

И.Л. Конорова¹, М.Ю. Максимова¹, И.Н. Смирнова¹,
Т.А. Болотова¹, Е.С. Ершова², Н.Н. Вейко², З.А. Суслина¹

Циркулирующая в плазме крови внеклеточная ДНК в патогенезе ишемического инсульта: роль транскрибируемой области рибосомного повтора

¹ — ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН, 125367, Москва, Волоколамское ш., 8

² — ФГБУ Медико-генетический научный центр РАМН, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

К настоящему времени установлено, что ДНК наряду с основными функциями (хранение и реализация генетической информации) также выполняет и ряд других функций, в частности, несет CpG-богатые последовательности, обладающие иммуностимулирующими свойствами. В данной работе мы исследовали динамику количественных и качественных характеристик внеклеточной ДНК (вкДНК), циркулирующей в плазме крови, в сопоставлении с биомеханикой потока образцов аутологичной крови, объемом инфаркта мозга и динамикой неврологических нарушений у больных в остром периоде ишемического инсульта. Полученные результаты выявили новую гемодинамическую функцию циркулирующей вкДНК и её важную роль в регуляции гидродинамического сопротивления потока крови в условиях нарушенного мозгового кровообращения. Показана зависимость объема инфаркта мозга, динамики клинической картины от концентрации в плазме CpG-богатой последовательности транскрибируемой области рибосомного повтора (рДНК). Установлено наличие новой функции фрагментов рДНК, циркулирующих в общем пуле вкДНК, а именно осуществление взаимосвязи между клетками крови и головного мозга для индукции нейропротекции при ишемическом инсульте.

Ключевые слова: ишемический инсульт, объем инфаркта, тяжесть неврологического дефицита, внеклеточная ДНК, циркулирующая ДНК, эндонуклеазы, рДНК, CpG-ДНК мотивы, сателлит III (1q12), снижающий гидродинамическое сопротивление полимер

I.L. Konorova¹, M.Iu. Maximova¹, I.N. Smirnova¹,
T.A. Bolotova¹, E.S. Ershova², N.N. Veiko², Z.A. Suslina¹

Circulating in blood plasma cell-free DNA in the pathogenesis of ischemic stroke: the role of the transcribed region of ribosomal repeat

¹ — Federal State Budgetary Institution «Research Center of Neurology», Russian Academy of Medical Sciences, 125367, Moscow, Russia

² — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478, Moscow, Russia

It has been established that DNA, in addition to its basic functions (storage and realization of genetic information), also carries CpG-rich sequences having immunopotentiating properties. In this study we investigated the dynamics of the quantitative and qualitative characteristics of cell-free DNA (cfDNA) circulating in blood plasma of patients with acute ischemic stroke compared with the biomechanics of their blood samples flow, cerebral infarct volume and dynamics of neurological disorders. The results obtained revealed a new drag-reducing function of the circulating cfDNA and its important role in a regulation of blood flow hydrodynamic resistance in conditions of disturbed cerebral circulation. Moreover, our results showed a dependence of cerebral infarct volume and clinical picture dynamics on the plasma concentration of transcribed region of ribosomal repeat CpG-rich sequences (rDNA). It was established a new function of rDNA fragments circulating in the total pool cfDNA, i.e., generation of the intercommunication between blood and brain cells to induce neuroprotection in ischemic stroke.

Key words: ischemic stroke, infarct volume, neurological deficit severity, cell-free DNA, circulating DNA, endonucleases, rDNA, CpG-DNA motifs, satellite III (1q12), drag-reducing polymer

В периферической крови человека циркулируют фрагменты внеклеточной ДНК (вкДНК), основным источником которой считают хроматин погибающих клеток организма [1], хотя она также синтезируется *de novo* и экскретируется во внеклеточное пространство жизнеспособными клетками организма [2]. Ежедневно миллиарды клеток нашего организма подвергаются запрограммированной клеточной гибели (в основном нейтрофилы) и сотни миллиардов образуются и теряет ядра в стадии своей конечной дифференцировки (в основном эритроциты), в результате чего из клеток ежедневно высвобождается и деградирует более 1 г ДНК [3, 4]. Для поддержания внутреннего гомеостаза организма вся ДНК должна быть должным образом фрагментирована и утилизирована, в чем неотъемлемое участие принимают специфические нуклеазы. Полагают, что благодаря некрозу в циркуляции появляются длинные фрагменты вкДНК, а апоптозу — более короткие [4, 5]. Соотношение длинных и коротких фрагментов характеризует целостность вкДНК (наличие одно- и двунилевых разрывов) [6]. Степень деградации вкДНК при апоптозе зависит от плотности упаковки ДНК и связана с транскрипционной активностью генома, что приводит к обогащению вкДНК кодирующими последовательностями [7].

При беременности, травме и патологии, сопровождающейся гибелью большого количества клеток, концентрация вкДНК может возрасти в десятки и сотни раз; её динамика коррелирует с тяжестью заболевания и имеет диагностическую значимость при ряде заболеваний [3, 8, 9]. Резкое повышение концентрации при ишемическом и геморрагическом инсульте служит неблагоприятным прогностическим фактором [9—12]. На модели фокальной ишемии/реперфузии головного мозга у животных показано, что концентрация вкДНК коррелирует с объемом инфаркта мозга [13], а внеклеточный хроматин, высвобождаемый из погибающих клеток и активированных нейтрофилов, повреждает окружающие ткани [14].

Ранее мы показали, что у больных с хронической сердечно-сосудистой и цереброваскулярной патологией в составе циркулирующей вкДНК накапливаются значительные количества транскрибируемой области рибосомного повтора (рДНК) [15, 16]. Это умеренно повторяющаяся последовательность генома (порядка 400 копий [17]), относительно устойчивая к двунилевым разрывам, что обуславливает её медленное выведение из системы кровообращения [18]. Высокий уровень рДНК в крови является маркером хронического патологического процесса [15]. Будучи высокомолекулярным линейным полимером, фрагмент рДНК имеет длину (порядка 13 тысяч пар нуклеотидов — т.п.н.), достаточную, чтобы снижать

гидродинамическое сопротивление (ГС) потока жидкости в соответствии с эффектом Томса [19]. Мы предположили, что рДНК, будучи высокомолекулярным линейным полимером, наряду с другими функциями, должен «гасить» локальные вихревые потоки в системе циркуляции крови, улучшая характеристики кровотока. Это подтверждено при исследовании образцов крови здоровых доноров и больных с окклюзирующими атеросклеротическими изменениями сонных артерий без выраженного неврологического дефицита: скорость протекания образцов крови через стеклянную трубку в стандартных условиях турбулентного потока прямо коррелировала с содержанием в пуле плазменной вкДНК, выделенной из плазмы, фрагмента рДНК. Эффект улучшения текучести крови путем снижения ГС её потока проявлялся в пределах определенных концентраций рДНК, выход за пределы которых у больных ассоциировался с повышением ГС потока крови и тяжестью неврологической симптоматики [16].

Фрагмент рДНК наряду с влиянием на характеристики потока крови, подобно бактериальной ДНК, содержит большое количество метилированных, цитозин-фосфат-гуанин (СрG)-динуклеотидов, которые являются лигандом Toll-подобного рецептора 9 типа (TLR9) [20]. Логично предположить, что СрG-богатые фрагменты рДНК могут быть потенциальным индуктором «стерильного» воспаления в области ишемии/реперфузии, выступая в качестве связанного с повреждением эндогенного молекулярного паттерна (DAMP), воздействующего на клетки в области пенумбры [21]. На модели инсульта у мышей показано, что СрG-лиганды (синтетические олигодезокси-нуклеотиды), стимулирующие экспрессию рецептора врожденного иммунитета — TLR9, повышают устойчивость (прекондиционирование) головного мозга к ишемии [22]. Причем нейропротекторный эффект достигается как при системном, так и при интраназальном введении СрG-лиганда [23, 24]. Правомерно встает вопрос, влияют ли фрагменты рДНК, циркулирующие в пуле вкДНК, на формирование инфаркта мозга при инсульте.

Цель исследования — выявление взаимосвязи между циркулирующими в плазме крови фрагментами рДНК и величиной инфаркта мозга, а также динамикой неврологических нарушений у больных в острой стадии ишемического инсульта.

Методика

Материалом служили образцы венозной крови клинически здоровых доноров (получали из Госпиталя ФСБ и Гематологического научного центра РАМН) и больных в острой стадии ишемического инсульта, находившихся на лечении в Федеральном государствен-

ном бюджетном учреждении «Научный центр неврологии» РАМН (ФГБУ «НЦН» РАМН). От каждого донора крови было получено согласие на забор крови и использование результатов обследования в научных целях. В качестве антикоагулянта использовали 500 ЕД гепарина (Richter, Венгрия). Из цельной крови центрифугированием (450g) отделяли плазму, замораживали и хранили при температуре -70°C . В каждом образце исследовали биомеханические свойства крови (ГС её потока), и характеристики вкДНК в аутологичной плазме, включая общую концентрацию вкДНК, концентрацию устойчивых к двунитевым разрывам высокомолекулярных фрагментов рДНК и легко подвергающейся фрагментации, сателлитной последовательности SatIII; содержание рДНК и SatIII в 1 нг пДНК; длину фрагментов вкДНК и нуклеазную активность плазмы.

Характеристика больных.

Контрольную группу ($n = 25$) составили клинически здоровые доноры: 16 мужчин и 9 женщин, в возрасте от 26 до 65 лет, которые по данным Госпиталя ФСБ и Гематологического научного центра РАМН не страдали артериальной гипертензией (АГ) и атеросклерозом.

Группу больных ($n = 62$) составили больные с ишемическим инсультом, поступившие в ФГБУ «НЦН» РАМН в острейшем периоде заболевания (первые 3 суток), не нуждающиеся в условиях реанимации: 38 мужчин и 23 женщины, в возрасте от 32 до 83 лет. Основным сосудистым заболеванием у 10 больных была АГ, у 3 — атеросклероз, у 49 больных — их сочетание. По результатам клинического обследования у 25 больных был диагностирован атеротромботический подтип инсульта, включая 4 артерио-артериальные эмболии, у 17 — кардиогенный эмболический, у 12 — лакунарный и у 8 чел. — гемодинамический подтип инсульта.

Исследованные параметры

Степень тяжести неврологических нарушений у больных определяли по шкале инсульта Национального института здоровья (NIHSS). Отсутствие неврологического дефицита оценивали как 0 баллов; неврологический дефицит легкой степени тяжести — от 1 до 6 баллов; средней степени тяжести — от 7 до 13 баллов включительно; значительно выраженный, соответствующий тяжелому инсульту — 14 баллов и более.

Наличие инфаркта у всех больных подтверждались результатами магнитно-резонансной томографии мозга (МРТ), проведенной при их поступлении в клинику. *Объем инфаркта* считали обширным, если он распространялся на весь бассейн артерий каротидной системы; большим — на весь бассейн одной

или нескольких ветвей мозговых артерий; средним — локализующийся в пределах бассейна отдельных ветвей этих артерий; малым — лакунарный инфаркт. При этом у 5 больных отмечался малый, у 36 — средний, у 13 — большой, а у 8 чел. — обширный инфаркт различной локализации.

ГС потока образца крови определяли по автоматически регистрируемому (с точностью до 0,02 с) времени протекания стандартного её объема через стеклянный капилляр в стандартных условиях турбулентного потока ($Re = 8000$) [25, 26].

Свойства вкДНК в плазме определяли с использованием описанных ранее методик [15, 17, 20]. *Выделение вкДНК* осуществляли из 0,5 мл предварительно обработанной РНКазой А и протеиназой К плазмы крови стандартным методом фенольной экстракции. *Концентрацию вкДНК* измеряли флуориметрически на люминесцентном спектрометре «LS 55» («Perkin Elmer», Англия) не менее 2 раз для каждого образца, используя ДНК-связывающийся флуоресцентный краситель (бис-бензimid, Hoechst 33258, Serva; $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм, $\lambda_{\text{флу}} = 450$ нм). Чтобы избежать влияния возможных белковых примесей на флуоресценцию комплекса вкДНК с красителем, флуоресценцию измеряли до и после исчерпывающего гидролиза ДНКазой 1 (фоновый сигнал). Относительная стандартная ошибка метода составляла 3%. *Размер фрагментов выделенной вкДНК* определяли методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле, который окрашивали бромистым этидием. В качестве маркеров длины использовали гидролизат ДНК рестриктазы фага λ HindIII и наборы фирмы «Ферментас» (Литва). *Концентрацию повторяющихся последовательностей генома (рДНК и SatIII)* в плазме определяли с использованием описанного метода количественной нерадиоактивной дот-гибридизации выделенной и денатурированной щелочью вкДНК с биотинилированными зондами на фильтрах (Hybond ExtraC, «Amersham») [15, 17]. В качестве зонда на консервативный участок рДНК использовали биотинилированную плазмиду, содержащую вставку рибосомного повтора человека в векторе рUC18 (от 9346 до 10783 нуклеотида, в соответствии с HSU 13369, GeneBank), для субфракции сателлита III — зонд рRt301. Расчет содержания рДНК приводится на всю транскрибируемую область рибосомного повтора. Биотин выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза («Sigma», США). Использовали субстрат для фосфатазы BCIP в присутствии NBT, который образует нерастворимый осадок («Sigma», США). Гибридизационный сигнал — интегральную интенсивность окрашенных пятен на фильтре — определяли компьютерным анализом

изображения фильтра с помощью программы «Images 6.0» (ИнтерЭВМ, Москва). Относительная стандартная ошибка метода измерения концентрации рДНК составляла 7—10%. Содержание рДНК и C_{satIII} в 1 нг вкДНК вычисляли путем деления значений концентрации рДНК и C_{satIII} в плазме на концентрацию вкДНК. Стандартную ошибку измерения содержания рДНК и C_{satIII} определяли, суммируя погрешности анализа концентраций вкДНК и рДНК, а также вкДНК и C_{satIII} в одном и том же образце плазмы.

Нуклеазную активность плазмы как показатель эффективности системы элиминации вкДНК из крови оценивали методом флуориметрии с использованием модельного субстрата — комплекса одонитевой ДНК с 30-звенным олигонуклеотидом, содержащим на 5'-конце флуоресцентную группу (5(6)-карбокситетрафторфлуоресцеин), а на 3'-конце — тушитель флуоресценции (ВНQ1, «Синтол», Москва, РФ). При эндонуклеазном гидролизе интенсивность флуоресценции красителя увеличивается [27]. Для калибровки использовали стандартный раствор ДНКазы-1 разных концентраций. Результат приводится в единицах ДНКазной активности (ед. акт./мл): 1 единица соответствует активности ДНКазы-1, взятой в концентрации 1 нг в 1 мл раствора (1 ч, 37°C).

Генотипирование ДНКазы I проводили по схеме 2, методика [28]. Данная система генотипирования состоит из трех независимых реакций. Для различия между аллелями $DNASE1*1$ (или *3) и $DNASE1*2$ (или *4) и для детекции $DNASE1*4$ проводили гидролиз эндонуклеазой рестрикции *XhoI* после проведения ПЦР. Выявление $DNASE1*3$ осуществляли методом амплификации рефракторной мутационной системы.

Полученные для каждого больного характеристики вкДНК сопоставляли с гидродинамическими характеристиками образца его крови, величиной инфаркта головного мозга и особенностями клинического течения заболевания.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Statgraphics Plus (1997) и Statistica 6.0 (2001). При ненормальном распределении данных результаты представляли в виде медианы значений и межквартильного интервала (Ме [25%; 75%]). Для проверки гипотезы о различии независимых выборок использовали Mann—Whitney U-тест и t-тест. Для оценки значимости различий двух совокупностей количественных признаков, измеренных в разных условиях, применяли Wilcoxon W-тест. Отличия при $P < 0,05$ считали значимыми. Для выявления связи признаков использовали непараметрический корреляционный анализ по Спирмену и параметрический — по Пирсону.

Результаты и обсуждение

Характеристики вкДНК и ГС потока крови у контрольных доноров

В организме человека многие процессы носят регуляторный характер и направлены на поддержание гомеостаза. Известно, что высокая нуклеазная активность крови приводит к быстрой деградации нуклеиновых кислот, а её изменение у больных по сравнению со здоровыми донорами обратно коррелирует с изменением концентрации вкДНК [3, 29]. Нормальный уровень вкДНК в плазме крови клинически здоровых доноров (196 нг/мл) поддерживается работой эндонуклеаз плазмы, что способствует её деградации и выведению из системы кровообращения (табл. 1). При этом индекс целостности вкДНК, оцениваемый нами по соотношению концентраций длинных и коротких фрагментов ($C_{pДНК}/C_{satIII}$), колебался от 1,86 до 0,07 (медиана 0,25 [0,14; 0,49]). Рост концентрации вкДНК сопровождался увеличением активности эндонуклеаз плазмы, а уменьшение — снижением.

Таблица 1

Гемодинамическое сопротивление и характеристики вкДНК у контрольных доноров

Контрольная группа	ГСК (%)	$C_{вкДНК}$ (нг/мл)	$C_{pДНК}$ (нг/мл)	$C_{pДНК}/C_{вкДНК}$ (пг/нг вкДНК)	C_{satIII} (нг/мл)	$C_{satIII}/C_{pДНК}$ (пг/нг вкДНК)	НА (ед. акт./мл плазмы)
Все доноры (n = 25)	106 [105; 107]	196 [117; 240]	0,42 [0,34; 0,55]	2,4 [1,6; 4,2]	1,47 [1,04; 2,52]	7,8 [5,7; 14,3]	3,8 [3,0; 5,9]
Подгруппа I (n = 12)	106 [105; 107]	117 [100; 134]	0,46 [0,34; 0,51]	4,3 [3,1; 4,7]	1,10 [0,89; 2,00]	8,9 [6,2; 18,0]	3,0 [2,2; 4,5]
Подгруппа II (n = 13)	106 [105; 107]	246 ^{***} [225; 315]	0,40 [0,27; 0,57]	1,6 ^{**} [1,2; 2,3]	1,64 [0,85; 4,40]	5,7 [5,3; 14,3]	4,3 [°] [3,5; 6,3]

Примечание. Здесь и в остальных таблицах: ГСК — гидродинамическое сопротивление крови; $C_{вкДНК}$ — концентрация вкДНК; $C_{pДНК}$ — концентрация рДНК; $C_{вкДНК}/C_{pДНК}$ — содержание рДНК в 1 нг вкДНК; C_{satIII} — концентрация сателлита III; НА — нуклеазная активность плазмы (° — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ относительно группы I; U-test)

Известно, что под воздействием ферментов фрагментируются преимущественно богатые аденин-тимином (АТ-богатые) последовательности вкДНК, что обусловлено структурными характеристиками циркулирующих фрагментов [30]. Тандемно организованная последовательность генома Сат III АТ-богата и имеет низкомолекулярную элементарную повторяющуюся единицу длиной 0,005 т.п.н., в связи с чем может быстро фрагментироваться и выводиться из кровотока. Полученные нами данные свидетельствуют, что выведение из циркуляции АТ-богатых фрагментов приводит к снижению общей концентрации вкДНК и повышению в её составе доли относительно устойчивых, высокомолекулярных фрагментов рДНК ($r = -0,96, p < 0,001$ — для образцов с концентрацией вкДНК, меньше медианы). При этом у доноров, уровень вкДНК в плазме крови которых был ниже медианы (в табл. 1: подгруппа I), содержание таких фрагментов в 1 нг вкДНК почти вдвое превосходило ($U = 38, p < 0,05$) их содержание у лиц с уровнем вкДНК, превышающим медиану (подгруппа II). Важно подчеркнуть, что, колебания концентрации вкДНК в плазме крови доноров осуществлялись без существенных изменений концентрации рДНК. Наблюдаемое по мере увеличения концентрации вкДНК снижение в её пуле содержания фрагментов рДНК (подгруппа II, $r = -0,64, p < 0,001$), по-видимому, обусловлено «разбавлением» их другими высокомолекулярными нуклеотидными последовательностями, о чем свидетельствуют высокомолекулярные фрагменты, составляющие абсолютное большинство на электрофореграммах вкДНК доноров обеих подгрупп (рис. 1 а).

Как и в предыдущих исследованиях [31], между концентрацией вкДНК и ГСК доноров выявлялась слабая обратная корреляционная зависимость ($r = -0,54, p = 0,024$). Слабая сила этой зависимости обусловлена колебаниями показателя ГС крови в узком диапазоне. При этом впервые установлено, что ГСК снижается не только при увеличении, но и при снижении относительно медианы концентрации вкДНК (рис. 1 б). Очевидно, в пределах физиологи-

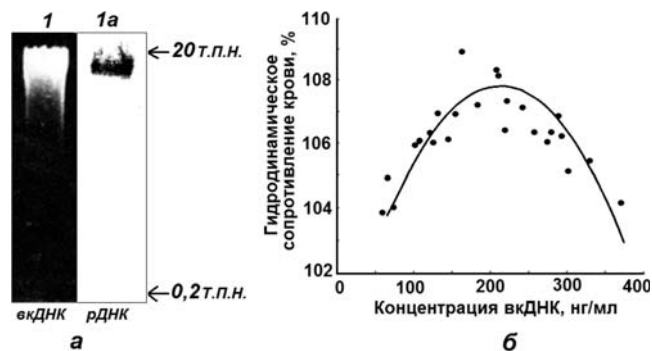


Рис. 1. Длина фрагментов внеклеточной ДНК (вкДНК) и зависимость гидродинамического сопротивления образцов крови от её концентрации в плазме здоровых доноров: а — длина фрагментов вкДНК, выделенной из плазмы крови доноров подгруппы I и подгруппы II и смешанной, анализируемая методом электрофореза в агарозном геле (дорожка 1) и методом блот-гибридизации с зондом на 28S рДНК (дорожка 1а); б — зависимость гидродинамического сопротивления образцов крови от концентрации вкДНК в плазме.

ческих концентраций, оптимальное для нормального кровообращения ГСК обеспечивается поддержанием баланса между концентрацией вкДНК и содержанием в её составе высокомолекулярной фракции, независимо от состава последовательностей.

ГСК и свойства вкДНК у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения (группа ОНМК)

В острейшем периоде ишемического инсульта (1—3 сутки) концентрация вкДНК в плазме крови больных увеличивалась от 2 до 6 раз по сравнению с донорами (табл. 2). Её уровень не различался у больных, госпитализированных в 1-й, 2-й и 3-й день после манифестации заболевания (928 [160; 1584], 1056 [522; 1188] и 1104 [427; 1480] нг/мл соответственно).

Нуклеазная активность плазмы в группе больных, в целом, была повышена незначительно и способствовала снижению концентрации вкДНК лишь у половины больных ($r = -0,50, p = 0,012$). Её общий пул в плазме крови больных, взятой в день госпитализации, на электрофореграммах (рис. 2 а) был представлен преимущественно высокомолекулярной фракцией

Таблица 2
Гемодинамическое сопротивление и характеристики вкДНК у больных в острейшем периоде ишемического инсульта

Группа обследованных лиц	ГСК (%)	$C_{вкДНК}$ (нг/мл)	$C_{рДНК}$ (нг/мл)	$C_{рДНК}/C_{пДНК}$ (пг/нг вкДНК)	$C_{СатIII}$ (нг/мл)	$C_{СатIII}/C_{вкДНК}$ (пг/нг вкДНК)	НА (ед. акт./мл плазмы)
Доноры (n = 25)	106 [105; 107]	196 [117; 240]	0,42 [0,34; 0,55]	2,4 [1,6; 4,2]	1,80 [1,19; 3,09]	14,3 [16,6; 21,5]	3,8 [3,0; 5,9]
ОНМК (n = 62)	108 * [108; 109]	1053 ** [286; 1584]	0,85 ** [0,32; 1,95]	3,8 * [1,6; 24,1]	8,41 ** [0,1; 19]	22,5 ** [14,0; 53,6]	6,3 [5,1; 8,7]

Примечание. ОНМК — острые нарушения мозгового кровообращения; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ относительно контроля; Mann—Witney U-test

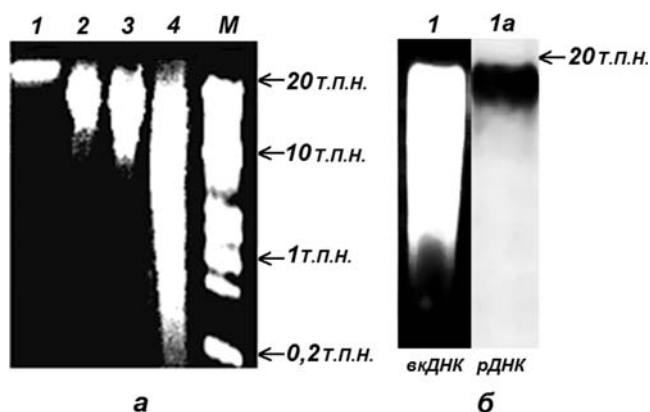


Рис. 2. Длина фрагментов внеклеточной ДНК (вкДНК), циркулирующей в плазме крови больных в острейшем периоде ишемического инсульта:

а — длина фрагментов вкДНК, анализируемая методом электрофореза в агарозном геле: 1 — вкДНК здорового донора; 2 — вкДНК больного на 1-е сутки; 3 — вкДНК больного на 3-и сутки; 4 — вкДНК больного на 7-е сутки после манифестации инсульта; М — маркер.

б — длина фрагментов вкДНК больного на 1-е сутки инсульта, анализируемая методом электрофореза в агарозном геле (дорожка 1) и методом блот-гибридизации с зондом на 28S рДНК (дорожка 1а).

(длина фрагментов 10—20 т.п.н.), что может быть результатом некроза ткани мозга в ходе формирования ядра инфаркта. Характерно, что при этом концентрация рДНК (0,97 [0,56; 2,00] нг/мл) была повышена в 2,5 раза относительно контроля ($U = 3$; $p < 0,001$), а сами фрагменты оставались высокомолекулярными, как у доноров (рис. 2 б). По мере увеличения концентрации вкДНК, несмотря на одновременный рост таковой обеих исследованных последовательностей ($r = 0,69$, $p = 0,0004$), их содержание в общем пуле снижалось ($r = -0,65$, $p < 0,0001$), а по мере уменьшения, наоборот, повышалось. При этом баланс фрагментов был смещён в сторону низкомолекулярной фракции (соотношение $C_{\text{рДНК}}/C_{\text{атIII}}$ составляло 0,09 [0,08; 0,10], $p < 0,05$).

В остром периоде (7—15 сутки), несмотря на значительно повышенную активность эндонуклеаз (6,9 [6,7; 16,6] нг/мл, $p < 0,01$), концентрация вкДНК изменялась незначительно ($r = -0,41$, $p = 0,043$), оставаясь повышенной до конца периода (580 [176; 936] нг/мл, $p < 0,05$), что согласуется с данными литературы [12]. При этом мы обнаружили, что концентрация рДНК также мало изменяется, превышая в 1,9 раза таковую доноров на 7-е сутки. В то же время, уровень СатIII продолжал нарастать, превосходя контрольный в 4,7 и 6,9 раза соответственно, на 1-е и 7-е сутки. Начиная с 7-го дня, на электрофореграмме выявлялось большое количество коротких фрагментов, длиной до 0,2 т.п.н. (см. рис. 2 а). Наряду с активацией эндонуклеаз, это могло быть результатом значительного увеличения апоптотической гибели клеток в более поздние сроки и яв-

ляющейся неотъемлемой частью формирования инфаркта мозга за счет области пенумбры [32].

Статистический анализ полученных данных выявил четко выраженную взаимосвязь между подтипом ишемического инсульта и активностью эндонуклеаз плазмы крови. Так, у больных с атеротромботическим и гемодинамическим подтипами инсульта в острейшем его периоде показатель активности эндонуклеаз был значительно повышен, при этом он был максимален при атеротромботическом, уменьшался в последовательности гемодинамический, лакунарный подтипы и был минимален у больных с кардиогенными эмболиями ($r = 0,56$, $p = 0,004$). Известно, что одним из генетических факторов, вовлеченных в предрасположенность к инфаркту миокарда, является полиморфизм Gln222Arg гена ДНазы I, причём аллель *DNASE1*2* в гене ДНазы I связана с инфарктом миокарда вне зависимости от общепринятых факторов риска [Kumamoto, 2006]. Мутационный анализ лейкоцитарной массы с целью определения полиморфных вариантов гена наиболее изученного фермента дезоксирибонуклеазы I (ДНазы I) в геноме случайной выборки больных ишемическим инсультом ($n = 37$) выявил два фенотипа, соответствующих аллелям *DNASE1*1* (50% больных) и *DNASE1*2* (50% больных). Причём аллель *DNASE1*1* наиболее часто встречалась у больных с гемодинамическим и лакунарным подтипами инсульта, в то время как аллель *DNASE1*2* выявлялась только у больных с атеротромботическим и кардиогенным эмболическим подтипами. Молекулярным различием между *DNASE1*1* и *DNASE1*2* является А-Г-переход в положении 2317 в экзоне 8. Этот однонуклеотидный полиморфизм А2317G приводит к замене Gln на Arg в аминокислотном положении 222 зрелого фермента (Gln222Arg полиморфизм). Gln222Arg полиморфизм влечет за собой функциональные изменения фермента ДНКазы I, уменьшая как её специфическую активность, так и чувствительность к протеолизу. Полученные нами данные свидетельствуют о генетической обусловленности атеротромботического и кардиогенного эмболического подтипов инсульта, что требует дальнейшего, тщательного исследования.

Хотя в группах больных с разными подтипами ишемического инсульта исследованные в острейшем его периоде показатели и различались, однако везде прослеживалась одна и та же зависимость ГС образцов крови как от концентрации вкДНК, так и от содержания в её составе длинных и коротких фрагментов. При этом во всех группах соотношение фрагментов было смещено в сторону низкомолекулярной фракции, но степень этого смещения, общий уровень вкДНК и степень повышения ГС потока образцов крови, как и активность эндонуклеаз плазмы крови,

могли различаться. Независимо от причин и механизмов развития инсульта, в острейшем его периоде ГС потока образцов крови больных значительно возросло (табл. 2), и в остром периоде оставалось повышенным (109 [109; 113] % на 5—17 сутки, $p < 0,001$), что также согласуется с полученными нами ранее данными [25]. При этом, как и ранее при использовании другого метода выделения вкДНК [31], в данной работе выявлена достоверная, но слабо выраженная прямая линейная зависимость ГС потока крови от концентрации вкДНК в плазме ($r = 0,34$, $p = 0,019$). Прямая зависимость, очевидно, обусловлена присутствием в плазме крови большого количества коротких, гидродинамически мало или совсем неэффективных фрагментов вкДНК. Действительно, показатель ГС был тем выше, чем больше было в плазме низкомолекулярных фрагментов СатIII ($r = 0,49$, $p = 0,004$) и меньше содержание в пуле вкДНК высокомолекулярных фрагментов рДНК ($r = -0,71$, $p = 0,01$).

Исключение составляли 11% больных, у которых уровень вкДНК в плазме крови был чрезмерно низким (32 [32; 36] нг/мл, $p < 0,0001$). ГС потока образцов их крови было статистически значимо повышено (110 [108; 112] %, $p < 0,05$), несмотря на огромное содержание в пуле вкДНК фрагментов рДНК (23,0 [18,3; 23,5] пг/нг, $p < 0,0001$). Такая картина не зависела от причин развития инсульта, поскольку у больных были диагностированы разные его подтипы (атеротромботический, кардиогенный эмболический, гемодинамический и лакунарный). Низкий уровень вкДНК не зависел также и от величины инфаркта, который мог быть малым, средним, и обширным. По-видимому, этот феномен обусловлен значительной активацией системы элиминации вкДНК, в том числе нуклеазной активности плазмы, превышавшей вдвое таковую у доноров ($p < 0,001$). И хотя соотношение концентраций фрагментов рДНК и СатIII у таких больных не отличалось от такового у остальных, содержание СатIII в составе вкДНК таких больных было повышено в 29 раз (229 [227; 254] пг/нг, $p < 0,0001$), в то время как содержание рДНК в 10. Таким образом, в отличие от предыдущих исследований, в данной работе впервые установлено, что повышение ГС образцов крови в острейшем периоде ишемического инсульта, наряду с ростом концентрации вкДНК, может быть обусловлено также значительным её снижением. Очевидно, это явление можно рассматривать как яркий пример дисрегуляции биомеханических свойств потока крови, приводящей к развитию острых нарушений мозгового кровообращения по ишемическому типу.

Напротив, ярким примером адаптивных и компенсаторно-приспособительных реакций может служить

отсутствие изменения характеристик вкДНК в острейшем периоде инсульта (168 [56; 580] нг/мл) у 25% больных при наличии инфарктов мозга различной величины (малой, средней, большой и обширной). Такие больные отличались неожиданно, вопреки клиническому прогнозу, благоприятным исходом инсульта и хорошим восстановлением неврологических функций. Этот феномен также не зависел от причин развития острых нарушений мозгового кровообращения, поскольку больные страдали лакунарным, гемодинамическим и кардиогенным эмболическим подтипами инсульта. ГС образцов их крови в острейшем периоде в отличие от остальных практически не изменялось (107 [106; 107] и 109 [108; 112] % соответственно, $p < 0,001$). Следует отметить, что у этих больных поддержание концентрации вкДНК на нормальном уровне с тем лишь отличием от доноров, что интервал варьирования её значений был вдвое шире, сочеталось со статистически значимо повышенной активностью эндонуклеаз плазмы крови (6,9 [6,4; 9,0] ед. акт./мл плазмы $p < 0,0001$) и нормальным соотношением высоко- и низкомолекулярных фрагментов (имело место лишь незначительное смещение в сторону последних). Интересно, что, несмотря на наличие корреляционной связи между содержанием обеих исследованных последовательностей в общем пуле вкДНК ($r = 0,88$, $p < 0,0001$), по мере увеличения концентрации рДНК содержание СатIII в общем пуле снижалось ($r = -0,67$, $p = 0,007$). Поскольку рДНК является снижающим ГС высокомолекулярным линейным полимером, то, очевидно, что в наномолярных концентрациях он способствует улучшению микроциркуляции в жизненно важных органах, подобно другим снижающим ГС полимерам [34], введение которых животным при ограничении притока крови к головному мозгу способствует облегчению тяжести ишемического повреждения его ткани [35]. Можно думать, что, помимо прочих причин, улучшение характеристик потока крови необходимо для этого количеством фрагментов рДНК, растворенных в плазме, благотворно влияя на микроциркуляторные процессы в почках, что способствует эффективному выведению из системы кровообращения низкомолекулярной фракции вкДНК.

Важно отметить, что у указанной категории больных высокий уровень активности эндонуклеаз в плазме прямо коррелировал с величиной очага повреждения ткани мозга ($r = 0,82$, $p < 0,0001$). Однако связи между величиной очага повреждения и концентрацией вкДНК, отмеченной ранее в экспериментах на животных [13], как и концентрацией фрагментов СатIII, мы не выявили ни у этих больных, ни в группе больных, в целом. Это свидетельствует о том, что наряду с гибелью клеток в области ишемии источником

избыточных количеств вкДНК при инсульте являются клетки, находящиеся за пределами этой области. Тем не менее, у указанных больных наблюдалась обратная корреляционная зависимость между величиной инфаркта и концентрацией в плазме крови фрагмента рДНК ($r = -0,61$, $\rho = 0,035$). При этом отмечено, что в 1-е сутки инсульта концентрация рДНК в плазме (0,89 [0,79; 1,14] нг/мл), как и его содержание в 1 нг вкДНК (5,8 [2,6; 17,5] пг/нг), была повышена вдвое по сравнению с донорами. Учитывая, что последовательность рДНК богата метилированными CpG-динуклеотидами — сайтами связывания с TLR9, напрашивается вывод, что к моменту манифестации заболевания эти больные были прекондиционированы эндогенным CpG-лигандом TLR9, а именно, внеклеточной рДНК. Согласно данным Y. Shintani с соавторами, TLR9 опосредует клеточную защиту от повреждения при ишемии посредством модуляции энергетического метаболизма в нейронах [36]. У больных это проявлялось в виде положительной динамики клинической картины в остром периоде и благоприятного исхода инсульта. Поскольку экспериментально установлено, что для осуществления нейропротекции [37], в частности при системном введении CpG-лиганда TLR9 (прекондиционирование), ограничивающей область ишемии, необходимо взаимодействие между клетками крови и мозга, экспрессирующими TLR9 [24], можно думать, что именно фрагменты рДНК, циркулирующие в плазме крови, являются тем промежуточным звеном, осуществляющим это взаимодействие по механизму «bystander» эффекта.

Заключение

Результаты исследования динамики количественных и качественных характеристик внеклеточной ДНК, циркулирующей в плазме крови клинически здоровых доноров и больных ишемическим инсультом, в сопоставлении с биомеханическими свойствами образцов их крови в стандартных условиях турбулентного потока позволили количественно подтвердить справедливость выдвинутой И.В. Ганнушкиной гипотезы о важной роли изменения характеристик циркулирующей в системе кровообращения вкДНК как в регуляции, так и в дизрегуляции биомеханических свойств потока крови при данной патологии. У доноров выявлена обратная корреляционная зависимость между концентрацией вкДНК в плазме, представленной преимущественно высокомолекулярной фракцией, и ГС крови. У больных в острейшем периоде инсульта оба показателя значительно возрастают и остаются повышенными в течение всего острого периода. Смещение при этом соотношения фрагментов в сторону низкомолекулярной фракции, оцениваемой

по концентрации SatIII, приводит к исчезновению обратной и появлению прямой линейной зависимости ГС крови от концентрации вкДНК, а уровень ГС обратно зависит от содержания в пуле вкДНК высокомолекулярного фрагмента рДНК. Существенно то, что снижающий ГС крови эффект фрагмента рДНК наблюдается только в пределах определенного диапазона концентраций вкДНК, выход за пределы которого приводит к дизрегуляции биомеханики потока крови (повышению его ГС) и развитию острых нарушений мозгового кровообращения. В рамках же упомянутого диапазона концентраций, поддерживаемого высокой активностью эндонуклеаз плазмы крови, повышение содержания фрагмента рДНК в составе пула вкДНК до инсульта способствует сохранению нормального ГС крови в острейшем его периоде, что сопряжено с хорошим восстановлением неврологических функций и благоприятным исходом инсульта. Следует отметить, что мы не обнаружили взаимосвязи между объемом инфаркта мозга больных и концентрацией вкДНК в их плазме. Однако выявлены особенности в повышении активности эндонуклеаз плазмы у больных с атеротромботическим и кардиогенным эмболическим подтипами инсульта, которые генетически обусловлены полиморфизмом Gln222Arg гена ДНКфзы I. Этот полиморфизм (аллель DNASE 1*2) влечет за собой функциональные изменения указанного фермента.

И наконец, выявлена обратная зависимость объема инфаркта мозга и динамики неврологических нарушений от концентрации рДНК в плазме крови в первые часы инсульта. Учитывая её высокий уровень и то, что последовательность рДНК богата метилированными CpG-динуклеотидами — лигандом TLR9, можно сделать вывод, что эти больные были прекондиционированы эндогенным CpG-лигандом TLR9, а именно фрагментом рДНК, обеспечивающим нейропротекцию от ишемического повреждения. Можно заключить, что в результате проведенного исследования выявлена новая функция фрагмента рДНК, циркулирующего в общем пуле вкДНК, — осуществление взаимосвязи между клетками крови и головного мозга, необходимая при организации нейропротекции в условиях нарушенного мозгового кровообращения. Поскольку значительную роль в течении и исходе острой фазы инсульта имеют механизмы элиминации вкДНК, а величина инфаркта мозга, как было показано выше, напрямую зависит от нуклеазной активности плазмы и обратно коррелирует с концентрацией фрагмента рДНК, полученные нами данные открывают перспективу поиска новых путей профилактики и терапии ишемического инсульта, направленных на эпигенетическое перепрограммирование ответа на ишемическое повреждение мозга.

Список литературы

1. *Peters D.L., Pretorius P.J.* Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — a new paradigm in genetic behavior // *Clin. Chim. Acta.* — 2011. — Vol. 412. — P. 806—811.
2. *Gahan P.B., Anker P., Stroun M.* Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 1137. — P. 7—17.
3. *Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П.* Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике // *Мол. Биол.* — 2008. — Т. 42(1). — С. 12—23.
4. *Nagata S., Kawane K.* Autoinflammation by endogenous DNA // *Adv. Immunol.* — 2011. — Vol. 110. — P. 139—1261.
5. *Wang B.G., Huang H.Y., Chen Y.C., Bristow R.E., Kassaei K., Cheng C.C., Roden R., Sokoll L.J., Chan D.W., Shih M.* Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 3966—3968.
6. *Chan K.C., Yeung S.W., Lui W.B., Rainer T.H., Lo Y.M.* Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood // *Clin. Chem.* — 2005. — Vol. 51. — P. 781—784.
7. *Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Vlasov V.V., Laktionov P.P.* Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content // *Expert Opin. Biol. Ther.* — 2012. — Vol. 12(1). — P. 141—153.
8. *Tsang J.C.H., Lo Y.M.D.* Circulating nucleic acids in plasma/serum // *Pathology.* — 2007. — Vol. 39(2). — P. 197—207.
9. *Butt A.N., Swaminathan R.* Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 1137. — P. 236—242.
10. *Ганнушкина И.В.* Аспекты дизрегуляции в патогенезе нарушений мозгового кровообращения // *Дизрегуляторная патология / Под ред. Г.Н. Крыжановского.* — М.: Медицина, 2002. — С. 260—293.
11. *Lam N.Y., Rainer T.H., Wong L.K., Lam W., Lo Y.M.* Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset // *Resuscitation.* — 2006. — Vol. 68(1). — P. 71—78.
12. *Tsai N.W., Lin T.K., Chen S.D., Chang W.N., Wang H.C., Yang T.M., Lin Y.J., Jan C.R., Huang C.R., Liou C.W., Lu C.H.* The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke // *Clin. Chim. Acta.* — 2011. — Vol. 412(5—6). — P. 476—479.
13. *Boyko M., Ohayon S., Goldsmith T., Douvdevani A., Gruenbaum B.F., Melamed I., Knyazer B., Shapira Y., Teichberg V.I., Eilir J.A., Klein M., Zlotnik A.* Cell-free DNA — a marker to predict ischemic brain damage in a rat stroke experimental model // *J. Neurosurg. Anesthesiol.* — 2011. — Vol. 23. — P. 222—228.
14. *De Meyer S.F., Suidan G.L., Fuchs T.A., Monestier M., Wagner D.D.* Extracellular Chromatin Is an Important Mediator of Ischemic Stroke in Mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2012. — Vol. 32. — P. 1884—1891.
15. *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.* Фрагменты транскрибируемой области рибосомного повтора в составе внеклеточной ДНК — маркер гибели клеток организма // *Биомед. Химия.* — 2008. — Т. 54(1). — С. 78—92.
16. *Конорова И.Л., Вейко Н.Н., Ершова Е.С., Антелава А.Л., Четчин А.О.* Гемодинамическая роль внеклеточной ДНК, циркулирующей в плазме крови, в патогенезе артериальной гипертензии и облитерирующего атеросклероза сонных артерий // *Ангиол. Сосуд. Хирург.* — 2009. — Т. 15(2). — С. 19—28.
17. *Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г., Нурбаев С.Д., Косякова Н.В., Шубаева Н.О., Ляпунова Н.А.* Количественное определение повторяющихся последовательностей в геномной ДНК человека. Обнаружение увеличенного количества рибосомных повторов в геномах больных шизофренией (результаты молекулярного и цитогенетического анализа) // *Мол. Биол.* — 2003. — Т. 37(3). — С. 409—419.
18. *Вейко Н.Н., Спитковский Д.М.* Накопление одиночных разрывов не приводит к парному разрыву ДНК — особенность транскрибируемого фрагмента рибосомного оперона человека, позволяющая его детектировать в биологических жидкостях при гибели различных клеток организма // *Радиаци. Биол. Радиоэкол.* — 2000. — Т. 40(4). — С. 396—404.
19. *Ганнушкина И.В., Антелава А.Л., Вейко Н.Н.* Гидродинамическая (не генетическая) эффективность разных форм ДНК // *Патол. Физиол. Эксп. Терап.* — 2000. — Т. 4. — С. 3—5.
20. *Вейко Н.Н., Калашикова Е.А., Кокаровцева С.Н., Костюк С.В., Ермаков Ф.В., Иванова С.М., Рязанцева Т.А., Еголина Н.А., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М.* Стимулирующее действие фрагментов транскрибируемой области рибосомного повтора на лимфоциты периферической крови человека // *Бюл. Эксп. Биол. Мед.* — 2006. — Т. 10. — С. 409—413.
21. *Kono H., Rock K.L.* How dying cells alert the immune system to danger // *Nat. Rev. Immunol.* — 2008. — Vol. 8(4). — P. 279—289.
22. *Stevence S.L., Leung Ph.Y., Vartanian K.B., Gopalan B., Yang T., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P.* Multiple Preconditioning Paradigms Converge on Interferon Regulatory Factor-Dependent Signaling to Promote Tolerance to Ischemic Brain Injury // *Journal Neurosci.* — 2011. — Vol. 31(23). — P. 8456—8463.
23. *Bahjat F.R., Williams-Karnesky R.L., Kohama S.G., West G.A., Doyle K.P., Spector M.D., Hobbs T.R., Stenzel-Poore S.P.* Proof of concept: pharmacological preconditioning with a Toll-like receptor agonist protects against cerebrovascular injury in a primate model of stroke // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2011. — Vol. 31. — P. 1229—1242.
24. *Packard A.E., Leung P.Y., Vartanian K.B., Stevens S.L., Bahjat F.R., Stenzel-Poore M.P.* TLR9 bone marrow chimeric mice define a role for cerebral TNF in neuroprotection induced by CpG preconditioning // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2012. — Vol. 32. — P. 2193—2200.
25. *Ганнушкина И.В., Антелава А.Л., Конорова И.Л., Суслина З.А., Лебедева Н.В.* О гидродинамическом сопротивлении крови и возможности его коррекции специальными полимерами в крови больных с ишемическими нарушениями мозгового кровообращения // *Гематология и трансфузиология.* — 1992. — Т. 9—10. — С. 16—19.
26. *Ганнушкина И.В., Антелава А.Л., Баранчикова М.В., Конорова И.Л., Куклей М.Л., Джибладзе Д.Н., Лагода О.В.* Новое в патогенезе мозгового кровообращения // *Журн. Неврол. психиатр. им. С.С. Корсакова.* — 1997. — Т. 97(6). — С. 4—8.

27. **Ермаков А.В., Коныкова М.С., Костюк С.В., Егорова Н.А., Вейко Н.Н.** Фрагменты внеклеточной ДНК из среды культивирования лимфоцитов человека, облученных в малых дозах, запускают развитие окислительного стресса и адаптивного ответа в необлученных лимфоцитах-свидетелях // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2008. — Т. 48. — С. 485—496.

28. **Yasuda T., Nadano D., Tenjo E., Takeshita H., Sawazaki K., Nakanaga M., Kishi K.** Genotyping of human deoxyribonuclease I polymorphism by the polymerase chain reaction // Electrophoresis. — 1995. — Vol. 16. — P. 1889—1893.

29. **Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V., Rykova E.Y., Pyshnyi D.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P.** Circulating DNA and DNase activity in human blood // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2006. — Vol. 1075. — P. 191—196.

30. **Van der Vaart M., Pretorius P.J.** Circulating DNA: its origin and fluctuations // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2008. — Vol. 1137. — P. 18—26.

31. **Ганнушкина И.В., Фараго М.Л., Антелава А.Л., Баранчикова М.В., Вейко Н.Н.** Гемодинамический эффект ДНК плазмы крови // Вест. РАМН. — 1998. — Т. 5. — С. 16—22.

32. **Скворцова В.И., Шурдумова М.Х., Константинова Е.В.** Значение Toll-подобных рецепторов в развитии ишемического повреждения // Журн. Невропатол. Психиатр. — 2010. — Т. (2). — С. 12—16.

33. **Kumamoto T., Kawai Y., Arakawa K., Morikawa N., Kuribara J., Tada H., Taniguchi K., Tatami R., Miyamori I., Kominato Y., Kishi K., Yasuda T.** Association of Gln222Arg polymorphism in the deoxyribonuclease I (DNase I) gene with myocardial infarction in Japanese patients // Eur. Heart J. — 2006. — Vol. 27(17). — P. 2081—2087.

34. **Brands J., Lipowsky H.H., Kameneva M.V., Villanueva F.S., Pacella J.J.** New insights into the microvascular mechanisms of drug reducing polymers: effect on the cell-free layer // PLoS One. — 2013. — Vol. 8(10). — e77252.

35. **Конорова И.Л., Ганнушкина И.В.** Возможность использования полимеров, снижающих гидродинамическое сопротивление крови, для предупреждения и лечения церебральной ишемии // Ангиол. Сосуд. Хирург. — 2002. — Т. 8(2). — С. 12—19.

36. **Shintani Y., Kapoor A., Kaneko M., Smolenski R.T., D'Acquisto F., Coppen S.R., Harada-Shoji N., Lee H.J., Thiemermann C., Takashima S., Yashiro K., Suzuki K.** TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2013. — Vol. 110(13). — P. 5109—5114.

37. **Максимова М.Ю., Ионова В.Г., Сыскина Е.Н., Шабалина А.А., Костырева М.В., Сенектупова О.А.** Нейроспецифические пептиды при атеротромботическом инсульте // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. — 2011. — Т. 5(3). — С. 4—9.

References

1. **Peters D.L., Pretorius P.J.** Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — a new paradigm in genetic behavior. Clin. Chim. Acta. 2011; 412: 806—11.

2. **Gahan P.B., Anker P., Stroun M.** Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA?. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008; 1137: 7—17.

3. **Tamkovich S.N., Vlasov V.V., Laktionov P.P.** Circulating deoxyribonucleic acids in blood and their using in medical diagnostics. Mol. Biol. (Mosc.). 2008; 42(1): 12—23. Review. Russian.

4. **Nagata S., Kawane K.** Autoinflammation by endogenous DNA. Adv. Immunol. 2011; 110: 139—61.

5. **Wang B.G., Huang H.Y., Chen Y.C., Bristow R.E., Kassaei K., Cheng C.C., Roden R., Sokoll L.J., Chan D.W., Shih M.** Increased plasma DNA integrity in cancer patients. Cancer Res. 2003; 63: 3966—8.

6. **Chan K.C., Yeung S.W., Lui W.B., Rainer T.H., Lo Y.M.** Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. Clin. Chem. 2005; 51: 781—4.

7. **Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P.** Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. Expert Opin. Biol. Ther. 2012; 12(1): 141—53.

8. **Tsang J.C.H., Lo Y.M.D.** Circulating nucleic acids in plasma/serum. Pathology. 2007; 39(2): 197—207.

9. **Butt A.N., Swaminathan R.** Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008; 1137: 236—42.

10. **Gannushkina I.V.** Aspects of dysregulation in the pathogenesis of cerebral blood flow disorders. Dizregulyatsionnaya pathology / G.N. Kryzhanovsky (ed.). Moscow: Medicine, 2002: 260—93. Russian.

11. **Lam N.Y., Rainer T.H., Wong L.K., Lam W., Lo Y.M.** Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset. Resuscitation. 2006; 68(1): 71—8.

12. **Tsai N.W., Lin T.K., Chen S.D., Chang W.N., Wang H.C., Yang T.M., Lin Y.J., Jan C.R., Huang C.R., Liou C.W., Lu C.H.** The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. Clin. Chim. Acta. 2011; 412(5—6): 476—9.

13. **Boyko M., Ohayon S., Goldsmith T., Douvdevani A., Gruenbaum B.F., Melamed I., Knyazer B., Shapira Y., Teichberg V.I., Eilir J.A., Klein M., Zlotnik A.** Cell-free DNA — a marker to predict ischemic brain damage in a rat stroke experimental model. J. Neurosurg. Anesthesiol. 2011; 23: 222—8.

14. **De Meyer S.F., Suidan G.L., Fuchs T.A., Monestier M., Wagner D.D.** Extracellular Chromatin Is an Important Mediator of Ischemic Stroke in Mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2012; 32: 1884—91.

15. **Veiko N.N., Bulycheva N.V., Roginko O.A., Veiko R.V., Ershova E.S., Kozdoba O.A., Kuzmin V.A., Vinogradov A.M., Iudin A.A., Speranskii A.I.** Ribosomal repeat in the cell free DNA as a marker for cell death. Biomed. Khim. 2008; 54(1): 78—93. Russian.

16. **Kononova I.L., Veiko N.N., Ershova E.S., Antelava A.L., Chechetkin A.O.** Haemodynamic role of blood-plasma circulating cell-free DNA and contained therein high-molecular-weight CpG-rich fraction in pathogenesis of arterial hypertension and atherosclerosis obliterans of carotid arteries. Angiol. Sosud. Khir. 2009; 15(2): 19—28. Russian.

17. **Veiko N.N., Egolina N.A., Radzivil G.G., Nurbaev S.D., Kosiakova N.V., Shubaeva N.O., Liapunova N.A.** Quantitative analysis of repetitive sequences in human genomic DNA and detection of an elevated ribosomal repeat copy number in patients with schizophrenia (the results of molecular and cytogenetic analysis). Mol. Biol. (Mosc.). 2003; 37(3): 409—19. Russian.

18. **Veiko N.N., Spitzkovskii D.M.** The accumulation of single-stranded breaks does not lead to paired DNA damage — the characteristic of the transcribing fragment of the human ribosomal operon that allows its being detected in biological fluids at

the death of different body cells. Radiats. Biol. Radioecol. 2000; 40(4): 396—404. Russian.

19. *Gannushkina I.V., Antelava A.L., Veiko N.N.* Hydrodynamic efficiency of various forms of free DNA. Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 2000; (4): 3—5. Russian.

20. *Veiko N.N., Kalashnikova E.A., Kokarovtseva S.N., Kostyuk S.V., Ermakov A.V., Ivanova S.M., Ryazantseva T.A., Egolina N.A., Lyapunova N.A., Spitkovskii D.M.* Stimulatory effect of fragments from transcribed region of ribosomal repeat on human peripheral blood lymphocytes. Bull. Exp. Biol. Med. 2006; 142(4): 428—32. English, Russian.

21. *Kono H., Rock K.L.* How dying cells alert the immune system to danger. Nat. Rev. Immunol. 2008; 8(4): 279—89.

22. *Stevence S.L., Leung Ph.Y., Vartanian K.B., Gopalan B., Yang T., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P.* Multiple Preconditioning Paradigms Converge on Interferon Regulatory Factor-Dependent Signaling to Promote Tolerance to Ischemic Brain Injury. Journal Neurosci. 2011; 31(23): 8456—63.

23. *Bahjat F.R., Williams-Karnesky R.L., Kohama S.G., West G.A., Doyle K.P., Spector M.D., Hobbs T.R., Stenzel-Poore S.P.* Proof of concept: pharmacological preconditioning with a Toll-like receptor agonist protects against cerebrovascular injury in a primate model of stroke. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2011; 31: 1229—42.

24. *Packard A.E., Leung P.Y., Vartanian K.B., Stevens S.L., Bahjat F.R., Stenzel-Poore M.P.* TLR9 bone marrow chimeric mice define a role for cerebral TNF in neuroprotection induced by CpG preconditioning. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2012; 32: 2193—200.

25. *Gannushkina I.V., Antelava A.L., Konorova I.L., Suslina Z.A., Lebedeva N.V.* Hydrodynamic resistance of blood and possibilities of its correction with special polymers in the blood of patients with ischemic cerebrovascular disorders. Gematol. Transfuziol. 1992; 37(9—10): 16—9. Russian.

26. *Gannushkina I.V., Antelava A.L., Baranchikova M.V., Konorova I.L., Kuklei M.L., Dzhiladze D.N., Lagoda O.V.* New findings concerning pathogenesis of disorders of cerebral circulation. Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova. 1997; 97(6): 4—8. Russian.

27. *Ermakov A.V., Kon'kova M.S., Kostyuk S.V., Ershova E.S., Egolina N.A., Veiko N.N.* Extracellular DNA fragments from culture medium of low-dose irradiated human lymphocyte trigger instigating of the oxidative stress and the adaptive response

in non-irradiated bystander lymphocytes. Radiats. Biol. Radioecol. 2008; 48(5): 553—64. Russian.

28. *Yasuda T., Nadano D., Tenjo E., Takeshita H., Sawazaki K., Nakanaga M., Kishi K.* Genotyping of human deoxyribonuclease I polymorphism by the polymerase chain reaction. Electrophoresis. 1995; 16: 1889—93.

29. *Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V., Rykova E.Y., Pyshnyi D.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P.* Circulating DNA and DNase activity in human blood. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006; 1075: 191—6.

30. *Van der Vaart M., Pretorius P.J.* Circulating DNA: its origin and fluctuations. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008; 1137: 18—26.

31. *Gannushkina I.V., Farago M.L., Antelava A.L., Baranchikova M.V., Veiko N.N.* Hemodynamic effect of plasma DNA. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 1998; (5): 16—22. Russian.

32. *Skvortsova V.I., Shurdumova M.Kh., Konstantinova E.V.* The significance of Toll-like receptors in the development of ischemic lesion. Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S.S. Korsakova. 2010; 110 (4 Suppl. 2): 12—7. Russian.

33. *Kumamoto T., Kawai Y., Arakawa K., Morikawa N., Kuribara J., Tada H., Taniguchi K., Tatami R., Miyamori I., Kominato Y., Kishi K., Yasuda T.* Association of Gln222Arg polymorphism in the deoxyribonuclease I (DNase I) gene with myocardial infarction in Japanese patients. Eur. Heart J. 2006; 27(17): 2081—7.

34. *Brands J., Lipowsky H.H., Kameneva M.V., Villanueva F.S., Pacella J.J.* New insights into the microvascular mechanisms of drag reducing polymers: effect on the cell-free layer. PLoS One. 2013; 8(10): e77252.

35. *Konorova I.L., Gannushkina I.V.* The possibility of using drag-reducing polymers for the prevention and treatment of cerebral ischemia. Angiol. Sosud. Khir. 2002; 8(2): 12—9. Russian.

36. *Shintani Y., Kapoor A., Kaneko M., Smolenski R.T., D'Acquisto F., Coppen S.R., Harada-Shoji N., Lee H.J., Thiemermann C., Takashima S., Yashiro K., Suzuki K.* TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013; 110(13): 5109—14.

Поступила 02.04.14

Сведения об авторах:

Максимова Марина Юрьевна — д.м.н., проф., гл. науч. сотр. 2-го неврологического отделения ФГБУ «НЦН» РАМН, e-mail: ncnmaximova@mail.ru

Смирнова Ирина Николаевна — к.м.н., врач-невролог 2-го неврологического отделения ФГБУ «НЦН» РАМН, e-mail: in-2so@yandex.ru

Болотова Татьяна Анатольевна — к.м.н., врач-невролог 2-го неврологического отделения ФГБУ «НЦН» РАМН, e-mail: in-2so@yandex.ru

Ершова Елизавета Сергеевна — к.б.н., ст. науч. сотр. лаб. молекулярной биологии ФГБУ «МГНЦ» РАМН, e-mail: ribgene@rambler.ru

Вейко Наталья Николаевна (Veiko Natalia Nikolaevna) — д.б.н., руководитель лаб. молекулярной биологии ФГБУ «МГНЦ» РАМН, e-mail: ribgene@rambler.ru

Суслина Зинаида Александровна — д.м.н., проф., акад. РАН, директор ФГБУ «НЦН» РАМН, зав. 2-м неврологическим отделением ФГБУ «НЦН» РАМН, e-mail: dir@neurology.ru