

В. К. ПОДГОРОДНИЧЕНКО, Л. Е. БРЫКСИНА, В. Л. КАРПОВ,
А. М. ПОВЕРЕННЫЙ

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТОК ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ С ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 6 VI 1975)

Антитела к двуспиральной РНК определяются в сыворотках больных различными коллагенозами (¹⁻³). Сыворотки здоровых людей, реагирующие с двуспиральной РНК, обнаруживаются значительно реже даже при использовании высокочувствительных методов, а их связывающая активность, как правило, существенно ниже (²). Вследствие этого изучение специфичности взаимодействия сывороток здоровых людей с двуспиральными РНК вызывает значительные затруднения.

Как показано в настоящей работе, такое исследование возможно с помощью радиоиммунологического метода при использовании ¹²⁵J полиИ·полиЦ с высокой удельной активностью.

Иодирование двуспирального комплекса полиИ·полиЦ (Calbiochem, США) ¹²⁵J (Венгрия) осуществляли по методу Коммерфорда (⁴). Взаимодействие сывороток с ¹²⁵J полиИ·полиЦ определяли методом, основанным на способности иммунного комплекса адсорбироваться на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах (⁵). В пробу вносили в 0,1 мл 0,15 М NaCl, 0,01 мкг ¹²⁵J полиИ·полиЦ с удельной активностью ~100 000 имп./мин. на 1 мкг, 0,1 мл сыворотки, инактивированной прогреванием при 56° в течение 30 мин., и 0,8 мл стандартного солевого раствора (0,15 М NaCl с 0,015 М цитратом натрия). После 30 мин. инкубации при 20° пробы наносили на фильтры синпор 8 (ЧССР). Радиоактивность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Ansitron», США. Активность сывороток выражали в процентах связывания фильтрами радиоактивности ¹²⁵J полиИ·полиЦ от количества внесенной в пробу. При постановке реакции ингибирования к 0,1 мл сыворотки добавляли 1 мкг немеченной полиИ·полиЦ, остальные ингибиторы в количестве 5 мкг на пробу. После инкубации (20 мин. при 20°) вносили ¹²⁵J полиИ·полиЦ и вновь инкубировали 20 мин. Общий объем реакционной смеси составлял 1 мл.

В реакции ингибирования использовали декстрансульфат (мол. вес 500 000) «Ferah», Берлин, препараты ДНК и РНК, получение и характеристики которых описаны в работе (²).

Фракционирование сыворотки крови на сефадексе G-200 осуществляли следующим образом. На колонку (48×2 см) наносили 1 мл сыворотки, собирали фракции по 2 мл и определяли оптическую плотность при 280 нм. Связывающую активность фракций определяли, добавляя к 0,5 мл элюата 0,01 мкг ¹²⁵J полиИ·полиЦ (1000 имп./мин) и 0,4 мл стандартного солевого раствора. После 30 мин. инкубации смесь наносили на нитроцеллюлозные фильтры и определяли радиоактивность адсорбированного комплекса.

Исследованные сыворотки здоровых людей в возрасте от 20 до 50 лет увеличивали адсорбцию ¹²⁵J полиИ·полиЦ фильтрами. На рис. 1 представлены результаты связывания ¹²⁵J полиИ·полиЦ сыворотками людей и различных животных. Из рис. 1 видно, что связывающая активность сы-

вороток мышей (СВА), крыс (Вистар), кроликов и пороков, которые значительно увеличивают адсорбцию ^{125}J полиИ·полиЦ по сравнению с контролем. Все 20 исследованных сывороток больных каллагенозами также обладали способностью адсорбировать ^{125}J полиИ·полиЦ на фильтрах.

Характеризуя специфичность реагирующего с ^{125}J полиИ·полиЦ фактора, присутствующего в сыворотках здоровых людей, исследовали способность препаратов ДНК, РНК, декстрансульфата и полиИ·полиЦ ингибировать реакцию между сыворотками и меченым двуспиральным ком-

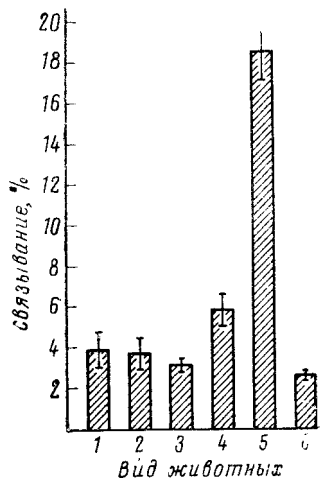


Рис. 1

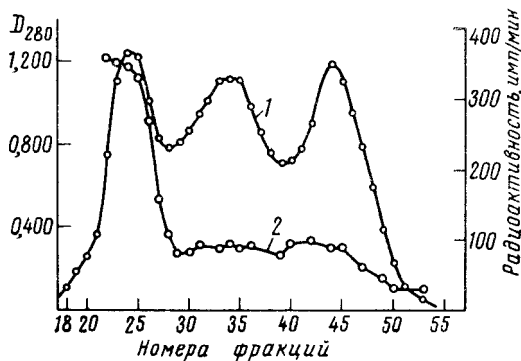


Рис. 2

Рис. 1. Взаимодействие сывороток здоровых людей и различных животных с ^{125}J полиИ·полиЦ: 1 — мышей (10 исследованных сывороток), 2 — кроликов (10), 3 — пороков (10), 4 — крыс (5), 5 — людей (20), 6 — контроль (без сыворотки)

Рис. 2. Хроматография сыворотки здорового человека на колонке с сефадексом G-200. 1 — D_{280} , 2 — радиоактивность

плексом (табл. 1). Как явствует из табл. 1, только препараты полиИ·полиЦ во всех случаях обладали сильной ингибирующей способностью. Наблюдаемое в ряде экспериментов неполное ингибирование, очевидно, связано с погрешностями метода. В значительно меньшей степени и не со всеми сыворотками реагировала рибосомная РНК. Декстрансульфат, препараты нативной и денатурированной ДНК значительно слабее ингибировали взаимодействие между сыворотками и ^{125}J полиИ·полиЦ. Обращает на себя внимание тот факт, что специфичность сывороточного фактора к двуспиральной РНК тем выше, чем выше связывающая активность сывороток.

При хроматографии 4-х сывороток на колонке (48×2 см) с сефадексом G-200 показано, что основная связывающая активность сосредоточена во фракциях первого пика. При этом специфичность, присущая цельной сыворотке, сохраняется и после хроматографии (табл. 1).

На рис. 2 представлены результаты одного эксперимента по определению связывающей активности фракций, полученных после пропускания сывороток через колонку G-200. Интересно отметить, что активность фракций 1-го пика во всех случаях превышала суммарную активность сывороток. Обработка 3-х сывороток 0,5 М 2-меркаптоэтанолом (Schuchardt, ФРГ) в течение 1 часа привела к ингибированию связывающей активности на 29, 39 и 57%, в то время как сыворотки кроликов, иммунизированных полиИ·полиЦ, на 90% утратили способность взаимодействовать с ^{125}J полиИ·полиЦ. Фактор сыворотки, реагирующей с двуспиральной РНК, устойчив к прогреванию при 56° в течение 30 мин., но полностью инактивируется при 70° в течение 10 мин.

Таблица 1

Влияние различных ингибиторов на связывание сыворотками здоровых людей ^{125}J полиИ·полиЦ

Сыворотки доноров	Связывание сыворотками ^{125}J полиИ·полиЦ, имп/мин	Ингибирование, %				
		нативная ДНК	денатурированная ДНК	РНК	полиИ·полиЦ	декстран-сульфат
А	323	0	2,7	0	100	—
Б	379	0	0	2,5	88,5	—
Г	239	0	—	—	83,6	—
В	169	0	6,5	56,9	88,5	—
Д	208	0	26,4	85,8	89,7	—
Ж	164	9,7	43,3	44,3	93,3	0
З	190	3,3	0	60,0	100	18,5
И	130	18,6	27,2	41,5	85,8	61,5
Фракция * 1-го пика (сыворотка А)	414	0	0	0	100	0

* Связывающую активность фракций определяли, как описано в подписях к рис. 2.

Известно, что в сыворотках людей содержатся «нормальные» антитела к односпиральной ДНК (⁶). Вполне вероятно, что взаимодействие сывороток здоровых людей с ^{125}J полиИ·полиЦ отражает присутствие в них «нормальных» антител к двуспиральной РНК, проявляющих такую же специфичность к двуспиральной РНК, как и антитела из сывороток больных системной красной волчанкой (⁷). Ранее нами в реакции пассивной гемагглютинации было показано увеличение числа сывороток, реагирующих с двуспиральной РНК, у лиц пожилого возраста, которое связывалось с большей вероятностью инфицирования их РНК-содержащими вирусами (²). При таком объяснении становится понятным наблюдаемое в нашей работе отсутствие связывающей активности у животных с коротким периодом жизни. Однако, имеющиеся сведения о наличии в неинфицированном организме человека двуспиральной РНК (⁸), обладающей биологической активностью, позволяют предположить существование фактора, либо регулирующего эту активность, либо способного защищать двуспиральную РНК от действия сывороточных РНКаз.

Научно-исследовательский институт
медицинской радиологии
Академии медицинских наук СССР
Обнинск Калужской обл.

Поступило
6 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Насонова, З. С. Алекберова и др., Терапевт. архив, № 11, 24 (1972).
- ² В. К. Подгородниченко, А. М. Поверенный и др., Вopr. мед. хим., т. 19, 6, 578 (1973).
- ³ M. R. Attias, R. A. Sylvester, N. Talal, Arthritis and Rheumatism, v. 16, 6, 719 (1973).
- ⁴ S. L. Commerford, Biochemistry, v. 10, 11, 1993 (1974).
- ⁵ I. N. Gavrilovskaya, I. K. Lavrova et al., Virology, v. 62, 1, 276 (1974).
- ⁶ А. М. Поверенный, М. И. Леви, Вopr. мед. хим., т. 11, 1, 85 (1965).
- ⁷ N. Talal, R. C. Gallo, Nature New Biol., v. 240, 240 (1972).
- ⁸ U. Torelli, G. Torelli, R. Cadossi, Exp. Cell Res., v. 88, 188 (1974).