

Действительный член АМН СССР В. М. ЖДАНОВ, М. И. ПАРФАНОВИЧ,
В. В. РИТОВА, Е. А. ПАКТОРИС, Э. И. СЧАСТНЫЙ,
Л. А. ИСАЕВА, И. Г. ХАРИТОНЕНКОВ, С. Г. ЛЕВИНА,
З. С. АЛЕКБЕРОВА, В. А. НАСОНОВА

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

В настоящее время системная красная волчанка многими принимается аутоиммунной болезнью парамиксовирусной (коревой) этиологии. Следующие факты обосновывают это предположение: высокий титр коревых антител у больных (¹, ²), наличие в цитоплазме пораженных клеток трубчатых структур, сходных с нуклеокапсидами парамиксовирусов (³⁻⁶), чувствительных к рибонуклеазе (⁷), обнаружение в этих же клетках антигенов коревого вируса методами иммунофлюоресценции (⁸). Было высказано предположение об интеграции вирусного генома клеточным (⁸, ⁹), однако это предположение никем не проверилось, а попытки выделить вирус кори или другой парамиксовирус из пораженных тканей до сих пор оставались безуспешными.

Для проверки гипотезы об интеграции вирусного генома клеточным, которая высказывалась и нами (¹⁰), мы применили метод молекулярной гибридизации РНК вируса кори и ДНК из тканей больных системной красной волчанкой.

Вирус кори (штамм Эдмонстон) выращивали на перевиваемой культуре обезьяньих клеток Vero или на первичной культуре куриных фибробластов. Для метки вирионной РНК в культуру вносили ³H-уридин или смесь ³H-уридина, ³H-аденина и ³H-гуанозина (30–50 мкС/мл) дробными дозами в течение 3–4 дней накопления вируса в культуре. Вирус концентрировали и очищали в сахарозных градиентах, как было описано ранее (¹¹), РНК экстрагировали детергент-фенольным методом, а удельную радиоактивность ее определяли по рибосомальной РНК меченой культуры.

ДНК из тканей погибших от системной красной волчанки, из лейкоцитов крови и клеточных осадков мочи больных получали следующим образом. Ткани измельчали в гомогенизаторе Поттера в буфере ТНЭ (трис-НСl 0,01 М, рН 7,4, NaCl 0,1 М, ЭДТА 0,001 М), затем клетки разрушали в гомогенизаторе Даунса, ядра осаждали центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин., осадок ресуспендировали в буфере ТНЭ, добавляли 0,2% додецилсульфатнатрия (ДСН), проназу (200 мкг/мл), инкубировали материал при 37° в течение 2–3 час., затем экстрагировали ДНК дважды фенолом, осаждали спиртом и оставляли на ночь при –20°. На следующий день ДНК осаждали из-под спирта в центрифуге, растворяли в буфере ТНЭ, обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE (10 мкм, амплитуда 5, два цикла по 20 сек.), примеси РНК удаляли щелочным гидролизом (0,5 М NaOH, 37°, 18 час.), нейтрализовали 0,5 М HCl, осаждали ДНК спиртом и хранили при –20°.

Перед началом гибридизации ДНК денатурировали кипячением в течение 10 мин., быстро охлаждали и смешивали с РНК вируса кори, меченой ³H-предшественниками. Гибридизацию проводили в буфере, содержащем трис-НСl 0,02 М, рН 7,4, NaCl 0,6 М, ЭДТА 0,001 М, ДСН 0,05%, при 68°, отбирая аликвоты, соответствующие разным значениям C_0t (¹²)

и храня их до окончания опыта при -20° . По окончании инкубации материал разводили в 10 раз буфером ТН (трис HCl $0,02 \text{ M}$, pH $7,4$, NaCl $0,4 \text{ M}$), пробы обрабатывали панкреатической рибонуклеазой и определяли долю РНК, ставшей устойчивой к ферменту в каждой пробе.

На рис. 1а, б представлены результаты серии опытов, в которых исследовалась кинетика гибридизации РНК вируса кори с ДНК из лейкоцитов крови двух больных системной красной волчанкой, и с ДНК из лимфоузла третьего больного. Во всех трех случаях были получены значения

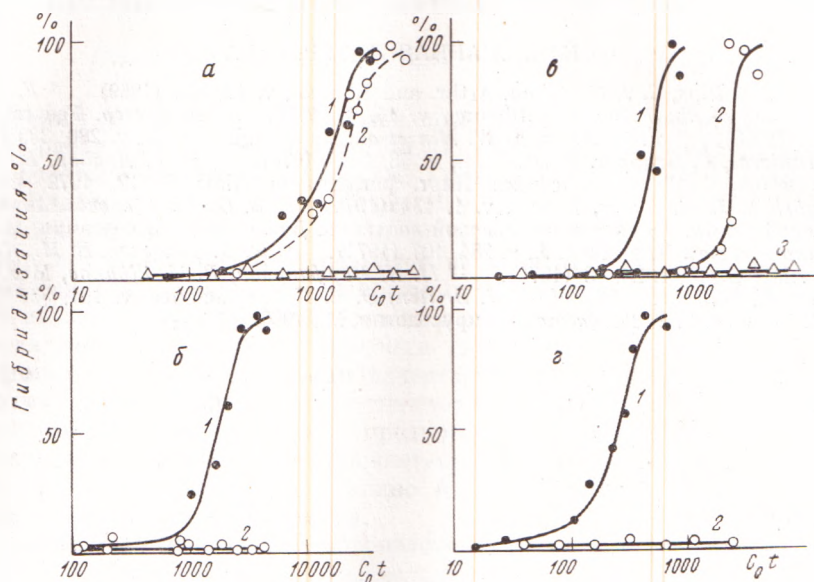


Рис. 1. Кинетика гибридизации коревой РНК, меченой ^3H -предшественниками с ДНК лейкоцитов (а), лимфатического узла (б), костного мозга (в) и лейкоцитов и почечного эпителия (г) больных системной красной волчанкой. а: 1, 2 — ДНК лейкоцитов двух больных, 3 — ДНК плаценты человека; б: 1 — ДНК лимфатического узла больного, 2 — ДНК селезенки здорового человека. в: 1 — ДНК костного мозга больного, 2 — ДНК плаценты человека; г: 1 — ДНК лейкоцитов и почечного эпителия больного, 2 — ДНК плаценты здорового человека

$1/2 C_0 t$, превышающие $1000 \text{ мол}/(\text{сек}\cdot\text{л})$, что соответствует реассоциации уникальных последовательностей (1 геном-эквивалент на 1 клетку). В двух других случаях, как указано на рис. 1в, г, получены значения $1/2 C_0 t$ порядка 500 и $240 \text{ мол}/(\text{л}\cdot\text{сек})$, что характерно для повторяющихся последовательностей (2–5 геном-эквивалентов на 1 клетку) (12). Контрольные образцы ДНК из селезенки плода человека и плаценты здоровой женщины не обнаружили тенденции гибридизации даже при высоких значениях $C_0 t$, соответствующих 3000 – $5000 \text{ мол}/(\text{сек}\cdot\text{л})$, показав, таким образом, отсутствие тканевых взаимодействий, что было обосновано гетерогенностью систем, в которых выращивали вирус кори (клетки куриных эмбрионов, обезьяньи клетки) и которые являлись источником ДНК (клетки человека).

Проведенные исследования позволяют дать рациональное объяснение механизмам аутоиммунных процессов, развивающихся при системной красной волчанке, положив в их основу интеграцию генома вируса кори (или сходного с ним вируса) клеточным геномом. Частичная экспрессия этих генов, ставших клеточными, может сопровождаться синтезом вирус-специфических белков, в том числе — антигенов, встраивающихся в паружные мембраны клеток, что характерно для парамиксовирусов (13). Эти антигены, с одной стороны, могут стимулировать образование специ-

фических антител, с другой стороны, делают образующие их клетки мишенью для атаки иммунокомпетентными клетками Т-ряда.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР

Поступило
4 VI 1974

Институт ревматизма
Академии медицинских наук СССР

Первый московский медицинский институт
им. И. М. Сеченова
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. E. Phillips, C. J. Christian, *Arthr. and Rheum.*, v. 12, 688 (1969). ² F. Hollinger, J. Sharp et al., *Arthr. and Rheum.*, v. 14, 1 (1971). ³ R. Fresco, *Federat. Proc.* v.27, 246 (1968). ⁴ F. Györkey, K. W. Min et al., *New Engl. Med. J.*, v. 280, 333 (1969). ⁵ M. Prunieres, C. Grupper, *Press. Med.*, v. 78, 841 (1970). ⁶ Е. О. Дрейер, В. А. Насонова и др., Тез. научн. сессии Инст. ревматизма АМН СССР, 1972, стр. 34. ⁷ F. Györkey, J. Sinkovics, *Lancet*, v. 1, 131 (1971). ⁸ З. С. Алекберова, Материалы к вирусной этиологии системной красной волчанки. Докторская диссертация, М., 1973. ⁹ J. Sinkovics, *New Engl. Med. J.*, v. 284, 107 (1971). ¹⁰ В. Д. Соловьев, В. М. Жданов, *Вестн. АМН СССР*, т. 28, 18 (1974). ¹¹ М. Н. Парфанович, В. М. Жданов, *Мол. биол. вирусов*, М., 1973, стр. 156. ¹² R. J. Britten, D. E. Kohne, *Science*, v. 161, 529 (1968). ¹³ В. М. Жданов, С. Я. Гайдамович, *Вирусология*, М., 1966.