

УДК 577.113.7+616-006.6

# Перераспределение свободных и связанных с форменными элементами циркулирующих ДНК при доброкачественных и злокачественных заболеваниях предстательной железы

О. Е. Брызгунова<sup>1#</sup>, С. Н. Тамкович<sup>1,2\*#</sup>, А. В. Черепанова<sup>1</sup>, С. В. Ярмошук<sup>3</sup>,  
В. И. Пермькова<sup>1</sup>, О. Ю. Анисеева<sup>3</sup>, П. П. Лактионов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

<sup>3</sup>Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

\*E-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru

# Авторы внесли равный вклад.

Поступила в редакцию 03.12.2014

После доработки 19.03.2015

**РЕФЕРАТ** Показано, что концентрация свободно циркулирующих ДНК (сцДНК) в плазме крови коррелирует с концентрацией ДНК, связанных с поверхностью клеток крови (скпДНК). Обратная корреляция между концентрацией сцДНК и активностью дезоксирибонуклеаз крови при отсутствии корреляции между дезоксирибонуклеазной активностью крови и концентрацией скпДНК свидетельствует о том, что нуклеазы крови являются важным регулятором концентрации сцДНК, однако они не гидролизуют скпДНК и не влияют на процесс диссоциации ДНК с клеточной поверхности. Возможность перераспределения молекул ДНК между пулами сц- и скпДНК показывает, что для анализа концентраций маркерных ДНК и нормирования данных предпочтительно использовать общий пул циркулирующих ДНК, состоящий из сц- и скпДНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дезоксирибонуклеазная активность, плазма, рак предстательной железы, циркулирующие ДНК.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** сцДНК – свободно циркулирующие ДНК; скпДНК – связанные с поверхностью клеток ДНК; ОЗПЖ – онкологические заболевания предстательной железы; ФБ-ЭДТА – 10 мМ фосфатный буфер (рН 7.5), содержащий 0.15 М NaCl и 5 мМ ЭДТА.

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в крови здоровых доноров и онкологических больных постоянно циркулируют внеклеточные ДНК. Такие циркулирующие ДНК обнаружены как в составе апоптотических телец, нуклеосом, макромолекулярных белковых комплексов плазмы крови [1, 2], так и на поверхности форменных элементов [1]. Ранее мы показали, что при развитии онкологических заболеваний, таких, как рак молочной железы [3, 4] и легкого [5], увеличивается концентрация сцДНК и снижается концентрация скпДНК. Взаимоотношения этих пулов циркулирующих ДНК исследованы не были.

В представленной работе изучено распределение циркулирующих ДНК между плазмой и поверхно-

стью форменных элементов крови при развитии онкологических заболеваний предстательной железы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы крови здоровых мужчин ( $n = 40$ ) в возрасте 37–71 ( $47.4 \pm 1.3$ ) лет и концентрацией простатспецифического антигена (ПСА), соответствующей клинической норме и не превышающей 2.8 нг/мл, получены из ЦКБ СО РАН. Образцы крови первично обратившихся больных с онкологическими заболеваниями предстательной железы в возрасте 45–84 ( $70.2 \pm 1.4$ ) лет получены из Муниципальной клинической больницы № 1; концентрация ПСА в группе больных с доброкачественной гиперплазией ( $n = 25$ ) и раком ( $n = 16$ ) предстательной железы составила

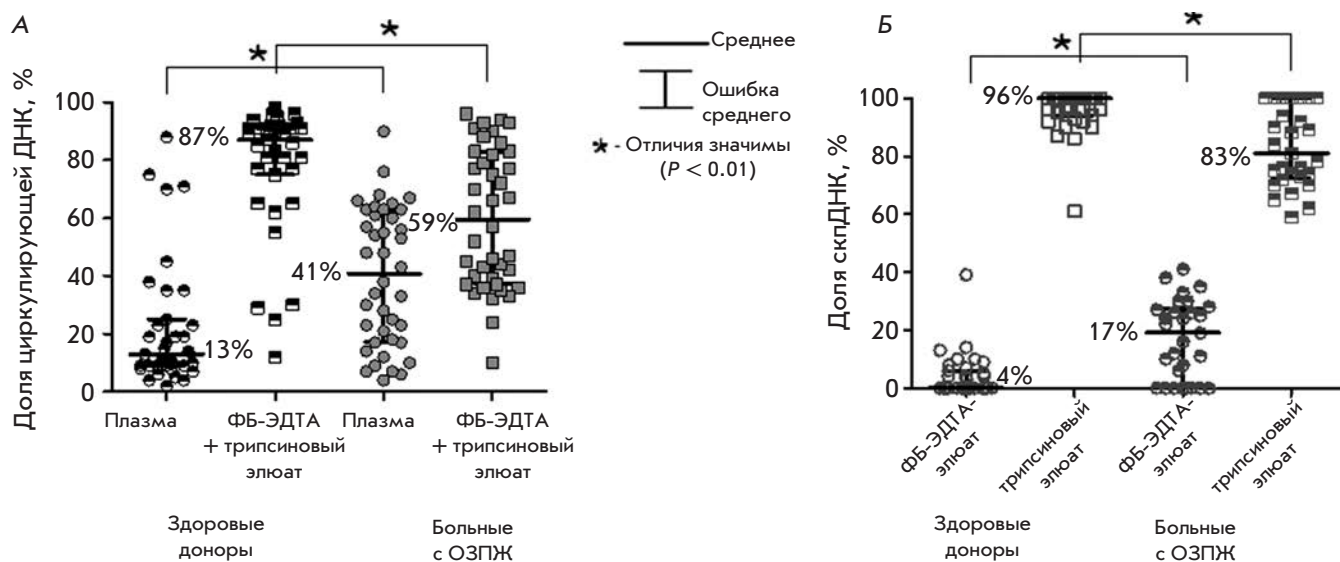


Рис. 1. Относительное содержание сцДНК и скпДНК (А) и скпДНК (Б) в крови здоровых доноров и пациентов с ОЗПЖ

0–31.7 и 0–103.1 нг/мл соответственно (повышена в 36 и 81% случаев). Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан. Стадию заболевания определяли по TNM-классификации.

Сбор и обработку крови, выделение сцДНК из плазмы, скпДНК из ФБ-ЭДТА-элюата и скпДНК из трипсинового элюата с поверхности форменных элементов крови проводили согласно [5]. Концентрацию внеклеточной ДНК определяли при помощи флуоресцирующего интеркалирующего красителя PicoGreen [5]. С учетом соотношения объемов плазмы, элюатов с поверхности клеток крови и суммарного объема крови минимальный уровень ДНК, детектируемой в плазме, составил 0.4 нг/мл крови, в ФБ-ЭДТА-элюате – 2 нг/мл крови и в трипсиновом элюате – 20 нг/мл крови. Интегральную активность ДНКаз в плазме крови здоровых доноров и больных определяли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) как описано в работе [6]. Чувствительность ИФА, определенная как минимальная статистически значимо определяемая активность ДНКазы I в образце, составляла 0.004 ед. акт./мл образца. Коэффициент вариации в каждой точке не превышал 4%.

Результаты обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 5 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и коэффициента корреляции Спирмена.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что в крови здоровых доноров, а также у больных раком легкого [5], желудка

и кишечника [7] постоянно присутствуют циркулирующие ДНК, которые находятся не только в плазме крови, но и входят в состав комплексов, связанных с поверхностью форменных элементов крови. Часть скпДНК диссоциирует после обработки клеток ФБ-ЭДТА-буфером и, по-видимому, связана с фосфолипидами и другими анионами клеточной мембраны через «мостики» из ионов двухвалентных металлов [8] или низкоаффинно, и элюируется в 9 раз большим объемом буфера (по сравнению с объемом плазмы); другая часть скпДНК удаляется с клеточной поверхности при обработке клеток 0.125% раствором трипсина и, по-видимому, входит в состав комплексов с поверхностными белками форменных элементов крови [1].

В представленной работе изучены корреляционные связи между концентрацией сцДНК и скпДНК в крови в норме и при развитии онкологических заболеваний предстательной железы (ОЗПЖ). Поскольку концентрации сцДНК и скпДНК у пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы не отличались статистически значимо от их концентрации в крови больных раком предстательной железы (данные не представлены), эти группы больных были объединены в общую группу пациентов с ОЗПЖ. При оценке отношения концентраций сцДНК и суммарной циркулирующей ДНК всей крови (сц + скпДНК) обнаружено статистически значимое ( $P < 0.01$ ) увеличение доли сцДНК при ОЗПЖ ( $40 \pm 4\%$ ) по сравнению с нормой ( $22 \pm 4\%$ ) (рис. 1А).

Обнаружили, что ФБ-ЭДТА-элюат с поверхности форменных элементов (т.е. «слабо» связанные скпДНК) у здоровых доноров и пациентов с ОЗПЖ содержит  $4 \pm 1$  и  $17 \pm 3\%$  от общего количества свя-

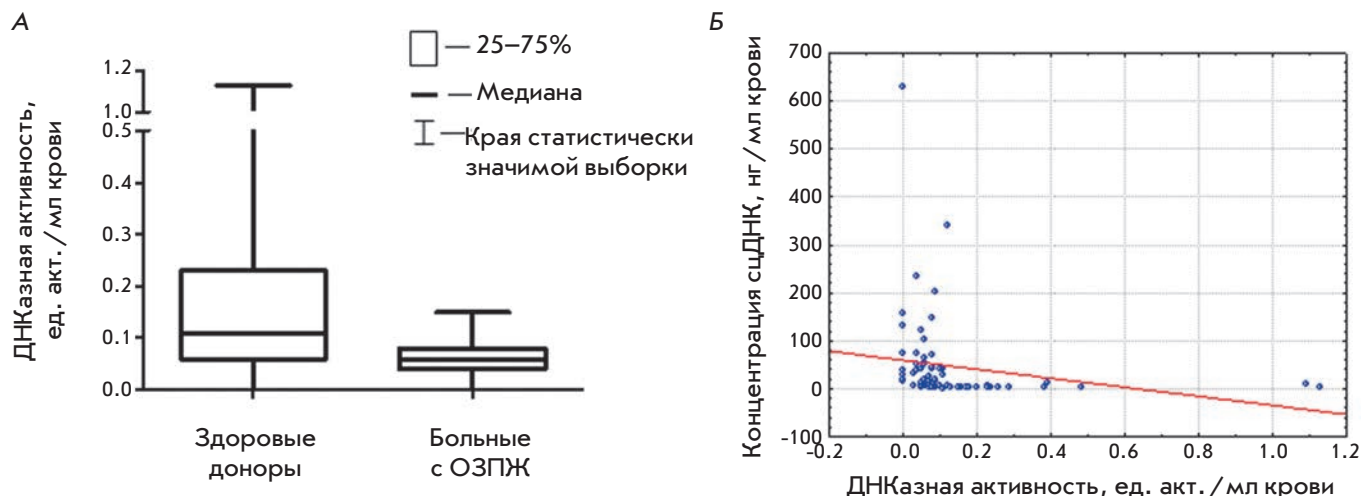


Рис. 2. Активность дезоксирибонуклеаз в плазме крови здоровых доноров и больных с ОЗПЖ (А); зависимость концентрации сцДНК от ДНКазной активности плазмы крови здоровых доноров и пациентов с ОЗПЖ (Б)

занных с клетками крови циркулирующих ДНК соответственно (рис. 1Б), и эти отличия между здоровыми и больными мужчинами статистически значимы ( $P < 0.01$ ).

Обнаруженное нами уменьшение доли скпДНК с одновременным увеличением доли сцДНК в крови при ОЗПЖ может быть следствием гидролиза скпДНК под действием дезоксирибонуклеаз крови. Данные о способности ДНКаз гидролизовать нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью клеток, противоречивы. Одни авторы полагают, что ДНКазы могут гидролизовать скпДНК [9], согласно другим – ДНКазы слабо влияют на концентрацию скпДНК [8, 10].

Активность ДНКаз крови определяли с использованием разработанного ранее иммуноферментного анализа, основанного на гидролизе ПЦР-фрагмента ДНК, модифицированного остатками биотина и флуоресцеина [6]. Определение концентрации сцДНК и активности ДНКаз плазмы крови здоровых доноров и онкологических больных выявило существование заметной (по шкале Чеддока) обратной корреляции между этими параметрами ( $R = -0.57$ ,  $P < 0.01$ ) (рис. 2).

Эти данные показывают, что ДНКазы, несмотря на статистически значимое ( $P < 0.01$ ) снижение их активности в крови больных ОЗПЖ по сравнению со здоровыми донорами (рис. 2), могут гидролизовать сцДНК и, по-видимому, являются одним из факторов негативной регуляции концентрации сцДНК.

Изучение зависимости между активностью ДНКаз плазмы крови и концентрацией скпДНК показало, что активность ДНКаз слабо коррелирует с концентрацией ДНК, связанных с поверхностью форменных элементов за счет ионных взаимодействий, и практически не коррелирует с концентрацией ДНК, связанных

с белками клеточной поверхности ( $R = -0.36$ ,  $P < 0.01$  и  $R = -0.28$ ,  $P < 0.01$  соответственно). Эти данные свидетельствуют о том, что ДНКазы практически не гидролизуют скпДНК, «прочно» связанные с белками клеточной поверхности, не вносят существенного вклада в процесс фрагментации скпДНК, ее диссоциации с поверхности клеток, а концентрация сцДНК не может возрастать за счет гидролиза скпДНК, прочно связанной с клеточной поверхностью.

Данные экспериментов *in vitro* [11] и результаты изучения скпДНК крови (рис. 1) показывают, что основная часть скпДНК удаляется с поверхности клеток при обработке клеток трипсином, т.е. связана с белками клеточной поверхности. Исходя из данных о корреляции между концентрацией скпДНК ФБ-ЭДТА-элюата и активностью ДНКаз, можно предположить, что часть «слабо» связанных скпДНК может обмениваться с ДНК внеклеточной среды и плазмы крови. Подтверждением этого предположения служит заметная (по шкале Чеддока) прямая корреляция между изменением концентрации сцДНК плазмы и концентрации «слабо» связанных скпДНК (ФБ-ЭДТА-элюат) ( $R = 0.67$ ,  $P < 0.01$ ) у пациентов с ОЗПЖ (рис. 3А).

Кроме того, нами обнаружена прямая корреляция между концентрацией скпДНК в ФБ-ЭДТА-элюате и трипсиновом элюате у пациентов с ОЗПЖ ( $R = 0.65$ ,  $P < 0.001$ ) (рис. 3Б), что может свидетельствовать о перераспределении ДНК между этими фракциями скпДНК.

Таким образом, полученные данные указывают на возможность частичного обмена сцДНК и скпДНК крови. Косвенно этот факт подтверждается также данными о размере фрагментов циркулирующей

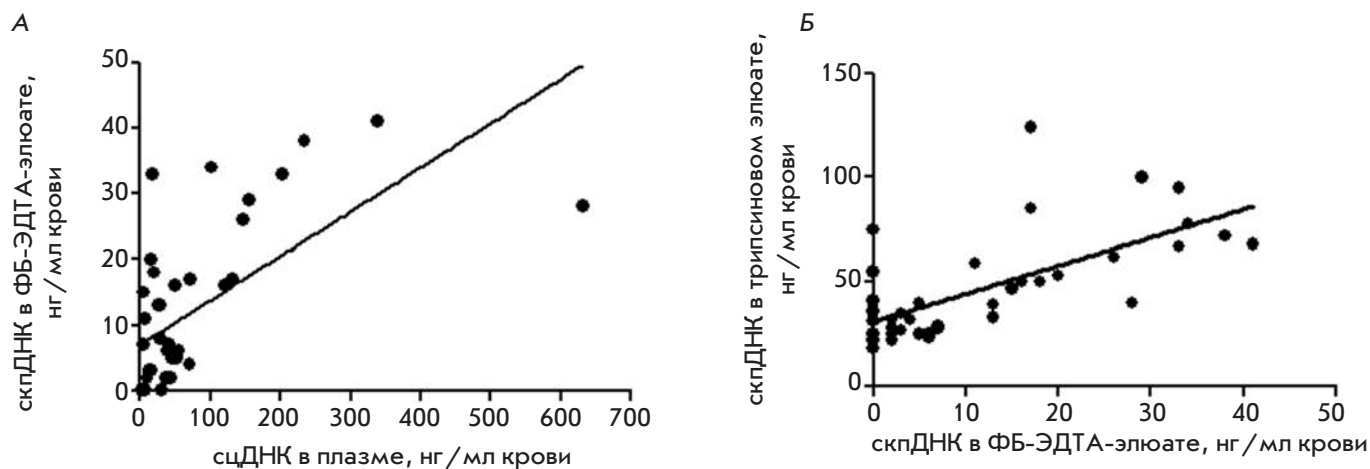


Рис. 3. Зависимость концентрации сцДНК в плазме крови от концентрации скпДНК в ФБ-ЭДТА-элюате (А); зависимость концентрации скпДНК в ФБ-ЭДТА-элюате от концентрации скпДНК в трипсиновом элюате (Б)

ДНК. скпДНК трипсинового элюата представлены преимущественно высокомолекулярной ДНК размером около 10–20 т.п.н., а сцДНК и скпДНК ФБ-ЭДТА-элюата содержат кроме высокомолекулярной ДНК фрагменты размером 200–500 п.н. [3], которые, по-видимому, и могут циркулировать в составе того или другого пула циркулирующих ДНК.

Причины снижения доли скпДНК в общем пуле циркулирующих ДНК в крови больных ОЗПЖ не известны. Вполне вероятно, что они могут быть связаны с изменением строения цитоплазматических мембран клеток крови. Действительно, показано, что при развитии онкологических заболеваний изменяется соотношение липидов в мембранах клеток крови, что приводит к увеличению вязкости липидного бислоя, нарушению межмолекулярных белок-липидных взаимодействий и, как следствие, дезорганизации белкового состава, нарушению функционирования катионтранспортирующих мем-

бранных систем и дезорганизации поверхностной архитектоники клеток [12].

Известно, что пул скпДНК служит ценным источником диагностического материала [4]. Возможность обмена сцДНК и скпДНК позволяет предположить, что в будущем наиболее точная диагностическая информация может быть получена при анализе суммарной циркулирующей ДНК крови. Действительно, при условии, что сцДНК и скпДНК могут обмениваться (и механизмы этого процесса пока неизвестны), для измерения относительных концентраций маркеров правильнее использовать суммарную циркулирующую ДНК крови (сцДНК + скпДНК). ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-01460), БОР (№ VI.62.1.4), а также стипендиями Президента РФ для молодых ученых и аспирантов (СП-1528.2013.4, СП-5711.2013.4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. // Молекуляр. биология. 2008. Т. 42. № 1. С. 12–24.
2. Geary R., Watanabe T., Truong L., Freier S., Lesnik E.A., Sioufi N.B., Sasmor H., Manoharan M., Levin A.A. // Pharm. Exp. Therap. 2001. V. 296. № 3. P. 890–897.
3. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004. V. 1022. P. 221–227.
4. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // Br. J. Cancer. 2006. V. 94. № 10. P. 1492–1495.
5. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyntseva N.V., Laktionov P.P. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1137. P. 214–217.
6. Cherepanova A., Tamkovich S., Pyshnyi D., Kharkova M.,

- Vlassov V., Laktionov P. // J. Immunol. Methods. 2007. V. 325. № 1–2. P. 96–103.
7. Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е., Рыкова Е.Ю., Колесникова Е.В., Шелестюк П.И., Лактионов П.П., Власов В.В. // Биомед. хим. 2005. Т. 51. № 3. С. 321–328.
8. Беляев Н.Д., Будкер В.Г., Горохова О.Е., Соколов А.В. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. С. 1667–1672.
9. Aggarwal S., Wagner R., McAllister P., Rosenberg B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 3. P. 928–932.
10. Dorsch C. // Thromb. Res. 1981. V. 24. № 1–2. P. 119–129.
11. Морозкин Е.С., Сильников В.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В.В., Лактионов П.П. // Бюл. эксп. биол. мед. 2009. Т. 147. № 1. С. 67–70.
12. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Федорова Т.С., Кравец Е.Б., Иванов В.В., Жаворонок Т.В., Часовских Н.Ю., Чудакова О.М., Бугусова В.Н. и др. // Бюл. сиб. медицины. 2006. Т. 2. С. 62–69.