

УДК 577.113

КОНЦЕНТРАЦИЯ И ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ С ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЦНС

Н.О. Туаева, В.Г. Винтер, В.В. Софронов, В.А. Емикеева

Аннотация

Показано, что концентрация внеклеточной ДНК плазмы крови у новорожденных детей значительно повышается при поражениях центральной нервной системы (ПП ЦНС). Выявлена низкомолекулярная фракция, содержащая фрагменты длиной около 2–5 тыс. п. н., тогда как в плазме крови детей из контрольной группы обнаружена только высокомолекулярная фракция (более 21 тыс. п. н.). Предположительно, увеличение концентрации внеклеточной ДНК может являться результатом апоптоза нервных клеток.

Введение

В настоящее время внеклеточная ДНК плазмы крови вызывает огромный интерес исследователей в первую очередь в связи с ее прогностической и диагностической значимостью при самых различных заболеваниях человека, включая неврологические патологии [1–3] и посттравматический синдром [4, 5]. К тому же известно, что существенно изменяется не только концентрация, но и фракционный состав ДНК плазмы крови: различные неврологические расстройства зачастую сопровождаются появлением низкомолекулярной внеклеточной ДНК [1, 3].

Однако, несмотря на усиленное изучение, остается еще много вопросов относительно роли внеклеточной ДНК в патологических процессах. Одним из наименее изученных аспектов остаются количественная и качественная характеристики внеклеточной ДНК плазмы крови у новорожденных детей. Как известно, при рождении организм ребенка испытывает сильный стресс, который может привести к различным негативным последствиям, особенно если внутриутробный период или роды протекали с осложнениями. Наиболее распространенными нарушениями этого периода являются заболевания, получившие общее название перинатальной патологии центральной нервной системы (ПП ЦНС). Эта группа заболеваний имеет широкий перечень нервно-психических последствий: от легкой задержки психомоторного развития до тяжелых форм детского церебрального паралича и умственной отсталости [6], что определяет необходимость поиска новых направлений в изучении патогенеза этих заболеваний и особенно их маркеров. Не исключено, что неврологическая симптоматика у новорожденных, как и у взрослых людей, сопровождается как увеличением концентрации внеклеточной ДНК, так и изменением ее фракционного состава. В связи с этим представляется актуальным определить концентрацию

внеклеточной ДНК плазмы крови у новорожденных детей и исследовать, какие процессы в организме новорожденного способны привести к ее изменению. Кроме того, одной из задач представленного исследования была сравнительная характеристика фракционного состава внеклеточной ДНК плазмы крови у здоровых новорожденных и при перинатальной патологии ЦНС.

1. Материалы и методика исследования

Исследована концентрация внеклеточной ДНК плазмы крови 77 новорожденных детей (масса тела – от 1100 до 4010 г), из которых 58 были пациентами Городской детской клинической больницы № 1 г. Казани, имеющими перинатальное поражение ЦНС и сопутствующие им заболевания различной степени тяжести. Девятнадцать новорожденных детей не имели каких-либо нарушений со стороны нервной системы, родились доношенными (средняя масса тела – 3500 г) и не имели инфекционных заболеваний. Эти новорожденные составили контрольную группу. Исследования проводили на 2–8 день жизни.

Количественный анализ внеклеточной ДНК. Венозную кровь (1 мл) с помощью катетера собирали в пробирку с 1% ЭДТА в соотношении 9:1. Плазму крови получали по методике [7]. В образцы плазмы (200 мкл) предварительно вносили протеиназу К (“Sigma”, США) до конечной концентрации 2.5 мкг на 1 мл плазмы и инкубировали в течение ночи при 56°C для облегчения диссоциации нуклеопротеидных комплексов. Затем ДНК плазмы депротенизировали фенольным методом по стандартной методике [8, с. 304–306], модифицированной для микроколичеств образца. В образцы ДНК после депротенизации добавляли TNE-буфер (10 мМ трис, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, pH 7.4), флуоресцентный краситель Hoechst 33342 до конечной концентрации 0.45 мкг/мл (“Sigma”, Германия) и измеряли флуоресценцию комплекса ДНК-Hoechst на люминесцентном спектрофотометре Hitachi MPF-4 (Япония). 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.

Определение фракционного состава внеклеточной ДНК. Фракционный состав внеклеточной ДНК, выделенной фенольным методом [8, с. 304–306] из суммарного пула образцов плазмы крови новорожденных детей (10 мл), определяли с помощью электрофореза в 0.7%-ном агарозном геле. Электрофорез проводили при силе тока 5 мА на 1 см геля в течение 1–1.5 ч в присутствии бромистого этидия (0.5 мкг/мл) [9].

Статистическая обработка результатов. Для каждой выборки определяли коэффициент асимметрии, эксцесса, медиану и квартили (2.5-й, 25-й, 75-й и 97.5-й перцентили). Сравнение выборок проводили, используя непараметрические критерии Крускала – Уоллиса и Манна – Уитни.

2. Результаты и обсуждение

В представленной работе определялась концентрация внеклеточной ДНК при ПП ЦНС гипоксической природы, однако такие неврологические состояния зачастую сопровождаются различными сопутствующими заболеваниями.

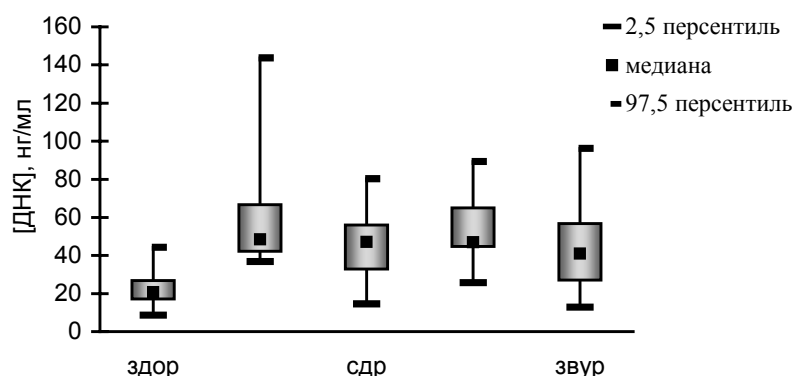


Рис. 1. Концентрация внеклеточной ДНК плазмы крови (нг/мл) у детей с ПП ЦНС при различных сопутствующих заболеваниях

Наиболее тяжелая клиническая картина соответствует наличию у новорожденного, помимо ПП ЦНС, синдрома дыхательных расстройств (СДР), осложненного инфекционной пневмонией ($n = 10$), а также осложнение ПП ЦНС внутриутробной или неонатальной инфекцией ($n = 9$). Отдельную группу составили дети, имеющие клинику СДР, но без инфекционных осложнений ($n = 24$). Более благоприятному прогнозу соответствуют задержки внутриутробного развития различной степени (ЗВУР), не осложненные инфекционным процессом ($n = 15$). Результаты исследования представлены на рис. 1.

Практически во всех группах новорожденных с ПП ЦНС содержание ДНК в плазме крови достоверно ($p < 0.01$) превышало этот показатель у здоровых новорожденных. Максимальная концентрация внеклеточной ДНК (48.5 нг/мл) наблюдалась при синдроме дыхательных расстройств в сочетании с пневмонией (на графике эта группа заболеваний обозначена как СДР+инфекция). При СДР, не осложненном инфекционным процессом, также наблюдалась высокая концентрация ДНК (47.1 нг/мл). У детей с клиническими симптомами ПП ЦНС, причиной которых явилась внутриутробная инфекция (ВУИ), средний показатель концентрации ДНК составил 46.9 нг/мл. У детей с задержкой внутриутробного развития (ЗВУР) – 41 нг/мл. При исследовании концентрации внеклеточной ДНК в плазме крови у детей контрольной группы установлено, что она варьируется от 11 до 38 нг/мл, составляя в среднем 20.7 нг/мл. Это соответствует данным литературы [10, 11], полученным при изучении внеклеточной ДНК в плазме крови у здоровых взрослых людей.

Как было отмечено выше, неврологические расстройства сопровождаются увеличением концентрации внеклеточной ДНК именно за счет ее низкомолекулярной фракции [1, 3]. В связи с этим представляло интерес сравнить фракционный состав ДНК плазмы крови у новорожденных в норме и при ПП ЦНС. Предварительные результаты показали, что у здоровых детей ДНК плазмы представлена высокомолекулярной фракцией (> 21 тыс. п.н.), тогда как у новорожденных с ПП ЦНС наряду с высокомолекулярными фрагментами она содержит большое количество более мелких фрагментов (3–5 тыс. п. н.) (рис. 2).

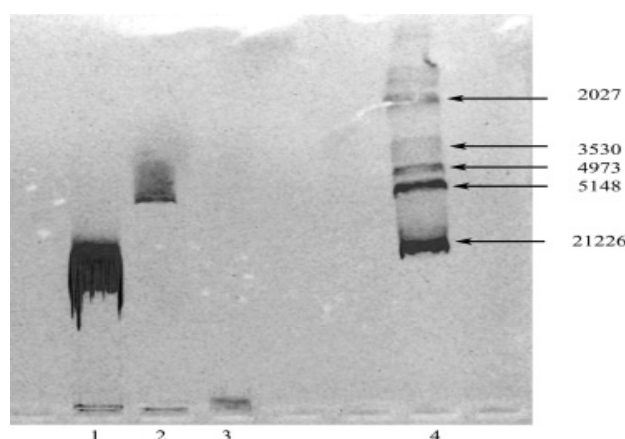


Рис. 2. Электрофорез внеклеточной ДНК в 0.7%-ном агарозном геле: 1 – ДНК фага λ , 2 – ДНК плазмы крови новорожденных с ПП ЦНС, 3 – ДНК плазмы крови здоровых детей, 4 – ДНК фага λ , фрагментированная рестриктазами Hind III и EcoR I

Появление низкомолекулярной фракции может быть связано с повреждением клеток мозга в результате процесса программированной клеточной гибели (апоптоза), усиление которого, предположительно, происходит во время гипоксических состояний. При этом апоптотические продукты выходят в кровоток и элиминируются фагоцитирующими клетками иммунной системы [12]. Не исключено, что увеличение содержания ДНК в кровотоке новорожденных связано с неспособностью фагоцитарного звена их иммунной системы осуществлять клиренс апоптотических продуктов в полной мере [13, с. 735–736].

Результаты исследования показывают, что повышение внеклеточной ДНК хотя и не может считаться критерием для дифференциальной диагностики ПП ЦНС, так как встречается при многих патологических состояниях, однако может являться дополнительным прогностическим критерием для оценки тяжести состояния новорожденных детей группы риска. Кроме того, появление низкомолекулярной фракции в составе внеклеточной ДНК позволяет предположить, что увеличение ее концентрации при ПП ЦНС происходит именно за счет низкомолекулярной фракции и свидетельствует о возможной активации апоптоза нервной ткани при ПП ЦНС.

Summary

N.O. Tuaeва, V.G. Vinter, V.V. Sofronov, V.A. Emikeeva. Quantification and fraction composition of free-cell DNA in newborn babies with perinatal CNS damages.

It was shown the newborn children blood plasma has significant increased DNA concentrations in case of central nervous system (CNS) damages. A fraction was found which contains short-cut DNA molecular fragments (about 2–5 thousand nucleotide pairs) in blood plasma of babies with CNS damages in comparison with healthy children (about 21 t.n.p.). An origin of such a DNA is not yet clear, although it may be the apoptosis of the nervous system cells.

Литература

1. Вознюк И.А., Одинак М.М., Васильева И.Н., Плужников Н.Н., Кузнецов А.Н. Внеклеточная низкомолекулярная фракция ДНК – маркер острого нейронального повреждения при инсульте // Современные подходы к диагностике и лечению нерв-

- ных и психических заболеваний. Материалы юбил. конф., посвящ. 140-летию кафедры нервных и душевных болезней. 14–16 июня 2000 г. – С.-Пб., 2000. – С. 358.
2. Ганнушкина И.В., Фараго М.Л., Антелава И.Н., Баранчикова М.В., Вейко Н.Н. Гемодинамический эффект плазмы крови // Вестник РАМН. – № 15. – С. 16–22.
 3. Ганнушкина И.В., Фараго М.Л., Карпунин А.В., Вейко Н.Н., Джигладзе Д.Н., Завалишин И.А. Уровень ДНК в плазме крови больных с атеросклеротическим поражением магистральных артерий головы и боковым амниотрофическим склерозом // Бюлл. Эксп. Биол. – 1997. – № 12. – С. 610–612.
 4. Lam N.Y.L., Rainer T.H., Chan L.Y.S., Joynt G.M., Lo D.Y.M. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients // Clin. Chemistry. – 2003. – V. 49. – P. 1286–1291.
 5. Lo D.Y.M., Rainer T.H., Chan L.Y.S., Hjelm N.M., Cocks R.A. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients // Clin. Chemistry. – 2000. – V. 46, No 3. – P. 319–323.
 6. Левитина Е.В. Состояние мембранодестабилизирующих процессов при перинатальном поражении нервной системы у детей // Ж. неврологии и психиатрии. – 2002. – № 5. – С. 45–48.
 7. Вдовиченко К.К., Маркова С.И., Цветкова И.А., Белохвостов А.С. Особенности выявления мутантной формы гена K-ras в плазме крови при некоторых типах онкологических заболеваний // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 71–75.
 8. Херрингтон С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
 9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
 10. Владимиров В.Г., Васильева И.Н., Шарова Л.А. Внеклеточная ДНК и ее значение для современной медицины // Клиническая медицина и патофизиология. – 1998. – № 1–2. – С. 112–119.
 11. Schneider T., Kurreck B., Markert-Hahr C., Block D., Kleiber J., Stockinger H. Isolation and specific enrichment procedure for serum or plasma derived DNA with MagNA pure // Abstr. for CNAPS III. Part I, DNA, Sect. A-Cancer. – 2003. – P. 1.
 12. Lorenz H-M., Herrmann M., Winkler T., Gaipf U., Kalden J.R. Role of apoptosis in autoimmunity // Apoptosis. – 2000. – V. 5. – P. 443–449.
 13. Мазурин А.В., Воронцов И.М. Пропедевтика детских болезней. – С.-Пб.: Фолиант, 2001. – 928 с.

Поступила в редакцию
19.06.05

Туаева Наталья Олеговна – младший научный сотрудник кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: Natalya.Tuaeva@ksu.ru

Винтер Виктор Георгиевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: Victor.Vinter@ksu.ru

Софронов Валерий Викторович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой детских болезней Казанского государственного медицинского университета.

E-mail: Vssofrov@mail.ru

Емикеева Венера Алексеевна – врач-неонатолог родильного отделения городской больницы № 4 г. Казани.