

УДК 571.27

ОЧИЩЕННАЯ МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК НЕ СПОСОБНА АКТИВИРОВАТЬ НЕЙТРОФИЛЫ ЧЕЛОВЕКА *in vitro*

© 2015 А.С. Приходько¹, А.К. Шабанов², Л.А. Зиновкина¹,
Е.Н. Попова³, М.А. Азнаурян¹, Н.О. Ланина¹,
М.В. Витушкина⁴, Р.А. Зиновкин^{3,4*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва

² Институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, 129010 Москва

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-0338,
электронная почта: roman.zinovkin@gmail.com

Поступила в редакцию 22.12.14

После доработки 22.01.15

Чрезмерная активация врожденного иммунитета зачастую приводит к фатальным последствиям и может рассматриваться как один из вариантов феноптоза. При тяжелых травмах в кровотоки попадают различные компоненты митохондрий, которые могут стимулировать миелоидные клетки врожденного иммунитета. Одним из таких стимуляторов предположительно может выступать митохондриальная ДНК (мтДНК) [1]. В настоящей работе была исследована роль мтДНК как непосредственного активатора нейтрофилов человека, а также как прогностического маркера у больных с тяжелой травмой. Количественное определение концентрации мтДНК в плазме больных с тяжелой травмой показало ее статистически значимое ($p < 0,02$) повышение у группы не выживших пациентов по сравнению с выжившими. В то же время высокоочищенные препараты мтДНК оказались не способны вызывать активацию нейтрофилов человека, что может указывать на существование дополнительных факторов, обеспечивающих узнавание мтДНК как «образа опасности».

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: травма, внеклеточная ДНК, митохондриальная ДНК, активация нейтрофилов.

Известно, что при травме в кровотоки попадают содержимое разрушенных клеток, в т.ч. компоненты митохондрий. Они могут функционировать в качестве эндогенных «образов опасности», ассоциированных с повреждением (Damage-associated molecular patterns, DAMPs), и инициировать воспаление, которое в ряде случаев приводит к развитию опасных для жизни осложнений [1]. Предположительно активация клеток иммунной системы с помощью митохондриаль-

ных DAMP (MTD) вызывается: 1) митохондриальными белками, несущими на N-концах формилметионин, что типично для бактериальных белков; 2) митохондриальным кардиолипином; 3) АТФ; 4) митохондриальной ДНК (мтДНК), обладающей многими свойствами прокариотической ДНК [1, 2]. Внеклеточная ДНК (внДНК) в плазме крови представлена в основном ядерной (ядДНК) и мтДНК. Показано, что повышение концентрации внДНК наблюдается при множестве патологических состояний [3]. Повышение концентрации мтДНК в крови пациентов с травмой может являться потенциальным прогностическим маркером [4, 5], коррелирующим с тяжестью травмы и смертностью [6, 7].

В подавляющем большинстве работ, посвященных изучению мтДНК, исследователи оперируют относительными, а не абсолютными значениями концентраций. Точное определение концентраций мтДНК может помочь система-

Принятые сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК; внДНК – внеклеточная ДНК; яДНК – ядерная ДНК; DAMP – «образы опасности», ассоциированные с повреждением (Damage-associated molecular patterns); MTD – митохондриальные DAMP; fMLP – formyl-Met-Leu-Phe; ISS – шкала тяжести повреждений (Injury Severity Score); P-p38 – фосфорилированная форма MAPK p38; MMP9 – матриксная металлопротеиназа (Matrix metalloproteinase 9).

* Адресат для корреспонденции.

тизировать результаты, полученные в разных исследованиях, а также разобраться в механизме действия этих нуклеиновых кислот как DAMP. В настоящей работе мы исследовали данный вопрос с помощью количественного определения внеклеточной ДНК в плазме крови 34 больных с тяжелой травмой.

Остается неясным, способна ли мтДНК в концентрациях, соответствующих физиологическим значениям, вызывать активацию иммунного ответа. Мы провели независимую проверку данных об активации нейтрофилов человека с помощью мтДНК и обнаружили, что очищенная мтДНК не вызывает активации нейтрофилов. В ранее опубликованных работах, по-видимому, были использованы недостаточно очищенные препараты мтДНК, примеси в которых и вызывали подобную активацию.

Полученные результаты подтверждают ценность мтДНК как прогностического фактора смертности у пациентов с тяжелой травмой и, одновременно, поднимают вопрос о существовании дополнительных факторов, позволяющих мтДНК функционировать в качестве DAMP.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика пациентов. Работу проводили с разрешения этического комитета НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. В работе была исследована кровь 34 пострадавших с тяжелой сочетанной травмой, которые находились на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии НИИ им. Н.В. Склифосовского в 2012–2014 гг., и кровь 10 здоровых добровольцев из числа врачей-ординаторов. В исследование не включали пациентов с комбинированной травмой и пациентов старше 70 лет. Тяжесть травмы оценивали по шкале тяжести повреждений – Injury Severity Score (ISS) с учетом их локализации: голова, грудь, живот, позвоночник, таз и конечности. Характеристика пострадавших представлена в табл. 1.

Пробоподготовка и выделение ДНК из плазмы крови. Через 24 ч после травмы у пострадавших отбирали 3 мл периферической венозной крови. Перед забором крови пациенты находились в состоянии покоя не менее 10 мин. Кровь, смешанную с ЭДТА (1,5 мг/мл), центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g. Отобранную плазму дополнительно центрифугировали 10 мин при 10 000 g. Верхнюю порцию плазмы помещали в микроцентрифужную пробирку объемом 0,5 мл и замораживали при -20° до выделения ДНК. Для контроля эффективности выделения в каждый образец плазмы объемом 0,4 мл перед про-

Таблица 1. Характеристика пострадавших с тяжелой сочетанной травмой

Характеристики	Выжившие	Умершие
Количество пациентов	25	9
Возраст, лет*	40 (28–50)	26 (22–59)
Мужчины	19	9
Женщины	6	0
Тяжесть повреждений по шкале ISS, баллы*	41 (34–41)	48 (43–57)
Нозокомиальная пневмония	16	7
Без пневмонии	9	2

* Указаны медианные значения (межквартильный интервал).

цедурой выделения вносили по 10 мкл (1,7 нг/мкл) экзогенной контрольной ДНК на основе плазмиды pBlueScriptSKII(–) размером 8 кб. Выделение ДНК из 100 мкл плазмы крови проводили с помощью набора Quick-gDNA Blood MiniPrep («Zymo Research», США) по протоколу производителя.

ПЦР в реальном времени. Количественную ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе iCycler («Bio-Rad», США) со смесью следующего состава: 5 мкл анализируемого образца; 10 мкл смеси B Eva Green («Синтол», Россия); 0,5 мкл смеси каждого из специфичных праймеров (10 мкМ); 9,5 мкл деионизированной воды. Каждый образец ДНК использовали в качестве матрицы в трех идентичных ПЦР-реакциях. Последовательности используемых праймеров указаны в табл. 2. Специфичность праймеров к мтДНК была дополнительно подтверждена с использованием ДНК из клеток эндотелия человека EA.hy926 без мтДНК (Rh0). Эффективность подобранных пар праймеров составила 93–101%. Реакцию ПЦР проводили в следующих условиях: 94° – 5 мин; 40 циклов: 94° – 20 с, 56° – 20 с, 72° – 20 с; 72° – 5 мин. Эффективность ПЦР рассчитывали с использованием серии разведений от 1 пг/мл до 10 мкг/мл препаратов тотальной ДНК из клеток HeLa («NEB», Англия) или серии разведений, приготовленных на матрице контрольной плазмиды. Нормализацию результатов проводили с учетом амплификации контрольной последовательности вносимой плазмидной ДНК [8].

Выделение нейтрофилов. Венозную кровь здоровых доноров собирали в гепаринизирован-

Таблица 2. Характеристика праймеров

Мишень	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')
яДНК человека, ретротранспозон LINE1	ACCTGCTCCTGAATGACTA	GATTCTGGTATGTGGTGTCTT
мтДНК человека, участок D-петли	ACCSTATGTTCGCAGTATCTGTC	ATGATGTCTGTGTGGAAAGTGG
Контрольная плаزمида, 8 кб	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA	ATTTGACTTTAGCCAGGTAGC

ные пробирки. Полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы) были выделены с помощью седиментации с декстраном и последующим центрифугированием в градиенте Фиколл-Пак (плотность 1,077 г/мл) [1]. Полученные нейтрофилы ресуспендировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 10%-ную телячью сыворотку с низким содержанием эндотоксинов («РАА Laboratories», Германия). Жизнеспособность нейтрофилов (>98%) определяли окраской трипановым синим.

Зимография. Выделенные нейтрофилы (1×10^6 в 1 мл) обрабатывали fMLP (formyl-Met-Leu-Phe), мтДНК или МТД в конечном объеме 0,5 мл в течение 1 ч при 37° в атмосфере 5%-ного CO₂. Количество секретируемой нейтрофилами желатиназы MMP9 определяли с помощью зимографии в ПААГ, содержащем 1 мг/мл желатина, по стандартной методике, описанной ранее [9].

Вестерн-блот. После инкубации с тестируемыми активаторами нейтрофилы лизировали в горячем буфере (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 2%-ный SDS; 10%-ный глицерин; 50 мМ ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) в течение 4 мин при 95°. Белки разделяли в 12%-ном ПААГ и переносили на PVDF-мембраны («Amersham», США). Были использованы антитела к β-актину, p-38 и P-38 («Cell Signaling», США), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich», США). Визуализацию проводили набором ECL («Amersham», США). Для денситометрического анализа использовали программу ImageJ 1.44p.

Выделение митохондриальных DAMP. Фракцию митохондрий выделяли из печени крыс или линии эндотелиальных клеток человека EA.hy926 с помощью дифференциального центрифугирования по протоколу, описанному ранее [1]. Для приготовления суспензии разрушенных митохондрий к фракции митохондрий добавляли протеиназный ингибитор («Amresco», США) и проводили озвучивание во льду на аппарате Branson Sonifier 150 («Branson Ultrasonics Corporation», США) при 100%-ной амплитуде, 10 раз по 30 с, с интервалом в 30 с. Суспензию разрушенных митохондрий центрифугировали

при 15 000 g (10 мин, 4°), затем при 100 000 g (1 ч, 4°). Концентрацию белков в супернатанте определяли по методу Брэдфорд с помощью Protein Assay Kit («Bio-Rad», США).

Выделение и очистка мтДНК. Стандартный препарат мтДНК выделяли из полученной фракции митохондрий с помощью набора «DNeasy Blood & Tissue» («Qiagen», США) согласно протоколу производителя. Дополнительную очистку препарата мтДНК проводили с помощью этанольной преципитации с ацетатом натрия. Осадок высушивали на воздухе и растворяли в деионизованной воде, затем дополнительно центрифугировали при 13 000 g в течение 30 мин и аккуратно отбирали супернатант. Концентрацию и чистоту полученного материала определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение при 230, 260 и 280 нм с помощью Nanodrop ND-1000 («Thermo Scientific», США).

Анализ результатов. Результаты представляли с указанием средних значений и среднеквадратичного отклонения в виде квартильных значений и медианы или в виде коробчатой диаграммы. Межгрупповые различия анализировали с помощью теста Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика пациентов и определение концентрации яДНК и мтДНК. Уровень тяжести повреждений, выраженный в баллах ISS, статистически значимо различался между группами выживших и умерших пациентов ($p = 0,02$) (табл. 1 и рис. 1, а). По данным измерения концентраций ДНК в крови здоровых доноров (контрольная группа, $n = 10$) медианная концентрация яДНК в плазме составила 0,1 мкг/мл (межквартильный интервал 0,08–0,16 мкг/мл), а медианная концентрация мтДНК – 0,19 нг/мл (интервал 0,15–0,26 нг/мл). Медианные концентрации яДНК и мтДНК у выживших пациентов ($n = 25$) составляли 4,5 мкг/мл (интервал 2,2–16,6 мкг/мл) и 0,9 нг/мл (интервал 0,7–2,0 нг/мл) соответственно (рис. 1, б и в). Для умерших пациентов ($n = 9$) эти значения составляли, соот-

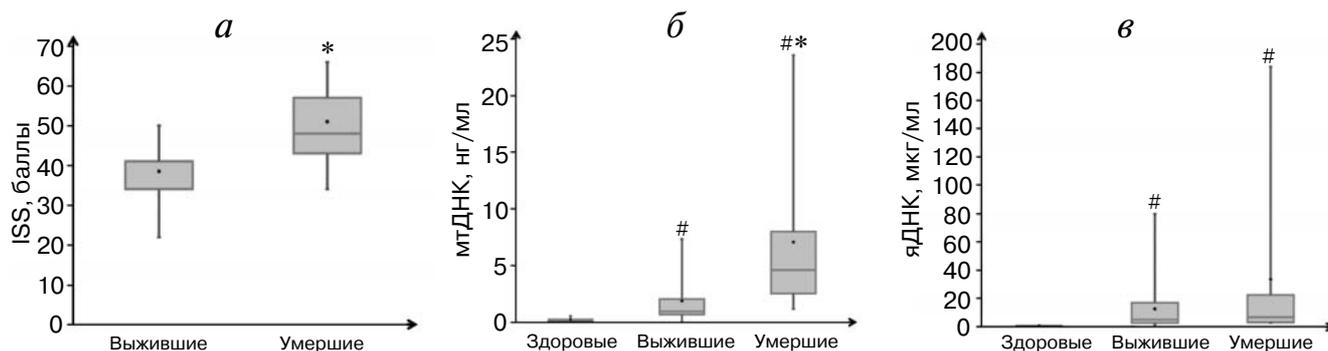


Рис. 1. Характеристика пациентов и определение концентрации яДНК и мтДНК. *a* – Уровень повреждений, определенный в баллах ISS, у выживших ($n = 25$) и умерших ($n = 9$) пациентов с тяжелой травмой. Концентрация мтДНК (*б*) и яДНК (*в*) в плазме крови у групп здоровых доноров ($n = 10$), а также выживших и умерших пациентов с тяжелой травмой. Средние арифметические значения показаны черными точками. # $p < 0,001$ – по критерию Манна–Уитни между здоровыми и травматическими больными; * $p < 0,02$ – межгрупповое различие по критерию Манна–Уитни между умершими и выжившими пациентами

ветственно, 6,3 мкг/мл (интервал 2,6–22,1 мкг/мл) и 4,6 нг/мл (интервал 2,5–8,0 нг/мл) (рис. 1, *б* и *в*). Статистически значимое различие между группами выживших и умерших пациентов наблюдалось только по уровню мтДНК ($p = 0,02$).

Выделение и очистка мтДНК из митохондрий.

При выделении мтДНК из культуры эндотелиальных клеток человека или из печени крыс стандартными методами, используемыми в работах Хаузер с соавт. [1, 10], мы обнаружили в полученных препаратах соотношения $A_{260}/A_{280} = 1,68$ и $A_{260}/A_{230} = 0,95$, что свидетельствовало о наличии примесей в препарате ДНК. После стадии дополнительной очистки (см. «Методы исследования») эти соотношения изменились до значений, характерных для чистых препаратов ДНК: $A_{260}/A_{280} = 1,91$ и $A_{260}/A_{230} = 1,67$ (рис. 2). В дальнейших опытах по активации нейтрофилов человека для сравнения мы использовали как препараты мтДНК после стандартного выделения, так и после дополнительного этапа очистки.

Влияние МТД и мтДНК на активацию нейтрофилов. Маркером ранней активации нейтрофилов может служить уровень активации (фосфорилирования) MAPK p38 (P-p38). Митоген-активируемые киназы быстро активируются при стимуляции нейтрофилов под действием различных «образов опасности» [11, 12]. Так же, как и Хаузер с соавт. [1], при действии МТД и fMLP мы уже через 5 мин наблюдали повышение уровня P-p38, который достигал своего пика через 10 мин и затем постепенно снижался в течение последующих 30 мин (данные не представлены). Препараты ДНК, выделенные по стандартному протоколу, также вызвали фосфорилирование p38 (рис. 3, *a*). Вместе с тем очищенные препараты мтДНК, полученные из клеток

эндотелия человека или из печени крыс, не вызвали повышения уровня фосфорилирования p38 ни в одном из 11 опытов (рис. 3, *a* и *б*).

Еще одним признаком активации нейтрофилов является высвобождение из третичных гранул желатиназы MMP-9, которая участвует в расщеплении внеклеточного матрикса в норме и при воспалительных процессах. С помощью зимографии в ПААГ с желатином мы показали, что инкубирование нейтрофилов с fMLP и МТД вызывает увеличение количества MMP9 в культуральной среде (рис. 3, *в* и *г*). В то же время инкубация нейтрофилов с очищенной мтДНК в концентрациях, на несколько порядков превы-

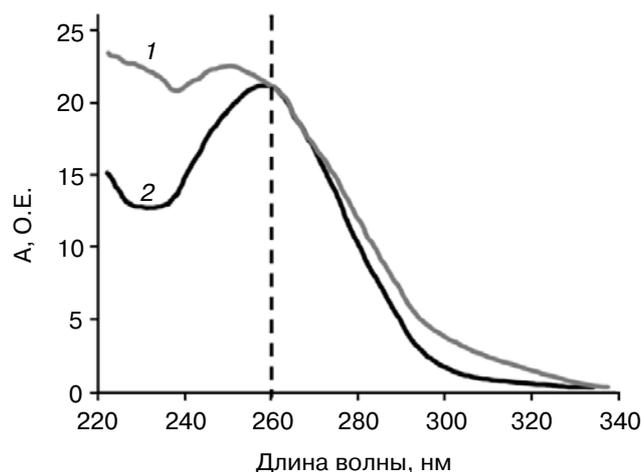


Рис. 2. УФ-спектр поглощения препарата мтДНК, выделенного из печени крыс стандартными методами (1) и после дополнительной очистки (2)

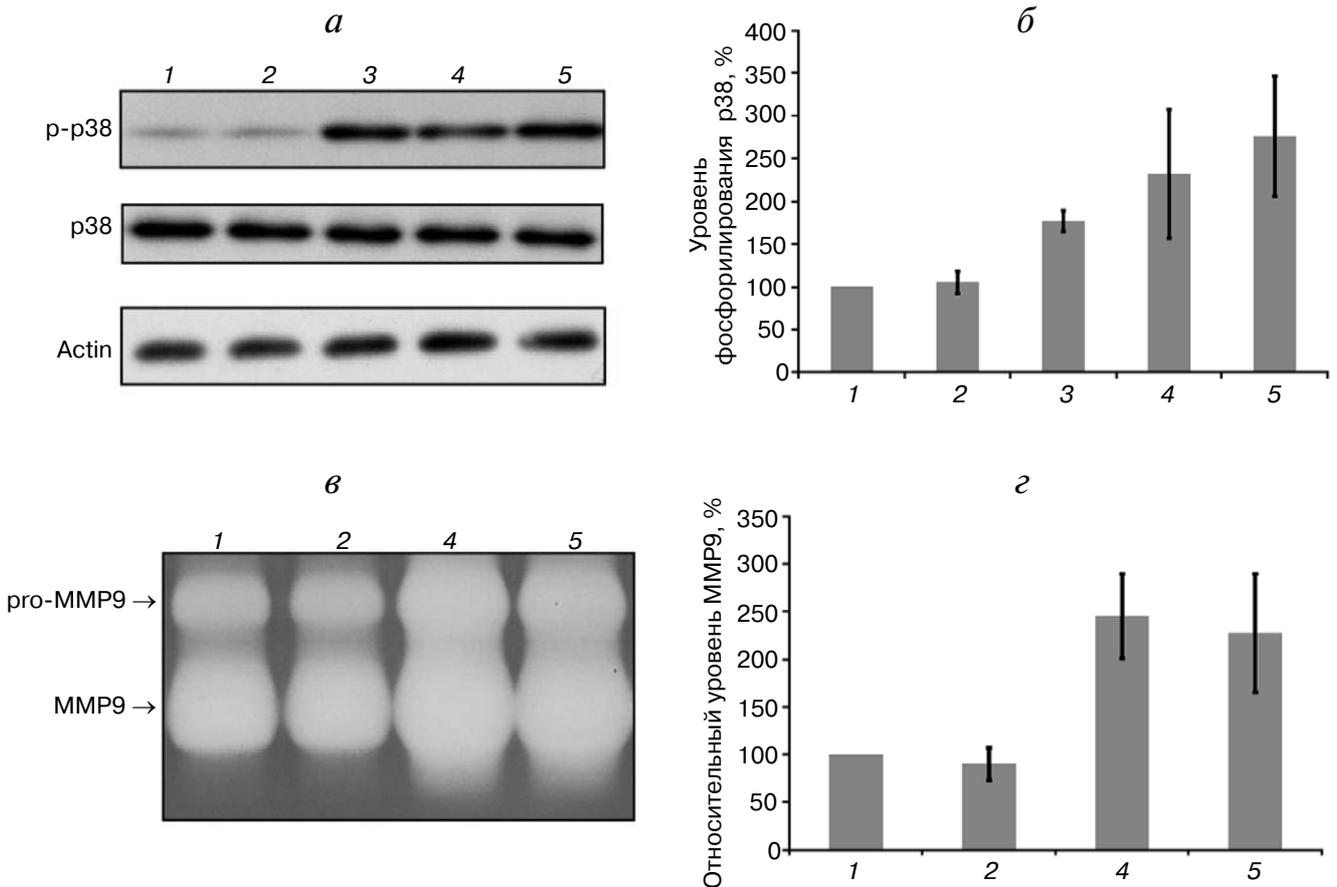


Рис. 3. Дополнительно очищенная мтДНК не вызывает активацию нейтрофилов человека. 1 – Контроль без активаторов; 2 – дополнительно очищенный препарат мтДНК (5 мг/мл); 3 – мтДНК, выделенная стандартным методом (5 мг/мл); 4 – препарат МТД (50 мг/мл); 5 – fMLP (10 нМ) (положительный контроль). Представлены средние значения и среднеквадратичное отклонение. а – Уровень Р-р38 через 10 мин после воздействия (результаты типичного эксперимента); б – результаты денситометрического анализа вестерн-блотов ($n = 11$); в – зимография культуральной среды препаратов через 45 мин инкубации (результаты типичного эксперимента); г – результаты денситометрического анализа зимограмм ($n = 4$)

шающих реальную концентрацию мтДНК в крови в норме и при травмах, не приводила к увеличению секреции MMP9 (рис. 3, в и г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первоначально концепция действия мтДНК как DAMP основывается на работах группы Хаузер с соавт. [1, 10]. В этих широко цитируемых работах показано, что мтДНК обнаруживается в крови больных в высоких концентрациях (медианное значение 2,7 мг/мл) и способна вызывать активацию выделенных нейтрофилов. Помимо данной работы точные концентрации мтДНК в крови больных с тяжелой травмой были определены всего лишь в нескольких исследованиях. Впервые концентрация внеклеточной мтДНК была измерена в 2004 г., ее медианное значение сос-

тавило 8 586 300 копий/мл (примерно 0,15 нг/мл) у пациентов с травмой и 1 607 000 копий/мл (примерно 0,03 нг/мл) в контрольной группе [7]. В работах последних лет значения медианных концентраций мтДНК у больных с тяжелой травмой варьируют от 1,7 нг/мл [4] до 200 нг/мл [5]. Стоит отметить, что прямые методы измерения тотальной внеклеточной ДНК, не использующие ПЦР, дают значения, не превышающие 2–3 мг/мл [13, 14]. Поскольку в одной диплоидной клетке присутствует, как правило, от нескольких сотен до нескольких тысяч молекул мтДНК, то несложно вычислить, что по массе яДНК превышает содержание мтДНК в клетке в несколько сотен или тысяч раз. Таким образом, если предположить, что при травматическом воздействии клеточные яДНК и мтДНК в равных пропорциях поступают в кровоток, то количества яДНК в плазме должны превышать тако-

вые мтДНК в сотни или тысячи раз, что соответствует данным, полученным в нашей работе. Однако следует отметить, что на соотношение яДНК/мтДНК может влиять множество различных факторов, таких как система удаления внеклеточных нуклеиновых кислот, наличие патогенов в организме, тип поврежденной ткани, относительное содержание в ней мтДНК, а также тип клеточной смерти.

Значительный разброс в определении количественных значений мтДНК может быть связан с техническими аспектами, которые редко заслуживают внимания авторов. Во-первых, для количественного определения мтДНК важно использовать экзогенные контроли – двухцепочечные кольцевые молекулы, добавляемые в пробы перед выделением тотальной ДНК [15]. В нашей работе в качестве экзогенного контроля мы использовали рекомбинантную плазмиду, что позволило повысить точность определения мтДНК. Во-вторых, для измерения мтДНК чрезвычайно важно использовать праймеры, специфичные исключительно к мтДНК, но не к многочисленным митохондриальным псевдогенам, присутствующим в ядерном геноме. В некоторых работах отсутствует информация о проведении таких тестов [1, 5], что может привести к завышению определяемых концентраций мтДНК. Мы полагаем, что медианные значения концентрации мтДНК, циркулирующей в крови пациентов с травмой, не превышают 10 нг/мл (рис. 1, а). Тем не менее следует изучить этот вопрос на большем количестве пациентов в независимых экспериментах. Также следует отметить, что мтДНК находится не только в плазме крови, но и на поверхности клеток, а также в составе микросом. Роль таких нуклеиновых кислот в развитии иммунного ответа до сих пор не определена.

Мы наблюдали достоверную корреляцию между повышением уровня мтДНК и смертностью (рис. 1, б), что соответствует данным многих других исследований [4, 8]. Однако остается неясным, вызывает ли мтДНК потенциально опасную чрезмерную активацию компонентов врожденного иммунитета или же концентрация мтДНК в крови является просто маркером повреждения клеток. Ранее в группе Хаузер было продемонстрировано, что мтДНК, как и DAMP, активируют нейтрофилы человека [1, 10]. Авторы показали, что образующаяся при травматических воздействиях мтДНК может активировать нейтрофилы человека через TLR9. Мы обнаружили, что при выделении мтДНК стандартными методами, используемыми в упомянутых работах, препараты мтДНК содержат примеси, которые мы пока не идентифицирова-

ли (рис. 2), и которые, вероятно, являются причиной активации нейтрофилов человека. Ни в одном из 11 опытов мтДНК, используемая в концентрациях до 5 мкг/мл, не вызывала фосфорилирования p38 в нейтрофилах, тогда как MTD, fMLP и «недоочищенная» мтДНК вызывали данные эффекты (рис. 3). Также очищенная мтДНК не вызывала увеличение секреции MMP9 (рис. 3).

Наша работа подтвердила данные о том, что митохондриальные обломки активируют провоспалительные каскады в нейтрофилах, а также стимулируют их дегрануляцию. В то же время мы обнаружили, что мтДНК в чистом виде не вызывает активацию нейтрофилов. Нуклеиновые кислоты вызывают воспалительный ответ нейтрофилов за счет взаимодействия с рецепторами TLR9, которые локализованы в основном в эндосомах [16]. Возможно, мтДНК сама по себе в отсутствие дополнительных факторов не способна проникать в клетки для взаимодействия с TLR9. Также нельзя исключить возможность того, что Хаузер с соавт. [1, 10] использовали кровь доноров с другими аллельными вариантами TLR9 или же эти рецепторы из-за повышенной экспрессии были экспонированы на плазматической мембране нейтрофилов [17].

Следует отметить, что ситуация, когда предполагаемый активатор/модулятор иммунных функций при более тщательной очистке оказывается слабоактивным или неактивным, встречается не впервые. Например, ядерный белок HMGB1 (*high-mobility group protein B1*) при выходе из клеток функционирует как DAMP, вызывая мощный иммунный ответ, при этом чистый препарат рекомбинантного HMGB1 оказался практически неактивен [18]. Мы проводили тщательную очистку препаратов мтДНК, что позволило более точно определить ее роль в активации иммунного ответа.

Возможно несколько вариантов действия мтДНК как активатора иммунного ответа. Во-первых, азотистые основания мтДНК могут быть *in vivo* окислены, что может значительно повысить ее активность как DAMP. При инъекции в суставы мышей мтДНК, а также окисленных олигонуклеотидов происходит воспаление суставов [19]. Помимо этого известно, что окисленная мтДНК активирует инфламмасому NLRP3 [20]. Во-вторых, для активации нейтрофилов могут требоваться дополнительные факторы (coDAMP). мтДНК находится в клетке в виде нуклеопротеидных комплексов в ассоциации с хеликазой TWINKLE [21] и транскрипционным фактором TFAM [22], основным компонентом этих комплексов. В составе белка TFAM, так же как и HMGB1, находятся консервативные доме-

ны (*high-mobility group*), которые потенциально способны вызывать активацию нейтрофилов. Показано, что TFAM в комбинации с формилированными митохондриальными белками усиливает их активирующее действие на моноциты человека [23]. Синергичное действие TFAM проявляется и с ДНК, что приводит к активации плазматитоидных дендритных клеток [24]. В-третьих, мишенью для мтДНК могут выступать и другие клетки иммунной системы, например, моноциты и макрофаги, активирующиеся при действии CpG-богатых участков неметилированной ДНК [25], которые присутствуют в геноме прокариот и митохондрий [26].

Согласно концепции фенотоза, предложенной В.П. Скулачевым, избыточный иммунный ответ на травму или инфекцию может рассматриваться как один из вариантов реализации программы самоуничтожения организма [27]. Не подлежит сомнению важность задачи идентификации экзо- и эндогенных «образов опас-

ности», вызывающих септическое и стерильное воспаление. При этом, несмотря на значительный прогресс в этой области [28], вклад отдельных компонентов митохондрий в активацию врожденного иммунитета все еще изучен недостаточно.

Авторы выражают глубокую признательность профессору, академику РАН Владимиру Петровичу Скулачеву, без участия которого данная работа не появилась бы на свет. Авторы также чрезвычайно благодарны Галине Федоровне Судьиной (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского) за неоценимую помощь в работе с нейтрофилами, а также за ценные советы и обсуждение результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-01057, опыты с нейтрофилами) и РНФ (проект 14-24-001307, определение мтДНК).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang, Q., Raof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury, *Nature*, **464**, 104–107.
- Krysko, D.V., Agostinis, P., Krysko, O., Garg, A.D., Bachert, C., Lambrecht, B.N., and Vandenabeele, P. (2011) Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation, *Trends Immunol.*, **32**, 157–164.
- Tsang, J.C., and Lo, Y.M. (2007) Circulating nucleic acids in plasma/serum, *Pathology*, **39**, 197–207.
- Gu, X., Yao, Y., Wu, G., Lv, T., Luo, L., and Song, Y. (2013) The plasma mitochondrial DNA is an independent predictor for post-traumatic systemic inflammatory response syndrome, *PLoS One*, **8**, e72834.
- Yamanouchi, S., Kudo, D., Yamada, M., Miyagawa, N., Furukawa, H., and Kushimoto, S. (2013) Plasma mitochondrial DNA levels in patients with trauma and severe sepsis: time course and the association with clinical status, *J. Crit. Care*, **28**, 1027–1031.
- Lo, Y.M., Rainer, T.H., Chan, L.Y., Hjelm, N.M., and Cocks, R.A. (2000) Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients, *Clin. Chem.*, **46**, 319–323.
- Lam, N.Y., Rainer, T.H., Chiu, R.W., Joynt, G.M., and Lo, Y.M. (2004) Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma, *Clin. Chem.*, **50**, 213–216.
- Хубутя М.Ш., Шабанов А.К., Скулачев М.В., Булава Г.В., Савченко И.М., Гребенчиков О.А., Сергеев А.А., Зоров Д.Б., Зиновкин Р.А. (2013) Митохондриальная и ядерная ДНК у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой, *Общая реаниматология*, **6**, 24–35.
- Ропова, Е.Н., Плетжшккина, О.У., Дугина, В.В., Domnina, L.V., Ivanova, O.Y., Izyumov, D.S., Skulachev, V.P., and Chernyak, V.V. (2010) Scavenging of reactive oxygen species in mitochondria induces myofibroblast differentiation, *Antioxid. Redox Signal.*, **13**, 1297–1307.
- Zhang, Q., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010) Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase, *Shock*, **34**, 55–59.
- Alvarez, M.E., Bass, J.I.F., Geffner, J.R., Calotti, P.X.F., Costas, M., Coso, O.A., Gamberale, R., Vermeulen, M.E., Salamone, G., and Martinez, D. (2006) Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation, *J. Immunol.*, **177**, 4037–4046.
- Zu, Y.-L., Qi, J., Gilchrist, A., Fernandez, G.A., Vazquez-Abad, D., Kreutzer, D.L., Huang, C.-K., and Ramadan, I. (1998) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF- α or FMLP stimulation, *J. Immunol.*, **160**, 1982–1989.
- Laktionov, P.P., Tamkovich, S.N., Rykova, E.Y., Bryzgunova, O.E., Starikov, A.V., Kuznetsova, N.P., Sumarokov, S.V., Kolomiets, S.A., Sevostianova, N.V., and Vlassov, V.V. (2004) Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease, *Nucleosides Nucleic Acids*, **23**, 879–883.
- Shaked, G., Douvdevani, A., Yair, S., Zlotnik, A., and Czeiger, D. (2014) The role of cell-free DNA measured by a fluorescent test in the management of isolated traumatic head injuries, *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.*, **22**, 21.
- Myers, M.B., Mittelstaedt, R.A., and Heflich, R.H. (2009) Using phiX174 DNA as an exogenous reference for measuring mitochondrial DNA copy number, *Biotechniques*, **47**, 867–869.
- Leifer, C.A., Kennedy, M.N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M.J., and Segal, D.M. (2004) TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation, *J. Immunol.*, **173**, 1179–1183.
- Lindau, D., Mussard, J., Wagner, B.J., Ribon, M., Ronnefarth, V.M., Quettier, M., Jelcic, I., Boissier, M.C., Rammensee, H.G., and Decker, P. (2013) Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9, *Eur. J. Immunol.*, **43**, 2101–2113.

18. Rouhiainen, A., Tumova, S., Valmu, L., Kalkkinen, N., and Rauvala, H. (2007) Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin), *J. Leukoc. Biol.*, **81**, 49–58.
19. Collins, L.V., Hajizadeh, S., Holme, E., Jonsson, M., and Tarkowski, A. (2004) Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces *in vivo* and *in vitro* inflammatory responses, *J. Leukoc. Biol.*, **75**, 995–1000.
20. Shimada, K., Crother, T.R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V.K., Wolf, A.J., Vergnes, L., Ojcius, D.M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K.A., Underhill, D.M., Town, T., and Arditi, M. (2012) Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis, *Immunity*, **36**, 401–414.
21. Spelbrink, J.N., Li, F.Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G.M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H.T., Zeviani, M., and Larsson, C. (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria, *Nature Genet.*, **28**, 223–231.
22. Parisi, M.A., and Clayton, D.A. (1991) Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins, *Science*, **252**, 965–969.
23. Crouser, E.D., Shao, G., Julian, M.W., Macre, J.E., Shadel, G.S., Tridandapani, S., Huang, Q., and Wewers, M.D. (2009) Monocyte activation by necrotic cells is promoted by mitochondrial proteins and formyl peptide receptors, *Crit. Care Med.*, **37**, 2000–2009.
24. Julian, M.W., Shao, G., Bao, S., Knoell, D.L., Papenfuss, T.L., VanGundy, Z.C., and Crouser, E.D. (2012) Mitochondrial transcription factor A serves as a danger signal by augmenting plasmacytoid dendritic cell responses to DNA, *J. Immunol.*, **189**, 433–443.
25. Hartmann, G., and Krieg, A.M. (1999) CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes, *Gene Ther.*, **6**, 893–903.
26. Pollack, Y., Kasir, J., Shemer, R., Metzger, S., and Szyf, M. (1984) Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 4811–4824.
27. Скулачев В.П. (1999) Феноптоз: запрограммированная смерть организма, *Биохимия*, **64**, 1679–1688.
28. Hill, S., and Van Remmen, H. (2014) Mitochondrial stress signaling in longevity: a new role for mitochondrial function in aging, *Redox Biol.*, **2**, 936–944.

PURE MITOCHONDRIAL DNA DOES NOT ACTIVATE HUMAN NEUTROPHILS *in vitro*

**A. S. Prikhodko¹, A. K. Shabanov², L. A. Zinovkina¹,
E. N. Popova³, M. A. Aznauryan¹, N. O. Lanina¹,
M. V. Vitushkina⁴, R. A. Zinovkin^{3,4*}**

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty
of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow 119991, Russia

² N. V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care,
Moscow 129010, Russia

³ M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia

⁴ M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-0338,
E-mail: roman.zinovkin@gmail.com

Received December 22, 2014

Received January 22, 2015

Excessive activation of the innate immune system often leads to fatal consequences and may be considered as one of the phenoptotic events. After traumatic injury, various components of mitochondria are released into the circulation and stimulate myeloid cells of the innate immunity. Presumably, mitochondrial DNA (mtDNA) might activate immune cells [1]. In the present study, we investigated the role of mtDNA as a direct activator of human neutrophils, as well as a prognostic marker in patients with severe trauma. Quantitative determination of mtDNA in the plasma of these patients revealed its significant increase ($p < 0.02$) in the group of survivors compared to non-survivors. Highly purified mtDNA was not able to induce activation of human neutrophils, thus possibly indicating the existence of additional factor(s) ensuring the recognition of mtDNA as a damage-associated molecular pattern.

Key words: trauma, extracellular DNA, mitochondrial DNA, neutrophil activation, damage-associated molecular patterns (DAMPs)