

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДНК ЭУКАРИОТ

© 2013 г. О.Ю. Филатов, О.В. Кашаева, Д.Ю. Бугримов*, А.А. Климович*

Московский государственный медико-стоматологический университет
имени А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва, Россия; *НИИ экспериментальной биологии и медицины
Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

Поступила: 08.07.2013. Принята: 30.07.2013

Фундаментальным понятием современной концепции иммунитета является определение иммунного ответа либо как «врождённого», либо как «адаптивного». Врождённая способность распознавать определённый тип антигенов возможна благодаря рецепторам, закодированным в зародышевой линии клеток, способных узнавать широкий спектр общих антигенов (молекул) для многих групп микроорганизмов. Это так называемые «паттернраспознающие» рецепторы. Одним из типов таких рецепторов являются Toll-like receptors 9 (TLR 9). Эти паттернраспознающие рецепторы расположены преимущественно в фагоцитирующих и антигенпрезентирующих клетках (макрофаги, дендритные клетки и т.д.). Фрагментированная ДНК эукариот принципиально может содержать лиганды для активации TLR 9 в своем составе, что было показано на модели коммерческого препарата деринат.

Ключевые слова: иммунитет, Toll-like рецепторы 9, фрагментированная ДНК эукариот, дезоксирибонуклеат натрия

ВВЕДЕНИЕ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) ставит инфекционные заболевания на одно из ведущих мест среди главных причин смертности (после ишемической болезни сердца, инсульта и др.) [1, 2]. По данным ВОЗ, ежегодно в мире умирает около 51 млн. человек, треть из них — от инфекционных болезней. Инфекционные заболевания остаются актуальной проблемой не только для развивающихся, но и для благополучных стран. В Российской Федерации ежегодно регистрируют около 35 млн. случаев инфекционных болезней [1, 2].

Фундаментальным понятием современной концепции иммунитета является определение иммунного ответа либо как «врождённого», либо как «адаптивного». Их отличие состоит в том, что рецепторы, которые ста-

рается задействовать организм для различения антигена, могут быть закодированы либо в зародышевой линии иммунокомпетентных клеток (врождённый иммунитет), либо появляться *de novo*, т.е. — как результат перегруппировки генов в иммунных клетках, способных к гибкому ответу на изменяющуюся структуру антигена (адаптивный иммунитет). Эти две системы глубоко интегрированы с помощью разнообразных молекулярных и клеточных структур и действуют синергично при бактериальной или вирусной инвазии. Врождённая способность распознавать определённый тип антигенов возможна благодаря рецепторам, закодированным в зародышевой линии клеток, способных узнавать широкий спектр общих антигенов (молекул) для многих групп микроорганизмов. Это так называемые «паттернраспознающие» или «образраспознающие» рецепторы. Они распознают консервативные молекулярные структуры микроорганизмов, такие как нуклеиновые кислоты, манноза, молекулы входящие в состав клеточных мембран микроорганизмов. Эти паттернраспознающие рецепторы рас-

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1. Кафедра патологической физиологии лечебного факультета МГМСУ им. А.И. Евдокимова.
E-mail: oleg0filatov@gmail.com

положены преимущественно в фагоцитирующих и антигенпрезентирующих клетках (макрофаги, дендритные клетки и т.д.). Распознавание системой «адаптивного иммунитета» происходит либо с участием антител, синтезируемых соответственно конкретной структуре антигена посредством соматической гипермутации в В-клетках, либо с помощью антиген-распознающих рецепторов Т-клеток [2, 3, 4, 5].

Кроме специфичности, принципиальным отличием этих двух типов иммунных реакций является также скорость и постоянство ответа. Врождённые иммунные реакции являются мало специфичными, но относительно быстрыми. Адаптивный иммунный ответ направлен на носитель антигена и формируется минимум несколько дней, но он сохраняется длительно и при повторном контакте с антигеном развивается много быстрее врождённого ответа и проявляется более интенсивно [2, 4].

В последнее время интерес к изучению врождённого иммунного ответа и его регуляции посредством адаптивного иммунного ответа на бактериальную или вирусную инвазию значительно вырос. Особенно интенсивно развивается изучение такого типа паттерн-распознающие рецепторов как Толл — подобные рецепторы [6]. Толл-подобные рецепторы (*англ. Toll-like receptor, TLR*) — класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ. Они играют ключевую роль в реализации врождённого иммунного ответа. На сегодняшний день у человека и мыши идентифицировано 13 типов Толл-подобных рецепторов (TLR).

Лигандами для TLR 9 (толл-подобных рецепторов 9, CD289) — мембранных белков, входящих в группу толл-подобных рецепторов, обеспечивающих функционирование врождённого иммунитета, являются неметилированные CpG мотивы ДНК [7, 8]. TLR 9 имеют внутриклеточную, точнее эндосомальную локализацию и экспрессируются моноцитами (макрофагами), плазматоцитозидными дендритными клетками и В-лимфоцитами. Неметилированные CpG мотивы распространены в бактериальной и вирусной ДНК. Именно их распознавание обеспечивают TLR 9 в системе врождённого иммунного ответа [3, 7, 8].

Метилирование ДНК является динамичным процессом, изменяющимся при разви-

тии тканей, дифференцировке и старении. Гипометилирование выявлено в тканях старых *salmon* (лососей), мышей, крыс, коров и человека. Оно особенно представлено в клетках головного мозга, печени, слизистой тонкого кишечника, сердца, селезенки и Т-лимфоцитарных тканях [1]. Все это позволяет предположить, что и фрагменты ДНК эукариот, содержащие достаточно неметилированных CpG мотивов, могут взаимодействовать с TLR 9.

В качестве модели фрагментированного ДНК эукариот нами был выбран коммерческий препарат Деринат® (натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты). Препарат является олигодезоксинуклеотидом (ОДН) эукариотического происхождения с молекулярной массой до 500 кДа, получаемым из молок рыб лососёвых пород. Учитывая, что масса одного нуклеотида составляет примерно 345 Да, количество нуклеотидов в молекуле исходного вещества оценивается как 1500. Поскольку длина наиболее распространённых ОДН измеряется в парах нуклеотидов, и равна 20 — 30 парам, молекула препарата состоит в среднем из 750 пар нуклеотидов. Ранее в доступной литературе высказывались предположения о том, что механизм действия дезоксирибонуклеата натрия на иммунокомпетентные клетки может опосредоваться через TLR 9 [2, 9, 10].

Для того чтобы проверить это предположение и оценить принципиальную возможность того, что фрагментированная ДНК эукариот может содержать лиганды для активации TLR 9, нами была проведена настоящая исследование.

Цель исследования:

1) определить нуклеотидный состав концевых фрагментов молекулы выбранного в качестве модели фрагментированного ДНК эукариот Дезоксирибонуклеата натрия.

2) экспериментально показать повышение уровня экспрессии TLR 9 иммунокомпетентными клетками (макрофагами) под влиянием фрагментированного ДНК эукариот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для количественного определения концентраций цепей ДНК и нуклеотидного состава окончаний раствора Дезоксирибонуклеата натрия (стандартный флакон коммерческого препарата Деринат®, раствор для внутримышечного введения 15 мг/мл, 5 мл) исполь-

зовался метод электрофореза ДНК в блоке агарозного геля с использованием трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) буфера, а также контроль концентрации проводился на приборе Флюориметр Qubit 2,0. Это позволило с высокой точностью (0,1 – 100 нг/мкл для ДНК и 0,25 – 100 нг/мкл для РНК) использовать связь флуоресцентного зонда с молекулой-мишенью. Погрешность и ошибка измерений составляла соответственно $p \leq 0,01$ и 5%.

Первоначально, для выделения вытяжки макрофагов, на половозрелых крысах-самцах (*Rattus rattus L.*), начальной массой 150 – 200 г в асептических условиях проводилось моделирование раны по модифицированной методике И.А. Сыченникова (1974) [11, 12,13]. Физиологическая особенность заживления асептической раны приводило к миграции макрофагов в зону заживления. Животные в эксперименте были разделены на 4 группы:

1. Контрольная группа (12 животных) – моделировалась рана без последующего введения Дезоксирибонуклеата натрия.

2. Группа МТДП (12 животных) – однократное ежедневное введение в область мягких тканей раны Дезоксирибонуклеата натрия в малой терапевтической дозе (МТДП): 0,0039 мл препарата (0,044 мг на крысу, рассчитанной по экстраполяции).

3. Группа СТДП (12 животных) – однократное ежедневное введение в область мягких тканей раны Дезоксирибонуклеата натрия в средней терапевтической дозе (СТДП): 0,015 мл препарата (0,11 мг на крысу).

4. Группа ВТДП (12 животных) – однократное ежедневное введение в область мягких тканей раны Дезоксирибонуклеата натрия в высокой терапевтической дозе (ВТДП): 0,1 мл препарата (0,99 мг на крысу).

Лекарственный препарат вводили внутримышечно, в ткани, около раны сразу после моделирования раны, на первые, вторые и на третьи сутки после моделирования. Это сроки обусловлены наибольшей интенсивностью миграции в очаг поражения макрофагов.

На каждом сроке исследования из-под повязки, из зоны регенерации собиралась отделяемое содержимое, которое с использованием маркеров макрофагальной реакции, проверялось в мазках-отпечатках на количественное наличие искомым клеток (макрофагов).

Наличие макрофагов – важное звено эксперимента, т.к. именно эти клетки, согласно дизайну исследования, были выбраны для

определения повышения экспрессии TLR 9, под влиянием Дезоксирибонуклеата натрия.

Далее проводилась окраска мазка метиленовым синим, после чего определялось число клеток в поле зрения для каждого срока и каждого лабораторного животного.

Следующий этап – определение количественной экспрессии TLR-9.

Изучение количественной экспрессии TLR-9 в клеточном материале раневого содержимого (макрофагов) крыс проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Эксперимент осуществлялся в несколько этапов: экстракция тотальной РНК тризоловым методом, процесс удаления примеси геномной ДНК из выделенной тотальной РНК, обратная транскрипция и ПЦР-амплификация в режиме реального времени. Тотальную РНК выделяли тризоловым методом по Маниатису [11, 12,13]. ПЦР-РВ проводили по следующей схеме: праймеры и зонды для ПЦР-РВ моделированы в программе Vector NTI 8,0, в соответствии с последовательностями мРНК исследуемых генов (из базы данных GenBank), и синтезированы в фирме Синтол (РФ). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали Hot Start Taq DNA Polymerase (СибЭнзим, РФ), Hot Start Taq DNA Polymerase (Qiagen, Германия), TaqBead HotStart Polymerase (Promega, США), а также наборы «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Буфер Б)» (Синтол, РФ). Для определения экспрессии гена актина (house-keeping гена), помимо имеющейся системы, использовали «Набор реактивов для обнаружения и определения ДНК-актина человека» (Синтол, РФ). Реакцию проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя на приборе iCycler BIO RAD (США) при следующей программе: 500С – 2 мин., 950С – 10 мин., (56–680С – 50 секунд, 950С – 15 секунд) 40 циклов. Определение относительного уровня экспрессии генов проводили с применением сравнительного метода пороговых циклов и программы REST 2008 [13].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием методов вариационной статистики и с использованием t-критерия Стьюдента ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке основного вещества Дезоксирибонуклеата натрия обнаружены три типа фрагментов ДНК (табл. 1): длинные – 40 %,

Таблица 1. Соотношение длинных, средних и коротких CpG-ОДН в растворе Дезоксирибонуклеата натрия

Серия вещества (номер пробы)	ДНК Мг 150 – 170 кДа (короткие)	ДНК Мг 180 – 200 кДа (средние)	ДНК Мг 220 – 250 кДа (длинные)	Соотношение РНК/ДНК	Длинные оканчиваются на CpG	Средние оканчиваются на CpG	Короткие оканчиваются на CpG	Прочие примеси
3070210 (№1)	20% (3мг/мл)	40% (6мг/мл)	40% (6мг/мл)	0,15	10%	20%	30%	следовая погрешность
3070210 (№2)	10% (1,5 мг/мл)	40% (6мг/мл)	50% (7,5 мг/мл)	0,075	10%	20%	30%	следовая погрешность
3070210 (№3)	20% (3мг/мл)	40% (6мг/мл)	40% (6мг/мл)	0,15	10%	20%	30%	следовая погрешность
3070210 (№4)	20% (3мг/мл)	40% (6мг/мл)	40% (6мг/мл)	0,01	10%	20%	30%	следовая погрешность
3070210 (№5)	10% (1,5 мг/мл)	40% (6мг/мл)	50% (7,5 мг/мл)	0,075	10%	20%	30%	следовая погрешность
3070210 (№6)	20% (3мг/мл)	40% (6мг/мл)	40% (6мг/мл)	0,065	10%	20%	30%	следовая погрешность

средние – 40% и короткие – 20%. Количественные соотношения между различными типами нуклеотидов в целом соответствовали распределению, описываемому правилом Чаргаффа. Определение нуклеотидного состава концевых участков фрагментов ДНК, которые входят в состав исследуемого препарата Деринат®, показало, что короткие фрагменты в 25% случаев оканчиваются неметилированным динуклеотидным мотивом CpG. Средние фрагменты в 15–20% случаев оканчиваются неметилированным мотивом CpG, а длинные фрагменты оканчиваются неметилированным мотивом CpG в 5% случаев (табл. 1).

Таким образом, выбранный в качестве модели фрагментированного ДНК эукариот, коммерческий лекарственный препарат Деринат® преимущественно содержит короткие и средние цепи ДНК, оканчивающиеся в среднем, в не менее 50% мотивом CpG.

Неметилированные CpG-мотивы в ДНК эукариот, скрыты внутри её структуры и содержатся, преимущественно, в так называемых «CpG-островках». Размеры этих

островков варьируют от 0,5 до 5 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов). Их встречаемость – 1:100 т.п.н.

Все house-keeping genes (постоянно активные гены) и 40% tissue-specific genes (тканеспецифичные гены) содержат CpG-островки.

В процессе производства лекарственного препарата Деринат®, в результате фрагментации ультразвуком молекул ДНК, содержащихся в гомогенизате молок лосося, неметилированные CpG-мотивы обнажаются и становятся доступными для воздействия на TLR 9 клеток, экспрессирующих этот рецептор. Таким образом, этот результат показал принципиальную возможность фрагментированной ДНК эукариот содержать в с лиганды для TLR 9 в своем составе.

Чтобы убедиться, что ДНК эукариот способно стимулировать накопление иммунокомпетентных клеток в раневом содержимом, мы провели исследование мазков-отпечатков взвеси ткани раневого содержимого. Это исследование показало (табл. 2), что введение Дезоксирибонуклеата натрия вызывало миграцию макрофагов в область моделирован-

ной раны активнее, чем в контрольной группе. Эта разница составляла значение от 30 до 90% (по сравнению с контрольной группой) и зависела от дозы вводимого препарата. Наиболее выраженной миграция становилась на третьи сутки введения ВТДП, она превысила данные контрольной группы в 2 раза.

Таким образом, можно говорить, что введение Дезоксирибонуклеата натрия вызывало усиление регенерации и активации макрофагальных факторов заживления раны, и интенсивнее всего выражалось при введении ВТДП в окружающие ткани.

Для подтверждения влияния фрагментированного ДНК эукариот (на модели Дезоксирибонуклеата натрия) на способность иммунокомпетентных клеток изменять экспрессию рецептора TLR 9, было проведено следующее исследование. Мы определяли уровень экспрессии TLR 9 макрофагов в условиях эксперимента с моделированной раной. Результат представлен в **табл. 3**. Представленные данные позволяют проследить отчетливую закономерность: в материале раневого содержимого в макрофагах происходит четко фиксируемое повышение экспрессии TLR 9, причем относительные единицы её, пропорционально и достоверно увеличиваются при введении высоких доз Дезоксирибонуклеата натрия. Это напрямую свидетельствует о зависимости активности макрофагов от введения Дезоксирибонуклеата натрия.

Однако нельзя исключить из рассмотрения и иные механизмы реализации действия фрагментированной ДНК эукариот. Так, можно предположить, что применение Дезоксирибонуклеата натрия может вызывать экспрессию TLR 9 любых других клеточных популяций организма (дендритные клетки, клетки Лангерганса, лимфоциты). В свою очередь активация TLR 9 плазматоцитидных дендритных клеток может вызывать противовирусное действие, за счёт выработки интерферонов I типа (α и β), которые активируют ряд генов, ответственных за эффект прямой противовирусной активности [14].

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, можно заключить следующее.

ДНК эукариот, моделью которой в данной работе послужил коммерческий лекарственный препарат Деринат[®], несет в своем составе лиганды (неметилированные CpG-мотивы) для рецепторного взаимодей-

Таблица 2. Соотношение содержания макрофагов в поле зрения в экспериментальных группах (п/з)

Группы	Сроки эксперимента			
	начало	1 сутки	2 сутки	3 сутки
контрольная группа	1–2	1–2	2–3	3–4
НТДП	1–2*	1–2*	3–4	4–5*
СТДП	2–3	2–3	4–5*	4–5*
ВТДП	2–3*	4–5*	4–5	6–8*

Примечание: * $p \leq 0,01$

Таблица 3. Уровень экспрессии TLR-9 макрофагов, выделенных из мягких тканей экспериментальных, и рассчитанный с помощью программного обеспечения Rest 2008, (о.е.э.)

Группы	Сроки эксперимента			
	начало	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки
контрольная группа	1,2±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1
НТДП	1,3±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1	1,6±0,1
СТДП	1,4±0,1	1,6±0,1	1,6±0,1	1,7±0,1
ВТДП	1,5±0,1	1,7±0,1	1,8±0,1	1,9±0,1

Примечание: * $p \leq 0,01$, о.е.э. — относительные единицы экспрессии

ствия с TLR 9 иммунокомпетентных клеток, очевидно в достаточном количестве для их активации. Этот факт позволяет, во-первых, использовать фрагменты ДНК эукариот, обогащенные неметилированными CpG-мотивами, в качестве средства коррекции функционирования иммунокомпетентных клеток, в частности макрофагов. Во-вторых, этот факт позволяет предположить принципиальную возможность эндогенно образующихся (в том числе и при патологических процессах) фрагментов собственной ДНК участвовать в активации иммунного ответа.

Таким образом, из полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Действующее вещество выбранного в качестве модели фрагментированного ДНК эукариот Дезоксирибонуклеата натрия более чем на 2/3 состоит из фрагментов ДНК, оканчивающихся нуклеотидным мотивом CpG.

2. В область моделированной раны мигрировали макрофаги — именно те клетки, у которых имеются филогенетически наиболее значительное количество TLR 9, и одни из многих клеток, физиология которых позво-

ляет им участвовать в регенерации тканей и являться незаменимым звеном врождённого иммунитета. Интенсивность миграции макрофагов была прямо связана с действием Дезоксирибонуклеата натрия.

3. Введение Дезоксирибонуклеата натрия вызывает экспрессию TLR 9 макрофагов, пропорционально зависящую от дозы вводимого вещества.

4. Фрагментированная ДНК эукариот способна взаимодействовать с TLR 9 иммунокомпетентных клеток, по крайней мере, макрофагов, и вызывать их активацию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ганковская О.А.* Молекулярно-генетические механизмы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек при патологии инфекционного генеза. Автореферат на соискание учёной степени канд. мед. наук. Москва 2010, 33 с.
2. *Громов М.И.* Применение иммуномодуляторов в хирургической практике. TERRA MEDICA 2006, 1, 10 – 14.
3. *Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С.* Действие дезоксирибонуклеиновой кислоты прокариот на гуморальные и клеточные факторы врождённого и адаптивного иммунитета позвоночных. Тихоокеанский медицинский журнал 2009, 3, 8 – 10.
4. *Singh S.M., Murphy B. and O'Reilly R.L.* Clin. Gen. Involvement of gene-diet/drug interaction in DNA methylation and its contribution to complex diseases: from cancer to schizophrenia 2003, 64, 6, 451 – 460.
5. *Schetter C., Vollmer J.* Toll-like receptors involved in the response to microbial pathogens: development of agonists for Toll-like receptor 9. Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 2004, 7, 204 – 210.
6. *Goerdts S., Orfanos C.E.* Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. Immunity 1999, 10, 137 – 142.
7. Novel Tlr-9 Agonist Cyt003-Qbg10 Shown To Improve Asthma Control In Placebo-Controlled Phase II Clinical Trial. The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2011, May, 13 – 18.
8. *Vollmer J., Weeratna R.D., Jurk M., Samulowicz U., McCluskie M.J., Payette P., Davis H.L. et al.* Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. Immunology 2004, 113 (2).
9. *Пыцкий В.И.* В кн.: Механизмы возникновения и развития бронхиальных астм и основные принципы их лечения. Фармарус Принт Медиа, Москва 2008, 46 – 47.
10. *Серов В.Н., Тютюнник В.А., Твердикова М.А., Павлович С.В.* Иммунная и репаративная терапия в комплексном лечении воспалительных заболеваний гениталий у женщин. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии 2010, 9, 2, 57 – 63.
11. Лабораторные методы исследования в клинике. Под ред. В.В.Меньшикова. Медицина, Москва 1997, 191.
12. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* В кн.: Молекулярное клонирование. Мир, Москва 1984, 479.
13. *Потапов С.Г., Хрустиков В.С.* Изучение поглощательной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса. В кн.: Проблемы гематологии и переливания крови, Москва 1977, 11, 49 – 49.
14. *Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтм А.* Пер. с англ. Ковальчук Л.В., Певницкий Л.А., Хромова С.С.. В кн.: Иммунология. 7-е издание. Учебник для вузов. Логосфера, Москва 2007, 568.

MORPHOPHYSIOLOGICAL PRINCIPLES OF IMMUNOLOGICAL EFFECT OF EUKARYOTIC DNA

O.J. Filatov, O.V. Kashaev, D.Y. Bugrimov*, A.A. Klimovitch*

Moscow State Medical and Dental University after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia;

**Research Institute of Experimental Biology and Medicine of Voronezh State Medical University after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia*

The fundamental concept of the modern concept of immunity is to determine the immune response to either «innate» or as «adaptive». The innate ability to recognize a specific type of antigen possible by receptors encoded in the germ line cells capable of recognizing a wide range of common antigens (molecules) for many groups of organisms. This is the so-called «Pattern recognition receptors (PRRs)». One type of these receptors is Toll-like receptors 9 (TLR 9). Pattern recognition receptors (PRRs) are located mainly in phagocytic and antigen presenting cells (macrophages, dendritic cells, etc.). Fragmented DNA eukaryote cells can to comprise ligands to activate TLR 9, in principle. Its composition, has been shown to model the commercial pharmaceutical drug, Derinat.