

УДК 616.056-577.2.04

**СОДЕРЖАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК
В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ
КРИТИЧЕСКОГО ВОЗРАСТНОГО ПЕРИОДА
ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХАЛЬНОЙ АСТМЕ**

Р.А. Курбанов, З.И. Абрамова

Аннотация

Изучена взаимосвязь концентрации внеклеточной ДНК в сыворотке крови у детей с атопической бронхиальной астмой (АБА) в зависимости от возраста детей, половой принадлежности, времени обследования, степени тяжести АБА и уровня содержания аутоантител (ААТ) к нДНК. Установлена прямая корреляционная зависимость между концентрацией внеклеточной (внкДНК) и уровнем ААТ к нДНК в сыворотках детей. Статистически значимая связь между концентрацией внкДНК и уровнем содержания ААТ к нДНК по мере усиления тяжести течения АБА указывает на ДНК-зависимый характер иммунного ответа при АБА.

Введение

В конце 1970-х годов появились методически достаточно обоснованные сообщения о наличии в сыворотке крови животных и человека некоторых количеств ДНК [1–3], однако вопросы о ее происхождении до сих пор остаются не выясненными. Одни авторы связывают появление внеклеточной ДНК с апоптотической или иной гибелью клеток с последующим выходом хроматина из них [4, 5], другие считают, что внеклеточная ДНК плазмы активно секретируется живыми клетками [6–8]. Некоторые авторы полагают, что главным источником ДНК являются ядра распадающихся полиморфноядерных нейтрофилов, которые скапливаются в дыхательных путях в ответ на хроническую бактериальную инфекцию [9]. Высокая концентрация ДНК является одним из основных факторов накопления патологически вязкого секрета бронхов [10]. Накопление чрезмерных количеств ДНК в дыхательных путях увеличивает вязкость слизи, существенно нарушая дренаж бронхов и благоприятствуя развитию инфекции. Это ведет к дальнейшему выбросу нейтрофилов и образованию еще больших количеств ДНК.

Еще в ранних работах [11, 12] при хронической пневмонии и инфекционно-аллергической бронхиальной астме (не атопической) в сыворотке крови больных отмечалось повышение содержания ДНК, РНК и недифференцированных нуклеотидов. Их уровень оказывался коррелятивно связанным с величинами показателей СОЭ, С-реактивного белка, количеством лейкоцитов, данными рентгенологического обследования больных. У детей с бронхиальной астмой обнаруживалось повышение количества ДНК плазмы и снижение РНК,

т. е. наблюдался более сложный характер нарушения нуклеинового обмена. После лечения в соответствии с улучшением клинического состояния больных прогрессивно снижалось содержание ДНК и нарастало содержание РНК. Авторы полагают, что неизбежная при бронхиальной астме гипоксия приводила к метаболическим нарушениям системы ДНК – РНК – белок, т. е. к дефициту синтеза белковых структур.

С другой стороны, существовало представление о нуклеиновых кислотах как об иммунологически инертных молекулах. Было известно, что при введении животным геномной ДНК позвоночных специфические антитела к нативной ДНК (нДНК) не образуются [13]. Исключением считалось патологическое состояние, возникающее при заболевании системной красной волчанкой, когда собственная ДНК является основным аутоантигеном. Впервые такие АТ, индуцированные у генетически здоровых мышей иммунизацией нДНК, были получены в работе D.D. Desai с соавторами [14], где в качестве иммуногена использовали комплекс нДНК с высокоиммуногенным ДНК-связывающим пептидом бактериального происхождения. Такие АТ обладали высокой специфичностью связывания с нДНК и способностью вызывать в эксперименте аутоиммунные поражения, аналогичные тем, что наблюдаются у больных СКВ [15].

В настоящее время известно, что ААТ к нДНК образуются и при многих не аутоиммунных заболеваниях, в том числе атопических и аллергических, в небольшом количестве встречаются в сыворотке крови у здоровых лиц [16, 17].

Исключением не является и бронхиальная астма, которая, по мнению некоторых авторов может являться претендентом на аутоиммунное заболевание, т. к. ААТ к ДНК при данной патологии обнаруживают каталитические свойства. Высокий уровень внеклеточной ДНК в крови может являться одной из причин индукции ДНК-гидролизующих антител [18].

Целью данной работы было изучение внеклеточной ДНК периферической крови детей больных бронхиальной астмой с различной степенью тяжести.

1. Условия эксперимента

Принимая во внимание, что для оптимального своевременного обследования детей с АБА педиатру необходимо обладать всесторонней информацией о возрастных стадиях становления иммунной системы ребенка и ее связи с ходом развития астмы, были исследованы изменения концентрации внкДНК в периферической крови у детей с АБА в критические возрастные периоды.

В работе была обследована группа детей (141 человек) из аллергологического отделения Детской Республиканской Клинической Больницы (ДРКБ) с диагнозом «атопическая бронхиальная астма» (АБА). Контрольную группу составляли 18 относительно здоровых подростков призывного возраста (табл. 1).

Единственным критерием при отборе в опытную группу служило только наличие диагноза АБА. Оказалось, что среди таких детей количество мальчиков с АБА значительно превышало количество девочек (табл. 1). По возрастным периодам (препубертатный и пубертатный периоды) и среди мальчиков и среди девочек распределение было примерно одинаковым (37.59% против 31.91% у мальчиков и 16.31% против 14.19% у девочек соответственно).

Табл. 1

Половая и возрастная характеристика обследованных

	Дети с АБА (<i>n</i> = 141)	Здоровые (<i>n</i> = 18)
Мальчики	98 (69.50%)	18 (100%)
Девочки	43 (30.50%)	
Девочки:		
Препубертатный период (7–11)	23 (16.31%)	
Пубертатный период (12–16)	20 (14.19%)	
Мальчики:		
Препубертатный период (8–12)	53 (37.59%)	
Пубертатный период (13–17)	45 (31.91%)	

Соотношение обследованных детей с АБА разной степени ее тяжести по сравнению со среднестатистическими данными по стране представлено в табл. 2.

Следует отметить значимо большее количество детей в Республике Татарстан (РТ), впервые заболевших астмой, чем в среднем по РФ. Причиной этого может быть неблагоприятное состояние экологической обстановки в РТ, что сказывается на будущих матерях и может впоследствии проявляться у их детей возникновением астмы.

Табл. 2

Соотношение обследованных детей, больных астмой в зависимости от степени тяжести (%)

Степени тяжести персистирующей АБА	Эпидемиологические показатели по РФ [19]	РТ (<i>n</i> = 141)
легкая	5	44.0
средняя	25–30	20.6
тяжелая	65–70	35.4

В работе использован флуориметрический метод с применением красителя Hoechst 33342 (бис-бензimid) в качестве флуорохрома [20]. Для приготовления стандартных разведений использовали ДНК эритроцитов цыплят («Reanal», Венгрия) в концентрациях от 350 до 5 нг ДНК на 1 мл раствора. Концентрацию внеклеточной ДНК определяли по калибровочной кривой.

Полученные данные характеризовали при помощи следующих величин: среднего значения, стандартного отклонения и структурных характеристик – медианы (*Me*), коэффициента асимметрии (*As*) и эксцесса (*Ex*), персентилей. Медианы значительно отличаются от средних (рис. 1, *в*), а выборочные *As* и *Ex* превышают критические значения для нормального распределения, что говорит об асимметричном распределении концентраций внкДНК в данных выборках. Поэтому для описания использовали структурные характеристики (*Me*, персентили), а для оценки различий между группами применяли непараметрические критерии Крускала – Уоллиса и *t*-критерий Манна – Уитни. [21]. Данные представлены как медиана и интерперсентильный размах.

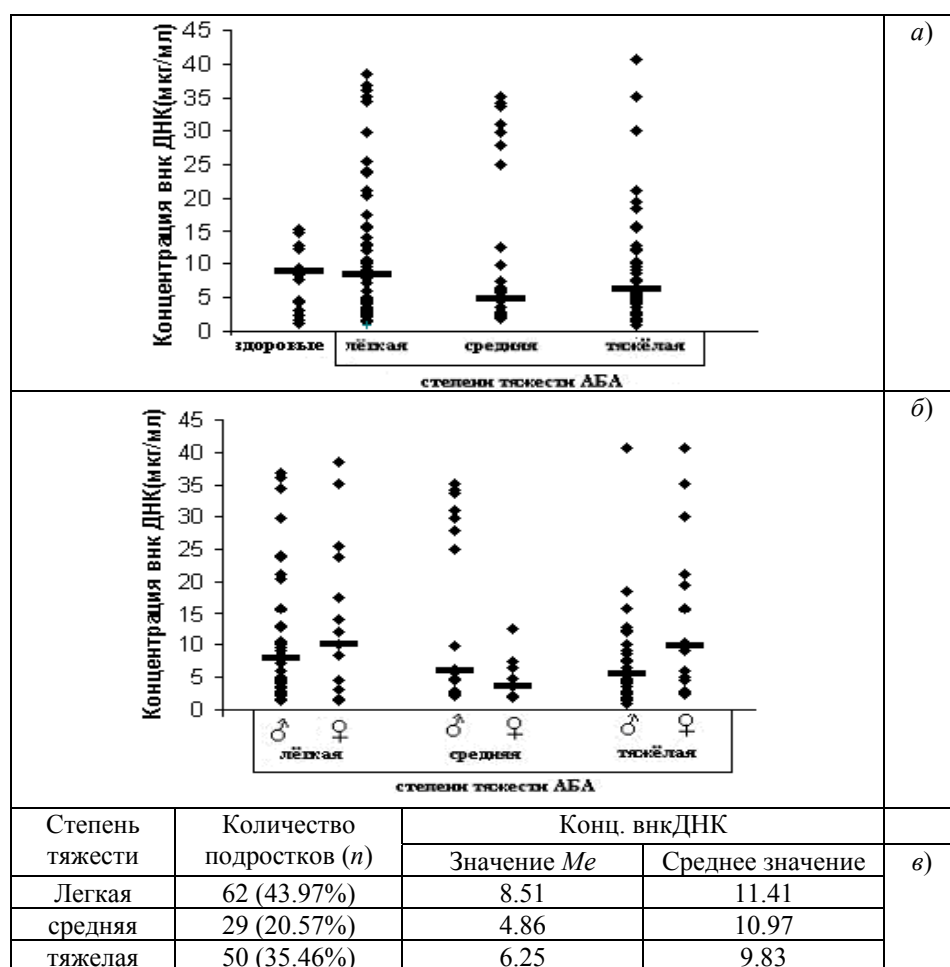


Рис. 1. Распределение больных АБА по степени тяжести для общей выборки (а), у подростков различного пола (б) и соотношение показателей медианы и среднего значения концентрации ДНК для данной выборки (в)

2. Результаты и обсуждение

Полученные данные о концентрациях внкДНК в сыворотке крови обследованных представлены на рис. 2. Обращает на себя внимание разброс индивидуальных показателей у больных с АБА от 0.96 до 40.7 мкг/мл. Среди относительно здоровых – от 1.2 до 15.35 мкг/мл.

У 58 человек с АБА (41.14%) концентрация внкДНК составила от 0.96 до 5 мкг/мл, у 63 больных (44.68%) – от 5.09 до 15.35 мкг/мл и у 20 больных (14.18%) – от 15.62 до 40.7 мкг/мл, в отличие от группы относительно здоровых лиц, концентрация внкДНК в которой составила от 0.96 до 5 мкг/мл у 6 человек (33.33%) и от 5.09 до 15.35 мкг/мл у 12 человек (66.67%), т. е. высокая концентрация внкДНК в крови характерна только для детей с АБА.

У детей с АБА в разных возрастных группах комплекс изменений значений иммунологических показателей и степень выраженности изменений относительно нормативных в соответствующей возрастной группе имеют различия

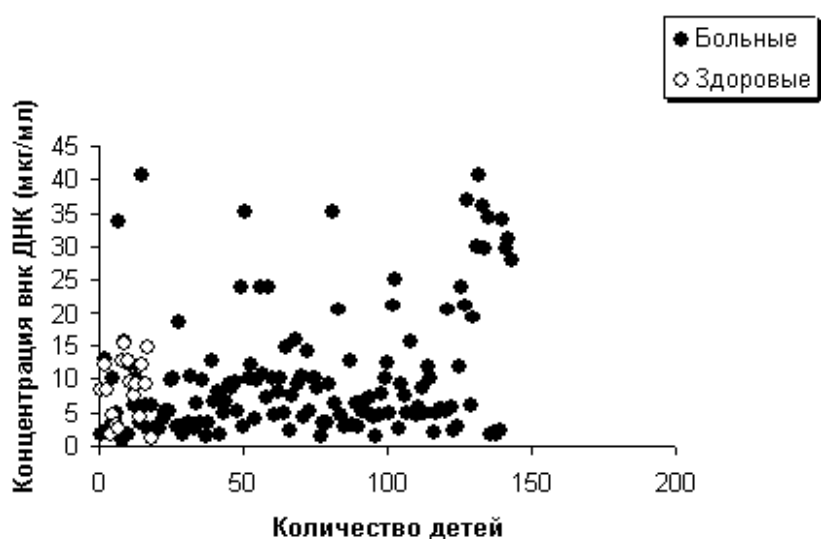


Рис. 2. Содержание внкДНК в сыворотке периферической крови детей с АБА школьного возраста и относительно здоровых лиц призывного возраста

[22], поэтому мы определяли концентрацию внкДНК у девушек и юношей в критические возрастные периоды.

Как видно из рис. 3, достоверной разницы в концентрации внкДНК между девушками ($Me = 7.36$ мкг/мл; 25-й-перцентиль = 3.2 мкг/мл; 75-й-перцентиль = 15.74 мкг/мл) и юношами ($Me = 6.17$ мкг/мл; 25-й-перцентиль = 3.6 мкг/мл; 75-й-перцентиль = 12.11 мкг/мл) общей выборки не было обнаружено ($p = 0.88$).

Табл. 3

Характеристика достоверности результатов

Степень тяжести АБА	Количество (n)		Конц. внкДНК (Me)		p
	♂	♀	♂	♀	
легкая	47	15	7.94	10.17	0.80
средняя	19	10	6.08	3.53	0.036
тяжелая	32	18	5.44	9.95	0.05

Поэтому мы сравнили изменения концентрации внкДНК у мальчиков и девочек в зависимости от тяжести астмы. Концентрации внкДНК (по Me) у девушек и юношей различались (рис. 1, б): при легкой степени – 10.17 и 7.94 мкг/мл, при средней степени – 3.53 и 6.08 мкг/мл и тяжелой степени – 9.95 и 5.44 мкг/мл соответственно. Как следует из табл. 3, различия в концентрации внкДНК в сыворотке крови становятся значимыми ($p < 0.05$) у подростков с АБА при средней и тяжелой степенях. Причем при средней степени тяжести АБА концентрация внкДНК в крови выше у мальчиков, чем у девочек, в то время как при тяжелой степени тяжести АБА она значительно выше у девочек, чем у мальчиков (табл. 3).

Связано ли изменение концентрации внкДНК в сыворотке крови подростков с физиологическим состоянием в критические возрастные периоды или

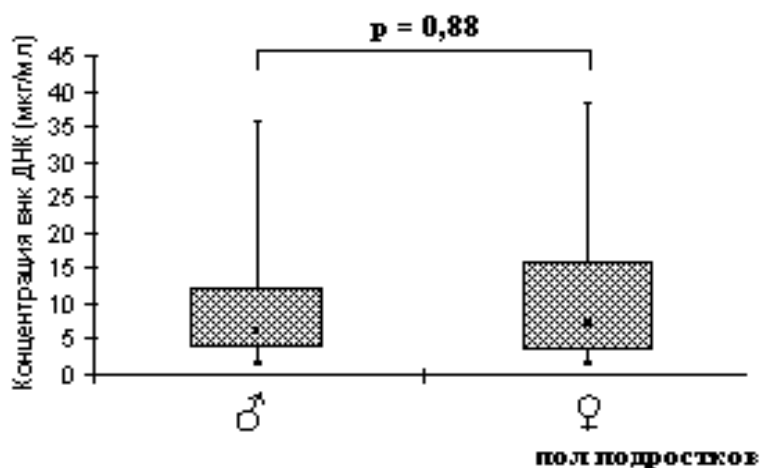


Рис. 3. Концентрация внкДНК в сыворотке крови у девушек и юношей школьного возраста

только с развитием астмы? Для того чтобы получить ответ на данный вопрос были изучены изменения в концентрации внкДНК в сыворотке детей в препубертатный (7–11 лет у девочек и 8–12 лет у мальчиков) и пубертатный периоды (12–16 лет у девочек и 13–17 у мальчиков).

Табл. 4
Сравнение концентраций внкДНК (*Me*) в сыворотке детей в препубертатный и пубертатный периоды

Возрастные периоды	Пол		Уровень значимости <i>p</i>
	♂	♀	
Препубертатный	5.12	9.73	0.39
Пубертатный	7.49	6.17	0.58
Уровень значимости <i>p</i>	0.21	0.65	

Сравнение данных по концентрации внкДНК в сыворотке детей в препубертатный и пубертатный периоды показало, что возрастные особенности детей, по-видимому, не влияют на концентрацию внкДНК ($p = 0.21$ у мальчиков и $p = 0.65$ у девочек). Не было различий в концентрации внкДНК у девочек и мальчиков соответствующих возрастных периодов ($p = 0.39$ в препубертатный период и $p = 0.58$ в пубертатный период) (табл. 4).

На рис. 4 представлены результаты определения концентрации внкДНК в сыворотке крови детей с АБА критических возрастных периодов в зависимости от степени тяжести заболевания.

Полученные данные говорят о достоверных различиях в концентрации внкДНК в сыворотке крови только у детей пубертатного периода. Причем здесь наблюдается неоднозначная картина: если у девочек концентрация внкДНК в сыворотке достоверно выше при тяжелой степени тяжести ($p = 0.05$), то у мальчиков она оказывается выше при легкой степени тяжести ($p = 0.05$).

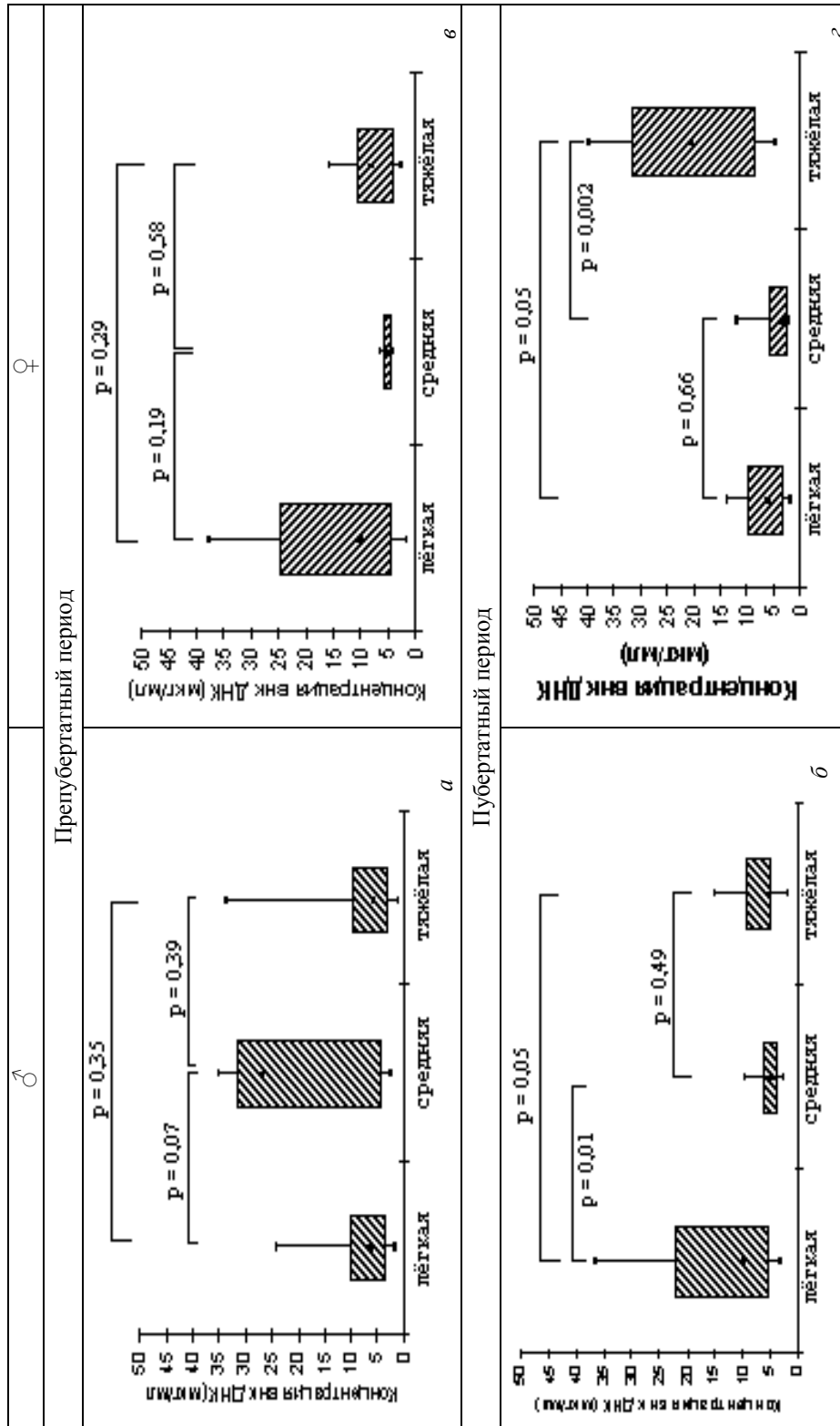


Рис. 4. Сравнение изменения концентрации внкДНК в сыворотке детей с АБА в критические (препубертатный и пубертатный) периоды жизни (а, б – мальчики, в, г – девочки)

Табл. 5

Зависимость концентрации внк ДНК в сыворотке крови от пола (*a*),
возраста больных (*б*), времени обследования (*в*), тяжести АБА (*г*)

	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	<i>г</i>
Количество больных (<i>n</i>)	141	141	141	141
Коэффициент корреляции Спирмена (r_s)	-0.01	0.07	0.19	-0.06
Уровень значимости (<i>p</i>)	0.88	0.42	0.19	0.45

Возможно, это обстоятельство может как-то объяснить тот факт, что у мальчиков в пубертатном периоде часто наблюдается не только ремиссия заболевания, но и полное исчезновение симптомов астмы [23].

Обращают на себя внимание изменения в концентрациях внкДНК в сыворотке у детей с АБА средней степени тяжести, которые характеризуются значительным разбросом индивидуальных данных (рис. 4). Медики считают, что это критическая фаза заболевания, которая влияет на ход дальнейшего развития астмы: регресс или усугубление течения заболевания.

Используя метод корреляционного анализа, мы проследили за изменениями концентрации внкДНК в зависимости от возраста детей с АБА, от половой принадлежности больных, от времени обследования, от степени тяжести АБА в общей группе больных ($n = 141$). Было установлено, что концентрация внкДНК в сыворотке крови детей больных АБА не зависит от перечисленных выше факторов. Об этом свидетельствуют данные, представленные в табл. 5.

Однако нами была обнаружена значимая прямая корреляционная зависимость ($p = 0.00006$) между концентрацией внкДНК и уровнем ААТ к нДНК (рис. 5).

Далее мы попытались выявить корреляцию между уровнем ААТ к нДНК и концентрацией внкДНК у больных с АБА при легкой, средней и тяжелой степенях тяжести (рис. 6, 7, 8). При легкой степени тяжести АБА корреляции между этими показателями не наблюдается ($p = 0.09$). При средней степени тяжести АБА между концентрацией внкДНК и уровнем ААТ к нДНК выявлена достоверная прямая корреляционная зависимость ($p = 0.02$). При тяжелой степени тяжести АБА положительная корреляция между указанными показателями приобретает еще более высокую значимость ($p = 0.005$). То есть прослеживается тенденция роста корреляционной зависимости между концентрацией внкДНК и уровнем ААТ к нДНК по мере утяжеления течения АБА.

Ранее методом ИФА нами было показано (результаты не приведены), что уровень ААТ к нДНК достоверно увеличивается по мере усложнения степени тяжести АБА – от легкой к тяжелой. Полученные в настоящей работе данные о зависимости между уровнем ААТ к нДНК и концентрацией внкДНК позволяют предположить ДНК-зависимый (ДНК) характер иммунного ответа при АБА. Большая зависимость при тяжелой степени тяжести АБА, чем при легкой, сопоставляется с более высоким уровнем ААТ к нДНК при тяжелой степени АБА, чем при легкой. На антиген-зависимый характер образования ААТ к нДНК указывает большинство работ [24–29].

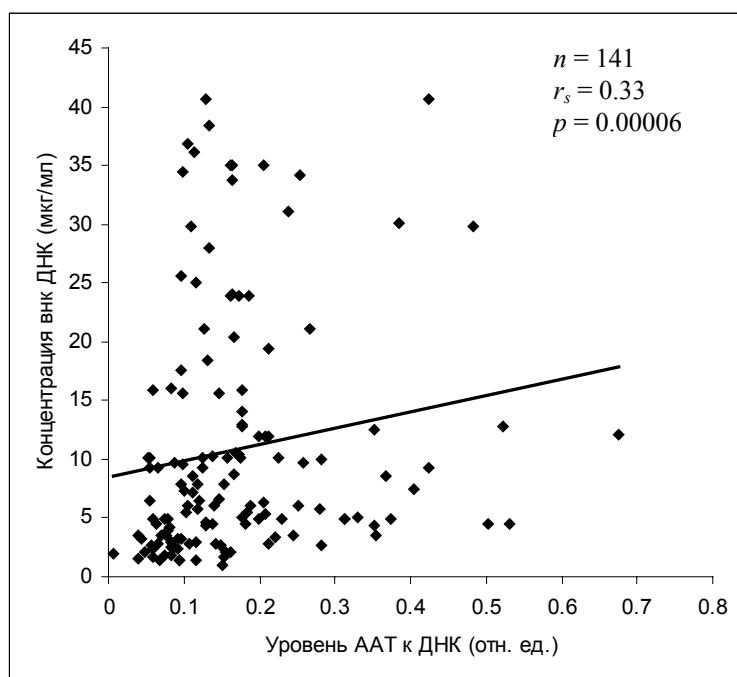


Рис. 5. Зависимость между концентрацией внкДНК и уровнем ААТ к нДНК

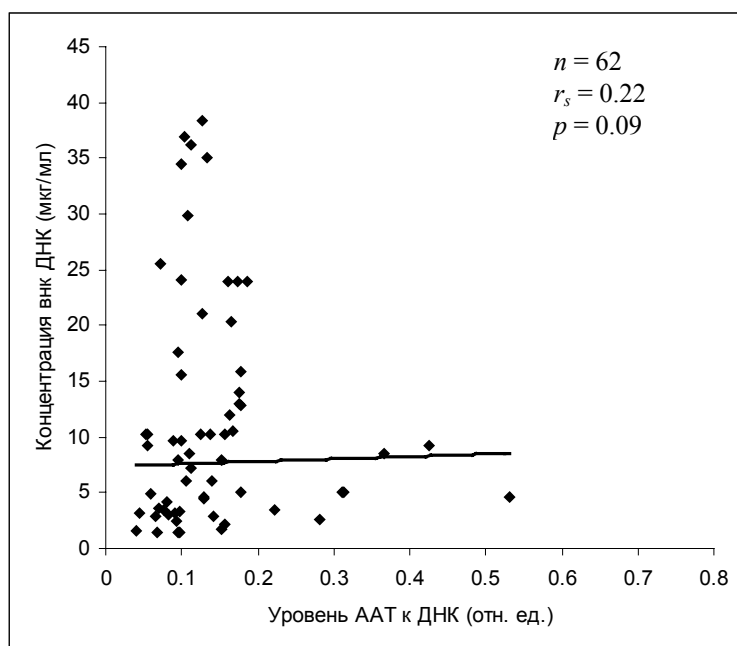


Рис. 6. Зависимость изменения концентрации внкДНК от уровня ААТ к нДНК при легкой степени тяжести АБА

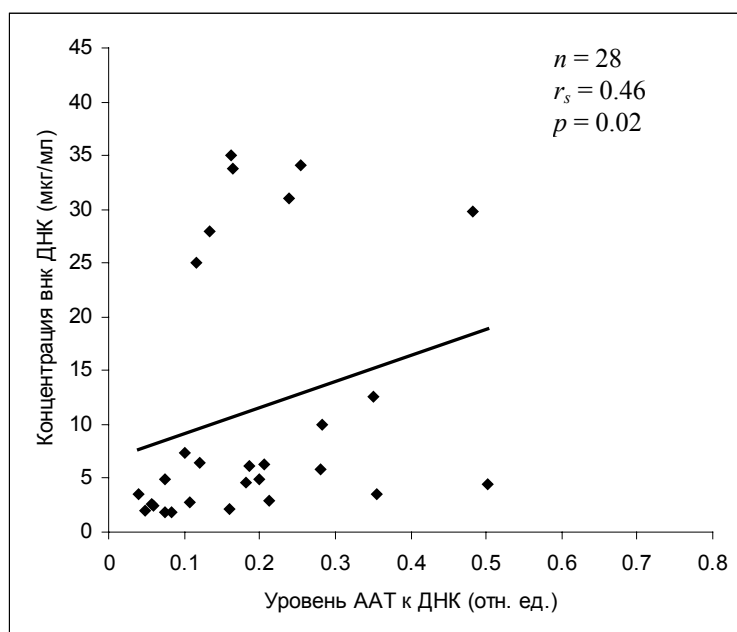


Рис. 7. Зависимость изменения концентрации внкДНК от уровня ААТ к нДНК при средней степени тяжести АБА

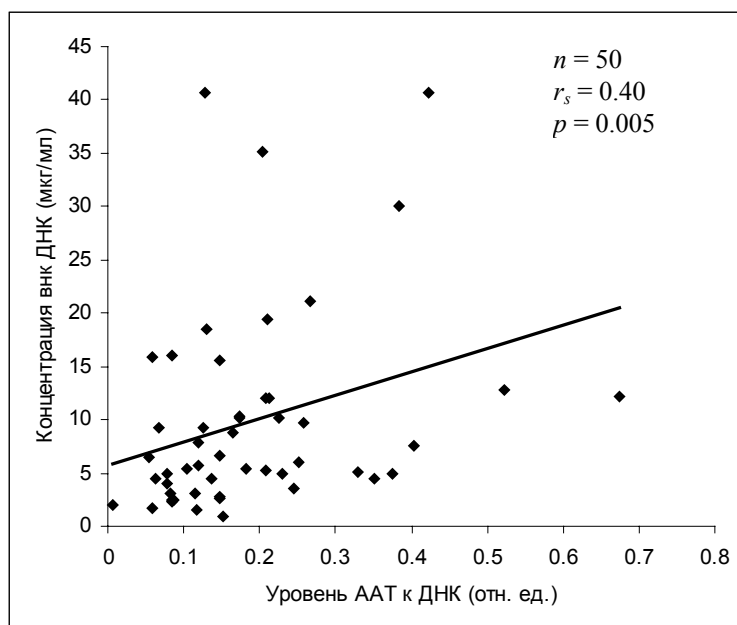


Рис. 8. Зависимость изменения концентрации внкДНК от уровня ААТ к нДНК при тяжелой степени тяжести АБА

Summary

R.A. Kurbanov, Z.I. Abramova. The level of extracellular DNA in peripheral blood in critical aged children with atopic bronchial asthma.

We have studied of concentration of extracellular DNA in blood serum of children with atopic bronchial asthma in dependence of age, sex, season, grade of severity and level of autoantibodies to dsDNA. Direct correlation ($p = 0.0006$) between concentration of extracellular DNA and level of autoantibodies to dsDNA was established. Upward trend of this correlation in dependence of increase of atopic bronchial asthma severity indicates dsDNA-dependent character of immune response.

Литература

1. *Belokhvostov A.S., Zelenkova N.K.* Low-molecular weight nucleic acids in the blood of rats with Zajdela's hepatoma // *Cancer Lett.* – 1978. – V. 5, No 6. – P. 351–356.
2. *Hamilton T.C., Smith A.G., Griffin Ch.A.* Ribonucleic acid in plasma from normal adults and multiple myeloma patients // *Klin. Wachr.* – 1979. – V. 57, No 9. – P. 451–456.
3. *Leon S.A., Shapiro B., Sclaroff D.M.* Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy // *Cancer Res.* – 1977. – V. 37, No 3. – P. 646–650.
4. *Giacona M.B., Ruben G.C., Iczkowski K.A.* Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls // *Pancreas.* – 1998. – V. 17. – P. 89–97.
5. *Deligezer U., Erten N., Akisik E.E.* Circulating fragmented nucleosomal DNA and caspase-3 mRNA in patients with lymphoma and myeloma // *Exp. Mol. Path.* – 2006. – V. 8, No 1. – P. 72–76.
6. *Янева И.С., Федоров Н.А., Боровкова Т.В., Севастьянова М.Г.* Выделение, идентификация и электрофоретические свойства ДНК, экстрактируемой лимфоцитами человека // *Биохимия.* – 1990. – Т. 55, Вып. 4. – С. 745–753.
7. *Chen J.S.* Possible Origin of Extrachromosomal DNA from human lymphocytes following in vitro treatment by phytohemagglutinin // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2001. – V. 945. – P. 289–291.
8. *Chen Z., Fadiel A., Naftolin F.* Circulation DNA: Biological implications for cancer metastasis and immunology // *Med. Hypotheses.* – 2005. – V. 65, No 5. – P. 956–961.
9. *Ramsey B.W., Dorkin H.L.* Efficacy of aerosolized tobramycin in patients with cystic fibrosis // *Pediatr Pulmonol.* – 1994. – V. 17(6). – P. 404–408.
10. *Shak S., Capon D.J., Hellmiss R.* Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1990. – V. 87(23). – P. 9188–9192.
11. *Подлубная Л.С.* Значение показателей нуклеинового обмена у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких // *Врачебное дело.* – 1977. – № 11. – С. 93–94.
12. *Сосенкова Н.М.* Анализ летальности больных бронхиальной астмой пожилого и старческого возраста // *Сб. науч. тр. Всесоюз. НИИ пульмонологии.* – 1974. – Т. 11. – С. 93–94.
13. *Stollar B.D., Rashtchian A.* Immunochemical approaches to gene probe assays. // *Anal. Biochem.* – 1987. – V. 161(2). – P. 387–394.
14. *Desai D.D., Krishnan M.R., Swindle J.T.* Antigen-specific induction of antibodies against native mammalian DNA in nonautoimmune mice // *J. Immunol.* – 1993. – V. 151. – P. 1614–1626.
15. *Pisetsky D.S.* Immune response to DNA in systemic lupus erythematosus. // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2001. – V. 3, No 11. – P. 850–853.

16. Добродеева Л.К., Сулонова Г.А. Аутоантитела у практически здоровых людей // Иммунология. – 1990. – № 2. – С. 52–55.
17. Коликова Ю.О., Фурманова П.В., Ишмухаметова Д.Г., Винтер В.Г. Аутоантитела к ДНК: половой диморфизм и возрастная динамика их содержания в сыворотке крови здоровых лиц // Иммунология. – 2003. – № 4. – С. 250–251.
18. Шевчук Н.А. Времяразрешенный иммунофлуоресцентный анализ на ДНК и исследование содержания ДНК в сыворотке человека // Вопр. мед. химии. – 2001. – Т. 47, № 4. – С. 2–5.
19. Абелевич М.М., Яновер Л.Г., Тарасова А.А. Особенности клинического течения бронхиальной астмы у детей при летальных исходах // 6-й нац. конгресс по болезням органов дыхания. – Новосибирск, 1996. – С. 61.
20. De Barro P.J., Sherratt T.N., Brookes C.P. Spatial and temporal variation in British field populations of the grain aphid *Sitobion avenae* (F.) (Homoptera Aphididae) studied using RAPD-PCR // Proc. Roy. Soc. L. – 1995. – V. 262. – P. 321–327.
21. Акберова Н.И. Сравнение данных. Непараметрические критерии значимости. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2004. – 50 с.
22. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. – М.: Наука, 1990. – 224 с.
23. Астафьева Н.Г. Бронхиальная астма у подростков // Аллергология. – 2005. – № 2. – С. 41–49.
24. Kramers C., Hylkema M.N., van Bruggen M.C. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo // J. Clin Invest. – 1994. – V. 94(2). – P. 568–577.
25. Huck S., Deveaud E., Namane A. Abnormal DNA methylation and deoxycytosine-deoxyguanine content in nucleosomes from lymphocytes undergoing apoptosis // FASEB J. – 1999. – V. 13, No 11. – P. 1415–1422.
26. Mohan C., Liu F., Xie C. Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their first-degree relatives // Clin. Exp. Immunol. – 2001. – V. 123, No 1. – P. 119–126.
27. Williams R.C.Jr., Malone C.C., Meyers C. Detection of nucleosome particles in serum and plasma from patients with systemic lupus erythematosus using monoclonal antibody 4H7 // J. Rheumatol. – 2001. – V. 28, No 1. – P. 81–94.
28. Kubota T., Watanabe N., Kaneko T. Activation of autoreactive T cells that help nucleobindin-injected mice produce anti-DNA antibodies // Immunol. Lett. – 2001. – V. 75, No 2. – P. 111–115.
29. Сучков С.В., Наумова Т.Е., Третьяк Е.Б. Молекулярные основы патогенности ДНК-связывающих аутоантител // Иммунология. – 2004. – № 2. – С. 115–119.

Поступила в редакцию
13.09.06

Курбанов Рустем Альбертович – аспирант кафедры биохимии Казанского государственного университета.

Абрамова Зинаида Ивановна – доктор биологических наук, заведующий лабораторией БНК Казанского государственного университета.