментальные данные по влиянию компонентов белоксинтезирующей системы на генном уровне. Известно, что в процессе регенерации ткани или органа добавление в определенных дозировках экзогенных нуклеиновых кислот in vivo или in vitro иногда оказывает стимулирующий эффект. Макромолекулы в виде более мелких фрагментов (пента- или секстануклеотидов) проникают главным образом в гомологичные органы, где и поглощаются клетками.

Проникшие макромолекулы довольно долго находятся в клетке в виде крупных фрагментов и оказывают эффект по крайней мере по двум каналам — через активацию генетического аппарата клетки и путем включения в процесс трансляции белкового синтеза непосредственно на полирибосомах. Последняя возможность была доказана экспериментально. Что касается действия экзогенных нуклеиновых кислот на уровне хромосомного аппарата клетки, то по этому вопросу экспериментальных данных явно недостаточно. Между тем в ряде случаев предварительная блокада ядра клетки специфическими ингибиторами не позволяет реализовать эффект экзогенных макромолекул. В этом плане мы привели несколько спекулятивных гипотез, которые нуждаются в дальнейшей экспери-

ментальной проверке. Несмотря на то что механизмы действия экзогенных РНК и ДНК остаются во многом не ясными, эта проблема затронула наиболее существенную сторону современной биологии — проблему биосинтеза белка.

Анализ литературных данных об участии РНК в передаче антигенной информации свидетельствует о том, что в последнее время этим процессам придается большое значение, однако остается совершенно не ясным, как передается в данном случае специфическая информация и как транслируется специфичность комплекса РНК — антиген. Опыты многих исследователей по защитной и восстановительной роли экзогенных нуклеиновых кислот при лучевом поражении, хотя и вносят существенный вклад в эту проблему, однако результаты этих опытов не всегда воспроизводятся однотипно и подчас имеют противоречивый характер. Аналогичная ситуация складывается при анализе работ по изучению влияния экзогенных биомакромолекул на процессы регенерации органов и тканей.

Если одни авторы считают целесообразным применение для стимуляции процессов репарации ДНК и ДНП и получают при этом положительные результаты, то опыты других свидетельствуют о лучшем эффекте экзогенных РНК. Это, очевидно, связано с различным моделированием и использованием различных концентраций экзогенных биомакромолекул и тем, что мы пока очень мало представляем себе механизмы взаимодействия этого материала с ядром и цитоплазмой клетки.

Вместе с тем описанные эксперименты, показывают, что мы имеем дело с действием на клетку нового класса веществ,— веществ, обладающих информационными свойствами, которые, очевидно, способны довольно сильно изменять метаболическую активность клетки, тем самым влияя на ее дифференцировку и митотическую активность. Направленное использование экзогенных информационных макромолекул несомненно открывает перспективу более устойчивой реставрации биосинтеза белков в пораженной и регенерирующей клетке по сравнению с влиянием таких веществ, как витамины, субстраты и другие биологически активные соединения. Направленное применение экзогенных нуклеиновых кислот может также оказаться эффективнее и в том случае, когда введение недостающих белков не дает ни-

каких результатов. Вместе с тем необходимо отметить, что в настоящее время многие стороны характера действия экзогенных нуклеиновых кислот на клетку пересматриваются. Накапливается ряд данных, свидетельствующих о том, что в составе препаратов экзогенных нуклеиновых кислот находятся другие низкомолекулярные продукты (некоторые белки, гликопептиды и т. д.), которые ответственны за эффект стимуляции или регенерации метаболических процессов в клетках. Дальнейшие эксперименты в этом направлении позволяют более конкретно выяснить природу и механизм действия тканевых регуляторных факторов в процессах роста, развития и регенерации.

ЛИТЕРАТУРА

Алексеев А. Б., Конышев В. А. Участие РНК в системе, регулирующей рост органов. Ж. общей биол., 1969, т. 30, № 4, с. 459—469.

Алексеев А. Б., Конышев В. А. Влияние введения гомологичных РНК на содержание и обновление нуклеиновых кислот в печени куриных эмбрионов. Бюлл. экспер. биол., 1969, № 4, с. 101—104.

Алексеева Н. Н., Разумова И. Л., Чернух А. М. Влияние цитоплазматической РНК и ее гидролизата на содержание липидов и коллагена в денервированной мышце. Труды научной конференции Ин-та нормальной и патологической физиологии АМН СССР. Т. 14. М., 1971, с. 5—6.

Грех И. Ф. Защитное действие некоторых пиримидиновых производных от рентгеновых лучей у белых мышей. Мед. радиол., 1958, т. 3, № 6, с. 67.

Губерниев М. А., Лейкина Е. М., Романова Л. К. О некоторых свойствах ДНП нормальных и регенерирующих органов млекопитающих. Ж. общей биол., 1967, т. 28, № 6, с. 675—683.

Дашкевич В. С. Исследование состояния ДНК интенсивно делящихся клеток. Автореф. дисс. канд. Новосибирск, 1955.

Залцмане В. К. Влияние РНК, полученной из печени крыс, на детерминацию белкового синтеза в печени куриного эмбриона. Изв. АН Латвийск. ССР, 1966, № 6, с. 78—85.

Керова Н. И., Антоненко С. Г. Влияние разновидных ДНК на нормализацию нуклеинового обмена в динамике лучевой болезни. В кн.: Вопросы радиобиологии. Минск, 1969, с. 135—142.

Конышев В. А. О механизмах регуляции роста органов и тканей в эмбриогенезе. Успехи совр. биол., 1969, т. 68, вып. 3, с. 412—433.

Конышев В. А., Хватов В. Б., Алексеев А. Б. Химические закономерности межклеточных взаимодействий в регуляции процессов роста. В кн.: Межклеточные взаимодействия в дифференцировке и росте. М., 1970, с. 212—225.

Красных И. Г., Шашков В. С., Магидсон О. Ю. Радиозащитное действие некоторых новых производных пурина и пиримидина. Фармакол. и токсикол., 1961, т. 24, № 5, с. 572—577.

Критский Г. А., Абидов А. А. О нуклеиновых блоках ДНК при воздействии ионизирующей радиации. В кн.: Тезисы секционных сообщений 2-го Всесоюзного биохимического съезда. Секция № 17. Ташкент, 1969, с. 15.

Крупко И. Л. Теория и практика современного лечения переломов. Вестн. хир., 1967, т. 98, № 6, с. 3—9.

Кузин А. М. Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии. М., 1970.

Курдюм В. А., Лазуркевич З. В. Фенотипическое действие экзогенных нуклеиновых кислот. В кн.: Биосинтез, структура и функция биополимеров. Вып. 7. Киев, 1971, с. 165.

Лазарев Н. В., Фелистович Г. И. Соотношения между действием пиримидиновых стимуляторов и ингибиторов клеточного роста и размножения. Вопр. онкол., 1961, т. 7, № 8, с. 65—72.

Лазарев Н. В., Фелистович Г. И. Пентоксил и его применение при алейкиях. Л., 1954.

Лейкина Е. М., Губерниев М. А., Романова Л. К. и др. О некоторых свойствах ДНП нормальных и регенерирующих органов млекопитающих. В кн.: Регенерация и клеточное деление. М., 1968, с. 238—241.

Лейкина Е. М., Романова Л. К., Антипова К. К. Изучение биологической активности ДНП, выделенного из ткани легкого, претерпевающего компенсаторную гипертрофию. В кн.: Условия регенерации органов и тканей у животных. М., 1966, с. 154—158.

Лейкина Е. М., Романова Л. К., Спитковский Д. М. и др. Сравнительное изучение некоторых физико-химических свойств фракций хроматина ядер гепатоцитов нормальной и регенерирующей печени крыс. В кн.: Материалы 6-й конференции по итогам современных исследований по изучению процессов регенерации и клеточного деления. М., 1971, с. 94—95.

Либинзон Р. Е., Константинова В. В., Муксинова К. Н. и др. Эффективность высокополимерной ДНК при лечении острой лучевой болезни. Радиобиология, 1963, т. 3, № 1, с. 111—116.

Либинзон Р. Е., Константинова В. В., Попова Т. Г. и др. К вопросу о механизме терапевтического действия высокополимерной ДНК при лучевой болезни. Радиобиология, 1963, т. 3, № 3, с. 456—462.

Либинзон Р. Е., Русинова Г. Г. Особенности включения экзогенной ДНК в ткани крыс после частичной гепатэктомии. В кн.: Механизмы регенерации и клеточного деления. М., 1971, с. 96.

Мазурик В. К., Брынсина Л. Е., Подгродченко Д. К. Биохимические механизмы влияния ДНК и тимидина на организм животного при пострадиационном восстановлении. В кн.: Радиация и организм. Обнинск, 1967, с. 148—151.

Михайлов В. П. Основные направления в изучении тканевых регенераторных процессов после лучевых повреждений. В кн.: Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевой болезни. Л., 1959, с. 5—20.

Моргунов И. Н., Бордонос В. Г. РНК и вопросы передачи антигенной информации в биосинтезе иммуноглобинов. В кн.: Биосинтез, структура и функция полимеров. Вып. 7. Киев, 1971, с. 181.

Полежаев Л. В. Восстановление регенерационной способности конечностей у аксолотлей после облучения рентгеновскими лучами. Докл. АН СССР, 1959, т. 127, № 3, с. 713—716.

Полежаев Л. В., Ахабадзе Л. В., Музпаева Н. А. и др. Стимуляция регенерации мышцы сердца. М., 1965.

Полежаев Л. В., Ермакова Н. И. Восстановление регенерационной способности конечностей у аксолотлей, подавленной рентгеновским облучением. Докл. АН СССР, т. 131, 1960, № 1, с. 209—212.

Поляков В. А. Особенности течения и принципы лечения комбинированных радиационных повреждений. М., 1966.
Поляков В. А., Торбенко В. М., Павлова М. Н. и др. Особенности течения закрытых и открытых переломов костей и повреждений суставов при лучевой болезни. В кн.: Переломы костей и повреждения суставов при лучевой болезни. М., 1967, с. 21—101.
Разумова И. Л., Алексеева Н. Н. О влиянии РНК на скорость регенерации нервных волокон перерезанного периферического нерва. Труды Ин-та нормальной и патологической физиологии. АМН СССР. Т. 13. М., 1970, с. 68—70.
Рогачева С. А. Терапевтическое действие клеток костного мозга и ДНК при острой лучевой болезни. Дисс. канд. Б. М., 1964.
Романцев Е. Ф., Блохина В. Д. и др. Ранние радиационно-биохимические реакции. М., 1966.
Саидрасулов С. С. Влияние комплекса, включающего нуклеиновые кислоты и витамины, на репаративную регенерацию колото-резанных проникающих ран миокарда. Изв. АН СССР. Серия биол., 1963, № 1, с. 99—104.
Скуба Н. Д. Количественное изменение ДНК в условиях репаративной регенерации миокарда в возрастном аспекте. В кн.: Кровообращение и старость. Киев, 1965, с. 130—135.
Спирин А. С., Белицина Н. В. Информационные РНК в раннем эмбриогенезе. Успехи совр. биол., 1965, т. 59, № 2, с. 187—204.
Стрелин Г. С. Процессы регенерации и репарации при лучевых повреждениях. Мед. радиол., 1960, № 2, с. 77—86.
Теплиц Н. А. Динамика изменений содержания нуклеиновых кислот при рентгеновском облучении, подавлении и восстановлении регенерационной способности конечностей у аксолотлей. Докл. АН СССР, 1964, т. 156, с. 1207—1209.
Токарская В. И., Уманский С. Р., Кузин А. М. Физико-химические свойства фракций ДНК. Молекулярная биол., 1967, т. I, № 4, с. 511—517.
Торбенко В. П., Сахаров Б. В. Белковые фракции сыворотки крови при открытом внутрисуставном повреждении коленного сустава, осложненном лучевой болезнью. В кн.: Переломы костей и повреждения суставов при лучевой болезни. М., 1967, с. 187—193.
Тучкова С. Я. О тканевых источниках при восстановлении регенерационной способности конечностей у аксолотлей, подавленных рентгеновским облучением. Докл. АН СССР, 1967, т. 176, с. 1181—1184.
Учитель И. Я., Хасман Э. Л., Зайцева Л. Г. Сохранность антигена в лизосомных и РНК-фракциях селезенки и печени кроликов во время антителообразования. Ж. микробиол., 969, № 8, с. 12—17.
Цыганков А. П. Гистохимическое и биохимическое изучение процесса проникновения РНК в клетки лимфатического узла кролика. Вестн. АМН СССР, 1964, № 12, с. 65—69.
Чеботарев Е. Е., Рябова Э. Э., Индык В. М. Защитное действие ДНК при нейтронном облучении. В кн.: Вопросы радиобиологии. Минск, 1969, с. 128—134.
Чернух А. М., Вышепан Е. Д., Алексеева Н. Н. и др. Влияние экзогенной РНК на триптофанпирролазу печени. Вопр. мед. химии, 1971, т. 17, № 2, с. 184—188.
Чернух А. М., Вышепан Е. Д., Разумова И. Л. и др. Особенности

течения экспериментального цирроза печени под влиянием печеночной РНК. Бюлл. экспер. биол., 1970, № 10, с. 12—15.
Чернух А. М., Вышепан Е. Д., Шукалова Т. Ф. Влияние гомологичной печеночной РНК на коллаген и триптофанпирролазу печени при отравлении крыс CCl_4. Бюлл. экспер. биол., 1971, № 6, с. 43—46.
Adler F. L., Fischman M., Dray S. Antibody formation initiated in vitro. 3. Antibody formation and allotypic specificity directed by ribonucleic acid from peritoneal exudate cells. J. Immunol., 1966, v. 97, p. 554—558.
Askonas B. A., Brent L., Gowland G. e. a. Failure to change the antigenicity of skin grafts by incubatio n with allogeneic ribonucleic acid. Nature (Lond.), 1966, v. 212, p. 1257—1258.
Askonas B. A., Rhodes J. M. Immunogenicity of antigen-containing ribonucleic acid preparations from macrophages. Nature (Lond.), 1965, v. 205, p. 470—474.
Bacq Z. M., Alexander P. Fundamentald of radiobiology. Oxford, 1961.
Bensch K. G., King D. W. Incorporation of heterologous deoxyribonucleic acid into mammalian cells. Science, 1961, v. 133, p. 381—382.
Betheil J. J., Arnstein H. R. Stimulation of cell-free protein synthesis by homologous and heterologous messenger ribonucleic acid. Biochem. biophys. Res. Commun., 1965, v. 21, p. 323—327.
Bishop D. C., Abramoff P. In vitro uptake of isofopically labeled RNA by mammalian spleen cells. Proc Soc. exp. Biol., 1965, v. 120, p. 378—383.
Bishop D. C., Pisciotta A. V., Abramoff P. Synthesis of normal and "immunogenic RNA" in peritoneal macrophage cells. J. Immunol., 1967, v. 9, p. 751—759.
(Brachet J.). Браше Ж. Биохимическая эмбриология. М., 1961.
Butros J. Differentiation of explanted fragments of early chick blastoderm. J. expl. Zool., 1963, v. 154, p. 125—133.
Butros J. Manpower production opportunities created by research and training grants. J. Embryol. exp. Morph., 1965, v. 13, p. 119—128.
Cochen E. Partial characterization by molecular hybridization of RNAs from immunocompetent cells exposed to antigen. Nature (Lond.), 1969, v. 221, p. 685—687.
Cochen E. P., Pasks J. J. Antibody production by nonimmune spleen cells incubated with RNA from immuniced mice. Science, 1964, v. 144, p. 1012—1013.
Cole L. J., Ellis M. E. Radiation-induced changes in tissue nucleic acids: release of soluble deoxypolynucleotides in the spleen. Radiat. Res., 1957, v. 7, p. 508—517.
Cook L., Davidson A. B., Davis D. V. e. a. Ribonucleic acid: effect on conditioned behavior in rats. Science, 1963, v. 141, p. 268—269.
Decken A. von der, The effect of chick-liver ribonucleic acid on amino acid—incorporation systems from rat liver. Biochem. J., 1965, v. 97, p. 870—878.
Diamondstone T. I., Litwack G. Differential response of inducible mammalian liver enzymes to in vivo stimulation by ribonucleic acid and a nucleotide mixture. Biochem. biophys. Acta, 1962, v. 57, p. 583—587.
Emanuelsson H. Vatiations in nucleic acid concentration during the

debelopment of early chick embryos. Acta phyisiol. scand., 1958, v. 44, p. 336—364.
Esposito S. RNA—induced biosynthesis of adult haemoglobin in cooleys disease. Experientia, 1964, v. 20, p. 643—644.
Feldman M., Elson D., Globerson A. Antibodies in ribonucleoproteins. Nature (Lond.), 1964, v. 185, p. 317—318.
Finnegan C. V., Biggin W. P. A study of the influence of isolated calf spleen RNA on amphibian histogenesis. J. Embryol. exp. Morph., 1966, v. 15, p. 1—14.
Fishman M., Adler F. L. Antibody formation initiated in vitro. J. exp. Med., 1963, v. 117, p. 595—602.
Franzl R. E. Immunogenic sub-cellular particles obtained from spleens of antigen-injected mice. Nature (Lond.), 1962, v. 195, p. 457—458.
Friedman H. Antibody plaque formation by normal mouse spleen cell cultures exposed in vitro to RNA from immune mice. Science, 1964, v. 146, p. 934—936.
Gartler S. M., Pavlovskis O. R. Demonstration of cellular uptake of polymerized DNA in mammalian cell cultures. Biochem. biophys. Res. Commun., 1960, v. 3, p. 127—131.
Glimcher M. J., Katz E. P., Travis D. F. The solubilization and reconstitution of bone collagen. J. Ultrastruct. Res., 1965, v. 13, p. 163—171.
Goldfeder A., Selig J. N., Miller L. A. Radiosensitivity and biological properties of tumours. Int. J. Radiat. Res., 1967, v. 12, p. 13—25.
Halac E., Rife U., Rinaldini L. Changes in composition of tibonucleic acid induced by antigenic stimulation. Nature (Lond.), 1964, v. 202, p. 558—559.
Harris J. W. Response of isolated leucocyte lysosomes to gamma irradiation. Radiat. Res., 1966, v. 28, p. 766—778.
(Hay E.) Хей Э. Регенерация. М., 1969.
Hill M., Jakubickova V. Intercellular passage of DNA as revealed in bohe marrow autoradiographs. Exp. Cell Res., 1962, v. 26, p. 541—551.
Hillman N. W., Niu M. C. Chick cephalogenesis. I. The effect of RNA on early cephalic development. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1963, v. 50, p. 486—493.
Ho Yen-sen, Chao Ten-chen, Li Si-oh. Studies on the mechanism of inductive formation of tryptophan pyrrolase in rat liver. Acta biochim. biophys. sin., 1965, v. 5, p. 153—163.
Holoubek V., Fanshier L., Crocker T. T. The inhibition of nuclear RNA synthesis by added RNA. Exp. Cell Res., 1966, v. 44, p. 362—374.
Jacherts D. Antikörpersynthese in vitro. IX. Synthese von informatorischer RNS und Antikörpern in einem zellfreien System aus menschlochen peripheren Leukocyten. Z. med. Mikrobiol., 1968, Bd 154, S. 245—266.
Jacob F., Monod J. Genetic regulatory mechanismus in the synthesis of proteins. J. molec. Biol., 1961, v. 3, p. 318—356.
Jankovič B. D., Isakovič K., Horvat J. Failure of ribonucleoprotein to transfer antibody formation. Nature (Lond.), 1959, v. 183, p. 1400—1401.
Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody—producing cells. Science, 1963, v. 140, p. 405.

Karpfel Z., Soska J., Drasil V. Effect of pyrimidine deoxyrifonucleotides on the regeneration of bone—marrow in irradiated mice. Nature (Lond.), 1959, v. 183, p. 1600—1601.
Kay E. R. Incorporation of deoxylibonucleic acid by mammalian cells in vitro. Nature (Lond.), 1961, v. 191, p. 387—388.
Lazda V. A., Starr J. L., Rachmeler M. The synthesis of ribonucleic acid during early antibody induction. J. Immunol., 1968, v. 101, p. 349—358.
Ledoux L., Gerber G. B., Charles P. e. a. Uptake of labelled DNA by isolated perfused organs. Experientia, 1967, v. 23, p. 16—18.
Mach B., Vassalli P. Biosynthesis of RNA in antibody-producing tissues. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1965, v. 54, p. 975—982.
Maisin J., Dumont P., Dunjic A. Yeast ribonucleic acid and its nucleotides as recovery factors in rats receiving an acute whole—body dose of X-rays. Nature (Lond.), 1960, v. 186, p. 487—488.
Mannick J. A., Egdahl R. H. Ribonucleic acid in "transfortation" of lymphoid cells. Science, 1962, v. 137, p. 976—977.
Mannick J. A. RNS-induced alterations in immunological behavior of lymphoid cells. В кн.: Genetic variations of somatic cells. Prague, 1966, c. 117—126.
Malpoix P. Inflience of extraneous ribonucleic acid on the differentiation of haematopoietic tissue in chick embryos. Nature (Lond.), 1964, v. 203, p. 520.
Maxwell E., Ashwell G. Effect of X-irradiation on phosphorus metabolism in spleen mitochondria. Arch. Biochem., 1953, v. 43, p. 389—398.
Miletic B., Petrovic D., Han A. Restoration of viability of x-irradiated L-strain cells by isologoues and neterologous highly polymerized deoxyribonucleic acid. Radiat. Res., 1964, v. 23, p. 94—103.
Moos M. L. Extraction of an osteogenic inductor factor from bone. Science, 1958, v. 127, p. 755.
Neuman M. W. The chemical dynamics of bone mineral. Chicago, 1958.
Nirenberg M. W., Matthei J. H. The depladence of cellfree protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1961, v. 47, p. 1588—1601.
Nirenberg M. W., Matthei S. H., Jones O. W. An intermediate in the biosynthesis of polyphenylalanine directed by synthetic template RNA. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1962, v. 48, p. 104—109.
Niu M. C. New approaches to the problem of embryonic induction. В кн.: Cellular mechanisms in differentiation and growth. Ed. by D. Rudnick. Princeton, 1956, p. 155—171.
Niu M. C. Current evidence concerning chemical inducers. В кн.: Evolution of nervous control from primitive organisms to man. Washington, 1959, p. 7—30.
Niu M. C. The mode of action of ribonucleic acid. Develop. Biol., 1963, v. 7, p. 379—393.
Niu M. C. The stability of the RNA-induced cellular changes. Fed. Proc., 1963, v. 22, p. 354.
Niu M. C. Mode of action of the exogenous ribonucleic acid in cell function. В кн.: Metabolic control mechanisms in animal cells. Washington, 1964, p. 167—180.

Niu M. C., Cordova C. C., Niu L. C. Ribonucleic acid—induced changes in mammalian cells. Proc nat. Acad. Sci. (Wash.), 1961, v. 47, p. 1689—1700.
Niu M. C., Cordova C. C., Niu L. C. e. a. RNA-induced biosynthesis of specific enzymes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1962, v. 48, p. 1964—1969.
Niu M. C., Niu L. C. Biological function of ribonucleic acid. В кн.: Genetic vatiations of somatic cells. Prague, 1966, c. 101—108.
Nygaard O. F., Potter R. L. Effect of radiation on DNA metabolism in various tissues of the rat. Radiat. Res., 1962, v. 16, p. 243—252.
Savkovič N. Recovery of reproductive ability by homologous testes DNA of rats irradiated during the infantile period. Nature (Lond.), 1964, v. 203, p. 1297—1298.
Savkovič N., Kasaki J., Hajdunckovič S. Recovery effect of heterologous deoxyribonucleic acid from various organs on irradiated mice. Nature (Lond.), 1966, v. 211, p. 1179—1180.
(*Saxen L., Toivonen S.*) *Саксен Л., Тойвонен С.* Первичная эмбриональная индукция. М., 1963.
Schwarz M. R., Rieke W. O. Appearance of radioactivity in mouse cells after administration of labeled macromolecular RNA. Science, 1962, v. 136, p. 152—154.
Sevastikoglou J. A. Morphological studies of fracture healing in tissue culture. Acta orthop. scand., 1962, v. 32, p. 199—209.
Sussdorf D. H. Rise of antibody titre in cell—free spleen preparations incubated in vitro. Nature (Lond.), 1961, v. 191, p. 770.
Vorbrodt A., Vorbrodt K. Cytochemical studies of some organs of mice intraperitoneally injected with deoxyribonucleic acid. Folia histochem. cytochem. 1963, T. I, c. 237—252.
(*Waddington C. H.*) *Уоддингтон К. Х.* Морфогенез и генетика. М., 1964.
Webb J. M., Levy H. B. A sensetive method for the determination of deoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms. J. biol. Chem., 1955, v. 213, p. 107—117.
Weisberger A. S. Induction of alered globin synthesis in human immature erythrocytes incubated with ribonucleoprotein Proc. nat Acad. Sci. (Wash.), 1962, v. 48, p. 68—80.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3

Глава I. **Индукция процессов регенерации кости экзогенными гомологичными РНК** 14

Вводные замечания 14
Эффективность различных концентраций экзогенной РНК в опытах in vitro и in vivo 20
Рентгено-морфологический анализ восстановительных процессов в зоне повреждения кости под влиянием экзогенных РНК различного происхождения 23
Индукция биосинтеза белков регенерата кости под влиянием различных препаратов экзогенных РНК 31
Стимулирование биосинтеза собственных нуклеиновых кислот клеток гомологичного органа под влиянием экзогенной РНК 42
Органоспецифические и межвидовые различия в действии экзогенных РНК 44
Механизм действия экзогенной РНК в остеогенных клетках 55

Глава II. **Влияние экзогенных нуклеиновых кислот на восстановительные процессы в печени** 65

Воздействие экзогенной ДНК и ДНП при частичной гепатэктомии 65
Лечебный эффект экзогенных РНК при циррозе печени . 75

Глава III. **Экзогенные РНК как факторы стимуляции восстановительного процесса в миокарде** . . . 83

Глава IV. **Влияние РНК на регенерацию тканей нервной системы. Стимуляция регенераторных процессов в периферических нервных волокнах** . . 95

Стимуляция физиологической регенерации нервной ткани коры мозга при помощи экзогенной РНК 98

Глава V. **Экзогенные нуклеиновые кислоты как факторы регуляции роста тканей и органов** 102

Глава VI. **Нарушения метаболизма ДНК и РНК в клетке после радиационного поражения и их коррекция экзогенными нуклеиновыми кислотами** . 113

Влияние экзогенных нуклеиновых кислот на восстановительные процессы кроветворной ткани 117
Терапевтический эффект действия предшественников нуклеиновых кислот 117
Действие полимерных ДНК 126
Особенности течения восстановительных процессов под влиянием комбинированных препаратов полимерных РНК и ДНК 140
Регенерация кости у облученных животных 147
Экспериментально-теоретическое обоснование применения экзогенных РНК при комбинированных поражениях 147
Заживление перелома кости у экспериментальных животных на фоне лучевой болезни и введения экзогенной РНК 149
Влияние экзогенных РНК на восстановление регенерационной способности тканей аксолотля при местном и общем рентгеновском облучении 163
Механизм действия экзогенных нуклеиновых кислот на восстановительные процессы в клетках тканей облученных животных 168

Глава VII. **Индукция антителообразования под влиянием экзогенной РНК** 177

Заключение 188
Литература 192

Белоус Аполлон Максимович,
Годин Виктор Павлович, Панков Евгений Яковлевич

Экзогенные нуклеиновые кислоты и восстановительные процессы

Редактор *Е. А. Гоголина*
Художественный редактор *Т. М. Смага.* Техн. редактор *Н. К. Петрова*
Переплет художника *О. А. Четверикова.* Корректор *Л. П. Тарарина*

Сдано в набор 18/III—1974 г. Подписано к печати 5/VI—1974 г. Формат бумаги 84×108[1]/32. 6,25 печ. л. (условных 10,50 п. л.) 10,83 уч.-изд. л. Бумага тип. № 1 глазир. Тираж 3000 экз. МН-71. Цена 1 р. 19 к. Заказ № 6703.

Издательство «Медицина». Москва, Петроверигский пер., 6/8

Типография им. Смирнова Смоленского облуправления издательств, полиграфии и книжной торговли, г. Смоленск, пр. им. Ю. Гагарина, 2.

1 р. 19 к.

6/279
33252

МЕДИЦИНА — 1974