

УДК 616.12-008..3..331.1.

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ CpG – БОГАТЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК НА ФОРМИРОВАНИЕ ГИПЕРТЕНЗИИ У СПОНТАННО-ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС (SHR)

Н.Н. Вейко^{1}, И.Л. Конорова², М.Е. Неверова¹, О.В. Фиделина¹,
Н.А. Мкртумова¹, Е.С. Ершова¹, М.С. Конькова¹, А.Ю. Постнов³*

¹ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, 115478, Москва,
ул. Москворечье, д. 1, МГНЦ РАМН; тел.: 111-85-76; факс: 324-07-02;
эл. почта: ribgene@rambler.ru

²ГУ Научный центр неврологии РАМН, Москва

³ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Росмедтехнологий, Москва

Исследованы свойства внеклеточной ДНК плазмы крови (вкДНК) больных эссенциальной артериальной гипертензией. Концентрация вкДНК у больных не отличалась от таковой у здоровых доноров, однако содержание маркера CpG – богатых фрагментов ДНК (CpG-ДНК) – транскрибируемой области рибосомного повтора (ТОРДНК) в составе вкДНК у них оказалось повышенным. Для выяснения роли CpG-ДНК в развитии гипертензии, 2-дневным крысам спонтанно-гипертензивной линии SHR и нормотензивной линии WKY однократно подкожно вводили 700 нг фрагмента ТОРДНК человека с целью выработки антител к CpG-ДНК и изменения содержания CpG – ДНК в составе вкДНК. Через 9 недель артериальное давление (АД) у крыс SHR, “иммунизированных” CpG-ДНК, было значительно ниже, чем у контрольных животных и не отличалось от такового у крыс WKY. С возрастом АД у “иммунизированных” крыс SHR повышалось, но достигало стабильно высоких показателей, характерных для половозрелых особей SHR, с задержкой на 8 недель. Анализ вкДНК на 17-й неделе постнатального развития показал, что у “иммунизированных” крыс SHR снижена концентрация вкДНК и содержание в её составе низкомолекулярных фрагментов и увеличено содержание CpG-ДНК. Этому сопутствовало увеличение в 3,5 раза эндонуклеазной активности крови и снижение количества не связанных с вкДНК антител к CpG-ДНК. При этом общее количество антител к CpG-ДНК у “иммунизированных” крыс не отличалось от такового у контрольных особей. Таким образом, более позднее формирование стабильно повышенного АД у “иммунизированных” крыс SHR оказалось несвязанным с увеличением выработки антител к CpG-ДНК. Обсуждаются возможные причины выявленного эффекта.

Ключевые слова: рибосомные гены, внеклеточная ДНК, артериальная гипертензия, SHR, WKY, антитела к ДНК.

ВВЕДЕНИЕ. Артериальная гипертензия (АГ), одно из широко распространенных заболеваний в развитых странах, представляет самую частую хроническую мультифакторную патологию, которая обусловлена как генетической

* - адресат для переписки

предрасположенностью, так и воздействием факторов окружающей среды [1]. В предыдущем исследовании мы показали, что у больных ишемической болезнью сердца, протекающей на фоне АГ 2-й и 3-й степени, значительно изменен состав вкДНК крови: в несколько раз по сравнению со здоровыми донорами (ЗД) увеличено содержание GC-богатой последовательности – транскрибируемой области рибосомного повтора (ТОрДНК) [2]. Накопление CpG – ДНК в составе вкДНК не безразлично для организма. CpG-ДНК взаимодействуют с рецепторами семейства TLR (TLR9), что приводит к активации фактора NF – каппа В, синтезу провоспалительных цитокинов и повышению уровня активных форм кислорода [3, 4]. В последние годы было показано, что белки семейства TLR экспрессируются многими клетками млекопитающих, в том числе и эндотелиальными [5]. Ряд авторов полагает, что развитие АГ у человека связано с дисфункцией клеток эндотелия [1]. Можно предположить, что активация TLR9 в эндотелиальных клетках CpG-богатыми фрагментами вкДНК – одна из причин эндотелиальной дисфункции. Если это действительно так, то правомерно ожидать, что уменьшение содержания CpG-ДНК во вкДНК может привести к нормализации процессов в эндотелиальных клетках и к снижению АД.

С другой стороны, увеличение концентрации CpG-ДНК может быть компенсаторной реакцией, направленной, в том числе и на улучшение реологических свойств (текучести) крови [6, 7]. Ранее было показано, что ТОрДНК медленнее фрагментируется под действием эндонуклеаз крови и накапливается в плазме, циркулируя в составе вкДНК в виде высокомолекулярных фрагментов [8]. В экспериментах *in vitro* установлено, что, в отличие от низкомолекулярных, высокомолекулярные фрагменты ДНК значительно снижают гидродинамическое сопротивление крови (эффект Томса) [9]. У здоровых доноров выявлена обратная корреляция между гемодинамическим сопротивлением и концентрацией вкДНК, представленной преимущественно высокомолекулярными фрагментами (более 20 т.п.н.) [10]. У больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения, вызванными атеросклерозом в сочетании с АГ или без неё, выявлена обратная зависимость между тяжестью заболевания и длиной циркулирующих в плазме фрагментов вкДНК, что сопоставимо с прогнозом последствий инсульта [7]. В последние годы установлено, что лиганды для TLR9 влияют на физиологию мезенхимальных стволовых клеток, в частности на процессы их дифференцировки [11].

С целью исследования возможной роли внеклеточной CpG-ДНК в патогенезе АГ, мы, во-первых, проанализировали свойства вкДНК у больных АГ, не осложненной атеросклерозом (нарушением мозгового кровообращения, ишемической болезнью сердца, синдромом Лериша) и другими хроническими заболеваниями, во-вторых, провели иммунизацию крыс спонтанно-гипертензивной линии SHR фрагментами ТОрДНК человека для того, чтобы индуцировать у них выработку антител к CpG-ДНК и, тем самым, снизить содержание CpG-ДНК в крови. В результате проведенного исследования мы обнаружили интересный эффект: иммунизация крыс SHR в раннем постнатальном периоде фрагментами CpG-ДНК замедлила формирование у них АГ, значительно отодвинув во времени срок начала повышения АД и достижения стадии стабильной гипертензии. При этом содержание собственного маркера CpG-ДНК (фрагмента крысиной ТОрДНК) во вкДНК крыс SHR не только не упало, но увеличилось в 2,4 раза.

МЕТОДИКА.

Больные артериальной гипертензией (БГ). Исследованы образцы плазмы крови 15 больных в возрасте от 51 до 67 лет с АГ (систолическое давление от 140 до 179, диастолическое давление от 90 до 109 мм рт. ст.), не принимавших антигипертензивной терапии. Все больные проходили обследование в ГУ Научном центре неврологии РАМН, где у них был исключен атеросклероз сосудов головы, сердца и ног. Кровь брали из локтевой вены при поступлении больных в клинику до начала лечения. Контрольную группу составили 25 практически

здоровых доноров (ЗД) в возрасте от 26 до 65 лет, у которых были исключены АГ и атеросклероз.

Эксперимент на животных. Работа проведена на крысах спонтанно-гипертензивной линии (SHR) и нормотензивной линии Wistar-Kyoto (WKY). Крыс содержали в виварии при естественном освещении и свободном доступе к стандартной пище и воде. Эксперимент проводили весной, длительность светового дня составляла не менее 12 час. Двухсуточным крысам однократно подкожно вводили либо препарат ДНК (**p(ТОрДНК)** или **p(Сат3)**) в дозе 700 нг, разведенной в 0,2 мл физиологического раствора, либо – равный объем физиологического раствора (контроль (**К**)). В зависимости от линии крыс и вводимого раствора, животных разбили на 5 групп по 3 особи в каждой группе: (1) SHR^К, (2) SHR^{p(ТОрДНК)}, (3) SHR^{p(Сат3)}, (4) WKY^К и (5) WKY^{p(ТОрДНК)}. У бодрствующих животных, начиная с 9-й, по 16-ю неделю включительно проводили регулярные еженедельные замеры АД на хвосте с использованием плетизмографического метода. Среднее из 7 последовательных измерений принимали за уровень недельного систолического АД. По окончании периода измерения АД животных забивали декапитацией, кровь быстро собирали в охлажденные пробирки с гепарином и отделяли плазму центрифугированием (450 g, 10 мин), сразу замораживали и хранили при -58°C.

Приготовление препаратов ДНК для введения животным. Использовали плазмиду **p(ТОрДНК)**, вектор pBR322, вставка: участок рибосомного повтора человека от -515 до 5321 нуклеотида (HSU 13369, GeneBank) и плазмиду **p(Сат3)**, вектор pBR322, вставка: субклонированный фрагмент сателлита 3, локализованный в прицентромерном гетерохроматине 1-й хромосомы (1q12). Плазмиды выделяли из биомассы *E. coli* стандартным методом [12]. Далее проводили дополнительную очистку от РНК (гидролиз РНКазой А, 75 мкг/мл, 37 °С, 3 часа), экстрагировали ДНК фенолом и осаждали этанолом в присутствии 2М ацетата аммония. После растворения в воде, проводили обработку тритоном X-114 [13] и гельфильтрацию на носителе HW-85. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически.

Свойства вкДНК плазмы крови человека и животных (концентрация вкДНК и ТОрДНК, содержание ТОрДНК во вкДНК) определяли с использованием методик, описанных ранее [2, 14]. При проведении дот-гибридизации в качестве зонда на консервативный участок ТОрДНК человека и крысы (28S рДНК) использовали биотинированную плазмиду, содержащую вставку рибосомного повтора человека в векторе pUC18 (от 9346 до 10783 нуклеотида, в соответствии с HSU 13369, GeneBank). Расчет содержания ТОрДНК приводили на всю транскрибируемую область рибосомного повтора человека или крысы.

Нуклеазную активность плазмы крови определяли с использованием модельного субстрата – комплекса одностречевой ДНК с 30-звенным олигонуклеотидом, содержащим на 5'-конце флуоресцентную группу (5(6)-карбоксиродамин), а на 3'-конце тушитель флуоресценции (BHQ1, "Синтол", Москва, РФ). Метод подробно описан ранее [2, 15]. Для калибровки использовали стандартный раствор ДНКазы-1. Калибровочная кривая связывает величину разгорания флуоресценции красителя с концентрацией ДНКазы 1 в растворе. Результат выражали в единицах ДНКазной активности. 1 единица соответствует активности ДНКазы-1, взятой в концентрации 1 нг/мл (1 час, 37°C). Относительная стандартная ошибка метода – 5%.

Содержание антител к ДНК (АТ_{днк}) в плазме крови крыс определяли, как описано ранее, [2, 16] с небольшими изменениями. Полистирольные 96-луночные планшеты фирмы Costar обрабатывали протаминсульфатом (50 мкл, 1 мг/мл, 90 мин, 25°C), наносили раствор ДНК (50 мкл, 5 нг/мл, 4°C, 24 часа) в стандартном солевом буфере (ССБ, 0,15 М NaCl, 0,015 М цитратный буфер, pH 7). Мишенью для АТ_{днк} служили (1) геномная ДНК крысы, (2) линейаризованные **p(ТОрДНК)** и (3) **p(Сат3)**. Для каждой пробы плазмы для одной и той же мишени отводили три лунки для определения свободных АТ_{днк} и три лунки –

ГИПОТЕНЗИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ CpG-ДНК У КРЫС SHR

для определения общих АТ_{днк}. Блокирование проводили 3% раствором БСА в буфере А (фосфатный солевой буфер, 0,05% твин-20). Определяли свободные АТ_{днк}, для чего плазму крови предварительно прогревали 15 мин при 55°C и развели буфером А в 200 раз. После исчерпывающего гидролиза вкДНК в плазме ДНКазой 1 и последующего 15 мин прогревания при 55°C для инактивации ДНКазы 1 определяли общее количество АТ_{днк} в плазме, методика описана ранее [16]. Отмывку от неспецифического связывания проводили буфером А и 10-кратным ССБ. АТ_{днк}, связавшиеся с ДНК, выявляли с помощью вторичных антител к Fc-фрагментам иммуноглобулина G крысы, конъюгированных с пероксидазой хрена (ООО “Вектор-Бест”, Новосибирск, РФ). Пероксидазную активность выявляли в реакции с тетраметилбензидином. Поглощение (450 нм) измеряли на приборе “Эффос 9305”, РФ. В качестве контроля использовали стандартизированную сыворотку крысы SHR в последовательных разведениях. За единицу содержания антител принимали активность стандартизированной сыворотки в соответствующем разведении, оценённую по светопоглощению в относительных единицах. Относительная стандартная ошибка метода 8±6%.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Statgraphics. Выборки анализировали, используя критерий Колмогорова – Смирнова, средние значения величин сравнивали с использованием t-критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Свойства вкДНК плазмы крови больных артериальной гипертензией (БГ). Полученные результаты показали, что концентрация вкДНК в плазме крови обследованных БГ варьирует от 6 до 890 нг/мл (среднее ±SD, 252±229, n=15), а в плазме крови ЗД – от 51 до 380 нг/мл (190±89, n=25). Распределение концентраций вкДНК у ЗД и БГ приведено на рисунке 1А. Анализ двух выборок по методу Колмогорова-Смирнова (D=0,31, p=0,29) и сравнение средних значений (p>0,1) показали, что концентрации вкДНК у БГ достоверно не отличаются от таковых у ЗД.

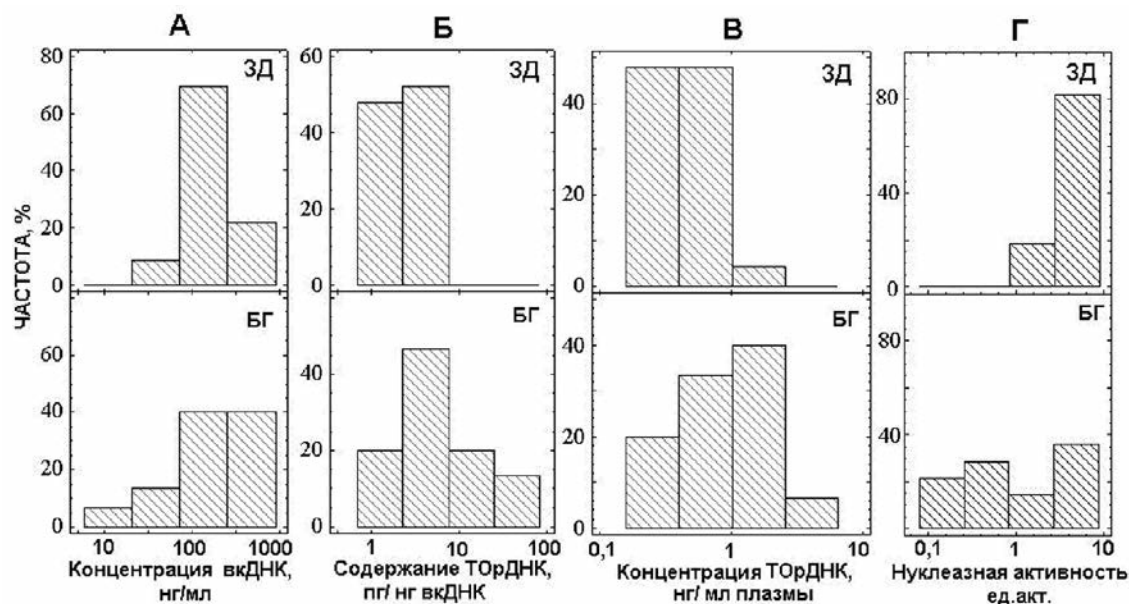


Рисунок 1.

Частотное распределение концентрации вкДНК (А), содержания ТОрДНК во вкДНК (Б), концентрации ТОрДНК (В) и нуклеазной активности (Г) в плазме периферической крови здоровых доноров (ЗД, n = 25) и больных артериальной гипертензией (БГ, n = 15).

Все данные приведены в логарифмической шкале.

Изменение состава вкДНК оценивали по изменению содержания в ней маркера СрG-ДНК – транскрибируемой области рибосомного повтора человека (ТОрДНК) [2]. Это наиболее известная многокопийная СрG-обогащенная последовательность генома млекопитающих, которая относительно устойчива к двунитевым разрывам и накапливается в составе вкДНК крови в норме и при патологии [8]. В геноме человека содержание ТОрДНК варьирует от 0,9 до 2,9 пг/нг ядерной ДНК (среднее $1,78 \pm 0,04$ [14]). В составе вкДНК у БГ содержание фрагментов ТОрДНК было выше, чем у ЗД ($D=0,49$, $p=0,02$) и варьировало от 1,5 до 81,3 пг/нг вкДНК, в то время как у ЗД – от 0,7 до 6,7 пг/нг вкДНК (рис. 1Б). Концентрация ТОрДНК в плазме у БГ была достоверно выше, (рис. 1В, $D=0,7$, $p<0,001$) и варьировала от 0,2 до 6,4 нг/мл плазмы, в то время как у ЗД – от 0,16 до 1,5 нг/мл. У 47% больных АГ мы наблюдали снижение нуклеазной активности (НА) плазмы крови по сравнению со ЗД (рис. 1Г).

По содержанию ТОрДНК в составе вкДНК больные были разделены на две подгруппы: БГ(1) – 7 человек, у которых содержание ТОрДНК было низким (до 5 пг/нг вкДНК) и БГ(2) – 8 человек, у которых вкДНК оказалась обогащённой фрагментами ТОрДНК (рис. 2В). Эти две подгруппы значительно различались и по другим свойствам вкДНК (рис. 2). У больных в группе БГ(1) по сравнению со ЗД и больными группы БГ(2) концентрации вкДНК (рис. 2А) и ТОрДНК (рис. 2Б) были увеличены, а НА значительно снижена (рис. 2Г).

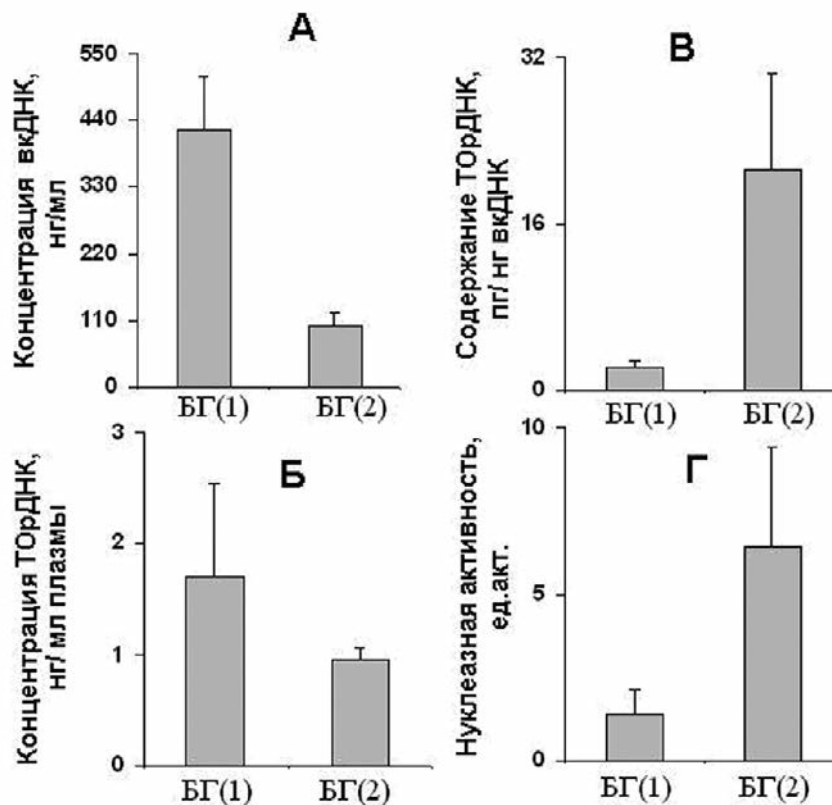


Рисунок 2.

Средние значения концентрации вкДНК (А) и ТОрДНК (Б), содержания ТОрДНК в вкДНК (В) и НА (Г) в группе больных АГ с низким (БГ(1)) и высоким (БГ(2)) содержанием ТОрДНК.

Приводится стандартная ошибка.

Таким образом, при АГ у части больных по сравнению со ЗД на фоне несущественных изменений общей концентрации вкДНК наблюдается значительное увеличение содержания маркера СрG – ДНК. Возникает вопрос: повышение содержания СрG-ДНК есть следствие АГ (нейтральная или компенсаторная реакция организма) или один из факторов, индуцирующих и поддерживающих её?

Предварительный анализ клинических данных (статья готовится к печати) показал, что у больных группы БГ(1) с низким содержанием фрагментов ТОрДНК в вкДНК, величина АД выше, чем у больных группы БГ(2) с повышенным содержанием ТОрДНК. Это может свидетельствовать об антигипертензивной направленности повышения содержания высокомолекулярных CpG – ДНК в составе вкДНК.

Выявленные изменения свойств вкДНК и нуклеазной активности у больных АГ (результаты настоящего исследования), а также различными нарушениями мозгового кровообращения [10], ишемической болезнью сердца, острым инфарктом миокарда [2] и ревматоидным артритом [17] послужили поводом для начала опытов на животных. Чтобы выяснить роль накопления CpG-ДНК в составе вкДНК в развитии АГ, мы обратились к её модели у животных – спонтанно-гипертензивной линии крыс (SHR), у самцов которой при достижении возраста полового созревания развивается стойкое повышение АД [1].

Замедление развития АГ у крыс линии SHR после “иммунизации” фрагментами CpG-ДНК в раннем онтогенезе. Мы предположили, что стимуляция выработки у крыс дополнительного количества антител против CpG-ДНК может изменить содержание этих последовательностей в составе вкДНК. Ранее было показано, что антитела против CpG-ДНК циркулируют в крови человека в норме и при патологии, как в свободном виде, так и в комплексах с вкДНК [2, 16]. Чтобы индуцировать повышенный синтез антител к CpG-ДНК, 2-дневным крысам SHR и WKY подкожно вводили 700 нг плазмиды **p(ТОрДНК)**, содержащей вставку – CpG-богатый фрагмент ТОрДНК человека в векторе pBR322. В качестве ДНК сравнения другим крысам SHR вводили плазмиду **p(Cat3)**, которая содержала вставку с невысоким содержанием CpG – повтора – субфракцию сателлита 3 человека (район 1q12) в векторе pBR322.

Данные о влиянии ранней “иммунизации” фрагментами ДНК на развитие АГ у крыс представлены на рисунке 3. У “иммунизированных” крыс SHR^{p(ТОрДНК)} АД до 9-й недели оставалось в пределах нормальных показателей, в то время как у контрольных крыс SHR^K и SHR^{p(Cat3)} АД повышалось уже с 6-й недели постнатального развития. На 11-й неделе у крыс SHR^{p(ТОрДНК)} АД начинало расти, но достигало стабильно высоких значений, характерных для SHR^K, только к 14-й неделе. При этом на 12-й неделе отмечалось кратковременное снижение АД у крыс SHR^{p(Cat3)}, такое же, как было ранее обнаружено при введении гена брадикинина человека в аденовирусном векторе [18]. Введение **p(ТОрДНК)** не вызывало изменения АД у крыс WKY. Таким образом, одноразовая инъекция **p(ТОрДНК)** 2-дневным крысам SHR замедляла развитие у них АГ, отодвигая срок достижения стабильно высокого уровня АД, как минимум, на 8 недель. Чтобы понять природу обнаруженного эффекта, мы, во-первых, проанализировали некоторые свойства вкДНК и, во-вторых, определили количество и специфичность антител, вырабатываемых против различных фрагментов ДНК у животных, у которых измеряли АД.

Особенности свойств вкДНК у половозрелых крыс, однократно инъектированных CpG-ДНК в раннем онтогенезе. Были проанализированы следующие свойства вкДНК: общая концентрация вкДНК, уровень её фрагментации (соотношение длинных и коротких фрагментов), содержание ТОрДНК во вкДНК и концентрация ТОрДНК в плазме крови. Также оценивали **НА** плазмы крови, как один из показателей активности систем элиминации вкДНК, которые влияют на её свойства. Уровень фрагментации определяли, как отношение значений концентрации вкДНК, тестируемой двумя разными красителями в одной и той же пробе: низкочувствительным к длине фрагментов в интервале от 0,1 до 21 т.п.н. (RiboGreen®, определяет концентрацию всех фрагментов ДНК), и высокочувствительным (Hoechst 33258, определяет концентрацию преимущественно высокомолекулярных фрагментов). В дополнительном эксперименте, мы показали, что различия в значениях концентрации ДНК, определяемой вышеуказанными красителями в одной и той же пробе, тем больше, чем больше количество коротких (менее 300 п.н.) фрагментов ДНК (рис. 4).

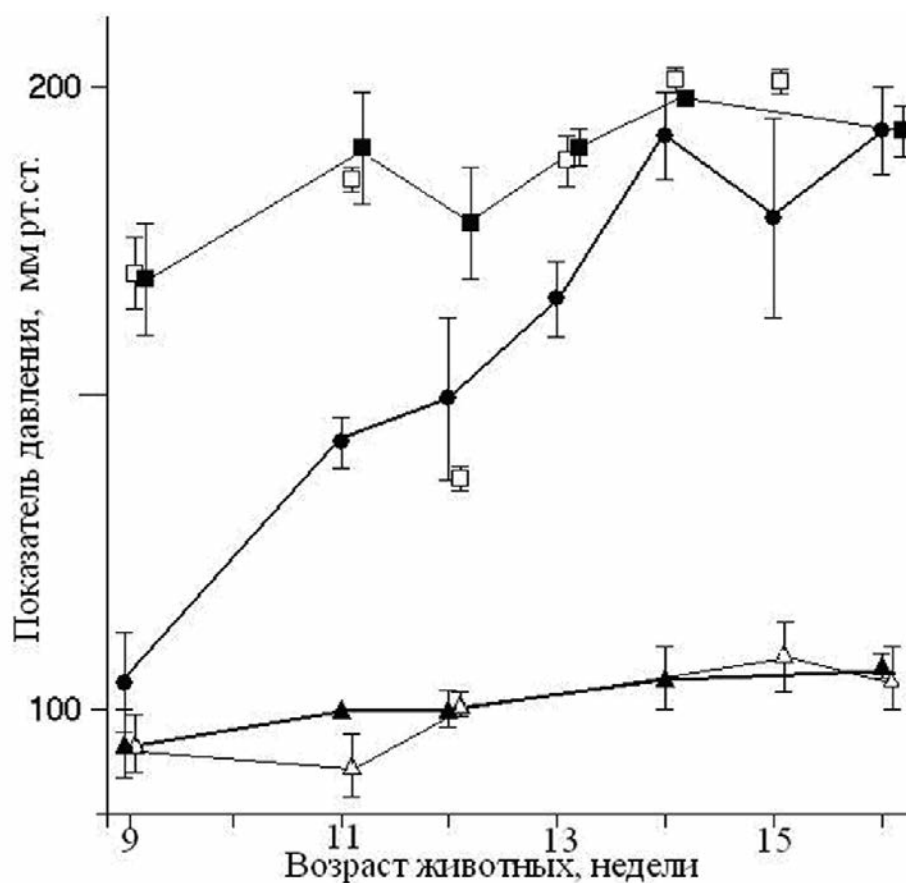


Рисунок 3.

Изменение систолического давления у крыс с возрастом. Обозначения: чёрный, белый квадрат и чёрный кружок - крысы SHR, которым подкожно вводили в двухдневном возрасте соответственно физиологический раствор, р(Саг3) и р(ТОрДНК). Чёрный и белый треугольники - крысы WKY, которым вводили соответственно р(ТОрДНК) и физиологический раствор. Каждая точка графика - средние значения давления для трёх крыс, приводится стандартная ошибка.

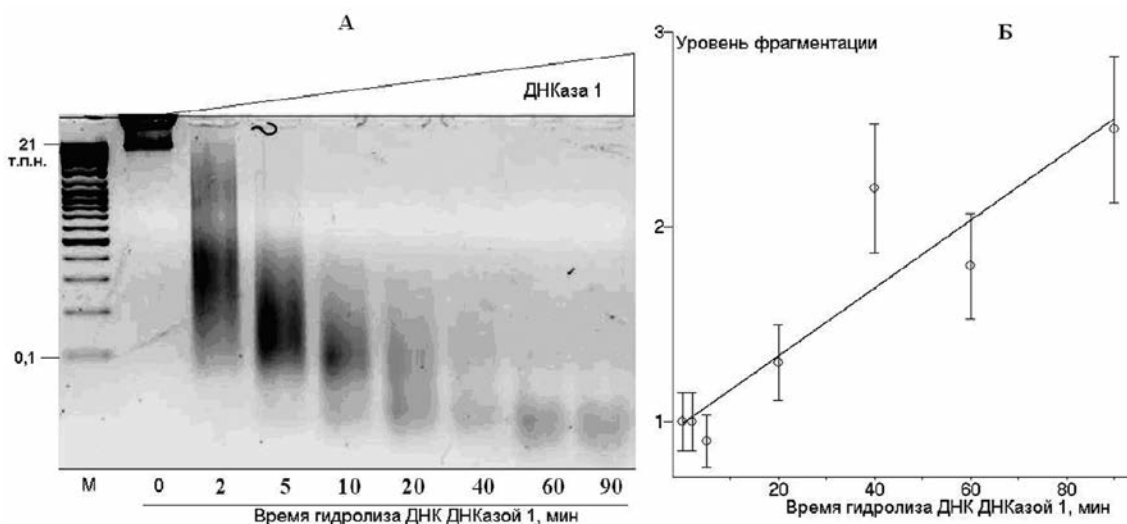


Рисунок 4.

Анализ уровня фрагментации ДНК с использованием двух красителей.

А. Электрофореграмма модельных образцов ДНК крысы с различной степенью гидролиза ДНКазой-1, 1% агарозный гель. М - маркер длин фрагментов. Указано время гидролиза ДНК при концентрации ДНКазы-1 1 мкг/мл, 37°C. Б. Отношение концентраций образцов ДНК, определенных с использованием красителя RiboGreen® и Hoechst 33258.

ГИПОТЕНЗИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ CpG-ДНК У КРЫС SHR

Сравнение свойств вкДНК контрольных крыс SHR^K и WKY^K выявило некоторые различия между этими линиями (рис. 5). Концентрация вкДНК у крыс SHR^K (1342 ± 315 нг/мл плазмы, приводится SE) больше ($p < 0,05$), чем у крыс WKY^K (970 ± 165 нг/мл, рис. 5Б). Как следует из данных электрофореза (рис. 5А), в составе вкДНК контрольных крыс обеих линий содержались как длинные (21 т.п.н.), так и короткие фрагменты. Содержание фрагментов крысиной ТОрДНК в составе вкДНК у крыс SHR^K ($0,62 \pm 0,05$ пг/нг вкДНК) было ниже ($p < 0,001$), чем у крыс WKY^K ($0,97 \pm 0,06$ пг/нг вкДНК, рис. 5Е) при отсутствии различий в концентрации фрагментов ТОрДНК в плазме ($p > 0,05$, рис. 5Д). **НА** плазмы крови крыс SHR^K (22 ± 4 ед.акт./мл) оказалась ниже, чем таковая плазмы крыс WKY^K (32 ± 4 ед.акт./мл, $p < 0,01$).

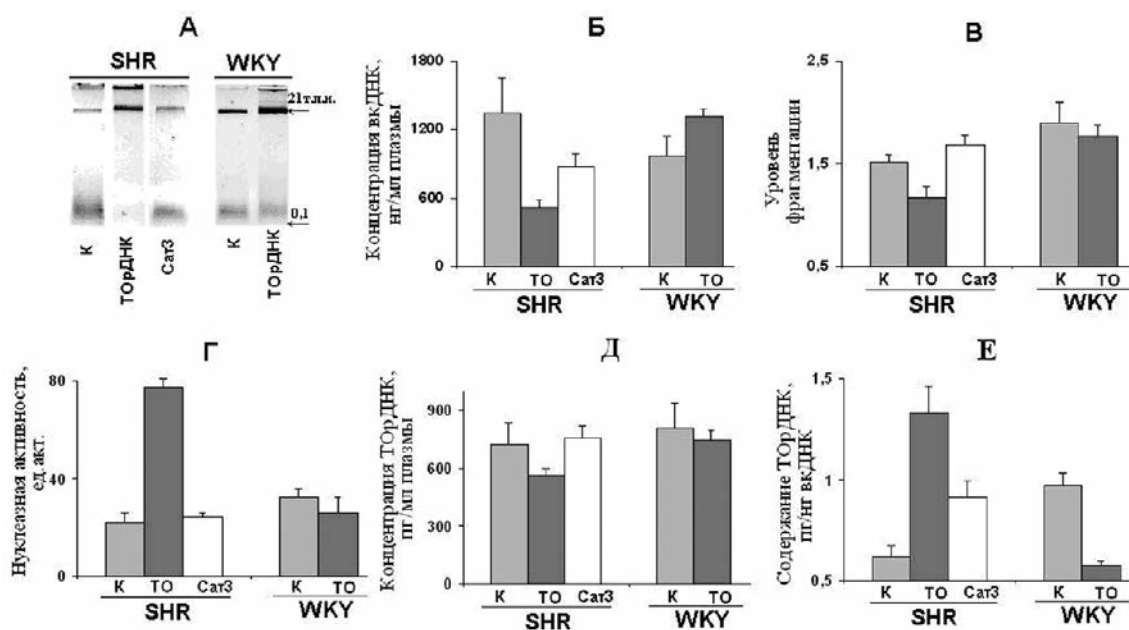


Рисунок 5.

Свойства вкДНК крыс SHR и WKY. А. Пример электрофореграмм, характерных для вкДНК крыс каждой группы (1,2% агарозный гель). Цифрами указаны длины фрагментов. Б. Концентрация вкДНК в плазме крыс. В. Уровень фрагментации вкДНК (пояснения в тексте). Г. Нуклеазная активность плазмы. Д. Концентрация ТОрДНК в плазме. Е. Содержание ТОрДНК в вкДНК. Обозначения: крысам вводили физ. раствор (светло серые столбики, К), **p**(ТОрДНК) (тёмные столбики, ТО) и **p**(Cat3) (белые столбики, Cat3).

Свойства вкДНК контрольных крыс и крыс, “иммунизированных” фрагментами ДНК, в обеих линиях различались по нескольким показателям (рис. 5). Концентрация вкДНК у крыс SHR^{p(ТОрДНК)} по сравнению с SHR^K оказалась сниженной в 2,6 раза ($p < 0,001$), а у крыс SHR^{p(Cat3)} – в 1,5 раза ($p < 0,01$; рис. 5Б). Показатель фрагментации вкДНК крыс SHR^{p(ТОрДНК)} был снижен в 1,3 раза ($p < 0,001$), у SHR^{p(Cat3)}, повышен на 10% ($p < 0,03$, рис. 5В). Уменьшение доли коротких фрагментов в составе вкДНК крыс SHR^{p(ТОрДНК)} отчетливо прослеживается на электрофореграммах вкДНК (рис. 5А). **НА** плазмы крови крыс SHR^{p(ТОрДНК)} в 3,5 раза превосходила контрольные значения, в то время как у крыс SHR^{p(Cat3)} не изменилась (рис. 5Г). Содержание фрагментов ТОрДНК в составе вкДНК у крыс SHR^{p(ТОрДНК)} превосходило в 2,4 раза ($p < 0,001$) таковое у контрольных животных (рис. 5Е), а у крыс SHR^{p(Cat3)} – в 1,4 раза ($p < 0,01$). Концентрация ТОрДНК в плазме SHR^{p(ТОрДНК)} была снижена в 1,3 раза ($p < 0,01$, рис. 5Д), а в плазме SHR^{p(Cat3)} не изменялась.

Изменения свойств вкДНК “иммунизированных” крыс WKY^{p(ТорДНК)} по сравнению с контролем были противоположны тому, что мы наблюдали у крыс SHR^{p(ТорДНК)}. Концентрация вкДНК у них возрастала в 1,4 раза ($p < 0,001$, см. рис. 5Б), при этом степень её фрагментации и *НА* плазмы практически не менялись. Содержание ТорДНК в составе вкДНК уменьшалось в среднем в 1,7 раза ($p < 0,001$) при практически неизменном уровне концентрации ТорДНК в плазме крови (рис. 5Д).

Содержание АТ_{днк} в плазме крови половозрелых крыс, “иммунизированных” CpG-ДНК в раннем онтогенезе. Антитела, которые образуются в организме млекопитающих к фрагментам вкДНК, можно охарактеризовать тремя параметрами: общее количество АТ_{днк} (сумма связанных с собственной вкДНК и свободных антител), количество свободных АТ_{днк} и относительное количество АТ_{днк}, образующих специфичные комплексы с отдельными фрагментами вкДНК. Мы определяли количество свободных и общих АТ_{днк} к крысиной ДНК и к модельным фрагментам, соответственно, до и после исчерпывающего гидролиза собственной вкДНК крысы в образцах плазмы ферментом ДНКазы-1.

Для анализа специфичности АТ_{днк} в качестве мишени в ИФА мы использовали две последовательности – **p(ТорДНК)** (определение АТ_{днк}, специфичных к CpG-ДНК, АТ_{днк}^{CpG}) и контрольную - **p(Сат3)**, содержащую мало CpG-повторов. АТ_{днк}, которые “узнают” преимущественно сахарофосфатную цепь ДНК, не обладают выраженной специфичностью к последовательности оснований и дают примерно одинаковый сигнал в ИФА на равном количестве ДНК-мишени любой последовательности. $K_{асс}$ комплексов АТ_{днк}^{CpG} с CpG-ДНК на порядок выше, чем неспецифичных комплексов с ДНК [16]. Отношение двух сигналов, полученных для одной и той же пробы плазмы крови на CpG-богатом и CpG-небогатом фрагментах ДНК, мы обозначили, как “показатель специфичности” (*ПС*). Значения *ПС*, меньше 1, говорят о том, что в плазме содержится мало АТ_{днк}^{CpG}, и в силу пока неясных причин, эффективность связывания АТ_{днк} с **p(Сат3)** выше, чем с **p(ТорДНК)**. Это может быть связано, как с лучшей сорбцией **p(Сат3)** на носителе, так и с наличием в крови крыс АТ_{днк}, специфичных к последовательностям ДНК, входящих в состав **p(Сат3)**. Нельзя также исключить вероятность того, что неспецифичные АТ_{днк} связываются менее эффективно с CpG-ДНК в силу, каких – либо конформационных особенностей сахарофосфатного остова в составе этих последовательностей. Чем больше *ПС*, тем выше доля АТ_{днк}^{CpG} в составе АТ_{днк}. Анализ данных количественного определения содержания в плазме крови крыс свободных и общих АТ_{днк} к геномной ДНК крысы и значений *ПС*, приведенных в таблице, показал следующее.

Таблица. Количество АТ_{днк} к ДНК крысы и *ПС* антител у крыс, которым вводили физиологический раствор или фрагменты ДНК.

№	Линия крыс и воздействие	Антитела к ДНК крысы*		<i>ПС</i> антител к ДНК, (сигнал pТорДНК / сигнал pСат3)	
		Свободные, отн.ед	Общие, отн.ед	Свободные АТ _{днк}	Общие АТ _{днк}
		1	2	3	4
1	SHR, физ.раствор	0,71 ± 0,06**	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,84 ± 0,03
2	SHR, pТорДНК	0,79 ± 0,07	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,77 ± 0,07
3	SHR, pСат3	0,78 ± 0,09	1,55 ± 0,08	1,8 ± 0,1	0,84 ± 0,03
4	WKY, физ.раствор	0,4 ± 0,03	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,73 ± 0,03
5	WKY, pТорДНК	0,63 ± 0,08	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1

Примечание: * - Определяли до (свободные) и после (общие) гидролиза вкДНК плазмы ДНКазой I (см. условия эксперимента); ** - приводится SE.

ГИПОТЕНЗИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ CpG-ДНК У КРЫС SHR

Количество общих $AT_{\text{днк}}$ к крысиной ДНК у крыс SHR^k в 1,4 раза меньше, чем у крыс WKY^k ($p < 0,01$, строки 1 и 4, столбец 2). Количество свободных $AT_{\text{днк}}$, напротив, в 1,8 раза больше ($p < 0,001$, строки 1 и 4, столбец 1). В плазме крови крыс SHR^k 38% от общего количества $AT_{\text{днк}}$ связаны с вкДНК, у крыс WKY^k этот показатель в 2 раза больше (78%). У крыс SHR^k в составе несвязанных с вкДНК $AT_{\text{днк}}$ содержится значительно больше $AT_{\text{днк}}^{CpG}$: **ПС** свободных $AT_{\text{днк}}$ для этих крыс в 1,8 раза выше, чем **ПС** для WKY^k (строки 1 и 4, столбец 3). Общие $AT_{\text{днк}}$ по этому показателю различаются не столь значительно – в 1,15 раза (строки 1 и 4, столбец 4). Можно предположить, что в составе вкДНК крыс SHR^k содержится меньше CpG – фрагментов, которые связывают специфичные $AT_{\text{днк}}^{CpG}$, чем у крыс WKY^k . Эти данные подтверждаются тем фактом, что содержание ТОрДНК в вкДНК крыс SHR^k меньше, чем у WKY^k (рис. 5).

“Иммунизация” крыс SHR не приводит к заметным изменениям содержания в плазме половозрелых крыс свободных и общих $AT_{\text{днк}}$ к крысиной ДНК (строки 1, 2 и столбцы 1,2), при этом количество $AT_{\text{днк}}$, связанных с вкДНК, незначительно повышается (до 44%). **ПС** свободных $AT_{\text{днк}}$ для крыс $SHR^{p(\text{ТОрДНК})}$ ниже в 1,5 раза, чем у крыс $SHR^{p(\text{Сат3})}$ и SHR^k ($p < 0,001$, строки 1, 2 и 3, столбец 3) и приближается к значениям, полученным для крыс WKY^k . Таким образом, при “иммунизации” фрагментами CpG-ДНК в крови SHR увеличивается количество $AT_{\text{днк}}^{CpG}$, связанных с вкДНК. Это говорит о том, что у них в составе вкДНК накапливаются последовательности, эффективно связывающие $AT_{\text{днк}}^{CpG}$, что коррелирует с описанным выше значительным повышением содержания ТОрДНК во вкДНК этих крыс.

У “иммунизированных” крыс $WKY^{p(\text{ТОрДНК})}$ общее количество $AT_{\text{днк}}$ было снижено в среднем в 1,8 раза по сравнению с WKY^k ($p < 0,001$, строки 4 и 5, столбец 2), количество свободных $AT_{\text{днк}}$ было увеличено в 1,6 раза ($p < 0,01$). В крови половозрелых крыс $WKY^{p(\text{ТОрДНК})}$ количество $AT_{\text{днк}}$, связанных с вкДНК, вдвое ниже (37%), чем у крыс WKY^k . **ПС** для свободных $AT_{\text{днк}}$ у крыс $WKY^{p(\text{ТОрДНК})}$ не отличался от **ПС** у WKY^k (строки 4 и 5, столбец 3), для общих $AT_{\text{днк}}$ **ПС** был увеличен в 1,2 раза ($p < 0,01$). По-видимому, при иммунизации крыс WKY фрагментами **p(ТОрДНК)** происходит снижение выработки в организме животного $AT_{\text{днк}}$ к геномной ДНК, при этом вкДНК приобретает свойства, приводящие к снижению количества связываемых с нею $AT_{\text{днк}}^{CpG}$. Эти данные коррелируют с уменьшением содержания собственных ТОрДНК в составе вкДНК у крыс $WKY^{p(\text{ТОрДНК})}$.

Таким образом, в результате проведенного исследования получен интересный результат: однократное введение 2-дневным крысам CpG-ДНК увеличило возраст стабильного повышения АД у крыс SHR и не изменило АД у крыс нормотензивной линии. Для того чтобы понять причину обнаруженного эффекта, необходимы исследования изменения профиля экспрессии генов, задействованных в развитии гипертензии у SHR. Поскольку мы наблюдаем отдаленный во времени эффект у взрослых крыс, “иммунизированных” в раннем возрасте, то изменения должны были коснуться стволовых клеток. В рамках настоящей работы мы оценили изменения свойств вкДНК и изменение двух факторов, влияющих на эти свойства (образование комплексов с $AT_{\text{днк}}$ и **НА**) при “иммунизации” фрагментами ДНК. На рисунке 6 дана гипотетическая схема, иллюстрирующая взаимодействие исследуемых нами факторов, приводящих к изменению свойств вкДНК. Источник вкДНК – клетки организма, погибающие в результате некроза или апоптоза. ДНК, поступающая в кровь, подвергается эндонуклеазному гидролизу. У человека и других млекопитающих обнаружено несколько типов ДНКаз, которые экскретируются многими клетками в кровь, а также локализуются на поверхности клеток, в том числе, на поверхности клеток мышц [19]. Короткие фрагменты вкДНК, образующиеся в результате эндонуклеазного гидролиза, могут элиминироваться почками, они обнаруживаются в моче. ДНК млекопитающих содержит последовательности, которые относительно устойчивы к двунитевым

разрывам, возникающим при накоплении в составе ДНК одонитевых разрывов, вносимых эндонуклеазами [8]. Эти высокомолекулярные фрагменты, представителем которых является ТОрДНК, накапливаются в составе вкДНК. По-видимому, основной путь элиминации этих фрагментов – связывание специфичными к CpG–ДНК антителами. Свойства вкДНК, таким образом, определяются интенсивностью процессов гибели клеток, уровнем *НА* крови, активностью работы выделительных систем и уровнем синтеза специфичных и неспецифичных антител к фрагментам вкДНК (схема на рис. 6).

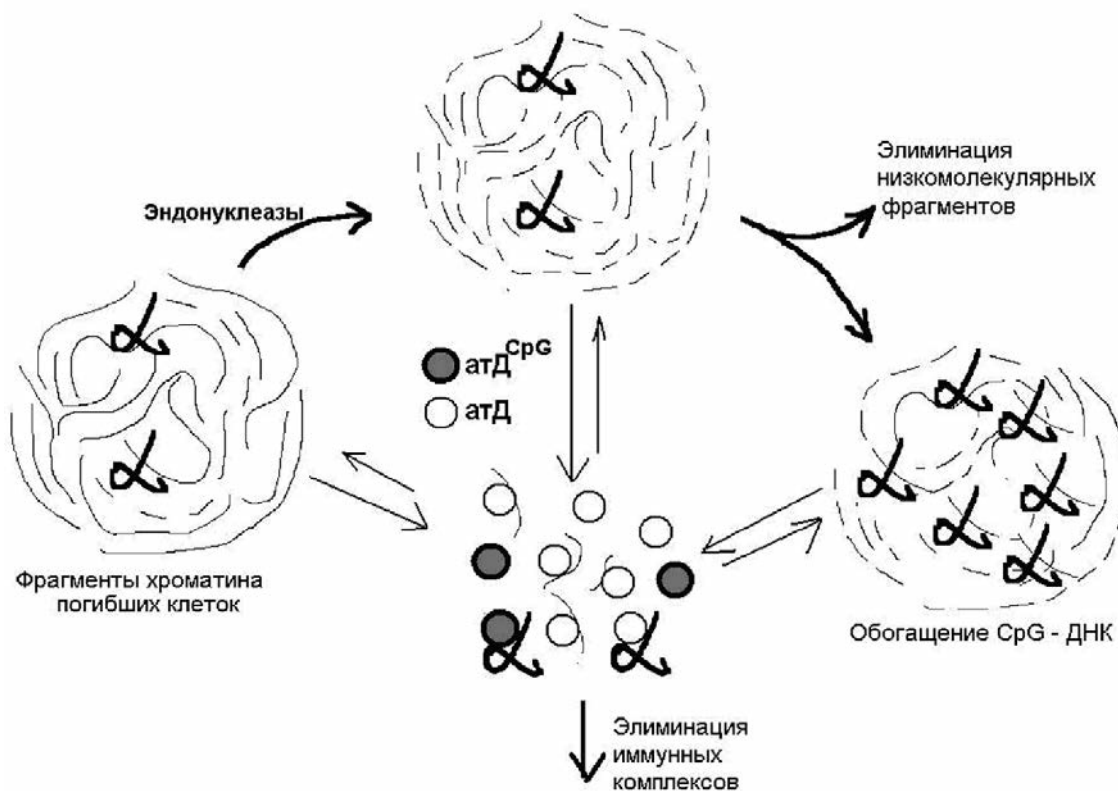


Рисунок 6.

Схема, отражающая изменение содержания вкДНК CpG - богатых фрагментов.
Пояснения в тексте.

У половозрелых крыс SHR увеличена концентрация вкДНК и снижено содержание CpG–ДНК по сравнению с крысами WKY. Это согласуется с более низкими значениями *НА*, снижением общего количества АТ_{днк} и с литературными данными об интенсификации апоптоза у крыс SHR [20, 21] и о сниженной клубочковой фильтрации [1]. АТ_{днк}^{CpG} у крыс двух линий синтезируются в, примерно, одинаковых количествах, но вкДНК крыс SHR^K значительно меньше связывает эти антитела, в результате чего они накапливаются в плазме в несвязанном с вкДНК виде. Свойства вкДНК крыс SHR^K в совокупности с пониженной *НА* очень похожи на свойства вкДНК подгруппы больных БГ(1) для которых мы обнаружили повышенные концентрации вкДНК и сниженное содержание ТОрДНК в вкДНК (рис. 2).

Подкожное введение CpG–фрагментов 2-дневным крысам SHR привело к тому, что, даже через 16 недель после введения, активность систем элиминации и свойства вкДНК были значительно изменены по сравнению с контролем.

В крови $SHR^{p(TOpДНК)}$ значительно увеличилась **НА**, при этом мы не наблюдали существенных изменений в количестве общих $AT_{днк}^{CpG}$, т.е. ожидаемой нами при планировании работы индукции синтеза $AT_{днк}^{CpG}$ в результате “иммунизации” не произошло. Можно предположить, что именно вследствие увеличения **НА** значительно изменились свойства вкДНК крыс $SHR^{p(TOpДНК)}$ – в несколько раз снизилась общая концентрация вкДНК, произошло значительное обогащение устойчивыми к фрагментации последовательностями (ТОрДНК), что привело к снижению количества свободных $AT_{днк}^{CpG}$ (рис. 6). Введение контрольной последовательности **p(Cat3)** вызывало похожие эффекты у крыс SHR (рис. 5), но гораздо менее выраженные: достоверно снизилась концентрация вкДНК и немного увеличилось содержание ТОрДНК в вкДНК, но **НА**, степень фрагментации вкДНК и количество свободных $AT_{днк}^{CpG}$ практически не изменились.

У крыс WKY введение CpG – ДНК стимулировало прямо противоположные изменения – увеличение концентрации вкДНК и снижение содержания ТОрДНК, что сопровождалось снижением количества связанных с вкДНК $AT_{днк}$ и уменьшением **НА**. Свойства вкДНК крыс $WKY^{p(TOpДНК)}$ мало отличаются от свойств вкДНК крыс SHR^k , тем не менее, у крыс $WKY^{p(TOpДНК)}$ повышения АД не произошло. Таким образом, можно предположить, что изменение свойств вкДНК у SHR^k (и у больных АГ) не является самостоятельной причиной повышения АД.

Для того, чтобы понять, почему две линии крыс по-разному реагируют на “иммунизацию” одним и тем же фрагментом CpG–ДНК необходимы дальнейшие исследования. Можно лишь высказать некоторые предположения. CpG–ДНК активирует в клетке сигнальный путь, связанный с эндосомальными рецепторами TLR9. Кроме того в последние годы показано, что CpG–ДНК может взаимодействовать с другими рецепторами, расположенными на поверхности клеток, что приводит к активации других сигнальных каскадов в клетке [22]. Последовательность **p(ТОрДНК)** содержит наряду с сайтами связывания с TLR9 участки, которые являются блокаторами этих рецепторов (короткие повторы с общей формулой G_n [23]). Если молекула **p(ТОрДНК)** фрагментируется медленно (крысы SHR, снижена **НА**), то относительная концентрация свободных фрагментов – ингибиторов TLR9 невелика и они мало влияют на активацию TLR9. Если **p(ТОрДНК)** гидролизует достаточно быстро до низкомолекулярных фрагментов (крысы WKY), то концентрация ингибиторов TLR9 повышается и они способны блокировать действие лигандов TLR9. В этом случае активируются другие сигнальные пути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Резюмируя результаты проведенных исследований, можно сделать следующие выводы.

1) Выявлены однотипные изменения свойств вкДНК и фактора, отвечающего за её элиминацию из крови, у подгруппы больных АГ (БГ(1)) и половозрелых самцов (17-недель) крыс SHR. Для тех и других характерны повышенная концентрация вкДНК, сниженное содержание ТОрДНК в её составе и низкие значения **НА**.

2) При однократном подкожном введении **p(ТОрДНК)** в раннем онтогенезе обнаружено значительное замедление развития АГ у крыс гипертензивной линии, “иммунизация” не влияет на уровень АД у нормотензивных крыс.

3) Замедление развития АГ у “иммунизированных” CpG-ДНК крыс SHR не связано с повышением синтеза антител к CpG-ДНК, но коррелирует со значительным ростом НА и обогащением вкДНК фрагментами CpG – ДНК.

Выявленная возможность отсроченного формирования стабильной АГ у крыс SHR, “иммунизированных” в двухдневном возрасте **p(ТОрДНК)**, позволяет поставить ряд новых экспериментальных задач, которые мы планируем решить в дальнейших исследованиях. Во-первых, необходимо выяснить, возможно ли пролонгировать выявленный эффект путем дополнительных инъекций плазмиды **p(ТОрДНК)** “иммунизированным” крысам SHR в более поздние сроки, влияет ли введение CpG-ДНК на АД у взрослых крыс SHR^k ? При этом важно проследить

динамику изменения свойств вкДНК у “иммунизированных” крыс SHR в период с начала повышения АД до формирования стойкой гипертензии. Во-вторых, крайне важно определить, экспрессия каких генов изменяется в клетках крыс SHR после “иммунизации” и какие сигнальные пути задействованы в этом процессе?

ЛИТЕРАТУРА

1. Гогин Е.Е., Гогин Г.Е. (2006) Гипертоническая болезнь и ассоциированные болезни системы кровообращения. Изд-во “Ньюдиамед”. Москва.
2. Вейко Н.Н., Булычева Н.В., Рогинко О.А., Вейко Р.В., Ершова Е.С., Коздоба О.А., Кузьмин В.А., Виноградов А.М., Юдин А.А., Сперанский А.И. (2008) Биомедицинская химия, **54**(1), 78-93.
3. Ae-Kyung Yi., Tuetken R., Redford T., MaWaldschmid R., Kirsch J., Krieg A. (1998) J. Immunology, **160**, 4755-4761.
4. Klinman D., Ylt A., Beaucage S., Conover J., Krieg A. (1996) Immunology, **93**, 2879-2883.
5. Fitzner N., Clauberg S., Essmann F., Liebmann J., Kolb-Bachofen V. (2008) Clin. Vaccine Immunol., **15**, 138-146.
6. Ганнушкина И.В. (2005) в: Очерки ангионеврологии (Под ред. З.А. Суслиной) Изд-во “Атмосфера”, Москва, 17-40.
7. Ганнушкина И.В., Конорова И.Л. (2008) Патол. физиол. экспер. тер., №3, 2-10.
8. Вейко Н.Н., Спитковский Д.М. (2000) Радиационная биология. Радиоэкология, **40**, 396-404.
9. Ганнушкина И.В., Антелава А.Л., Вейко Н.Н. (2000) Патологическая физиология и экспериментальная терапия, №4, 3-5.
10. Ганнушкина И.В., Фараго М.Л., Антелава А.Л., Баранчикова М.В., Вейко Н.Н. (1998) Вестник РАМН, **5** (14), 16-22.
11. Cho H., Bae Y., Jung J. (2006) Stem. Cells, **24**, 2744-2752.
12. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
13. Aida Y., Pabst M. (1990) Immunol. Methods, **132**, 191.
14. Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г., Нурбаев С.Д., Косякова Н.В., Шубаева Н.О., Ляпунова Н.А. (2003) Молекулярная биология, **37**, 409-419.
15. Ермаков А.В., Костюк С.В., Еголина Н.А., Калашикова Е.А., Кокаровцева С.Н., Малиновская Е.М., Вейко Н.Н. (2007) Радиационная биология. Радиоэкология, **47**, 133-140.
16. Вейко Н.Н., Костюк С.В., Ермаков А.В., Калашикова Е.А., Рязанцева Т.А., Сперанский А.И. (2007) БЭБиМ., **144**, 277-282.
17. Вейко Н.Н., Шубаева Н.О., Иванова С.М., Сперанский А.И., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М. (2006) БЭБиМ., **143**, 282-285.
18. Неверова М.Е., Фиделина О.В., Мкртумова Н.А., Постнов А.Ю., Постнова Д.А., Калинин В.Н. (2008) Кардиология, **48**, 41-45.
19. Shiokawa D., Shika Y., Saito K., Yamazaki K., Tanuma S. (2005) Biochem J., **392**, 511-517.
20. Sharifi A., Schiffrin E. (1998) Am. J. Hypertens, **11**, 1108-1116.
21. Hamlet P., Richard L., Dam T.V., Teiger E., Orlov S.N., Gaboury L., Gossard F., Themblay J. (1995) Hypertension, **26**, 642-648.
22. Sanjuan M., Rao I N., Lai I K.-T., Gu Y., Sun S., Fuchs A., Fung-Leung W.-P., Colonna M., Karlsson L. (2006) J. Cell Biol., **172**, 1057-1068.
23. Ashman R., Goeken J., Drahos J., Lenert P. (2005) Int. Immunol., **17**, 411-420.

Поступила: 10. 09. 2008.

DELAYED APPEARANCE OF HYPERTENSION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT (SHR) INJECTED WITH CpG-RICH DNA EARLY IN ONTOGENESIS

*N.N. Veiko¹, I.L. Konorova², M.E. Neverova¹, O.V. Fidelina¹, N.A. Mkrtumova¹, E.S. Ershova¹,
M.S. Kon'kova¹, A.Iu. Postnov³*

¹Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moskvorechie str., 1, Moscow, 115478 Russia; tel.: 111-85-76; fax: 324-07-02; e-mail: ribgene@rambler.ru

²Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

³Russian Research Cardiology Complex, Moscow

In this study we have investigated properties of blood serum extracellular DNA (cell-free DNA) from patients with essential arterial hypertension (AH). Cell-free DNA concentration was not changed in the control AH group compared to norma (healthy donors) but fragments of CpG-rich cell-free DNA marker content were increased at transcribed area of ribosomal repeat (TArDNA, CpG-DNA). To evaluate effect of CpG-DNA on AH development in 2-day SHR line and in control normotensive line (WKY), 700 ng of human TArDNA single subcutaneous injection were inoculated to obtain anti-CpG-DNA polyclonal antibodies. These antibodies could change CpG-DNA contents in total cell-free DNA. Blood pressure (BP) in 9-week SHR line rats immunized with CpG-DNA was equal to BP of WKY rats. Then BP of immunized SHR steadily increased with age and reached high value 8 weeks later compared to control SHR rats. Cell-free DNA analysis in 17-week SHR line rats showed significantly reduced concentrations of cell-free DNA and also showed decrease in small DNA fragments content, but increased content of CpG-DNA (rat TArDNA). These changes were accompanied with 3.5-fold blood endonuclease activity increase and decrease of free (unbound to cell-free DNA) anti-CpG-DNA antibodies quantity. Total anti-CpG-DNA antibodies quantity in immunized rats wasn't changed compared to control animals. Thus, observed effect of increase in stable BP elevation age in immunized SHR line rats doesn't relate to increase of anti-CpG-DNA antibody production. Possible reason of this effect is further discussed.

Key words: ribosomal genes, cell-free DNA, arterial hypertension, SHR, WKY, DNA antibodies.