

ТУАЕВА НАТАЛЬЯ ОЛЕГОВНА

**ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК И ЕЕ УЧАСТИЕ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ У
НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2007

Работа выполнена в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Казанского государственного университета имени В.И. Ульянова-Ленина.

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Винтер Виктор Георгиевич
доктор биологических наук
Абрамова Зинаида Ивановна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор,
академик АН РТ
Зубаиров Дилявер Мирзабдуллоевич

доктор ветеринарных наук, профессор
Фаизов Тагир Хадиевич

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии РАН
им. В.А. Энгельгардта, г. Москва

Защита состоится 22 февраля 2007 года в « 13⁰⁰ » часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан 19 января 2007 года.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Абрамова З.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В современной биологической науке важное место отводится изучению молекул, участвующих в межклеточных коммуникациях. Одними из таких молекул может являться внеклеточная ДНК (вкДНК). По некоторым данным, вкДНК может осуществлять передачу генетических функций «по горизонтали» (Adams, 1985; Владимиров, 1998), выполнять метаболическую функцию как предшественник коферментов и кофакторов (Беседнова, 1999), стимулировать иммунный ответ (Pisetsky, 2001; Krieg, 2002) и обеспечивать оптимальные условия гемодинамики (Ганнушкина, 1998). Существуют убедительные доказательства участия вкДНК в патогенезе аутоиммунных заболеваний у взрослых лиц (Wiktorowich, 1987; Lorenz, 2000). Однако данные, представленные в источниках литературы немногочисленны, нуждаются в дополнениях и систематизации.

Ведутся исследования по использованию вкДНК плазмы крови в качестве прогностического и диагностического критерия при онкологических (Anker, 2001; Gonzalez, 2000; Esteller, 2001; Bremnes, 2005), неврологических (Ганнушкина, 1998; Вознюк, 2000; Rainer, 2003; Holdenrieder, 2005), аутоиммунных (Tan, 1996; Herrmann, 1998; Nezhlin, 1999) заболеваниях, при выявлении генетически детерминированных патологий плода (Parasavva, 2005) и мониторинге беременности у женщин группы риска по преэклампсии (Zhou, 2005; Farina, 2005). Возможность использования вкДНК в медицине обусловлена изменениями ее концентрации, изменениями в структуре и размерах молекул вкДНК плазмы крови, появлением различных мутаций.

Необходимо отметить, что количественная и качественная характеристики вкДНК остаются практически не изученными у детей. В доступных нам источниках литературы обнаружена одна работа (Wu, 2002), в которой затрагивается вопрос возрастной динамики концентрации вкДНК плазмы крови, и две работы, в которых рассматривается половой диморфизм данного параметра (Wu, 2002; Jung, 2004). Исследований, касающихся вкДНК в плазме крови новорожденных, обнаружить не удалось.

Пренатальный и неонатальный периоды характеризуются высокой скоростью преобразования различных органов и систем. Даже при благоприятных обстоятельствах рождения и периода адаптации организм ребенка испытывает метаболический стресс (Володин, 1999). Несмотря на высокие репаративные возможности организма в раннем постнатальном онтогенезе, многие патологические процессы новорожденных оставляют глубокий след и проявляются в последующие возрастные этапы. Осложнения, возникающие в перинатальном периоде, могут приводить к широкому спектру последствий – от легкой задержки психомоторного развития, до детского церебрального паралича или летального исхода. При этом отмечается, что иногда незначительные на первый взгляд отклонения, как, например, легкая асфиксия или недоношенность, могут сказаться в будущем более серьезными нарушениями, чем более грубые, например, родовая травма (Ратнер, 1995). Это

определяет необходимость поиска новых, «скрытых» маркеров повреждения нервной и иммунной систем в раннем неонатальном периоде. Не исключено, что количественные и структурные особенности вкДНК отражают изменения, происходящие в организме новорожденного при перинатальной патологии.

Таким образом, разносторонняя характеристика вкДНК (ее количество, размер, происхождение) у новорожденных детей в норме и при патологии может иметь как фундаментальное, так и практическое значение для медико-биологической науки, обеспечивая теоретическую и методологическую основу для нового подхода к ранней диагностике нарушений иммунитета.

Цель исследования

Целью настоящей работы явилась характеристика внеклеточной ДНК плазмы крови как участника иммунного ответа у новорожденных детей в раннем неонатальном периоде.

Задачи

В соответствии с основной целью исследования были поставлены следующие задачи:

- Провести сравнительный количественный анализ вкДНК плазмы крови у новорожденных детей в норме и при перинатальной патологии.
- Исследовать содержание апоптотических и активированных клеток в популяции лимфоцитов периферической крови во взаимосвязи с концентрацией вкДНК, для подтверждения возможности лимфоцитарного происхождения вкДНК.
- Охарактеризовать вкДНК плазмы крови новорожденных детей по размеру молекул и по содержанию некоторых мобильных генетических элементов (МГЭ), относящихся к семействам LINE1 и Alu, в норме и при перинатальной патологии.
- Определить уровень содержания антител (АТ) к нативной и денатурированной ДНК (нДНК и дДНК) у новорожденных детей в норме и при перинатальной патологии и провести корреляционный анализ между концентрацией вкДНК и содержанием АТ к н- и дДНК для выявления возможного участия вкДНК в иммунном ответе.

Научная новизна

Впервые изучены концентрация вкДНК плазмы крови и содержание АТ, реагирующих с нативной и денатурированной ДНК у новорожденных детей.

Выяснено, что перинатальная патология сопровождается нарушением апоптоза лимфоцитов в сторону его усиления. На основании анализа корреляционной связи между содержанием апоптотических / активированных лимфоцитов и концентрацией вкДНК установлено, что вкДНК плазмы крови новорожденных детей может происходить как из апоптотических, так и из активированных клеток, циркулирующих непосредственно в периферической крови.

Показано, что в случаях патологии вкДНК представлена, в основном, фрагментами низкой молекулярной массы, содержит LINE-элементы и инвертированные Alu-повторы.

Обнаружена взаимосвязь концентрации вкДНК и содержания АТ к обоим типам ДНК при некоторых заболеваниях в неонатальном периоде. Выявленная взаимосвязь носит разнонаправленный характер в зависимости от типа патологии и гестационного возраста ребенка, что может иметь существенное значение для ранней, доклинической диагностики и прогноза нарушений иммунитета в раннем неонатальном периоде и последующих возрастных этапах. В случае положительной связи предполагается наличие аутоиммунного ответа на вкДНК уже в раннем неонатальном периоде.

Научно-практическая значимость работы

Разработана теоретическая и методологическая база для нового подхода в доклинической диагностике патологии иммунной системы на основе анализа нарушения апоптоза иммунокомпетентных клеток у новорожденных детей. Результаты работы в дальнейшем могут быть использованы в медицине (иммунологии и педиатрии) для оценки состояния новорожденных и прогнозирования развития иммунологических осложнений.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование

Работа в течение 2001 – 2005 гг. выполнялась в соответствии с планом НИР Казанского государственного университета (№ гос. регистрации 01.200300073), с 2006 по 2010 гг. проводится в соответствии с планом НИР № 01.200609657. Исследования поддержаны грантом НИОКР АН РТ (03-3.3-76/2006Г). Научные положения диссертации и выводы базируются на собственных результатах исследований автора. Изучение состояния популяции лимфоцитов выполнялось на базе каф. детских болезней КГМУ, совместно с иммунологической лабораторией РЦПБ СПИД.

Положения, выносимые на защиту

1. Концентрация вкДНК у недоношенных новорожденных детей и у новорожденных с перинатальной патологией повышена по сравнению с данным показателем в контрольной группе.
2. ВкДНК плазмы крови происходит из активированных и апоптотических лимфоцитов.
3. ВкДНК плазмы крови новорожденных детей в норме представлена высокомолекулярными фрагментами ДНК, а при патологии – фрагментами деградированной ДНК. В составе последовательностей вкДНК содержатся МГЭ, относящиеся к семействам LINE1 и Alu, содержание которых различно в норме и при патологии.
4. Между концентрацией вкДНК и уровнем содержания АТ к ДНК существует взаимозависимость, свидетельствующая о возможности влияния вкДНК на уровень содержания АТ.

Апробация работы

Основные результаты исследований докладывались на ежегодных научно-практических конференциях Казанского государственного университета (2004 – 2006 гг.), на ежегодной региональной конференции «Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе» (Казань, 22 – 23 ноября 2005 и 2006 г.г.); на Научно-практической конференции молодых ученых (КГМА, Казань, 2006); на международном конгрессе "Иммунитет и болезни: от теории к терапии" (Москва, 3-8 октября 2005); на международных конференциях: «Дни науки 2005» (Днепропетровск, 2005), «Circulating Nucleic Acids in Plasma or Serum - IV» (London, UK, 2005) и «BioScience 2006 - bioscience for the 21st century», (23 - 27 July, Glasgow, UK, 2006).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 работы в центральных изданиях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 153 страницах машинописного текста, включает 19 рисунков и 16 таблиц; состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы, включающего 235 ссылок, из которых 91 на отечественные, 144 на зарубежные работы.

Благодарности за помощь в работе

Данная работа посвящается научному руководителю, доктору биологических наук, профессору В.Г. Винтеру. Автор выражает искреннюю благодарность за всестороннюю помощь в работе научному руководителю д.б.н. Абрамовой З.И., зав. кафедрой биохимии, проф. Ишмухаметовой Д.Г., инженеру каф. биохимии Гаврилову В.С., зав. кафедрой детских болезней КГМУ, проф. Софронову В.В., зав. каф. биохимии КГМУ, д.м.н. Мустафину И.Г., зав. отделением патологии новорожденных городской клинической больницы № 4 Емикеевой В.А., а так же всему коллективу кафедры биохимии Казанского государственного университета и коллективу лаборатории КЛД Федерального научно - клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии г. Москвы и лично д.м.н., проф. Белохвостову А.С. за помощь в освоении методов ПЦР и в организации ПЦР-лаборатории.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовались образцы плазмы и лимфоциты периферической крови новорожденных детей ($n = 277$) и их матерей, полученные в период с 2003 по 2006 годы. Контингент новорожденных детей был представлен доношенными и недоношенными новорожденными различных сроков гестации (табл. 1).

Таблица 1. Группы новорожденных, взятые в исследование в зависимости от гестационного возраста

| Группа | Гестационный возраст | Масса тела (г) | n |
|--------------------------|----------------------|----------------|-----|
| Доношенные | 38 – 40 недель | 2550 – 4700 | 110 |
| Недоношенные I степени | 35 – 37 недель | 2145 – 2960 | 54 |
| Недоношенные II степени | 32 – 34 недели | 1560 – 2220 | 59 |
| Недоношенные III степени | < 31 недели | 980 – 1800 | 53 |

Перинатальная патология у доношенных и недоношенных новорожденных детей была представлена заболеваниями: внутриутробная инфекция (ВУИ), перинатальная патология ЦНС (ПП ЦНС), задержка внутриутробного развития (ЗВУР), респираторный дистресс-синдром (РДС), проявляющийся в виде пневмопатии (Табл. 2).

Таблица 2. Характеристика подгрупп новорожденных, взятых в исследование

| Группа | Подгруппа | Масса тела | n |
|--------------------------|------------------------|-------------|----|
| Доношенные | ПП ЦНС | 2550 – 4700 | 31 |
| | ВУИ | | 9 |
| | ЗВУР | | 14 |
| | РДС | | 10 |
| Недоношенные I степени | ПП ЦНС | 2145 – 2960 | 21 |
| | ВУИ | | 8 |
| | ЗВУР | | 13 |
| | РДС | | 14 |
| | Без тяжелых осложнений | | 9 |
| Недоношенные II степени | ПП ЦНС | 1560 – 2220 | 8 |
| | ВУИ | | 10 |
| | ЗВУР | | 16 |
| | РДС | | 20 |
| | Без тяжелых осложнений | | 5 |
| Недоношенные III степени | ПП ЦНС | 980 – 1800 | 11 |
| | ВУИ | | 16 |
| | ЗВУР | | 17 |
| | РДС | | 13 |
| | Без тяжелых осложнений | | 6 |

Контрольную группу составили доношенные новорожденные дети ($n = 26$), без патологии, с массой тела при рождении 3000 – 3880 г, с оценкой по шкале Апгар 8 – 10 баллов.

Кровь в объеме 1 мл брали с помощью катетера, самотеком из локтевой вены в вакуумные пробирки с напыленной ЭДТА- Na₂. Кровь центрифугировали при 4⁰С последовательно при 1,5 тыс. оборотов в минуту (об/мин) – 10 минут, при 3 тыс. об/мин - 15 минут, при 5 тыс. об/мин – 15 минут.

Определение концентрации вкДНК. Плазму крови депротеинизировали по стандартной методике (Маниатис, 1984), с использованием протеиназы К («Serva», Германия), фенола и хлороформа. Концентрацию вкДНК в депротеинизированных образцах определяли спектрофлуориметрическим методом с использованием интеркалирующего красителя Hoechst 33342 («Sigma», Германия) на люминесцентном спектрофотометре MPF-4 («Hitachi», Япония).

Исследование состояния популяции лимфоцитов периферической крови новорожденных детей. Согласно методике цитофотометрии (Olson, 1974; Козинец, 1986), готовили мазки периферической крови, фиксировали клетки метанолом, окрашивали по Фельгену и определяли площадь ядра, плотность упаковки хроматина и уровень содержания ДНК в ядре клетки с помощью микроскопа «Люмам ПМ-11», соединенного через интерфейс И2 с ПК. Измерения проводили в проходящем свете с фильтром ЗЕ11-3 (с полосой пропускания 480 – 560 нм) и объективом МИ-90. Использовали следующие параметры измерения: размер зонда – 0,05 мм с проекцией на объект - 0,56 мкм и шаг сканирования – 0,5 мкм в гомогенном режиме. Полученные данные подвергали математическому анализу для определения процента клеток с морфологическими проявлениями апоптоза (сжатое ядро, конденсированный хроматин и сниженное содержание ДНК в ядре) и активированных лимфоцитов (увеличенное ядро и повышенное содержание ДНК в ядре).

Результаты были дополнены методом проточной цитометрии с использованием пропидиума йодида на цитофлуориметре FacsCalibur («Becton Dickinson», США). Данным методом определяли процент гиподиплоидных (апоптотических), диплоидных и тетраплоидных (пролиферирующих) лимфоцитов.

Размер фрагментов вкДНК определяли по электрофоретической подвижности фрагментов вкДНК, выделенных из суммарного пула образцов плазмы крови новорожденных детей в норме (5 мл) и при патологии неонатального периода (5 мл) в 0,7% агарозном геле.

Наличие МГЭ в плазме крови определяли методом ПЦР с помощью праймеров:

- На 3'-концевой участок LINE: 5'-ctgaatgggttccttcag-3' и 5'-gaattaacccttgaccctag-3';
- На 5'-концевой участок LINE: 5'-agaaaggtggcttcgagagg-3' и 5'-catggactctgtcctcggcg-3' (Владимиров, 2002);
- Непарный праймер Tc65 (Nelson, 1998): 5'-aagtcgcgccgcttgagccgagat-3'.

Последовательности праймеров, взятые из источников литературы, были проверены через базу данных BLAST (NCBI).

Продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле с окраской бромистым этидием. Количество амплификатов определяли денситометрией негативов с помощью компьютерной программы ScionImage 4.02.Beta.

Содержание АТ к ДНК, относящихся к классу IgG, в плазме крови новорожденных детей и их матерей оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на 96-луночных планшетах Linbro («Flow», США). В качестве стандарта использовали пул образцов плазмы крови здоровых мужчин 20 – 25 лет (25 человек), содержание АТ к ДНК у которых находилось в пределах доверительного интервала, определенного нами для данной группы. Положительным контролем при постановке анализа служила сыворотка крови женщины, страдающей системной красной волчанкой (СКВ).

Для выявления популяции АТ к нативной ДНК (нДНК), в качестве антигена (АГ) использовали коммерческий препарат нативной ДНК эритроцитов цыплят.

Для выявления популяции АТ к денатурированной ДНК (дДНК), ДНК эритроцитов денатурировали кипячением с 1xSSC (0,0015M NaCl, 0,00075M цитрат Na) и добавляли 35% формальдегид, содержащий 0,001M ЭДТА. Степень денатурации определяли по величине гиперхромного эффекта.

В ИФА использовали антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой (СН1/HRP к IgG человека, «Сорбент ЛТД», Москва). В качестве индикаторного красителя использовали ортофенилендиамин. Интенсивность цветной реакции измеряли на приборе Multiscan («Flow», Англия) при длине волны 492 нм.

Статистический анализ. В каждой выборке определяли величину асимметрии и эксцесса для оценки характера распределения данных. Так как распределение признака в большинстве выборок отличалось от нормального, для характеристики каждой выборки использовали такие показатели как медиана и перцентили (2,5; 25; 75; 97,5). Для сравнения данных применяли дисперсионный анализ, используя критерии Манна-Уитни, Ван-дер-Вардена и Краскела-Уоллиса, предусмотренные для сравнения ранжированных значений (Лакин, 1990; Акберова, 2004), с поправкой Бонферрони (Акберова, 2004) для исключения эффекта множественных сравнений. Взаимосвязь между параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (Лакин, 1990). Статистическая обработка выполнена с помощью пакета программ Excel Office 2000.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Концентрация вкДНК. На первом этапе исследования установлены нижняя и верхняя границы нормы для концентрации вкДНК плазмы крови (рис. 1) в контрольной группе относительно здоровых новорожденных детей (определены как 2,5 и 97,5 перцентили, соответственно). Индивидуальные показатели концентрации вкДНК в контрольной группе варьировали от 9,18 до 55,51 нг/мл со средним значением 22,51 нг/мл (медиана).

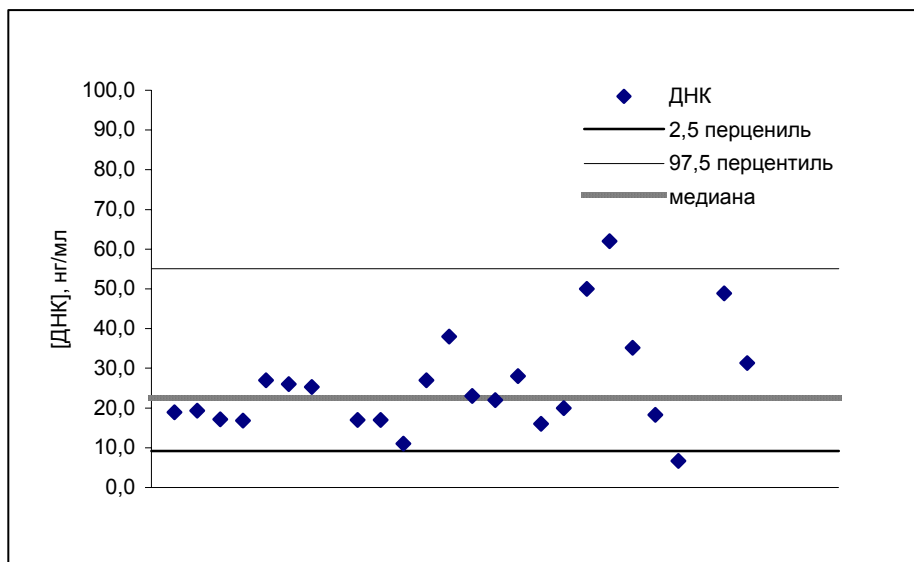


Рис. 1. Показатели концентрации вкДНК в контрольной группе (пояснения в тексте).

Проведено исследование концентрации вкДНК плазмы крови у недоношенных новорожденных детей различного гестационного возраста без тяжелых осложнений перинатального периода (рис. 2).

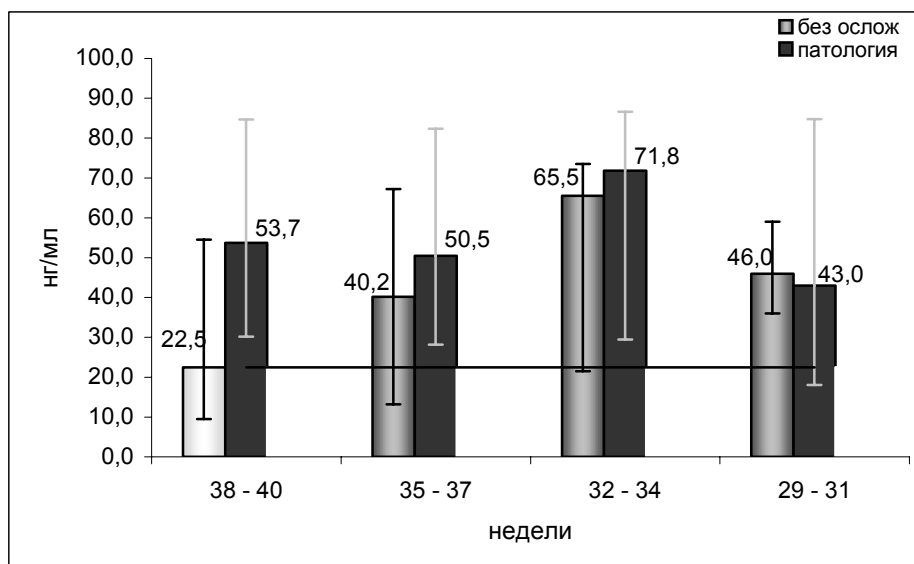


Рис. 2. Концентрация вкДНК у новорожденных детей различного гестационного возраста. Светлый столбик на гистограмме – показатель в контрольной группе. Числами обозначены средние значения (медиана).

Результаты показали, что у недоношенных детей без тяжелых осложнений и у доношенных и недоношенных детей при перинатальной патологии концентрация вкДНК повышена по сравнению с концентрацией вкДНК в контрольной группе. Максимальные показатели наблюдались у недоношенных детей 32 – 34 недели гестации (рис. 2).

При отдельном рассмотрении каждого заболевания установлено, что концентрация вкДНК во всех подгруппах детей достоверно выше, чем в контрольной группе относительно здоровых доношенных детей. Максимальные показатели концентрации вкДНК при всех исследованных заболеваниях наблюдались в гестационный период 32 – 34 недели (рис. 3). Подъем показателей концентрации вкДНК в данный гестационный период свидетельствует о том, что концентрация вкДНК плазмы крови зависит как от патологии, так и от степени недоношенности.

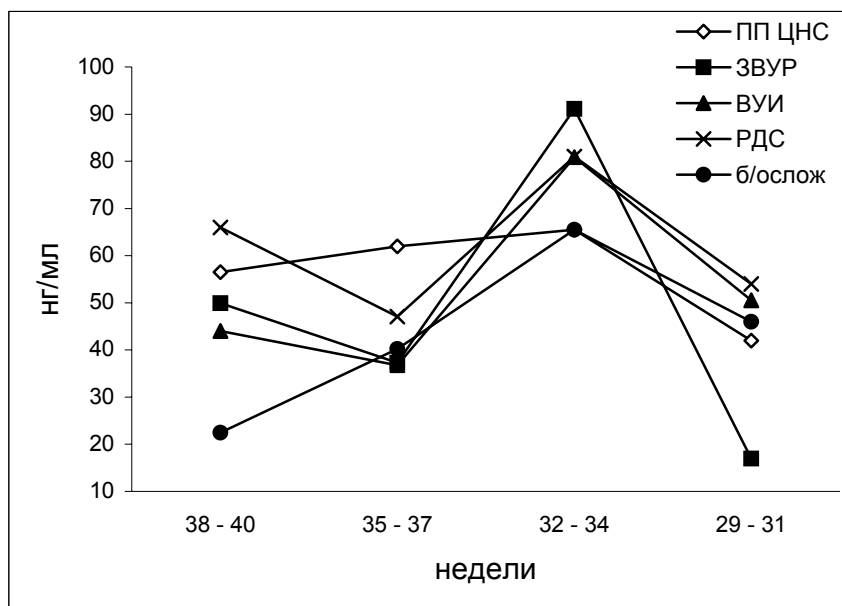


Рис. 3. Показатели концентрации вкДНК у новорожденных при различных заболеваниях.

Причины появления вкДНК в плазме крови новорожденных детей. По данным литературы, вкДНК может экскретироваться активированными лимфоцитами (Rogers et al., 1972; Янева, 1990) или являться результатом их апоптотической гибели (Stroun et al., 1987). Кроме того, лимфоцит, отражая стереотипные изменения, происходящие в клетках разных локусов организма (Нарциссов, 1986), является наиболее доступным объектом для исследования. Поэтому для решения поставленной задачи было исследовано состояние популяции лимфоцитов периферической крови детей в раннем неонатальном периоде.

Результаты исследования выявили среди популяции лимфоцитов контрольной группы в среднем 2,5 % активированных (пролиферирующих) и 2,9 % клеток с морфологическими проявлениями апоптоза (рис. 4а).

У недоношенных новорожденных всех трех гестационных периодов без тяжелых осложнений обнаружено значительное повышение доли апоптотических лимфоцитов (рис. 4а). Увеличение количества апоптотических клеток было еще более выражено при перинатальной патологии (рис. 4б) и достигало максимальных значений в гестационном периоде 32 – 34 недели.

Наряду с апоптотическими клетками, в популяции лимфоцитов периферической крови выявлены лимфоциты с признаками активации. Максимальное количество активированных лимфоцитов наблюдалось у недоношенных 32 – 34 недель гестации с патологией (рис. 4б).

Корреляционный анализ связи количества активированных, апоптотических клеток и концентрации вкДНК выявил корреляцию средней степени между активированными клетками и концентрацией вкДНК плазмы крови у доношенных новорожденных. У недоношенных детей 35 – 37 и 32 – 34 недель гестации наблюдалась прямо пропорциональная зависимость концентрации вкДНК от содержания активированных и апоптотических клеток.

У новорожденных 29 – 31 недели гестации выявлена взаимосвязь концентрации вкДНК только с апоптотическими клетками (табл. 3).

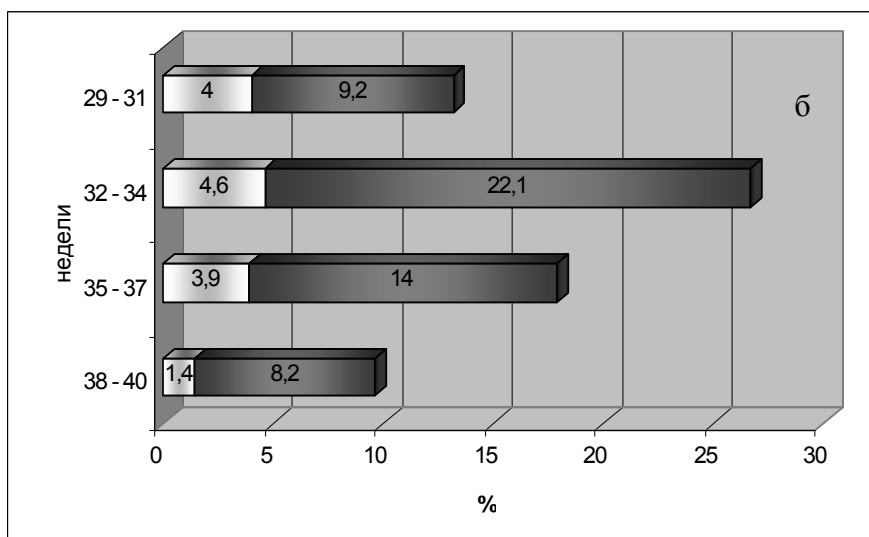
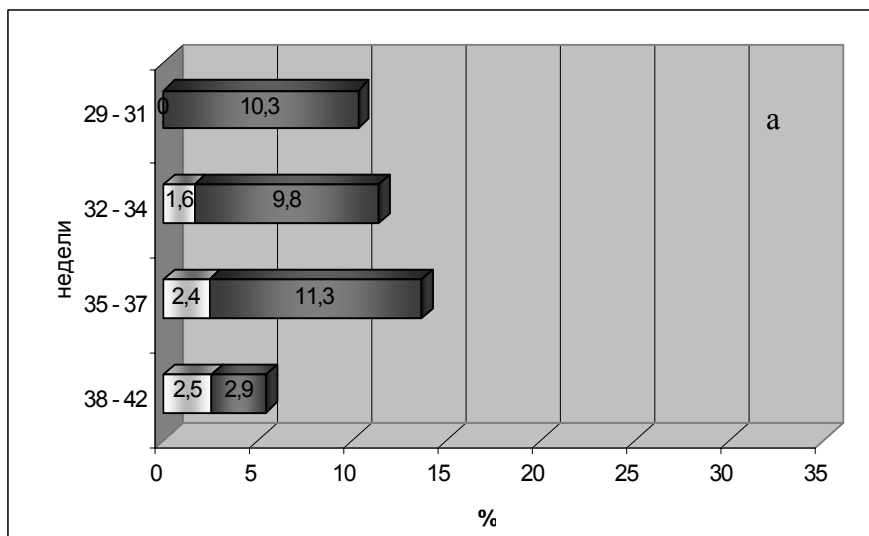


Рис. 4. Содержание апоптотических (темные столбики) и активированных (светлые столбики) клеток в популяции лимфоцитов периферической крови новорожденных детей: а – без тяжелых осложнений, б – при перинатальной патологии.

Таблица 3. Коэффициенты корреляции между показателями концентрации вкДНК и активированными (r_1)/апоптотическими (r_2) лимфоцитами

| Гестационный возраст (недели) | r_1 | r_2 |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 38 - 40 | 0,400 (P<0,05) | 0,257 (P>0,05) |
| 35 - 37 | 0,570 (P<0,05) | 0,600 (P<0,05) |
| 32 - 34 | 0,707 (P<0,01) | 0,619 (P<0,05) |
| 29 - 31 | 0,081 (P>0,05) | 0,880 (P<0,01) |

Полученные результаты показали, что недоношенность и перинатальная патология сопровождаются нарушением апоптоза в сторону его усиления, и позволили сделать вывод о том, что вкДНК в кровотоке новорожденных детей может происходить как из активированных, так и из апоптотических клеток.

Характеристика вкДНК. Существование двух различных путей появления вкДНК в кровотоке ставит вопрос о различии свойств такой ДНК. Анализ длин фрагментов вкДНК у новорожденных в норме и при патологии показал (рис. 5), что у здоровых детей вкДНК плазмы представлена высокомолекулярной фракцией (>21 т.п.н.), тогда как при патологии снижается содержание высокомолекулярной фракции и появляются низкомолекулярные фрагменты (3 - 5 т.п.н.).

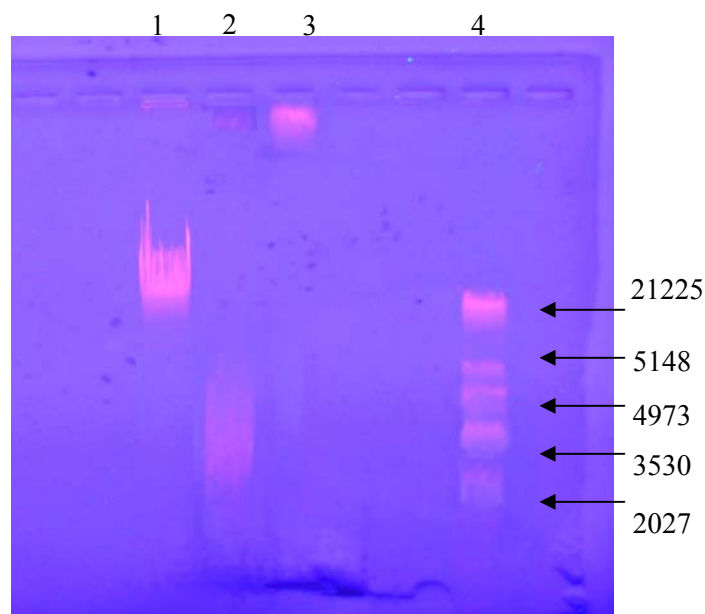


Рис. 5. Электрофореграмма подвижности фрагментов вкДНК в 0,7 % агарозном геле
 1. ДНК фага лямбда
 2. вкДНК, выделенная из плазмы крови новорожденных с патологией
 3. вкДНК, выделенная из плазмы крови здоровых детей
 4. маркер длин фрагментов ДНК – ДНК фага лямбда, фрагментированная Hind III и EcoRI

Следует отметить, что деградированная ДНК при патологии представлена более длинными фрагментами, чем апоптотическая ДНК (обычно имеющая размеры, кратные размерам ДНК нуклеосомы – 200 п.н.). В качестве рабочей гипотезы, требующей дальнейшего исследования, можно предположить, что наряду с усилением апоптоза, происходит его нарушение на этапе деградации Ca^{2+}/Mg^{2+} -зависимой нуклеазой, отвечающей за межнуклеосомную деградацию ДНК.

Особый интерес представляло наличие в плазме крови МГЭ семейства LINE1. LINE-элементы существуют в плазме крови в 2-х формах: полной и укороченной с 5'-конца (Владимиров, 2002). Длина полной формы LINE составляет более 3000 п.н., поэтому в работе амплифицировали 3' и 5'-концевые фрагменты LINE-ДНК (по 100 п.н.). О содержании полных форм LINE-элементов в плазме крови судили по выявлению 3' и 5'-концевых участков в равных пропорциях. Укороченные формы LINE-элементов определяли по преобладанию 3'-концевых участков в одном и том же образце.

В данном исследовании LINE-элементы выявлены как у относительно здоровых новорожденных детей, так и у новорожденных с патологией (рис. 6). ВкДНК относительно здоровых детей содержит полные формы LINE-элементов (т.е. амплифицировались и 3'-, и 5'-фрагменты последовательности LINE).

Увеличения относительного содержания LINE-элементов (относительно общего содержания вкДНК) у больных новорожденных по сравнению со здоровыми обнаружено не было, но изменялось соотношение полных и

укороченных форм. Так, при ПП ЦНС отмечалось наличие укороченных LINE-элементов у 66,7 % новорожденных, при РДС – у 60 %.

Абсолютное увеличение LINE-элементов может являться одной из причин усиления апоптоза лимфоцитов, за счет способности этих фрагментов ДНК проникать в клетки и вызывать запрограммированную клеточную гибель, что было показано при лучевой патологии (Владимиров, 1998). Увеличение содержания укороченных форм свидетельствует об усилении процессов неравной рекомбинации между LINE-элементами, что расценивается как показатель генетического стресса (Владимиров, 2002).

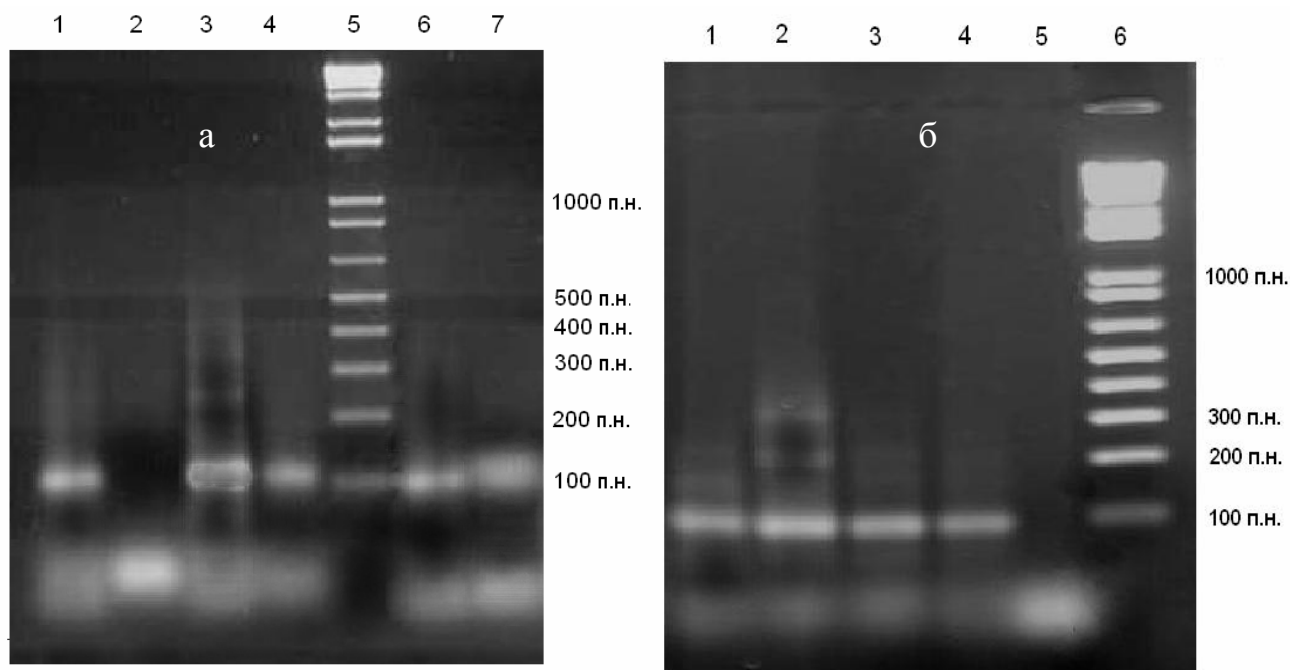


Рис. 6. Примеры полиморфизма LINE-элементов в плазме крови новорожденных детей, выявленного методом ПЦР:

- а:** 1 - 5'-концевой участок LINE у новорожденного с ПП ЦНС
 3 - 3'-концевой участок LINE у новорожденного с ПП ЦНС
 4, 6 - 5'-концевой участок LINE у новорожденного с РДС
 7 - 3'-концевой участок LINE у новорожденного с РДС
 2 – отрицательный контроль
 5 – Маркер длин фрагментов ДНК 100 – 12000 п.н. («Invitrogen», USA);
- б:** 1 - 5'-концевой участок LINE у новорожденного с ПП ЦНС
 2 - 3'-концевой участок LINE у новорожденного с ПП ЦНС
 3 - 5'-концевой участок LINE у здорового новорожденного
 4 – 3'-концевой участок LINE у здорового новорожденного
 5 – отрицательный контроль
 6 – Маркер длин фрагментов ДНК 100 – 12000 п.н. («Invitrogen», USA)

Другой тип последовательностей – инвертированные Alu-повторы (интер-Alu) были амплифицированы на матрице ДНК, выделенной из плазмы крови новорожденных детей, с помощью непарного праймера Tс65, предложенного Nelson для идентификации человеческой ДНК в гибридах человеческих лимфоцитов и клеток грызунов (Nelson, 1998).

Фрагменты вкДНК, фланкированные интер-Alu (рис. 7), амплифицировались в 30% образцов плазмы крови, взятых от относительно здоровых новорожденных и в 90% случаев – при перинатальной патологии. В том числе: при ПП ЦНС – у 30,3 %; при ЗВУР – у 100 %; при СДР – у 100 %; при ВУИ – у 50 % новорожденных.

При денситометрии негативов выявлено увеличение абсолютного количества интер-Alu в плазме крови новорожденных с патологией по сравнению с Тс65-положительными образцами плазмы относительно здоровых детей. При некоторых заболеваниях (РДС при II степени недоношенности и ВУИ) увеличение количества интер-Alu повторов достигало 300 % от уровня нормы.

Увеличение содержания Alu-повторов в составе вкДНК плазмы крови ранее документировано для аутоиммунных заболеваний (Li, Steinman, 1989). Следует отметить, что антитела-абзимы, реагирующие с нДНК у больных аутоиммунными заболеваниями, обладают специфичностью к CpG-обогащенным участкам ДНК (Pisetsky, 2001; Tran, 2003). Не исключено, что выявленные Alu обладают иммуностимулирующими свойствами, так как содержат большое количество CpG-динуклеотидов (Pavliček et al., 2001; Pisetsky, 2001).

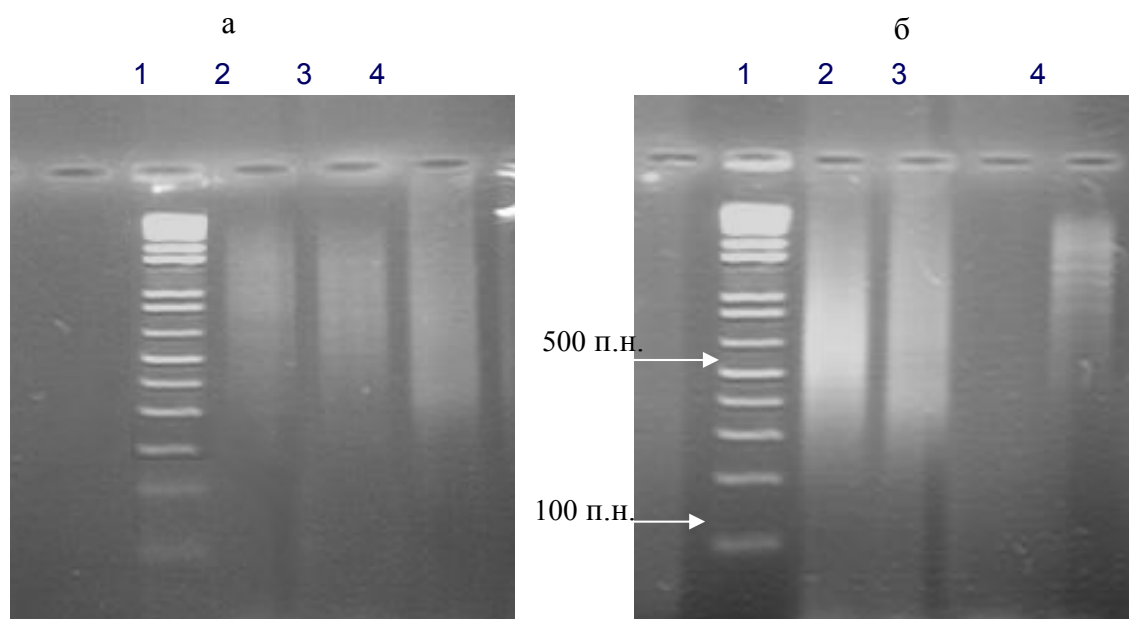


Рис. 7. Интер-Alu повторы в плазме крови новорожденных детей, выявленные методом ПЦР:

- а: 1 - Маркер длин фрагментов ДНК 100 – 12000 п.н. («Invitrogen», USA)
- 2, 3 - положительная реакция с Тс65 у здорового новорожденного
- 4 – положительная реакция с Тс65 у новорожденного с ЗВУР
- б: 1 - Маркер длин фрагментов ДНК 100 – 12000 п.н. («Invitrogen», USA)
- 2 - положительная реакция с Тс65 у новорожденного с ВУИ
- 3, 4 - положительная реакция с Тс65 у новорожденных с ПП ЦНС

Взаимосвязь концентрации вкДНК с содержанием АТ к ДНК у новорожденных. На данном этапе работы были определены средние показатели содержания АТ к н- и дДНК в контрольной группе, составившие, соответственно 1,23 и 1,02 отн. ед., и границы нормы содержания АТ к ДНК в контрольной группе, которые определены как 2,5 и 97,5 перцентили (рис. 8).

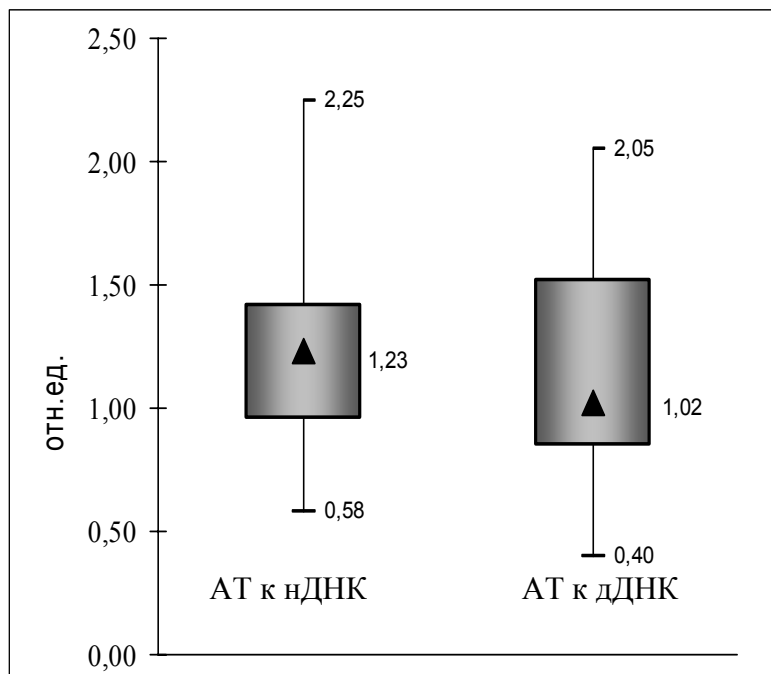


Рис. 8. Уровни содержания АТ к н- и дДНК у новорожденных детей контрольной группы. Нижняя метка погрешности – 2,5 перцентиль, нижняя – 97,5 перцентиль. Треугольником обозначена медиана.

При исследовании содержания АТ к ДНК у недоношенных новорожденных без тяжелых осложнений, не выявлено характерной для IgG зависимости их содержания от гестационного возраста (рис. 9). Так, у новорожденных 35 – 37 и 29 – 31 недель гестации содержание АТ к нДНК было достоверно ниже нормы, тогда как у новорожденных 32 – 34 недель гестации уровень АТ к нДНК превышал аналогичный показатель в контрольной группе почти в 2 раза. В случае АТ к дДНК минимальные, достоверно более низкие значения наблюдались у новорожденных 29 – 31 недели гестации.

При перинатальной патологии у новорожденных 38 – 40 недель гестации уровень содержания АТ к нДНК снижен по сравнению с нормой. В остальные гестационные периоды достоверных отличий от уровня нормы не выявлено. В гестационные периоды 35 – 37 и 29 – 31 недель уровни содержания АТ к нДНК при патологии превышали аналогичные показатели у недоношенных новорожденных без осложнений.

Уровни содержания АТ к дДНК у новорожденных с перинатальной патологией не отличались от таковых показателей у новорожденных соответствующих гестационных возрастов без тяжелых осложнений.

Показатели АТ к ДНК у новорожденных варьируют в широких пределах. Отсутствие зависимости уровня содержания АТ к ДНК от гестационного возраста позволило нам предположить, что пул АТ к ДНК может формироваться не только за счет трансплацентарного перехода материнских антител (содержание которых зависит от гестационного возраста). Не исключено, что иммунная система ребенка способна продуцировать АТ к ДНК

в ответ на появление в кровотоке вкДНК. Это определило необходимость исследовать факторы, влияющие на содержание АТ к ДНК у новорожденных. Для решения поставленной задачи был проведен корреляционный анализ, устанавливающий взаимосвязь содержания АТ к ДНК у новорожденных с аналогичным показателем у их матерей, с массой тела детей при рождении и с концентрацией вкДНК.

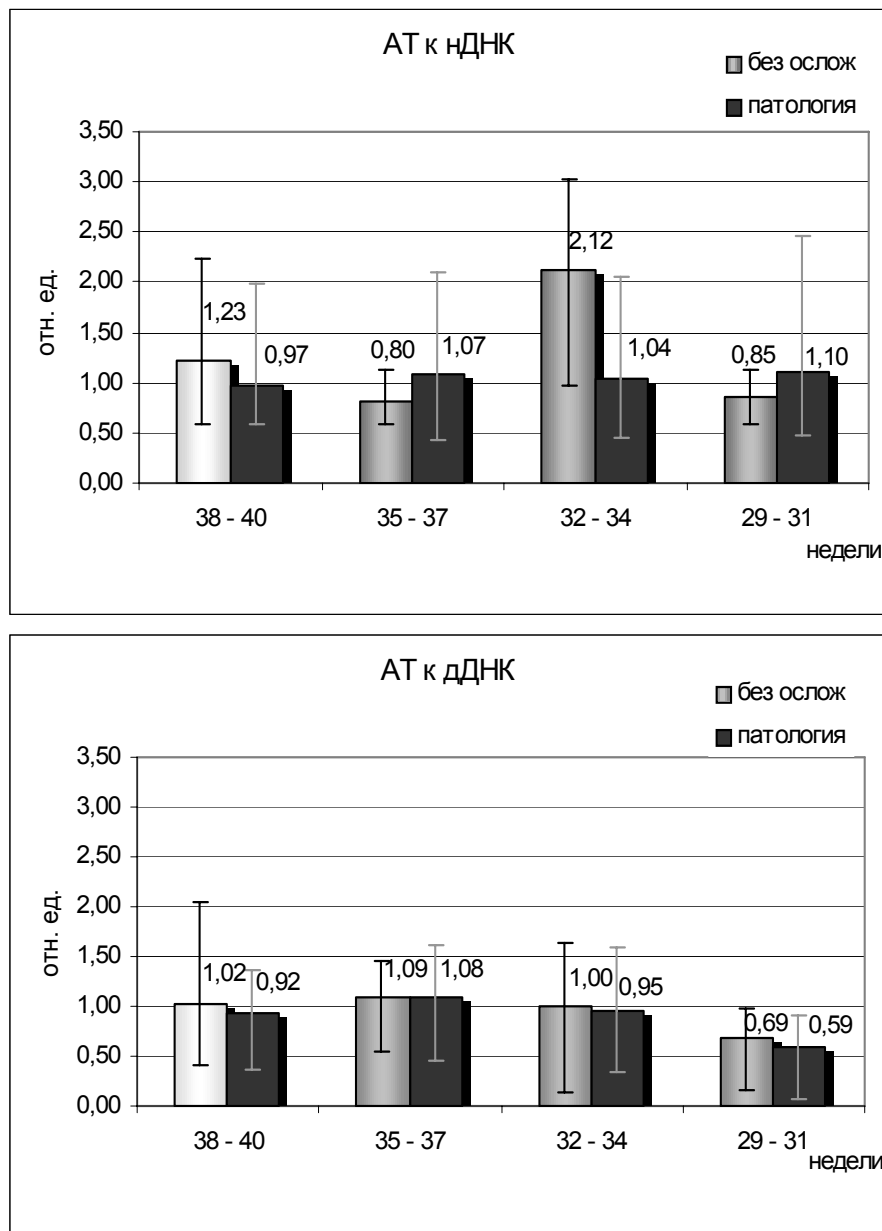


Рис. 9. Уровни содержания АТ к нДНК и дДНК у новорожденных детей различного гестационного возраста без осложнений и при перинатальной патологии. Светлый столбик – показатели АТ в контрольной группе относительно здоровых новорожденных детей.

Результаты показали, что у относительно здоровых новорожденных (табл. 4) уровень содержания АТ к нДНК практически в равной мере зависит как от содержания АТ к нДНК у матери, так и от массы тела ребенка при рождении. Уровень содержания АТ к дДНК коррелирует с материнским уровнем АТ к дДНК. Взаимосвязи с концентрацией вкДНК не обнаружено.

В группах недоношенных новорожденных без тяжелых осложнений (табл. 5) корреляционный анализ показал, что лишь у детей 35 – 37 недель

гестации сохраняется средняя степень корреляции ($P > 0,05$) с материнским уровнем АТ к нДНК. При других гестационных периодах эта взаимосвязь пропадает. В то же время более значительным становится влияние вкДНК – наблюдаются корреляции средней степени ($P > 0,05$) при гестационном возрасте 35 – 37 и 32 – 34 недели.

Таблица 4. Коэффициенты корреляции между содержанием АТ к ДНК у ребенка и у матери (r_1); между содержанием АТ к ДНК и массой тела при рождении (r_2); между содержанием АТ к ДНК и концентрацией вкДНК в плазме крови (r_3) у новорожденных контрольной группы

| Подкласс АТ к ДНК | r_1 | r_2 | r_3 |
|-------------------|----------------|---------------|-------|
| АТ к нДНК | 0,506* | 0,643* | 0,145 |
| АТ к дДНК | 0,638 * | 0,376 | 0,116 |

* - $P < 0,05$

Таблица 5. Коэффициенты корреляции между содержанием АТ к ДНК у ребенка и у матери (r_1); между содержанием АТ к ДНК и массой тела при рождении (r_2); между содержанием АТ к ДНК и концентрацией вкДНК в плазме крови (r_3) у недоношенных новорожденных без тяжелых осложнений перинатального периода

| Подкласс АТ к ДНК | Гестационный возраст (недели) | r_1 | r_2 | r_3 |
|-------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|
| АТ к нДНК | 35-37 | 0,410 | 0,257 | 0,371 |
| | 32-34 | - | - | 0,350 |
| | 29-31 | - | - | 0,291 |
| АТ к дДНК | 35-37 | - | - | - |
| | 32-34 | - | - | 0,452 |
| | 29-31 | - | - | - |

В общих гестационных группах новорожденных с перинатальной патологией не выявлено значимой взаимосвязи между исследуемыми параметрами, что определило необходимость анализа корреляции при каждом заболевании (табл. 6). Выяснено, что в некоторых случаях содержание АТ к н- или дДНК определяется материнским уровнем АТ и/или массой тела ребенка при рождении. Наряду с этим, становится все более значимой взаимосвязь между уровнем содержания АТ к обоим типам ДНК и концентрацией вкДНК.

Необходимо отметить, что при одних и тех же заболеваниях, но в различные гестационные периоды связи между двумя исследуемыми параметрами носили разнонаправленный характер: у новорожденных 38 – 42 и 32 – 34 недели в большинстве случаев корреляция носила характер обратной зависимости, а у новорожденных 35 – 37 и 29 – 31 недель гестации – прямой.

Не претендуя на объяснение каждого конкретного заболевания (это требует отдельных клинических исследований), позволим себе сделать общее предположение, что снижение содержания АТ к ДНК при возрастании концентрации вкДНК можно объяснить расходом имеющихся в кровотоке новорожденного АТ данного класса, вероятно, перешедших к нему от матери,

на формирование иммунных комплексов с вкДНК, неактивных в реакции ИФА. С этой точки зрения, непосредственный интерес представляет исследование содержания иммунных комплексов в плазме крови новорожденных детей, что будет выполнено в ходе дальнейшей работы.

Таблица 6. Коэффициенты корреляции между содержанием АТ к ДНК у ребенка и у матери (r_1); между содержанием АТ к ДНК и массой тела при рождении (r_2); между содержанием АТ к ДНК и концентрацией вкДНК в плазме крови (r_3) у новорожденных с перинатальной патологией

| Подкласс АТ к ДНК | Гестационный возраст (недели) | Патология | r_1 | r_2 | r_3 |
|-------------------|-------------------------------|-----------|--------|---------|----------------|
| АТ к нДНК | 38 - 40 | ПП ЦНС | 0,500 | -0,245 | -0,643* |
| | | ЗВУР | - | 0,736* | -0,778* |
| | | ВУИ | 0,881* | 0,509 | - |
| | | РДС | -0,569 | - | -0,486 |
| | 35 - 37 | ПП ЦНС | - | - | - |
| | | ЗВУР | - | - | 0,670* |
| | | ВУИ | 0,780* | 0,307 | 0,800* |
| | | РДС | - | 0,381 | - |
| | 32 - 34 | ПП ЦНС | 0,280 | 0,254 | -0,508* |
| | | ЗВУР | - | -0,552 | -0,682* |
| | | ВУИ | - | 0,579 | - |
| | | РДС | 0,309 | - | -0,342* |
| | 29 - 31 | ПП ЦНС | - | - | 0,724* |
| | | ЗВУР | -0,407 | - | 0,348 |
| | | ВУИ | - | 0,874* | - |
| | | РДС | 0,250 | 0,347 | 0,301 |
| АТ к дДНК | 38 - 40 | ПП ЦНС | - | - | -0,486 |
| | | ЗВУР | - | 0,809* | -0,920* |
| | | ВУИ | - | 0,561 | 0,300 |
| | | РДС | 0,515 | - | - |
| | 35 - 37 | ПП ЦНС | - | - | -0,383 |
| | | ЗВУР | - | 0,759* | 0,700* |
| | | ВУИ | -0,708 | 0,579 | - |
| | | РДС | -0,434 | - | 0,338 |
| | 32 - 34 | ПП ЦНС | 0,378 | 0,254 | 0,746* |
| | | ЗВУР | - | -0,552 | - |
| | | ВУИ | - | 0,579 | - |
| | | РДС | 0,309 | - | - |
| | 29 - 31 | ПП ЦНС | 0,459 | - | 0,259 |
| | | ЗВУР | - | -0,714* | 0,371 |
| | | ВУИ | - | - | - |
| | | РДС | - | 0,470 | 0,606* |

* - $P < 0,05$

Прямую зависимость между показателями концентрации вкДНК и содержания АТ к ДНК можно объяснить выработкой собственных АТ, то есть, аутоиммунным ответом на вкДНК в раннем неонатальном периоде.

Полученный результат позволяет сделать вывод, что вкДНК может изменять уровень содержания АТ к ДНК, повышая или снижая его. Причем это влияние разнонаправлено в зависимости от типа патологии и гестационного возраста и может быть использовано в дальнейшем для оценки состояния иммунной системы новорожденного ребенка в раннем неонатальном периоде и прогноза развития патологии иммунной системы в последующие возрастные этапы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные результаты и данные литературы, мы предположили, что вкДНК апоптотического происхождения может являться важным участником иммунного ответа, приводящим к срыву иммунологической адаптации у недоношенных новорожденных и у новорожденных с перинатальной патологией. Негативное влияние вкДНК может быть реализовано следующим образом. При появлении на свет новорожденного ребенка, большая часть лимфоцитов которого не имеют на своей поверхности IgD (Володин, 1999), поток чужеродных АГ приводит к их активации, которая заканчивается активационно-индуцированным апоптозом (Талаев, 1997; Хаитов, 2000). У недоношенного ребенка, особенно при комбинированном, экзо- и эндогенном, воздействии на ДНК иммунокомпетентных клеток ДНК-тропными агентами (ДНК-вирусы или гипоксия), происходят наиболее тяжелые формы нарушения репликации ДНК (Караулов, 1991), что ведет к активации апоптоза и выходу в кровоток большого количества апоптотических продуктов (Holdenrieder, 2004). Вышедшие в кровоток апоптотические тельца элиминируются фагоцитами. В случае дефекта в фагоцитарной системе или при «перегрузке» фагоцитарного звена умирающими клетками, апоптотические тельца могут образовывать иммунные комплексы с АТ к ДНК, полученными ребенком от матери, активируя таким образом систему комплемента и В-лимфоциты. Активированные лимфоциты, в свою очередь, могут экскретировать вкДНК или вырабатывать АТ, реагирующие с нативной и денатурированной ДНК, которые, возможно обладают каталитическими свойствами. Не исключено, что именно дальнейшая активация лимфоцитов и активационно-индуцированный апоптоз способствуют прогрессированию заболевания, обуславливая нейтропению (Володин, 1999), апоптоз макрофагов (Pisetsky, 2004) и выработку провоспалительных цитокинов (Таболин, 1997), повреждающих гематоэнцефалический барьер и приводящих к патологии ЦНС. В этом плане следует особенно выделить группу недоношенных новорожденных детей 32 – 34 недель гестации, у которых наблюдались максимальные показатели концентрации вкДНК, содержания апоптотических и активированных лимфоцитов. По данным литературы и жизненному опыту неонатологов, именно в этом гестационном возрасте отмечается наибольшая частота перивентрикулярных кровоизлияний (Зубарева, 2006), обуславливающая патологию ЦНС и смертность новорожденных этого гестационного периода.

Дальнейшее комплексное исследование концентрации внеклеточной ДНК, содержания и свойств АТ к ДНК, количества иммунных комплексов, состояния лимфоцитов и фагоцитарного звена у новорожденных детей во взаимосвязи с клиническими параметрами расширит представление о причинах иммунологических заболеваний и увеличит эффективность их лечения.

ВЫВОДЫ

1. В плазме крови новорожденных детей в норме и при патологии присутствует внеклеточная ДНК, концентрация которой значительно увеличена у недоношенных новорожденных и у новорожденных с перинатальной патологией и максимальна у новорожденных с гестационным сроком 32 – 34 недели.

2. В популяции лимфоцитов относительно здоровых новорожденных детей обнаружены лимфоциты с признаками апоптоза и активации (2,9 и 2,5 %, соответственно). У новорожденных различных гестационных возрастов без осложнений и при перинатальной патологии наблюдается нарушение апоптоза лимфоцитов в сторону его усиления, достигающее максимальных значений у новорожденных с перинатальной патологией 32 – 34 недель гестации.

3. Прямая корреляция между интенсивностью апоптотической гибели лимфоцитов/ их активацией и концентрацией внеклеточной ДНК плазмы крови указывает на лимфоцитарное происхождение вкДНК.

4. В плазме крови новорожденных с перинатальной патологией присутствуют низкомолекулярные фрагменты ДНК, среди которых содержатся LINE-элементы и инвертированные Alu-повторы, обогащенные CpG-динуклеотидами.

5. Уровни содержания антител к нативной и денатурированной ДНК у новорожденных в норме составляют, соответственно, 1,23 и 1,02 отн. ед. и определяются содержанием АТ к ДНК у матери и массой тела ребенка при рождении. У недоношенных новорожденных с перинатальной патологией выявлены взаимосвязи содержания АТ к ДНК и концентрации внеклеточной ДНК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Tuaeva N.O.** The free-cell DNA in blood plasma of newborn babies with perinatal CNS damage / **N.O. Tuaeva**, V.G. Vinter, A.S. Belokhvorostov // Clin. Chem. – 2005. – V. 51, № 10. – P. 21.
2. **Tuaeva N.O.**, Relationship between Cell-free DNA and Antibodies against DNA in Bloodstream of Newborns / **N.O. Tuaeva**, V.V. Sofronov, V.A. Emikeeva, D.M. Mustafina, D.I. Shegurova The // BioScience2006 - bioscience for the 21st century, 23 - 27 July. – SECC, Glasgow, UK, 2006. – Book Abstracts. – P. 9.
3. Сидорова Е.Е. Внеклеточная ДНК плазмы крови у новорожденных детей с перинатальной патологией ЦНС / Е.Е. Сидорова, **Н.О. Туаева**, З.И. Абрамова, В.Г. Винтер, С.Э. Гавор-

- Кваши, В.В. Софронов, В.А. Емикеева // I Международный симпозиум. Сборник статей ученых Казанского университета (на русском и французском языках). – Казань: Казанский государственный университет им. Ульянова-Ленина, 2005. – 568 с.
4. Софронов В.В. Количественные параметры ядерной и внеклеточной ДНК у новорожденных с клиническими проявлениями нарушения адаптации в раннем неонатальном периоде / В.В. Софронов, **Н.О. Туаева**, В.Г. Винтер, В.А. Емикеева, Д.И. Шегурова, Е.В. Маврина // Вопр. совр. педиатрии. – 2006. - № 6. – С. 26 – 29.
 5. Софронов В.В. Характеристика ядерной и внеклеточной ДНК у новорожденных в зависимости от гестационного возраста / В.В. Софронов, **Н.О. Туаева**, В.Г. Винтер, В.А. Емикеева, Д.И. Шегурова // Российский педиатрический журнал. – 2006. - № 6. – С. 13 – 15.
 6. **Туаева Н.О.** Антитела к ДНК у недоношенных новорожденных детей / **Н.О. Туаева**, Д.М. Мустафина, В.А. Емикеева // Материалы международного конгресса "Иммунитет и болезни: от теории к терапии" 3-8 октября 2005. – с. 14.
 7. **Туаева Н.О.** Аутоантитела к нативной ДНК у новорожденных детей группы риска / **Н.О. Туаева**, В.В. Софронов, В.Г. Винтер, Д.М. Мустафина, В.А. Емикеева, Е.В. Маврина // Материалы Международной научно-практической конференции «Дни науки 2005». Том 20. Медицина. – Днепропетровск: Наука і освіта. – 2005. – С. 58 – 59.
 8. **Туаева Н.О.** Взаимосвязь концентрации внеклеточной ДНК и содержания антител к нативной ДНК у новорожденных детей с пневмопатией / **Н.О. Туаева**, В.В. Софронов, В.А. Емикеева, З.И. Абрамова, К.В. Туточкина, Д.В. Мустафина, В.Г. Винтер // Казанский медицинский журнал. – 2006. - № 4. – С. 254 – 257.
 9. **Туаева Н.О.** Внеклеточная ДНК плазмы крови при патологии новорожденных / **Н.О. Туаева**, Д.М. Мустафина, В.А. Емикеева // Научно-практическая конференция молодых ученых // Тезисы докладов. – Казань, 2006. – С. 25 – 26.
 10. **Туаева Н.О.** 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 // Ученые записки Казанского государственного университета: Естественные науки. – 2005. – Т. 147. – С. 196 – 200.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

IgG (D) – иммуноглобулины класса G (или D)
LINE - long interspersed nuclear element – длинные диспергированные ядерные элементы
АГ – антиген
АТ – антитело
вкДНК – внеклеточная ДНК
ВУИ – внутриутробная инфекция
дДНК – денатурированная ДНК
ЗВУР – задержка внутриутробного развития
Интер-Alu – инвертированные Alu-повторы
МГЭ – мобильные генетические элементы
нДНК – нативная ДНК
отн. ед. – относительные единицы
ПП ЦНС – перинатальная патология ЦНС
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РДС – респираторный дистресс-синдром
СКВ – системная красная волчанка
Т.п.н. – тысячи пар нуклеотидов

e-mail: Natalya.Tuaeva@ksu.ru

Факс: +7(843)2387121