

14.00.00 Medical Science

14.00.00 Медицинские науки

UDC 616.24:577.113

**Extracellular Nucleic Acids in Blood of Patients
with Chronic Obstructive Pulmonary Disease**¹Larissa E. Muravlyova²Vilen B. Molotov-Luchanskiy³Dmitriy A. Klyuyev⁴Ryszhan E. Bakirova⁵Ludmila A. Demidchik⁶Evgeniya A. Kolesnikova¹Karaganda State Medical University, Kazakhstan

Gogol street, 40, Karaganda city 10008

Dr (Biology), Professor

E-mail: lem2403@mail.ru

²Karaganda State Medical University, Kazakhstan

Gogol street, 40, Karaganda city 10008

Dr (Medicine), Professor

E-mail: vilen53@mail.ru

³Karaganda State Medical University, Kazakhstan

Gogol street, 40, Karaganda city 10008

PhD (Medicine), Assistant Professor

E-mail: mythrandir79@mail.ru

⁴Karaganda State Medical University, Kazakhstan

Gogol street, 40, Karaganda city 10008

Dr (Medicine), Assistant Professor

E-mail: bakir15@mail.ru

⁵Karaganda State Medical University, Kazakhstan

Gogol street, 40, Karaganda city 10008

Assistant

E-mail: lusenok2008@mail.ru

⁵Karaganda State Medical University, Kazakhstan

Gogol street, 40, Karaganda city 10008

Assistant

E-mail: kolesnikova.evgenya@gmail.ru

Abstract. The concentrations of extracellular nucleic acids and acid-soluble precursors of nucleic acids in blood of patients with different forms and severity of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) were evaluated. The significant increase of the content of extracellular RNA and acid-soluble precursors of nucleic acids in plasma of patients with COPD was detected. The decrease of extracellular RNA in plasma of patients with COPD worsening was diagnosed. Extracellular DNA in plasma and red blood cells of patients didn't change significantly. The article examines the mechanisms of extracellular nucleic acids increase in blood of COPD patients, studies the possible role of extracellular RNA in development of coagulation disorders in COPD patients. The further research of the role of extracellular nucleic acids and their precursors in COPD progression is required.

Keywords: extracellular nucleic acids; blood; chronic obstructive pulmonary disease.

Введение. Присутствие в крови внеклеточных или циркулирующих нуклеиновых кислот (вкНК) было открыто в 1948 г. Mandel и Metais. Они представлены фрагментами как ДНК, так и РНК и находятся в крови в свободном виде. Кроме того, вкНК могут быть

сорбированы на форменных элементах крови [1]. Дискутируется вопрос о появлении вкНК в крови, как в условиях нормы, так и патологии. Высказано мнение, что наличие вкНК в крови является следствием апоптоза, а также их эвакуации из неповрежденных клеток [2, 3, 4, 5]. В ряде исследований указывается, что вкНК появляются в крови на финальных стадиях дифференциации эритроцитов и других клеток [6, 7]. В условиях патологии основными причинами появления вкНК являются апоптоз и некроз. В настоящее время установлено, что содержание циркулирующих нуклеиновых кислот меняется при диабете, инфаркте миокарда, системной красной волчанке, ревматоидном артрите, гепатите и других патологических состояниях [1, 8-10]. Нашими исследованиями показано, что при хронической болезни почек и при артериальной гипертензии, ассоциированной с хронической болезнью почек, увеличивается сорбция вкРНК на эритроцитах, снижается их содержание в плазме крови и усиливается экскреция с мочой [11].

Анализ данных литературы показал, что практически не исследовано содержание внеклеточных нуклеиновых кислот при хронических диффузных заболеваниях легких, что и послужило целью нашего исследования.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили эритроциты и плазма крови больных и здоровых людей. Сформировано 5 основных групп обследуемых лиц. В первую группу (n=15) вошли больные хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) средней, или умеренной, степени тяжести смешанной клинической формы (эмфизематозная и бронхитическая) в стадии обострения процесса с дыхательной недостаточностью (ДН) 2 степени. Вторую группу (n=11) составили больные ХОБЛ тяжелого течения, также смешанной формы (эмфизематозная и бронхитическая) в стадии обострения с ДН2. 3 группа (n=14) сформирована больными ХОБЛ средней степени тяжести, бронхитической формы в стадии обострения и ДН2. 4 группа (n=12) представлена больными ХОБЛ тяжелого течения, бронхитической формы с ДН2; В качестве контроля использовалась кровь клинически здоровых 32 доноров, в том числе, 15 женщин и 17 мужчин.

Забор крови у больных осуществлялся в стерильных условиях с соблюдением правил асептики в терапевтическом и пульмонологическом отделениях городской больницы № 2 Караганды (директор Бекембаев Ж.Р.), и медсанчасти «Шахтер Испат Кармет» (директор Баймуканов Е.А.) соответственно. Забор крови осуществлялся в утренние часы с помощью венепункции. Кровь стабилизировали гепарином. Исследование крови проводилось не позднее чем через час после забора крови. От каждого обследуемого было получено информированное согласие на участие в обследовании. Кислоторастворимую фракцию (КРФ), РНК и ДНК в плазме и эритроцитах оценивали по методу Л.И. Маркушевой и соавторов [12]. Единицы измерения – мкг/мл.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA версия 7.0 с учетом вычислительных методов, рекомендуемых для биологии и медицины. Статистические методы исследования включали в себя: расчет средней статистической величины выборки, медианы и моды, стандартного отклонения. Для определения достоверности полученных показателей использовались два метода: определение вероятности различия совокупностей с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Обсуждение. Изменение концентрации вкНК в крови больных может быть обусловлено рядом причин. Прежде всего, в условиях воспалительного процесса нуклеиновые кислоты высвобождаются из активированных фагоцитарных клеток [13]. Попадание фрагментов ДНК и РНК в кровь может быть следствием вступления в апоптоз достаточно большого числа клеток. Подтверждением корректности этого положения являются результаты I. K Demedts и соавт. [14], показавших участие апоптоза в механизмах развития ХОБЛ. Можно также предположить увеличение вкНК вследствие развития локальных очагов некроза у больных ХОБЛ при деструкции легочной паренхимы. На наш взгляд, одной из причин может быть усиление образования нейтрофильных внеклеточных ловушек "neutrophil extracellular traps" (NETs). По нашему мнению, из трех известных на сегодняшний день путей образования NETs [15] у больных ХОБЛ преобладает механизм, сопровождающийся лизисом нейтрофилов. Это позволяет объяснить увеличение не только вкДНК, но и вкРНК в плазме крови больных. Кроме того, в последнее время показано

окислительное повреждение НК при ХОБЛ [16]. Это также может быть причиной увеличения содержания внеклеточных нуклеиновых кислот.

В физиологических условиях внеклеточные нуклеиновые кислоты разрушаются ДНК-зами и РНК-зами, поглощаются клетками печени или другими клетками; показано участие в их элиминации фагоцитарных клеток [1]. Нарастание в крови больных КРФ можно объяснить увеличением активности эндонуклеаз. На наш взгляд, более вероятным является, наоборот, предположение о снижении активности эндонуклеаз, что и определяет достаточно высокую степень увеличения КРФ в крови больных ХОБЛ. Сорбция вкНК и КРФ на мембранах форменных элементов может приводить к изменению транспорта через плазматическую мембрану и влиять на физико-химические характеристики мембран. Связывание внеклеточных НК и КРФ с эритроцитами крови больных ХОБЛ можно рассматривать как одну из причин изменения сорбционной емкости мембран красных клеток, что хорошо согласуется с полученными нами ранее данными [17]. Изменение сорбционной емкости эритроцитов влияет на их поведение в условиях деформационного стресса.

В последнее время предложено рассматривать вкРНК как участника системы регуляции агрегантного состояния крови в качестве прокоагулянтного кофактора [18]. РНК запускает контактную фазу активации коагуляции и таким образом вносит вклад в нарушение гемостаза. Это хорошо согласуется с результатами Sabit R., Tomas P. [19], показавшими увеличение маркеров коагуляции в крови больных ХОБЛ.

Очевидно, нуждается в дальнейшем осмыслении роль вкНК как ко-предиктора легочного фиброза в исходе ХОБЛ. Если принять за основу гипотезу апоптоз-генерированной и NETs – генерированной презентации вкНК в крови больных, то их можно считать маркерами степени тяжести ХОБЛ, а также активации процесса прогрессирования заболевания. Кроме того, на вкНК необходимо обратить внимание как дополнительный фактор усугубления ДН у больных ХОБЛ. Влияя на динамику гемостаза, они могут стать участниками запуска субклинического ДВС-синдрома с образованием микротромбов в капиллярной сети легочного круга кровообращения. Вклад этого явления в развитие гипоксии и усиление ДН необходимо выяснить, так как это может дать дополнительные сведения о механизмах необратимого прогрессирования ХОБЛ.

Результаты. Результаты проведенного исследования представлены на рисунках 1 и 2. Из данных рисунка 1 следует, что содержание кислоторастворимых предшественников в плазме крови больных всех групп превышало значение контроля. Сравнение между группами показало, что содержание вкРНК в плазме крови больных с бронхитической формой ХОБЛ (3 группа) достоверно превышало таковой больных смешанной формой ХОБЛ (1 группа). Сопоставление результатов внутри групп показало отчетливый тренд к снижению вкРНК в плазме крови больных при нарастании степени тяжести ХОБЛ. Зафиксировано увеличение содержания вкДНК в плазме крови больных всех обследуемых групп, но отличие от контроля не носило достоверного характера. Уровень КРФ в плазме крови больных 1-4 групп достоверно отличался от значения контроля, но максимальное отклонение от нормы наблюдалось у больных с бронхитической формой ХОБЛ средней степени тяжести.

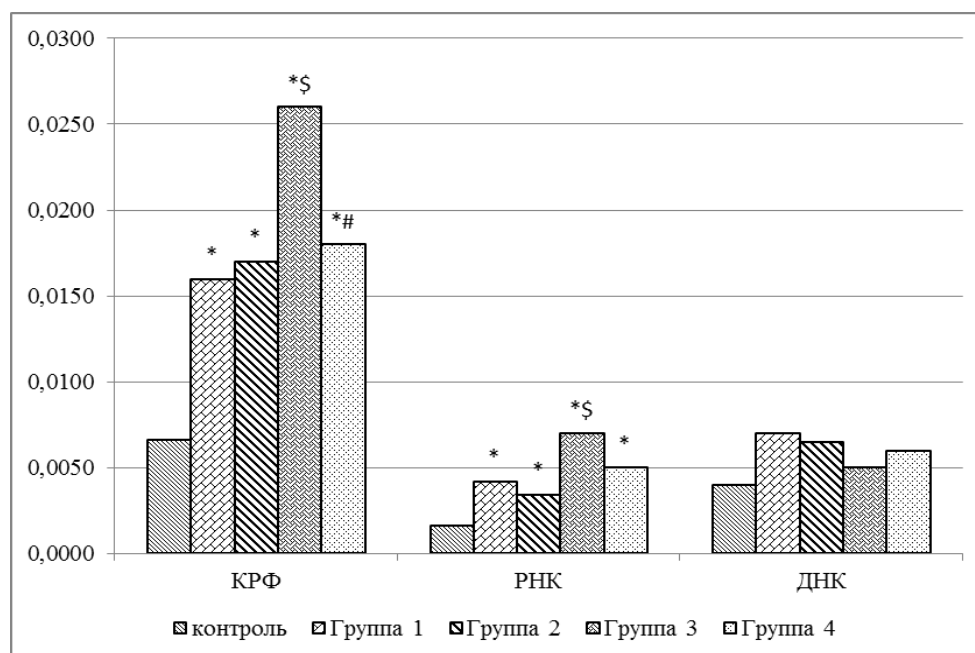


Рис. 1. Содержание внеклеточных нуклеиновых кислот и КРФ в плазме больных ХОБЛ

Примечание - * - достоверность по отношению к контролю ($p \leq 0,005$); # - достоверность по отношению к группе с той же формой заболевания, но с более легкой степенью (в данном случае отличия группы 4 от группы 3); § - достоверность по отношению к группе с другой формой заболевания, но с одинаковой степенью (в данном случае отличия группы 3 от группы 1)

В эритроцитах крови больных прослеживается иная картина. Обращает на себя внимание снижение содержания внеклеточной РНК, сорбированной на эритроцитах крови больных ХОБЛ смешанной формы по сравнению с таковой контроля. В то же время у больных с бронхитической формой ХОБЛ средней степени тяжести наблюдалось увеличение уровня внеклеточной РНК (на 22 %), тогда как при нарастании степени тяжести ХОБЛ этот показатель снижался. Не было выявлено отличий по содержанию внеклеточной ДНК, сорбированной на эритроцитах крови больных 1–4 группы, по сравнению с контролем. При общей тенденции к увеличению содержания КРФ достоверное отличие зафиксировано в эритроцитах крови больных 3 группы.

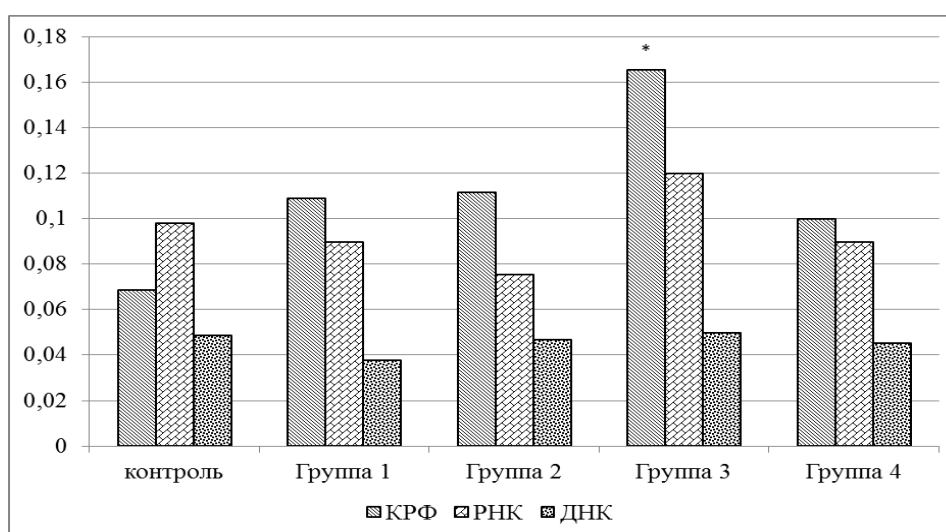


Рис. 2. Содержание внеклеточных нуклеиновых кислот и КРФ, сорбированных на эритроцитах крови больных ХОБЛ

Примечание - * - достоверность по отношению к контролю ($p \leq 0,005$).

Выводы. Следовательно, наши результаты показали увеличение содержания внеклеточных нуклеиновых кислот в крови больных ХОБЛ. Обсуждены возможные причины их появления в крови. Показано возможное участие внеклеточных нуклеиновых кислот в изменении сорбционного потенциала эритроцитов и их опосредованное влияние на систему гемостаза у больных ХОБЛ.

Примечания:

1. Внеклеточные нуклеиновые кислоты: происхождение и функции. Миниобзор / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев, Н.У. Танкибаева, В.В. Койков // Современные проблемы науки и образования. 21. №2. С. 15-20.

2. Zhong X.Y., Hahn S., Kiefer V., Holzgrevel W. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release // Annals of Hematology. 2007. Volume 86, N. 2. P. 139-143.

3. Туаева Н.О., Абрамова З.И., Мустафина Д.М. Внеклеточная ДНК в кровотоке человека II. Биологическая роль внеклеточной ДНК // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2008. Т.150. № 2. С. 59-70.

4. Зайцев В.Г., Скворцов В.В. Перспективы определения ДНК в сыворотке или плазме крови для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний // РМЖ. Онкология. 2009. Т.17, N 13 (352). С.864-866.

5. Scovassia, M. G. Bottonea, M. Biggiogera, C. Pellicciarib Dynamic relocation of nuclear proteins during the execution phase of apoptosis // Biochem. Pharmacol. 2008. V.1. N 76 (11). P. 1440-1450.

6. Tamkovich S.N., Vlassov V.V., Laktionov P. P. Circulating DNA in the Blood and Its Application in Medical Diagnosis // Molecular Biology. 2008. Vol. 42, N. 1. P. 9-19.

7. Van der Vaart M., Pretorius P.J. The Origin of Circulating Free DNA // Clinical Chemistry. 2007. 53. P. 2215.

8. Swaminathan R, Butt AN. Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments // Ann N Y Acad Sci. 2006. 1075. P. 1-9.

9. Tong YK, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids // Clin Chim Acta. 2006. 363 (1-2). P. 187-196.

10. Pisetsky DS. DNA as a marker of cell death in systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am. 2004. 30. P. 575-587.

11. Содержание внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме крови больных с гломерулопатиями и тубулопатиями /Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, М.К. Телеуов, Д.А. Ключев и соавт. // Современные проблемы науки и образования. 2010. №3. С. 23-27.

12. Ядерные белки хроматина в оценке эффективности лечения больных псориазом / Л.И. Маркушева, М.И. Савина, В.М. Решина и др. // Клиническая лабораторная диагностика. 2000. № 7. С. 18-20.

13. The clinical value of neutrophil extracellular traps / T. Logters, S. Margraf, J. Altrichter et al. // Med Microbiol Immunol. 2009. 198. P. 211-219.

14. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema / I. K. Demedts, T. Demoor, K.R. Bracke, G. F Joos, G.G. Brusselle // Respiratory Research. 2006. 7. P. 53.

15. Phillipson M., Kubus P. The neutrophil in vascular inflammation // Nature medicine. 2011. V.17, N11. P. 1381-1390.

16. Neofytou E, Tzortzaki EG, Chatziantoniou A, Sifakas NM. DNA Damage Due to Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) // International Journal of Molecular Sciences. 2012. Vol. 13, Issue 12. P. 16853-16864.

17 Metabolic status of erythrocytes at patients with chronic obstructive pulmonary disease / L.E. Muravlyova, V.B. Molotov-Luchanskiy, D.A. Kluyev et al. // Evro Medica, 2013.

18. Kannemeier Ch, Shibamiya A., Nakazawa F. et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation // PNAS. 2007. Vol. 104, 15. P. 6388-6393.

19. Sabit R., Tomas P. The effect of hypoxia on markers of coagulation and systemic inflammation in patients with COPD // Chest. 2010. 138. P. 47-51.

УДК 616.24:577.113

Внеклеточные нуклеиновые кислоты в крови больных хронической обструктивной болезнью легких

- ¹ Лариса Евгеньевна Муравлёва,
² Вилен Борисович Молотов-Лучанский.,
³ Дмитрий Анатольевич Ключев
⁴ Рысжан Емельевна Бакирова
⁵ Людмила Андреевна Демидчик
⁶ Евгения Александровна Колесникова

¹ Карагандинский государственный медицинский университет, Казахстан
Караганда, ул. Гоголя, 40, 100008
Доктор биологических наук, профессор
E-mail: lem2403@mail.ru

² Карагандинский государственный медицинский университет, Казахстан
Караганда, ул. Гоголя, 40, 100008
Доктор медицинских наук, профессор
E-mail: vilen53@mail.ru

³ Карагандинский государственный медицинский университет, Казахстан
Караганда, ул. Гоголя, 40, 100008
Кандидат медицинских наук, доцент
E-mail: mythrandir79@mail.ru

⁴ Карагандинский государственный медицинский университет, Казахстан
Караганда, ул. Гоголя, 40, 100008
Доктор медицинских наук, доцент
E-mail: bakir15@mail.ru

⁵ Карагандинский государственный медицинский университет, Казахстан
Караганда, ул. Гоголя, 40, 100008
преподаватель
E-mail: lusenok2008@mail.ru

⁶ Карагандинский государственный медицинский университет, Казахстан
Караганда, ул. Гоголя, 40, 100008
преподаватель
E-mail: kolesnikova.evgenya@gmail.ru

Аннотация. Была проведена оценка содержания внеклеточных нуклеиновых кислот и кислоторастворимых предшественников нуклеиновых кислот в крови больных с хронической обструктивной болезнью легких. Обнаружено достоверное повышение содержания внеклеточных РНК и кислоторастворимых предшественников нуклеиновых кислот в плазме крови больных с хронической обструктивной болезнью легких. Зафиксировано снижение содержания внеклеточных РНК в плазме крови больных по мере нарастания степени тяжести заболевания. Не наблюдалось значительных изменений со стороны внеклеточных ДНК в эритроцитах и плазме крови больных.

Ключевые слова: внеклеточные нуклеиновые кислоты; кровь; хроническая обструктивная болезнь легких.