

Курбанов Р.А., Абрамова З.И., Туаева Н.О.*, Цибулькина В.Н.**, Аддисон Д.*

Татарский государственный гуманитарно-педагогический университет,

* Казанский государственный университет,

** Казанский государственный медицинский университет

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК СЫВОРОТКИ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Изучена взаимосвязь концентрации внеклеточной ДНК (внкДНК) сыворотки крови детей с атопической бронхиальной астмой (АБА) с возрастом, полом, степенью тяжести АБА, сезонностью и уровнем содержания аутоантител (ААТ) к нативной ДНК (нДНК). Выявленная статистически значимая связь между концентрацией внкДНК и содержанием ААТ к нДНК, усиливающаяся по мере прогрессирования АБА, указывает на ДНК-зависимый характер иммунного ответа при АБА.

Введение

Атопическая бронхиальная астма (АБА) является заболеванием, в патогенезе которого нельзя исключить нарушение аутоиммунных механизмов, особенно при тяжелом течении [16], т.к. в развитие данного заболевания вовлечены элементы, регулирующие иммунный ответ при аутоиммунной патологии: тучные клетки, Т-лимфоциты, а также АТ к ДНК. Высокий уровень внеклеточной ДНК (внкДНК) в крови может являться одной из причин индукции ДНК-гидролизующих антител – маркеров аутоиммунного заболевания [7, 15]. Поэтому важно установить, на каком этапе развития АБА разворачиваются аутоиммунные процессы и что является предпосылкой для их активации: физиологические особенности, возраст, сезон или тяжесть болезни? Целью данной работы явился количественный анализ внкДНК сыворотки крови детей с АБА во взаимосвязи с указанными параметрами.

Материалы и методы

Обследована группа детей (140 человек) из аллергологического отделения Детской республиканской клинической больницы (ДРКБ) г. Казани с диагнозом «атопическая бронхиальная астма» (АБА) в возрасте 7–17 лет. Контрольную группу составили 18 относительно здоровых детей 15–17 лет.

Длину фрагментов внкДНК определяли с помощью электрофореза внкДНК, выделенной из суммарного пула образцов сыворотки крови детей с АБА (10 мл) фенольным методом [6]. Электрофорез проводили в 0,7% агарозном геле, при силе тока 5 мА/см в течение 1–1,5 ч. [4].

Количество внкДНК анализировали методом флуориметрии с ДНК-зондом Hoechst 33342 («Aldrich», USA) [10]. Концентрацию внкДНК в образцах определяли по калибровочной кривой (серия стандартных разведений ДНК эритроцитов цыплят («Reanal», Венгрия) с концентрациями от 350 до 5 нг ДНК на 1 мл).

Полученные данные характеризовали при помощи коэффициента асимметрии (As) и эксцесса (Ex). Так как выборочные As и Ex превышали критические значения параметрического распределения, для описания выборок использовали структурные характеристики – медиану (Me) и перцентили, а для оценки различий между группами применяли непараметрические критерии Крускала - Уоллиса и Т-критерий Манна - Уитни [1]. Данные представлены как Me и интерперцентильный размах. Связь между параметрами оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена [1].

Результаты и обсуждение

Одной из важных характеристик внкДНК является длина ее фрагментов. Для большинства описанных в литературе заболеваний наряду с увеличением общего количества внкДНК сыворотки характерно изменение соотношения фракций высоко- и низкомолекулярной внкДНК [8, 9].

Для исследования размера внкДНК в сыворотке больных с АБА и относительно здоровых доноров использовали суммарный пул: 36 образцов по 100 мкл и 18 образцов по 200 мкл соответственно. Из электрофореграммы (рис. 1) следует, что у здоровых детей внкДНК сыворотки представлена высокомолекулярной фракцией (>21 т.п.н.), тогда как при патологии наряду с высокомолекуляр-

ными фрагментами присутствует низкомолекулярная фракция (1–5 т.п.н.).

Достоверных различий концентрации внкДНК между девочками ($Me = 7,4$ мкг/мл; 25-й-перцентиль = 3,2 мкг/мл; 75-й-перцентиль = 15,7 мкг/мл) и мальчиками ($Me = 6,2$ мкг/мл; 25-й-перцентиль = 3,6 мкг/мл; 75-й-перцентиль = 12,1 мкг/мл) общей выборки обнаружено не было. Поэтому мы изучили половой диморфизм по концентрации внкДНК общей выборки в зависимости от тяжести астмы (табл. 1). Количество внкДНК (по Me) между девочками и мальчиками отличалось при легком, средней степени тяжести и при тяжелом течении заболевания. Однако различия были значимыми при средней степени тяжести и при тяжелом течении АБА. Причем при средней степени тяжести концентрация внкДНК выше у мальчиков, в то время как при тяжелом течении АБА она значительно выше у девочек.

Связано ли изменение концентрации внкДНК сыворотки крови детей только с прогрессированием астмы или имеет значение физиологическое состояние в критические возрастные периоды? По данным литературы [3], у детей с АБА разных возрастных групп комплекс изменений биохимических показателей и степень выраженности этих изменений отличаются от нормативных в соответствующих возрастных группах. Поэтому нами изучены изменения концентрации внкДНК сыворотки 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). Сравнение данных (табл. 2) показало, что возрастные особенности, по-видимому, не влияют на концентрацию внкДНК, так как различий между показателями в соответствующие возрастные периоды не наблюдалось.

На рис. 2 представлены результаты количественного анализа внкДНК сыворотки крови детей с АБА критических возрастных периодов в зависимости от степени тяжести заболевания.

Полученные данные говорят о достоверных различиях концентрации внкДНК сыворотки крови только у детей пубертатного периода. Причем у девочек концентрация

внкДНК сыворотки при тяжелом течении заболевания достоверно выше ($p = 0,05$), тогда как у мальчиков она оказалась значительно ниже ($p = 0,05$). Возможно, это обстоятельство может объяснить тот факт, что у мальчиков в пубертатном периоде часто наблюдается не только ремиссия заболевания, но и полное исчезновение симптомов астмы [2].

Используя корреляционный анализ, мы проследили изменения концентрации внкДНК в общей группе детей с АБА в зависимости от возраста, половой принадлежности, времени обследования (сезон течения

Таблица 1. Половой диморфизм по концентрации внкДНК в зависимости от тяжести АБА

Степень тяжести АБА	Количество (n)		Конц. внкДНК (Me)		Уровень значимости 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

Таблица 2. Сравнение концентраций внкДНК (Me) в сыворотке детей в препубертатный и пубертатный периоды

Возрастные периоды \ пол	□	□	Уровень значимости p
	□	□	
Препубертатный	5,12	9,73	0,39
Пубертатный	7,49	6,17	0,58
Уровень значимости p	0,21	0,65	

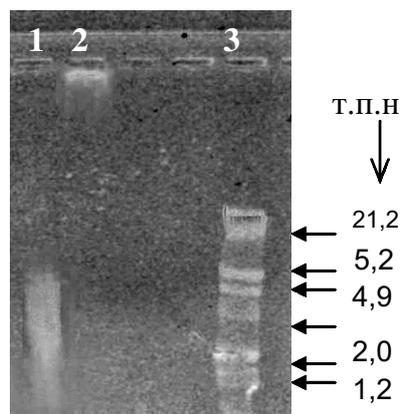


Рисунок 1. Длина фрагментов внкДНК сыворотки крови детей с АБА (1) и у относительно здоровых доноров (2). (3) – ДНК фага λ , фрагментированная рестриктазами $Hind III$ и $EcoR$.

Таблица 3. Зависимость концентрации внкДНК в сыворотке крови от пола (А), возраста больных (Б), времени обследования (В), тяжести АБА (Г)

	А	Б	В	Г
Количество больных (n)	140	140	140	140
Коэффициент корреляции (r _s)	-0,01	0,07	0,19	-0,06
Уровень значимости (p)	0,88	0,42	0,19	0,45

болезни) и от степени тяжести АБА. Установлено, что концентрация внкДНК сыворотки крови детей, больных АБА, не зависит от перечисленных выше факторов (табл. 3). Однако нами была обнаружена прямая корреляция ($p < 0,001$) между концентрацией внкДНК и уровнем ААТ к нДНК в общей группе (рис. 3а).

При исследовании аналогичной корреляции в зависимости от тяжести АБА получены следующие данные (рис. 3: б, в, г). При легкой форме АБА корреляции между

концентрацией внкДНК и уровнем ААТ к нДНК не наблюдается ($p = 0,09$). При средней степени тяжести выявлена достоверная прямая корреляция между данными показателями ($p = 0,02$). При тяжелом персистирующем течении АБА положительная корреляция приобретает еще более высокую значимость ($p = 0,005$). Таким образом, прослеживается тенденция роста сопряженности связи между концентрацией внкДНК и уровнем ААТ к нДНК по мере прогрессирования АБА.

Методом ИФА нами было показано (результаты не приведены), что содержание ААТ к нДНК достоверно нарастает по мере прогрессирования АБА. Выявленная в настоящей работе взаимосвязь между уровнем ААТ к нДНК и концентрацией внкДНК позволяет предположить ДНК-зависимый характер иммунного ответа при АБА. Более выраженная зависимость при тяжелой фор-

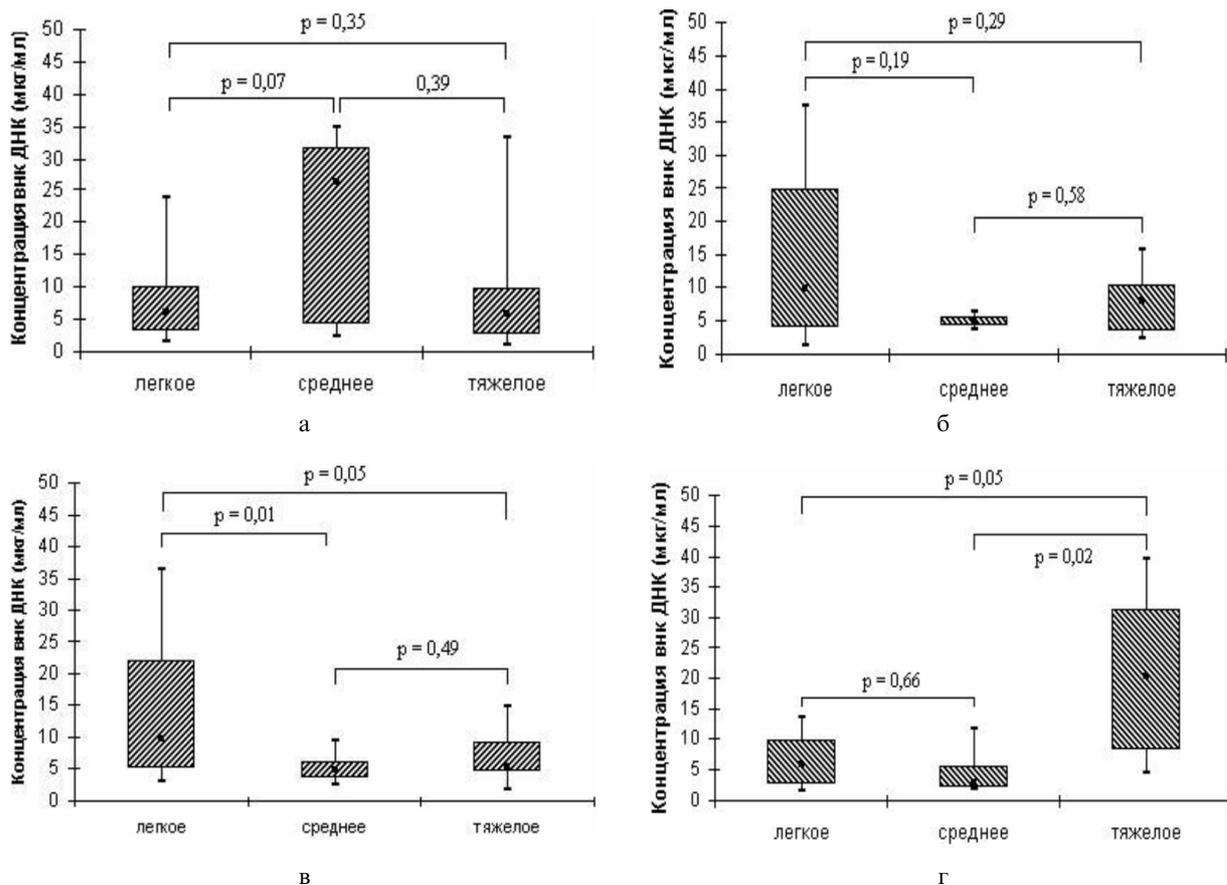


Рисунок 2. Изменение концентрации внкДНК в сыворотке детей с АБА в критические возрастные периоды (пояснения в тексте): А, Б – мальчики, В, Г – девочки.

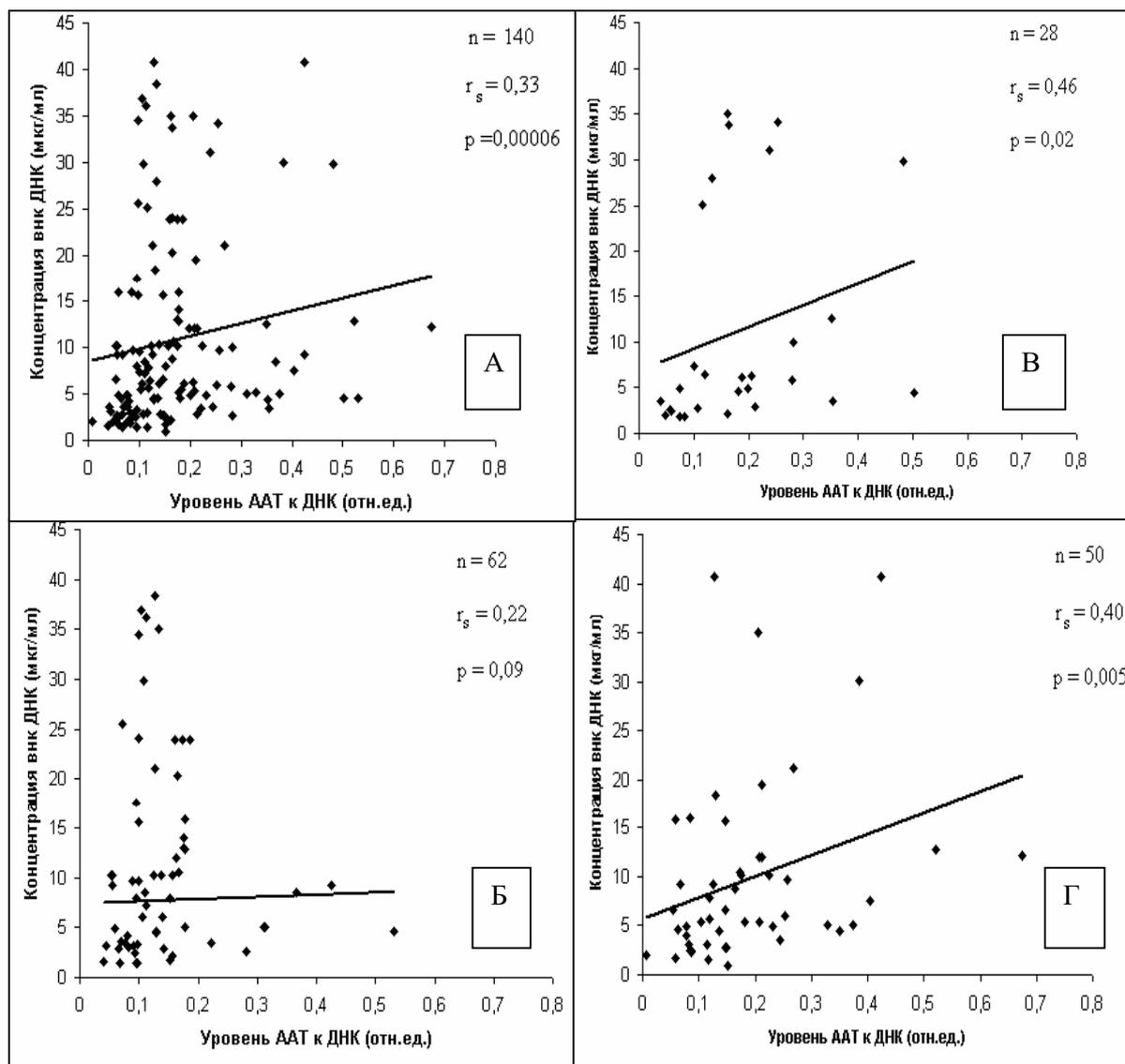


Рисунок 3. Зависимость уровня ААТ к нДНК от концентрации внкДНК: А – в общей группе больных; Б – при легком течении АБА; В – при АБА средней степени тяжести; Г – при тяжелом течении АБА.

ме АБА соответствует и более высоким уровням ААТ к нДНК при тяжелой степени АБА. На антиген-зависимый характер образования ААТ к нДНК указывают и данные литературы [5, 11–14]. Таким образом,

результаты, приведенные выше, подтверждают наличие элементов аутоиммунной патологии при среднетяжелом и тяжелом течении персистирующей атопической бронхиальной астмы.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИОКР РТ (грант №03-3.1-175 / 2005).

Список использованной литературы:

1. Акберова Н.И. Сравнение данных. Непараметрические критерии значимости. Казань, КГУ, 2004. 50 с.
2. Астафьева Н.Г. Бронхиальная астма у подростков. Аллергология. (2): 41-49. 2005.
3. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. М., Наука, 1990. 224 с.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984. 480 с.
5. Сучков С.В., Наумова Т.Е., Третьяк Е.Б. 2004. Молекулярные основы патогенности ДНК-связывающих аутоантител. Иммунология. (2): 115-119.
6. Херрингтон С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М., Мир, 1999. 558 с.

7. Шевчук Н.А. 2001. Времяразрешенный иммунофлуоресцентный анализ на ДНК и исследование содержания ДНК в сыворотке человека. Вопросы медицинской химии. 47 (4): 2-5.
8. Anker P., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. 2001. Circulating nucleic acids in plasma or serum. Clin. Chem. Acta. 313:143-146.
9. Bianchi D.W. 2004. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. Placenta. Suppl A: 93-101.
10. De Barro P.J., Sherratt, T.N., Brookes, C.P. 1995. Spatial and temporal variation in British field populations of the grain aphid *Sitobion avenae* (F.) (Homoptera Aphididae) studied using RAPD-PCR. Proc. Roy. Soc., London. 262: 321-327.
11. Huck S., Deveaud E., Namane A. 1999. Abnormal DNA methylation and deoxycytosine-deoxyguanine content in nucleosomes from lymphocytes undergoing apoptosis. FASEB J. 13: 1415-1422.
12. Kramers C., Hylkema M.N., van Bruggen M.C. 1994. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. J.Clin Invest. 94: 568-77.
13. Kubota T., Watanabe N., Kaneko T. 2001. Activation of autoreactive T cells that help nucleobindin-injected mice produce anti-DNA antibodies. Immunol.Lett. 75: 111-115.
14. Mohan C., Liu F., Xie C. 2001. Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their first-degree relatives. Clin.Exp.Immunol. 123: 119-126.
15. Pisetsky D.S. 2001. Immune response to DNA in systemic lupus erythematosus. Isr.Med.Assoc.J. 3: 850-853.
16. Rottem M, Shoenfeld Y. 2003. Asthma as a paradigm for autoimmune disease. Int.Arch.Allergy Immunol. 132: 210-214.

Статья поступила в редакцию 14.04.07