

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЙ СТИМУЛИРУЕТ TLR9-NF-κB СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Ершова Е.С.¹, Жесткова Е.М.², Савинова Е.А.¹, Костюк С.Э.¹, Салимова Т.А.¹, Вейко Н.Н.¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

² Московский амбулаторный центр психиатрии, психотерапии и наркологии «Осознанность выбора», Москва, Россия

Резюме. Шизофрения – психическое заболевание сложной этиологии. Множественные генетические факторы и факторы окружающей среды связаны с повышенным риском. В последнее время возрос интерес к роли иммунной системы в патофизиологии психических расстройств. Концепция нейровоспаления при нарушениях развития нервной системы приобретает широкий интерес, включая роль Toll-подобных рецепторов.

Заболевание шизофренией ассоциировано с повышением концентрации циркулирующей вкДНК в крови человека. Наряду со значительным увеличением общей концентрации фрагментов вкДНК у больных шизофренией значительно изменяется состав фрагментов вкДНК по сравнению с клеточной ДНК: накапливаются GC-богатые фрагменты рибосомного повтора и происходит окисление оснований. Аналогичные изменения, но менее выраженные, имеют место и для вкДНК здоровых доноров.

Для подтверждения гипотезы о возможном участии фрагментов вкДНК больных шизофренией в индукции воспаления путем активации сигнального пути TLR9-NF-κB-цитокины мы исследовали действие выделенных из плазмы крови образцов вкДНК здоровых и больных шизофренией мужчин на культивируемые мононуклеары человека.

В отличие от клеточной ДНК, вкДНК(SZ) и вкДНК(K) стимулируют в мононуклеарах транскрипцию гена TLR9. В результате в клетках уже через 1 час в 2,9 и 3,3 раза по сравнению с контролем возрастает количество РНК TLR9. Через 24 часа уровень РНК TLR9 немного снижается, но по-прежнему превышает контрольный в 2-3 раза. Через 1 час возрастает также и количество самого белка TLR9 соответственно в 1,5 и 1,7 раза по сравнению с контролем. В отличие от РНК TLR9, уровень белка TLR9 еще больше повышается через 24 часа культивирования.

Увеличение уровня экспрессии белка TLR9 коррелирует с увеличением в лимфоцитах количества транскрипционного фактора NF-κB и сопровождается нарастанием количества РНК гена провоспалительного цитокина IL8, транскрипция которого контролируется фактором NF-κB.

Адрес для переписки:

Ершова Елизавета Сергеевна
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П. Бочкова»
115522, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1.
Тел.: 8 (903) 717-07-10.
E-mail: Es-ershova@rambler.ru

Address for correspondence:

Elizaveta S. Ershova
N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics
1 Moskvorechie St
Moscow
115478 Russian Federation;
Phone: +7 (903) 717-07-10.
E-mail: Es-ershova@rambler.ru

Образец цитирования:

Е.С. Ершова, Е.М. Жесткова, Е.А. Савинова,
С.Э. Костюк, Т.А. Салимова, Н.Н. Вейко
«Внеклеточная днк плазмы крови больных
шизофренией стимулирует TLR9-NF-κB сигнальный
путь в культивируемых лимфоцитах человека»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 1025-1030.
doi: 10.15789/1563-0625-EDF-16907

doi: 10.15789/1563-0625-EDF-16907

© Ершова Е.С. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.S. Ershova, E.M. Jestkova, E.A. Savinova, S.E. Kostyuk,
T.A. Salimova, N.N. Veiko "Extracellular DNA from the blood
plasma of patients with schizophrenia stimulates the TLR9-
NF-κB signaling pathway in cultured human lymphocytes",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1025-1030.
doi: 10.15789/1563-0625-EDF-16907

© Ershova E.S. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EDF-16907

Таким образом, вкДНК(SZ) и вкДНК(K) в лимфоцитах стимулируют сигнальный путь TLR9-NF-κB-провоспалительные цитокины. Биологическое действие вкДНК зависит не только от GC-состава фрагментов, но и от концентрации этих фрагментов во внеклеточной среде. Поскольку концентрации вкДНК в крови больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами значительно увеличены, то следует ожидать и гораздо большего уровня активации сигнального пути TLR9-NF-κB в клетках организма больных людей.

Образцы вкДНК больных шизофренией обладают выраженным биологическим действием на клетки иммунной системы, стимулируя синтез провоспалительных цитокинов путем активации сигнального пути TLR9-NF-κB-провоспалительные цитокины. Высокое содержание вкДНК в плазме крови может быть одной из причин индукции и поддержания в организме больного шизофренией низкоуровневого воспаления.

Ключевые слова: шизофрения, воспаление, вкДНК, Toll-подобный рецептор, мононуклеары, IL-8

EXTRACELLULAR DNA FROM THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA STIMULATES THE TLR9-NF-κB SIGNALING PATHWAY IN CULTURED HUMAN LYMPHOCYTES

Ershova E.S.^a, Jestkova E.M.^b, Savinova E.A.^a, Kostyuk S.E.^a,
Salimova T.A.^a, Veiko N.N.^a

^a N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

^b Moscow Outpatient Center for Psychiatry, Psychotherapy and Narcology "Awareness of Choice", Moscow, Russian Federation

Abstract. Schizophrenia is a mental illness of complex etiology. Recently, there has been increased interest in the role of the immune system in the pathophysiology of mental disorders. The concept of neuroinflammation in neurodevelopmental disorders is gaining widespread interest, including the role of Toll-like receptors.

Schizophrenia is associated with an increase in the concentration of cfDNA in human blood, and the composition of cfDNA fragments changes significantly compared to cellular DNA: GC-rich fragments of the ribosomal repeat accumulate and base oxidation occurs. Similar changes, but less pronounced, also occur for cfDNA from healthy donors.

To confirm the hypothesis about the possible participation of cfDNA in the inflammation induction, we studied the effect of cfDNA samples on cultured mononuclear cells.

Unlike cellular DNA, cfDNA(SZ) and cfDNA(K) stimulate transcription of the TLR9 gene in mononuclear cells. After 1 hour the amount of TLR9 RNA increases by 2.9 and 3.3 times compared to the control. After 24 hours, the TLR9 RNA level decreases slightly, but is still 2-3 times higher than the control level. After 1 hour, TLR9 protein increases by 1.5 and 1.7 times, respectively, and further increased after 24h of culture.

An increase TLR9 protein expression correlates with an increase of the transcription factor NF-κB in lymphocytes and is accompanied by an increase in proinflammatory cytokine IL8 RNA, the transcription of IL8 is controlled by the NF-κB factor.

Thus, cfDNA(SZ) and cfDNA(K) stimulate the TLR9-NF-κB-proinflammatory cytokine signaling pathway in lymphocytes. The effect of cfDNA also depends on the concentration of these fragments in the extracellular environment. Since the concentrations of cfDNA in the blood of patients with schizophrenia are significantly increased compared to healthy donors, we should expect a much higher level of activation of the TLR9-NF-κB signaling pathway in the body cells of sick people.

Samples of cfDNA from patients with schizophrenia have a pronounced biological effect on cells of the immune system, stimulating the synthesis of pro-inflammatory cytokines by activating the TLR9-NF-κB-proinflammatory cytokines signaling pathway. High levels of cfDNA in blood plasma may be one of the reasons for the induction and maintenance of low-level inflammation in schizophrenia.

Keywords: schizophrenia, inflammation, cfDNA, Toll-like receptor, mononuclear cells, IL-8

Введение

Шизофрения — психическое заболевание сложной этиологии. Генетические факторы, факторы окружающей среды и акушерские осложнения влияют на развитие этой патологии [2, 5, 6]. Заболеванию шизофренией сопутствует окислительный стресс и воспаление. В крови больных обнаружены высокие уровни цитокинов, экспрессия генов которых контролируется транскрипционным фактором NF-κB [10]. Окислительный стресс и воспаление приводят к увеличению уровня гибели клеток. В результате в циркуляции в 2-3 раза возрастает концентрация внеклеточной ДНК (вкДНК) [1]. ВкДНК по нуклеотидному составу значительно отличается от геномной ДНК. В составе вкДНК плазмы крови повышено содержание GC-богатых фрагментов генома [4].

В последнее время концепция нейровоспаления вызывает большой интерес с точки зрения поиска новых подходов к терапии [4]. Провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB может быть активирован различными путями, в том числе и путем активации Toll-подобных белков-рецепторов семейства TLR [7, 8, 9]. Значительное увеличение количества вкДНК в крови больных шизофренией и увеличение в циркуляции количества неметилованных GC-богатых фрагментов рибосомных генов [4] позволяет предположить, что фрагменты вкДНК могут выступать в роли лигандов ДНК-сенсоров TLR9, которые образуют комплексы с CpG содержащими неметилованными фрагментами вкДНК. TLR9 являются компонентами врожденной иммунной системы. Эти ДНК-сенсоры локализованы на поверхности клеточной мембраны и в эндосомах [7]. Стимуляция TLR9 индуцирует сигнальный каскад, который приводит к транслокации NF-κB в ядро и активации транскрипции генов провоспалительных цитокинов.

Для подтверждения гипотезы о возможном участии фрагментов вкДНК больных шизофренией в индукции воспаления путем активации сигнального пути TLR9-NF-κB-цитокины мы исследовали действие выделенных из плазмы крови образцов вкДНК здоровых и больных шизофренией мужчин на культивируемые мононуклеары человека.

В исследовании приняли участие 10 здоровых мужчин и 10 мужчин — больных шизофренией в возрасте от 18 до 35 лет. ВкДНК выделяли из 0,8 мл плазмы периферической крови методом экстракции фенол-хлороформом. Концентрацию вкДНК определяли флуориметрически, с краси-

телем PicoGreen (Invitrogen, США) на спектрофлуориметре (EnSpire PerkinElmer, США). Контроль выделения ДНК и анализ длин фрагментов проводили электрофорезом в 1% агарозном геле. В исследование биологического действия брали суммарный образец вкДНК здорового контроля и суммарный образец вкДНК больных (соответственно вкДНК(К) и вкДНК(SZ)). В образцах вкДНК было определено содержание GC-богатого маркера (рибосомного повтора, рДНК) методом нерадиоактивной количественной гибридизации [10].

Мононуклеары из периферической крови 4-х здоровых доноров выделяли центрифугированием в градиенте плотности (1,077 г/мл, «Панек», Россия). Клетки инкубировали в присутствии вкДНК(SZ), вкДНК(К) и геномной ДНК в концентрации 50 нг/мл среды [раствор Hanks, 1 mM HEPES (Fluka) и 10% ЭТС (HyClone, USA)].

Клетки для проточной цитометрии фиксировали 3,7% формалином 30 мин при 4°C, обрабатывали 90% метанолом. Использовали флуоресцентно-меченные специфические антитела: TLR9 (NBP2-24729, Novus Bio, США), NF-κB (bs-0465r-cy7, Bioss, США). Клетки инкубировали с антителами (1 мкг/мл, 1 час, 25° С), промывали PBS (Панек, Россия) и анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFlexS (Beckman Coulter, США).

Выделение РНК из клеток осуществляли с использованием набора RNeasyPlus MiniKit (Qiagen, США). ПЦР в реальном времени проводили с использованием праймеров («Синтол», Москва) и красителя SybrGreen I на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Праймеры, использованные в работе: *TBP* (референсный ген) (F: 5'-GCCCCGAAACGCCGAATAT-3'; R: 5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTCT-3') *TLR9* (T G A A G A C T T C A G G C S S A A C T G ; T G C A C G G T C A C C A G G T T G T) ; *IL 8* (A A A T C T G G C A A C S S T A G T C T G ; G T G A G G T A A G A T G G T G G C T A A T).

Суммарные образцы вкДНК(К) и вкДНК(SZ) содержали соответственно 3,0 и 4,5 пг рДНК/нг ДНК, что в 2-3 раза превышает содержание рДНК в образцах клеточной ДНК (1,7 пг/нг ДНК). Для анализа биологического действия вкДНК на лимфоциты в среду культивирования клеток добавляли образцы вкДНК и образец клеточной ДНК в концентрации 50 нг/мл среды на 1 час (ранний ответ) и на 24 часа (поздний ответ). В отличие от клеточной ДНК, вкДНК(SZ) и вкДНК(К) стимулируют в мононуклеарах транскрипцию гена *TLR9*. В результате в клетках уже через 1 час в 2,9 и 3,3 раза по сравнению с контролем возрастает количество РНК *TLR9*.

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ОТВЕТЕ ЛИМФОЦИТОВ НА ДЕЙСТВИЕ ПРОБ вкДНК И клДНК. ДАННЫЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ГЕН) И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ (БЕЛОК)

TABLE 1. CHANGES IN THE ACTIVITY OF GENES INVOLVED IN THE RESPONSE OF LYMPHOCYTES TO THE ACTION OF cfDNA AND clDNA SAMPLES. REAL-TIME PCR (RNA) AND FLOW CYTOMETRY (PROTEIN) DATA

Ген Белок Gene Protein	1 час 1 hour			24 часа 24 hours		
	клДНК clDNA	вкДНК(К) cfDNA(K)	вкДНК(SZ) cfDNA(SZ)	клДНК clDNA	вкДНК(К) cfDNA(K)	вкДНК(SZ) cfDNA(SZ)
TLR9	1,0±0,3	2,9±0,5*	3,3±0,5*	1,1±0,3	2,3±0,5*	2,9±0,5*
TLR9	1,1±0,1	1,5±0,4	1,7±0,3*	1,0±0,1	2,4±0,6*	2,3±0,5*
NF-κB	1,4±0,1*	2,3±0,4*	2,9±0,3*	1,1±0,1	1,4±0,6	1,9±0,5*
IL8	1,0±0,2	1,7±0,4*	1,8±0,3*	1,0±0,1	2,4±0,2*	2,5±0,5*

Примечание. * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Note. *, differences with control are statistically reliable ($p < 0.05$).

Через 24 часа уровень РНК *TLR9* немного снижается, но по-прежнему превышает контрольный в 2-3 раза (табл. 1).

Количество белка определяли методом проточной цитометрии, анализируя фракцию лимфоцитов. При действии вкДНК(SZ) и вкДНК(К) на фоне повышенного уровня РНК через 1 час возрастает также и количество самого белка *TLR9* соответственно в 1,5 и 1,7 раза по сравнению с контролем. В отличие от РНК *TLR9*, уровень белка *TLR9* еще больше повышается через 24 часа культивирования.

Увеличение уровня экспрессии белка *TLR9* коррелирует с увеличением в лимфоцитах количества транскрипционного фактора NF-κB через 1 час культивирования в 2-3 раза. Через 24 часа количество фактора снижается, но превышает контрольный уровень. Действие образцов вкДНК сопровождается нарастанием количества РНК гена провоспалительного цитокина *IL8* (табл. 1), транскрипция которого контролируется фактором NF-κB.

Таким образом, вкДНК(SZ) и вкДНК(К) в лимфоцитах стимулируют сигнальный путь *TLR9*-NF-κB-провоспалительные цитокины. Эффекты, индуцируемые вкДНК(SZ) несколько

превышают эффекты от вкДНК(К) при введении в среду культивирования образцов вкДНК в одинаковой концентрации. Биологическое действие вкДНК зависит не только от GC-состава фрагментов, но и от концентрации этих фрагментов во внеклеточной среде. Поскольку концентрации вкДНК в крови больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами значительно увеличены [1], то следует ожидать и гораздо большего уровня активации сигнального пути *TLR9*-NF-κB в клетках организма больных людей.

Заключение

Образцы вкДНК больных шизофренией обладают выраженным биологическим действием на клетки иммунной системы, стимулируя синтез провоспалительных цитокинов путем активации сигнального пути *TLR9*-NF-κB-провоспалительные цитокины. Высокое содержание вкДНК в плазме крови может быть одной из причин индукции и поддержания в организме больного шизофренией низкоуровневого воспаления.

Список литературы / References

1. Жесткова Е.М., Ершова Е.С., Мартынов А.В., Захарова Н.В., Костюк Г.П., Вейко Н.Н., Костюк С.В. Концентрация циркулирующей внеклеточной ДНК в плазме периферической крови больных с острыми психозами эндогенной и экзогенной этиологии // Психиатрия, 2021. Т. 19, № 3. С. 6-14. [Jestkova E.M., Ershova E.S., Martynov A.V., Zakharova N.V., Kostyuk G.P., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Concentration of Circulating Cell-Free DNA in the Peripheral Blood Plasma of Patients with Acute Endogenous and Exogenous Etiology Psychoses. *Psikhiatriya = Psychiatry (Moscow)*, 2021, Vol. 19, no. 3, pp. 6-14. (In Russ.)]
2. Bramness J.G., Gundersen Ø.H., Guterstam, J., Rognli E.B., Konstenius M., Løberg E.-M., Medhus, S., Tanum, L., Franck, J. Amphetamine-induced psychosis – A separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? *BMC Psychiatry*, 2012, Vol. 12, 221. doi: 10.1186/1471-244X-12-221.
3. Chestkov I.V., Jestkova E.M., Ershova E.S., Golimbet V.E., Lezheiko T.V., Kolesina N.Y., Porokhovnik L.N., Lyapunova N.A., Izhevskaya V.L., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Abundance of ribosomal RNA gene copies in the genomes of schizophrenia patients. *Schizophr. Res.*, 2018 Jul;19, pp 305-314.
4. Ershova E.S., Jestkova E.M., Martynov A.V., Shmarina G.V., Umriukhin P.E., Bravve L.V., Zakharova N.V., Kostyuk G.P., Saveliev D.V., Orlova M.D., Bogush M., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Accumulation of Circulating Cell-Free CpG-Enriched Ribosomal DNA Fragments on the Background of High Endonuclease Activity of Blood Plasma in Schizophrenic Patients. *Int. J. Genomics*, 2019, Vol. 2019, 8390585. doi: 10.1155/2019/8390585.
5. Hilker R., Helenius, D., Fagerlund, B., Skytthe, A., Christensen, K., Werge T.M., Nordentoft, M., Glenthøj B. Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. *Biol. Psychiatry*, 2018, Vol. 83, pp. 492-498.
6. Grohs M.N., Reynolds, J.E., Liu, J., Martin, J.W., Pollock, T., Lebel, C., Dewey D., Kaplan B.J., Field C.J., Dewey D. Prenatal maternal and childhood bisphenol a exposure and brain structure and behavior of young children. *Environ. Health*, 2019, Vol. 18, 85. doi: 10.1186/s12940-019-0528-9.
7. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, pp 373-384.
8. McKernan D.P., Dennison U., Gaszner G., Cryan J.F., Dinan T.G. Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: Further evidence of a pro-inflammatory phenotype. *Transl. Psychiatry*, 2011, Vol. 1, e36. doi: 10.1038/tp.2011.37.
9. Patlola S.R., Donohoe G., McKernan D.P. Counting the Toll of Inflammation on Schizophrenia – A Potential Role for Toll-like Receptors. *Biomolecules*, 2023, Vol. 13, 1188. doi: 10.3390/biom13081188.
10. Yang Q., Wang G., Zhang F. Role of peripheral immune cells-mediated inflammation on the process of neurodegenerative diseases. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 582825. doi: 10.3389/fimmu.2020.582825.

Авторы:

Ершова Е.С. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Жесткова Е.М. – к.м.н., врач-психиатр, Московский амбулаторный центр психиатрии, психотерапии и наркологии «Осознанность выбора», Москва, Россия

Савинова Е.А. – научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Authors:

Ershova E.S., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Jestkova E.M., PhD (Medicine), Psychiatrist, Moscow Outpatient Center for Psychiatry, Psychotherapy and Narcology “Awareness of Choice”, Moscow, Russian Federation

Savinova E.A., Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Костюк С.Э. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Kostyuk S.E., Research Assistant, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Салимова Т.А. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Salimova T.A., Research Assistant, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Вейко Н.Н. — д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Veiko N.N., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 04.04.2024

Принята к печати 17.04.2024

Received 03.04.2024

Revision received 04.04.2024

Accepted 17.04.2024