

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В КРОВИ И МОЧЕ БОЛЬНЫХ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИЕЙ И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Муравлёва Л. Е.¹, Молотов-Лучанский В. Б.¹, Клюев Д. А.¹, Танкибаева Н. У.¹, Калиева Ш. С.¹, Жолдаспаева Н. Б.², Сиденко В. Л.²

¹*Государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан (100008 Караганда, ул. Гоголя, 40), e-mail: muravlev@inbox.ru, vilen53@mail.ru, mythrandir79@mail.ru*

²*Областной центр медицинской помощи ветеранам войны, г. Караганда, Казахстан*

Исследовано содержание внеклеточных нуклеиновых кислот и кислоторастворимых предшественников нуклеиновых кислот в крови и моче больных сахарным диабетом 2 типа с диабетической нефропатией и артериальной гипертензией (АГ+ДН). В качестве группы сравнения выбраны больные сахарным диабетом 2 и артериальной гипертензией (АГ+СД). Выявлен единый тренд изменения внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме крови и эритроцитах больных АГ+ДН и АГ+СД. Развитие нефропатии сопровождалось прогрессивным увеличением содержания внеклеточных нуклеиновых кислот, особенно ДНК, в моче больных, что может быть потенциальным маркером неблагоприятного течения АГ и дебюта ангиопатических осложнений.

Ключевые слова: нефропатия, артериальная гипертензия, внеклеточные нуклеиновые кислоты, биологические жидкости.

THE EXTRACELLULAR NUCLEIC ACIDS IN BLOOD AND URINE OF PATIENTS AT DIABETIC NEPHROPATHY AND ARTERIAL HYPERTENSION

Muravluova L. E.¹, Molonov-Luchansky V. B.¹, Kluev D. A.¹, Tankibaeva N. U.¹, Kalieva Sh. S.¹, Zholdaspaeva N. B.², Sidenko V. L.²

¹ *State medical university, Karaganda, Kazakhstan (100008, Karaganda, Gogol street, 40), e-mail: muravlev@inbox.ru, vilen53@mail.ru, mythrandir79@mail.ru*

² *The regional center of the veteran medical care*

The concentration of extracellular nucleic acids and acid-soluble precursors of nucleic acids in the blood and urine of patients at type 2 diabetes with diabetic nephropathy and arterial hypertension was studied. The patients at type 2 diabetes with arterial hypertension were selected as the comparison group. The similar trend of extracellular nucleic acid alteration in plasma and erythrocytes of patients at diabetic nephropathy and arterial hypertension and diabetes with arterial hypertension was observed. The development of diabetic nephropathy was accompanied with progressive increasing of extracellular nucleic acid concentration especially DNA in the urine of patients. It would be a potential marker of negative prognosis in hypertension and the onset of diabetes complications.

Key words: diabetic nephropathy, arterial hypertension, extracellular nucleic acids, biological liquids.

Введение

Прогноз в отношении работоспособности, качества и длительности жизни пациентов, страдающих сахарным диабетом, зависит во многом от присоединения артериальной гипертензии (АГ). При этом важное значение имеют темпы прогрессирования, степень АГ, возможности её коррекции и эффективность гипотензивной терапии. Однако такие модифицируемые факторы влияния на АГ, как медикаментозная терапия, диетические

стимулы, коррекция образа жизни должны быть точно соотнесены со знаниями о механизмах развития АГ у больных диабетом, в том числе при развитии диабетических осложнений. К универсальным процессам регулирования артериального давления относятся клеточно-молекулярные взаимодействия, обеспечивающие базисные эндогенные влияния на органы-мишени в связи с развитием АГ.

В последнее время большое внимание уделяется изучению характера изменения внеклеточных циркулирующих нуклеиновых кислот (вкНК), их роли в механизмах развития патологических процессов. Рассматриваются также диагностические перспективы определения показателей вкНК [4,8].

Начаты исследования вкНК в биологических жидкостях больных сахарным диабетом. Kocic G et al. [5,6] проведено исследование активности РНК-аз и уровней олигонуклеотидов в крови больных ювенильным диабетом и взрослых больных инсулинзависимым и инсулиннезависимым диабетом. Выявлено снижение активности нуклеаз при увеличении концентрации олигонуклеотидов. Увеличение содержания олигонуклеотидов ведет к активации Toll-подобных рецепторов, что, в свою очередь, ведет к иммунной стимуляции и секреции цитокинов. В другом исследовании этих авторов [7] обнаружено изменение белков Vcl-2 и Вах, а также NF-κВ тимоцитов крыс после инкубации клеток с образцами вкРНК, выделенных из крови больных ювенильным диабетом и сахарным диабетом 1 типа.

В исследовании A.N. Butt et al. [3] обнаружено, что у больных диабетической нефропатией уровень mRNA нефрина в крови выше, чем в контрольной группе и у больных СД с нормоальбинурией (normoalbuminuric). По мнению авторов, это может отражать развитие и прогрессирование микроальбинурии. У больных ретинопатией уровень mRNA родопсина в крови также повышался относительно нормы и СД без ретинопатии. По мнению авторов, определение вкНК открывает новые перспективы для разработки новых неинвазивных методов для диагностики осложнений сахарного диабета. В более поздних исследованиях предложено определение внеклеточной ДНК для раннего выявления ретинопатии у больных инсулиннезависимым диабетом [10].

Вместе с тем, практически не исследован характер и направленность изменения внеклеточных нуклеиновых кислот в крови и моче больных диабетической нефропатией и артериальной гипертензией (АГ+ДН). Нашими ранее проведенными исследованиями показан разнонаправленный характер изменения вкНК в крови больных гломерулопатиями и тубулопатиями [1,9].

Целью настоящей работы являлось изучение динамики содержания циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот у больных сахарным диабетом 2 типа, страдающих артериальной гипертензией.

Пациенты и методы исследования

Сформированы две группы пациентов. 1-я группа (n=15) – больные сахарным диабетом 2 типа (СД2) и артериальной гипертензией (СД+АГ), не имеющие диабетической нефропатии; 2-я группа – больные СД2 с доказанной диабетической нефропатией (ДН) и артериальной гипертензией, развившейся спустя несколько лет после диагностирования у них сахарного диабета (n=19). В качестве контроля использовались кровь и моча клинически здоровых 32 доноров.

Все пациенты прошли общий терапевтический осмотр, включавший основные (расспрос, объективное исследование, в том числе пальпацию, перкуссию, аускультацию внутренних органов) и дополнительные (измерение АД, ЭКГ, специальные пробы мочи по Нечипоренко и Зимницкому) методы. Артериальное давление определялось по общепринятому методу Короткова. Артериальная гипертензия диагностировалась как на основании результатов измерения АД во время осмотров, так и на основании изучения анамнеза и официальных медицинских документов (эпикризы, протоколы обследования, в том числе суточного мониторирования АД), изучалась также объективность самооценки и самоконтроля больных с постоянной АГ. Артериальная гипертензия (АГ) классифицировалась по степеням согласно критериям экспертов ВОЗ. Обследованные пациенты имели 2-ю (160-179 мм рт. ст. систолическое АД и 90-109 мм рт. ст. – диастолическое АД) или 3-ю (систолическое АД \geq 180 мм рт. ст.; диастолическое АД \geq 110 мм рт. ст.) степени АГ. Стратификация рисков сосудистых событий проводилась согласно рекомендациям Американской ассоциации кардиологов (2001), поддержанным ВОЗ. Группы риска, к которым относились обследованные больные, идентифицировались как 3-я (86 % пациентов) и 4-я (14 % больных).

Обязательными методами лабораторных исследований являлись общие анализы крови и мочи, биохимические тесты на активность трансаминаз, уровни креатинина крови и мочевины. Оценка скорости клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции проводились методом Реберга – Тареева. Также использовались подходы, предложенные Кокрофтом и Голтом (формула СКФ по *Cockcroft-Gault*).

Нефропатия у больных сахарным диабетом диагностировалась по признаку стойкой протеинурии, эритроцитурии в сочетании или без снижения СКФ. При этом принималось во внимание отсутствие клинических и лабораторных признаков мочевой инфекции, обострения хронического пиелонефрита. В эту же группу (АГ+ДН) вошли пациенты с лабораторными показателями доклинической стадии диабетической нефропатии, которая диагностировалась на основании обнаружения микроальбуминурии при не менее чем трех определениях ее с помощью тест-полос «Микроальт». Проведены всем больным

ультразвуковые исследования почек, органов брюшной полости. Ряд пациентов прошел рентгеноурографические исследования для оценки функции мочевых путей, сосудисто-паренхиматозных взаимоотношений в почках. В группу АГ+СД вошли пациенты, не имевшие признаков диабетической нефропатии, в том числе показавшие отрицательный результат теста на микроальбуминурию.

Обязательным был осмотр специалистов: окулиста (исследование глазного дна, выявление признаков ангиопатии, диабетической ретинопатии), невропатолога (выявление признаков дисциркуляторной энцефалопатии).

Из данных исследований исключались больные, страдавшие ожирением, ишемической болезнью сердца с выраженной клиникой стенокардии, наличием недавно перенесенного инфаркта миокарда и инфаркта мозга, наличием больших остаточных изменений после перенесенного инфаркта мозга, лица с признаками прогрессирующей остеоартропатии. Не включались в исследование пациенты с конкурирующими острыми заболеваниями или обострениями хронических в их высокоактивной фазе (активность процесса 2–3 – степеней): пневмонией, ХОБЛ, туберкулезом, абсцессами мягких тканей. Критериями исключения были также сопутствующие аутоиммунные заболевания в фазе активного иммунного воспаления (тиреоидит с тиреотоксикозом, диффузный токсический зоб, гипотиреоз средней и тяжелой степеней, ревматоидный артрит, бронхиальная астма и т.д.).

Объектом исследования служили кровь (плазма, эритроциты) и моча больных. Контролем служили образцы крови и мочи 32 практически здоровых людей (первичных доноров).

Содержание кислоторастворимой фракции (КРФ), внеклеточных РНК и ДНК в крови и моче оценивали по методу Л.И Маркушевой и соавторов [2]. Единицы измерения – мкг/мл. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования приведены в таблице 1. Из данных таблицы 1 следует, что у больных 1 группы выявлена тенденция к увеличению содержания кислоторастворимых предшественников, а также сорбции на эритроцитах вкНК и, особенно, ДНК.

Таблица 1. Изменение содержания внеклеточных нуклеиновых кислот у пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом ($X \pm m$)

Показатели, единицы измерения	Контроль, n=32	АГ+СД, n=15 (1 группа)	АГ+ДН, n=19 (2 группа)
Эритроциты			
КРФ, мкг/мл	1,536 ± 0,772	2,1±0,385	2,9±0,70
РНК, мкг/мл	1,22±0,890	1,57±0,123	2,8±1,72
ДНК, мкг/мл	0,045±0,028	0,88±0,310*	1,08±0,49*
Плазма крови			
КРФ, мкг/мл	0,03±0,013	0,036±0,013	0,053±0,019
РНК, мкг/мл	0,03±0,00162	0,005±0,001*	0,004±0,001*
ДНК, мкг/мл	0,02±0,007	0,011±0,007	0,019±0,006
Моча			
КРФ, мкг/мл	1,58± 0,236	2,5±0,64	1,40±0,664
РНК, мкг/мл	0,122±0,0313	2,09±1,59*	0,78±0,244*
ДНК, мкг/мл	0,045±0,028	0,17±0,016	0,39±0,074*
Примечание: * – достоверность по сравнению с группой контроля $p < 0,05$.			

В плазме крови больных этой группы зафиксировано снижение содержания внеклеточных НК и, особенно, РНК относительно контроля. В моче больных АГ+СД наблюдалось увеличение как КРФ, так и внеклеточных нуклеиновых кислот относительно таковых контроля.

У больных 2 группы сохранялась тенденция к увеличению содержания кислоторастворимых предшественников, а также сорбированных на эритроцитах вкРНК и ДНК. При сохранении единого тренда зафиксированы количественные различия относительно контроля и показателей 1 группы.

В плазме крови больных 2 группы зафиксировано снижение содержания внеклеточной РНК при увеличении кислоторастворимых предшественников относительно контроля. В моче больных этой же группы наблюдалось увеличение содержания вкРНК и ДНК, причем уровень внеклеточной ДНК был достоверно выше такового контроля и 1 группы.

Данные литературы и наши собственные результаты позволили сформулировать рабочую гипотезу об изменении содержания внеклеточных нуклеиновых кислот в крови и, особенно, в моче больных при формировании диабетической нефропатии на фоне

артериальной гипертензии. Полученные данные показали, что определение внеклеточной ДНК в моче может быть потенциальным маркером раннего выявления диабетической нефропатии.

Таким образом, при программировании терапевтических воздействий на артериальную гипертензию у больных сахарным диабетом 2 типа целесообразно использовать показатели вкНК как в качестве предикторов неблагоприятного течения АГ и дебюта ангиопатических осложнений, так и маркеров эффективности медикаментозных и немедикаментозных видов лечения больных.

Список литературы

1. Содержание внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме крови больных с гломерулопатиями и тубулопатиями / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, М.К. Телеуов и соавт. // Современные проблемы науки и образования. – 2010. – №3. – С. 23-27.
2. 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.
3. Butt A.N et al. Circulating nucleic acids and diabetic complications. *Ann N Y Acad Sci.* 2006. – 1075. 258-270.
4. Gahana P B., Swaminathan R. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: Recent Developments // *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, vol. 1137. – P. 1-6.
5. Kocic G. et al. Altered degradation of circulating nucleic acids and oligonucleotides in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 79(2):204-213.
6. Kocic G. et al. Possible Impact of Impaired Double-stranded RNA Degradation and Nitrosative Stress on Immunoinflammatory Cascade in Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009; 117(9): 480-485.
7. Kocic G. et al. Circulating nucleic acids in type 1 diabetes may modulate the thymocyte turnover rate. *Cell Immunol.* 2010; 266 (1):76-82.
8. 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, No. 1. – P. 9-19.
9. Tankibayeva N, Kluev D, Muravleva L, Molotov-Lushanskyi V Determination of extracellular nucleic acids content in blood and urine of patients with tubulopathy and glomerulopathy. Abstracts of the 4th International Congress of Molecular Medicine (27-30 June, 2011. – Istanbul, Turkey) // *In Vivo*, 2011. – V.25, N 3. – P. 561-562.

10. Shereen A. et al. Assessment of Cell-Free DNA with Microvascular Complication of Type II Diabetes Mellitus, Using PCR and Elisa. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2010; V 29, Issue 3. – P. 228-236.

Рецензенты:

Омарова И.М., д.м.н., зав. отделением химиотерапии Карагандинского областного онкологического диспансера, г. Караганда.

Койчубеков Б.К., д.б.н., зав. кафедрой медицинской биофизики и информатики Карагандинского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения республики Казахстан, г. Караганда.