©И.Н. Васильева, В.Г. Беспалов, 2013
УДК 616.006.-577.1

Вопросы онкологии, 2013. Том 59, № 6

И.Н. Васильева, В.Г. Беспалов

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург

Рассматриваются функции внДНК при опухолевом процессе, результаты секвенирования и диагностичекое значение внДНК при онкологических заболеваниях, изменения внДНК при лечении злокачественных опухолей. Приведены примеры определения модифицированных онкоспецифических последовательностей внДНК в клинических целях для диагностики злокачественных новообразований некоторых локализаций. Оценка внДНК может стать информативным молекулярно-биологическим маркером в диагностике и лечении онкологических заболеваний.

Ключевые слова: **внеклеточная ДНК, секвенирование, апоптоз, диагностика и лечение злокачественных опухолей**

Молекулярно-биологические методы все шире используются в онкологии. Одним из актуальных направлений в этой области является определение внеклеточной ДНК (внДНК), история изучения которой насчитывает более 65 лет. В настоящее время исследование внДНК применяется в клинической практике в диагностике и лечении различных заболеваний: онкологических, сердечно-сосудистых, пульмонологических, неврологических, инфекционных, аутоиммунных; внДНК плазмы крови матери используют для определения пола, группы крови и наличия хромосомных болезней плода [2]. В недавних исследованиях были получены новые данные относительно содержания, состава и функции внеклеточных нуклеиновых кислот, говорящие о перспективности их использования в диагностике и лечении онкологических заболеваний.

Цель настоящего обзора состоит в обобщении современных данных об источниках выделения, возможной функции и особенностей строения внДНК онкологических больных, динамике изменения содержания и состава внДНК при прогрессировании онкологических заболеваний и в процессе лечения.

Функции внДНК при опухолевом процессе

Небольшие количества внеклеточной ДНК (внДНК) обнаружены в плазме крови и других биологических жидкостях организма. Инкубация препаратов очищенной ДНК с кровью приводит к быстрому гидролизу ДНК, поэтому возможность циркуляции внДНК обеспечивается связью с белками и липидами или упаковкой в окруженные клеточными и эндоплазматическими мембранами структуры. Время циркуляции ДНК в плазме крови невелико, например, содержание фетальной ДНК в кровотоке матери двукратно уменьшается за 16 мин, а через 2 ч после родов эта фракция исчезает полностью [40]. ДНК выводится из организма при участии печени и почек, при патологических состояниях определяют внДНК в моче [27]. У больных системной красной волчанкой и у онкологических больных повышение содержания внДНК связывают, в том числе, со снижением активности ДНКаз крови [48, 53]. ДНКазной активностью обладают антитела, обнаруженные в крови больных системной красной волчанкой [53] и у здоровых людей [58]. Антитела к ДНК и другим ядерным компонентам обладают высокой специфичностью, различаются в зависимости от разрушаемой ткани и осуществляют клиренс, способствуя макрофагальному захвату продуктов разрушения клеток. Снижение ДНКазной активности у онкологических больных, по-видимому, связано со снижением иммунитета. В то же время, динамика увеличения содержания внДНК в немалой степени зависит от ее выделения в результате гибели клеток [7].

Процесс апоптоза лежит в основе патогенеза многих заболеваний [49]. Онкологические, ревматоидные, пульмонологические и некоторые другие заболевания обусловлены ингибированием апоптоза и могут сопровождаться изменением уровня внДНК. Показано, что в состоянии ремиссии уровень внДНК в плазме крови у больных хронической обструктивной болезнью легких понижен [3]. Численность клеточ-

ной популяции зависит от равновесия процессов пролиферации и гибели клеток. Если на ранних этапах роста опухоли у онкологических больных содержание внДНК может снижаться как признак ингибирования апоптоза, то с прогрессированием опухолевого процесса содержание внДНК растет [2].

В настоящее время обсуждается концепция о том, что опухоли, представляя из себя избыточные клеточные массы, являются результатом древнего эволюционного механизма многоклеточных организмов на пути к экспрессии эволюционно новых генов. При этом высказано предположение о роли внДНК в передаче генетической информации по горизонтали [13].

Внеклеточные ДНК активно выделяются из клеток, разносятся кровотоком к другим клеточным популяциям и проявляют биологическую активность [27, 29]. По данным А.С. Белохвостова с соавт. [6, 16, 57], активное выделение ДНК частично зависит от межклеточного перераспределения Ca2+ и связано с обработкой клеток, в частности, ионофорами Ca2+. В экспериментах показано, что лимфоциты спонтанно выделяют ДНК в среду инкубации в концентрации 0,11 мкг/мл [14]. КоличествоДНК в среде инкубации лимфоцитов не зависит от времени инкубации и от числа погибших клеток. Лимфоциты, отделенные центрифугированием и помещенные вновь в ту же среду, прекращают выделение ДНК; в свежей среде экскреция ДНК продолжается. Имеющиеся данные свидетельствуют о контроле процесса выделения ДНК из делящихся или дифференцирующихся клеток. Выделяемая ДНК переносит сигнал между отдельными клетками и популяциями клеток, меняя их биологию, в основном, двумя путями: участвуя в иммунном ответе или в злокачественной трансформации клеток-мишеней.

Работы ряда авторов подтверждают возможность снижения иммунитета под воздействием внДНК. Показано, что обогащенный нуклеотидами G/C фрагмент транскрибируемой области рибосомного повтора способен накапливаться в составе внДНК. Этот фрагмент стимулирует транскрипцию генов стволовых клеток мезенхимы и ингибирует дифференцировку мезенхимальных клеток в адипоциты, активируя TLR9 и MyD88-зависимые сигнальные систем и действуя подобно экзогенной ДНК бактерий и вирусов [36]. ВнДНК, введенная одновременно с лигандом TLR9, ингибирует продукцию интерлейкинов в первичных эндотелиальных клетках и фибробластах человека [20]. А.В. Ермаков и соавторы [4] впервые обнаружили развитие адаптивного ответа после облучения в малых дозах лимфоцитов человека в фазе Go. Облучение вызвало транспозицию гомологичных участков хромосом в ядре клетки и активацию ядрышко-образующего участка. Эти же реакции наблюдались в необлученных лимфоцитах после добавления к ним внДНК из среды инкубации облученных лимфоцитов. Аналогичный результат, выразившийся в развитии эффекта свидетеля, был получен на монослойной культуре клеток мезенхимы. Необходимым звеном развития эффекта свидетеля является повышение уровня NO и ROS (реактивных форм кислорода) эндотелиальными клетками человека после их облучения. Такое повышение уровня NO и ROS вызывает не только инкубация эндотелиальных клеток с внДНК из среды облученных клеток, но и инкубация с окисленной in vitro ДНК человека. Следовательно, внДНК опосредует развитие эффекта свидетеля и повышение содержания ROS в результате окисления геномной ДНК после облучения клеток. Полагают, что эффект свидетеля частично зависит от TLR9 сигнального пути [36].

ВнДНК может проникать в клетки и в некоторых случаях экспрессироваться в них, вызывая биологическую модификацию реципиентных клеток. Не только опухолевые клетки, циркулирующие в крови, могут давать метастазы, но и ДНК, выделившаяся из опухолевых клеток, может участвовать в опосредовании этого процесса. Показано, что клетки линии SW480 (карцинома человека), имеющие точечные мутации гена K-ras в обоих аллелях, могут выделять виртосомный ДНК/РНК комплекс, содержащий мутантный K-ras. Культивируемые NIH/3T3 клетки, полученные из тканей эмбриона мыши, в присутствии неочищенного супернатанта клеток SW480, содержащего комплекс виртосомы, вызывают появление очага неопластической трансформации. Присутствие мутированного гена ras в очаге трансформации 3T3 клеток подтверждено гибридизационным анализом после амплификации и секвенированием ПЦР-продукта [12]. Аналогичным образом виртосомы, выделенные клетками линии J774 (лейкемия) и клетками P497 (глиальная опухоль), достигают нестимулированных лимфоцитов и стимулируют в них синтез ДНК для клеточного деления [11].

Эти данные подводят к гипотезе геометастазии, заключающейся в том, что ДНК, выделяющаяся из клеток опухоли в кровь, переносится к другим клеткам, возможно, стволовым, которые трансформируются во «вторичную» опухоль [30]. Экспериментальным подтверждением этого предположения являются исследования D.C. Garcia-Olmo с соавт. [31]. В культуру клеток NIH/3T3 вносили образцы плазмы крови больных колоректальным раком, содержащей мутантный K-ras, и образцы плазмы здоровых людей. В стандартные чашки с культурой кле-

ток добавляли плазму больных, во-первых, напрямую, а во-вторых, через мембрану с порами 0,4 мкм для того, чтобы исключить контакт с циркулирующими опухолевыми клетками хозяина. В большинстве экспериментов обнаружен перенос генетического материала человека в культуру NIH/3T3 клеток. В мышиной эмбриональной культуре были обнаружены последовательности генов человека K-ras, p53 и кодирующие последовательности β-глобина. Клетки NIH/3T3 оказались трансформированы после инкубации с плазмой больных колоректальным раком, и инъекция этих клеток вызвала развитие карциномы у мышей линии NOD-SCID. Инкубация плазмы, прошедшей через искусственную мембрану с порами диаметром 0,4 мкм, с клетками NIH/3T3 дала тот же результат, означающий, что размеры трансформирующего фактора меньше, чем 0,4 мкм. Присутствие везикулярных структур такой величины в кровотоке было подтверждено G. Serrano-Heras с соавт. [44].

Обнаружено повышенное выделение ДНК-содержащих частиц у крыс с опухолями и последовательности K-ras в этой ДНК по сравнению с контрольными животными. Полагают, что такая ДНК переносится в кровотоке и может трансформировать клетки. Выделение опухолевой ДНК, связанное с малигнизацией, происходит на ранних стадиях развития опухоли [32]. После инъекции клеток SW480 карциномы человека иммунокомпетентным крысам, подвергнутым канцерогенному воздействию 1,2-диметилгидразина, у них возникала карцинома толстой кишки. Карциномы не развивались в случае введения животным ДНКазы I и протеазы. Опыты подтверждают, что клетки SW480 карциномы человека явились источником онкогенной ДНК в кровотоке. В то же время, в опытах без воздействия 1,2-диметилгидразина не было отмечено злокачественной трансформации [51].

Секвенирование внДНК при онкологических заболеваниях

В настоящее время секвенирована внДНК плазмы крови больных раком простаты [52] и сыворотки крови пациенток, страдающих раком молочной железы [35]. Аналогичные исследования проведены с внДНК здоровых доноров [15], беременных женщин [25], больного системной красной волчанкой [53], среды культивирования апоптотических клеток эндотелия пупочной вены человека — HUVEC [41], а также крыс, облученных в дозах 8 и 100 Гр [55]. Скрининг по банку данных показал, что внДНК гомологична фрагментам генома человека, а секвенированные клоны внДНК облученных крыс гомологичны ДНК грызунов. В составе сиквенсов внДНК больных раком молочной железы не обнаружено фрагментов Y-хромосомы, найденных при аналогичном исследовании больных раком простаты [35,52]. С другой стороны, обнаружен ген вируса гепатита B у одного из доноров, который скрыл это заболевание [15]. Такие находки свидетельствуют о чувствительности исследования внДНК.

К особенностям первичной структуры внДНК относится обогащение нуклеотидами G и C. Содержание G/C-пар в геноме человека составляет 41% [38]. В секвенированной внДНК человека содержание нуклеотидов G+C оказалось выше и составило от 43 до 51% [15, 35, 52, 53]. ВнДНК облученных крыс содержит 48% G/C-пар, при среднем содержании их в геноме грызунов 43% [55]. Такой нуклеотидный состав характерен для хроматина, организованного в виде нуклеосом [50]. Большинство авторов указали, что длина клонированных фрагментов внДНК составила от 40 до 600 пар нуклеотидов, фрагменты ДНК такой длины обычно образуются в результате межнуклеосомной деградации при апоптозе и циркулируют в составе апоптотических телец. Для клонирования низкомолекулярной внДНК облученных животных элюировали ДНК с длиной молекул 160–180 пар нуклеотидов из соответствующего участка геля. Длина вставочных фрагментов в клонах варьировала от 40 до 400 пар нуклеотидов. Длинные фрагменты внДНК могли образоваться в результате слипания коротких при клонировании [55].

ВнДНК больных раком простаты и в группе контроля обнаруживает повышенную способность связывания изоформы K27me2 гистона H3 [52]. Последовательности внДНК беременных женщин сходны с ДНК нуклеосом [25]. ВнДНК облученных крыс содержит сайты формирования стабильных нуклеосом [55].

В составе сиквенсов внДНК больных раком простаты, здоровых доноров, а также среды культивирования HUVEC короткие повторяющиеся элементы Alu представлены в 2–3 раза чаще, чем в ДНК генома [15, 41, 52]. Эти сведения соответствуют результатам гибридизации образцов сыворотки и плазмы крови с ДНК фрагмента Alu [47]. Длинные повторяющиеся LINE-элементы представлены в секвенированной внДНКчеловека в меньших пропорциях, чем в среднем по геному. ДНК среды культивирования HUVEC содержит в 1,4 раза меньше элементов длинных повторов по сравнению с ДНК генома [41]. В некоторых случаях удается найти различия в сиквенсах ДНК, выделенной при принципиально отличающихся состояниях организма. В числе клонов внДНК больных раком простаты клоны LINE-элементов составляют 8%, что меньше, чем в ДНК здоровых доноров — 21%.

В сиквенсах внДНК идентифицированы последовательности длинных концевых повторов — LTR. Участки длинных концевых повторов семейств ERV и ERVL представлены значимо меньше в внДНК больных раком простаты, чем у здоровых людей, и это, как полагают, может лечь в основу диагностики заболевания [52]. Неопределенных фрагментов генома несколько больше во внДНК больных раком простаты: 45% по сравнению с 35% в группе контроля. По-видимому, внДНК онкологических больных содержит некоторое количество специфических последовательностей, выделяемых опухолью. В внДНК облученных крыс клоны фрагментов LINE составляют 15% от общего числа исследованных клонов. После облучения в различающихся дозах (8 и 100 Гр) значимые гомологии в ДНК, клонированной после облучения в дозе 8 Гр, составили 36%, что больше, чем после облучения в дозе 100 Гр (25%) [55].

Применение технологии массового параллельного пиросеквенирования для исследования ткани опухоли 12 больных раком молочной железы и 11 здоровых женщин позволило выявить значительное отличие профиля метилирования ткани опухоли по сравнению с нормальной тканью. Однако, таких отличий не было выявлено в внДНК этих пациенток [35], несмотря на то, что, по данным многих авторов, внДНК больных раком преимущественно метилирована [27]. Метилированию подвергаются сайты, содержащие динуклеотид CpG. Такой процесс в промоторных участках генов ингибирует генную экспрессию и синтез белков. ВнДНК больных системной красной волчанкой, как и внДНК облученных животных, имеет большее содержание динуклеотида CpG по сравнению с ДНК генома [53, 54]. При обеих патологиях секвенированы клоны с последовательностью (CG)n, представляющие CpG-островки. Такие участки относят к простым повторам. ВнДНК онкологических больных содержит 0,48% простых повторов, а в контрольной группе их меньше — 0,37% [52]. FISH-гибридизация ДНК среды культивирования HUVEC показала повышенное содержание участков теломер и центромер, локализованных в С-бандах хромосом [41]. В С-бандах расположен конститутивный хроматин, обычно репрессированный метилированием. В интерфазе такие участки могут прилегать к ядерной мембране и вместе с ней оказаться в апоптотических гранулах. Фрагменты сателлитной ДНК обнаружены в числе клонов внДНК больных раком простаты, из них по сравнению с группой контроля наиболее представлены центромерные участки хромосомы 12, наименее — хромосомы 9, по сравнению с группой контроля [52].

В клинической практике ДНК пациента секвенируют, чтобы охарактеризовать ранее неизвестные мутации. В сиквенсах внДНК онкологических больных обнаружено значительно большее количество мутаций по сравнению с группой, не имеющей онкопатологии [35,52].

Диагностическое значение внДНК в онкологии

ВнДНК онкологических больных представляет собой ДНК генома, которая выделяется из размножающихся неопластических клеток, гибнущей ткани опухоли, из тканей, окружающих опухоль, и в результате нормального обмена тканей. Увеличение содержания внДНК, определяемой различными методами, наблюдают при многих онкологических заболеваниях. Концентрация внДНК в плазме крови здоровых людей находится в пределах 3–44 нг/мл. У пациентов с немелкоклеточным раком легкого содержание внДНК варьирует от 24 до 100–688 нг/мл плазмы. У больных аденокарциномой поджелудочной железы уровень внДНК в плазме крови составил в среднем 568 нг/мл, тогда как у больных хроническим панкреатитом — 343 нг/мл. Уровень внДНК больных колоректальным раком изменяется от 560 нг/мл сыворотки крови в 1-й стадии до 769 нг/мл в 4-й стадии [27]. Содержание суммарной внДНК мало зависит от локализации новообразования, однако увеличивается при метастазировании, изменяется в динамике развития опухоли в зависимости от стадии процесса. ВнДНК считают неспецифическим онкологическим маркером, увеличение содержания этого показателя наблюдают и в других случаях: при ишемии, травме, аутоиммунных заболеваниях, воспалении, тяжелых физических нагрузках, при беременности, а также у пожилых людей [2, 28, 33]. Количественный анализ внДНК применяют в комплексной диагностике в сочетании с другими клиническими данными или специфическими онкомаркерами.

ВнДНК онкологических больных состоит из фракций: высокомолекулярной — 21–80 тысяч пар нуклеотидов и низкомолекулярной, нуклеосомной — 160–180 пар нуклеотидов [6, 46]. При исследовании плазмы крови и асцитной жидкости крыс с перевитой гепатомой Зайделла, мышей с перевитой опухолью Эрлиха, а также крыс, подвергнутых воздействию облучения, было установлено, что содержание ДНК плазмы крови увеличивается за счет низкомолекулярной фракции [16]. Уровень низкомолекулярной внДНК повышен через 2 ч после облучения животных, достигает максимума через 5 ч, а спустя 24 ч достоверно снижен [57].

Кроме ДНК, свободно циркулирующей в бесклеточной части крови, существует фракция ДНК, связанная с поверхностью лейкоцитов и эритроцитов. Распределение внДНК между плазмой крови и поверхностью форменных элементов может быть различным. Среди здоровых доноров суммарный уровень связанных с поверхностью клеток нуклеиновых кислот у мужчин выше, чем у женщин. Снижение содержания связанных с поверхностью клеток нуклеиновых кислот у пациентов с раком желудка и толстой кишки, раком молочной железы, немелкоклеточным раком легких свидетельствует о плохом прогнозе. Полагают, что внДНК образует сеть для уничтожения бактерий, находясь в комплексе с белками Ku70 и Ku80 поверхности клеточной мембраны [19]. В дополнение к выше сказанному, среднее содержание ДНК плазмы крови увеличено у больных раком желудка и толстой кишки до 150 нг/мл, раком молочной железы — до 484 нг/мл, а у больных немелкоклеточным раком легких не отличается от контроля [9, 10, 43]. Значимое снижение уровня внДНК наблюдают у больных неопухолевыми заболеваниями легких. У пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в состоянии ремиссии уровень низкомолекулярной внДНК снижен до 7,8 нг/мл плазмы крови, в отличие от 23,5 нг/мл у больных хроническим необструктивным бронхитом в ремиссии и 28,4 нг/мл у здоровых людей [3]. Нормальные и пониженные значения внДНК соответственно, у больных с онкологическими заболеваниями легких и хронической обструктивной болезнью легких, по-видимому, связаны с ингибированием апоптоза. У больных немелкоклеточным раком легких мутации в онкогенах K-Ras и EGRF, как полагают, коррелируют с низкой выживаемостью [17]. Для повышения чувствительности оценки эффективности терапии и прогноза онкологических больных разрабатывают методы анализа соотношения фрагментов ДНК после проведения ПЦР с праймерами к Alu-повторам. В составе амплифицированной внДНК анализируют содержание фракций ДНК, содержащих 400–180 и менее 150 пар нуклеотидов [39]. Амплификация с праймерами к онкогенам c-Myc, BCAS1 и HER2 позволила обнаружить значимое повышение содержания внДНК в моче больных раком простаты, что может служить маркером для диагностики заболевания [18].

Возможности минимально инвазивной диагностики злокачественных опухолей с использованием внДНК

Кровью снабжаются все системы организма, поэтому внДНК может поступать в кровяное русло от любого внутреннего органа. Подсчитано, что опухоль весом 100 г состоит из 3×10^{10} опухолевых клеток, и около 3,3% ДНК опухоли может выделяться в кровь каждый день [23]. Эта ДНК в плазме крови составляет пул для исследований изменений в генах опухолевой супрессии и опухолевого роста без взятия тканевой биопсии. ВнДНК служит субстратом для определения точечных мутаций, анализа микросателлитов, характеризующих потерю гетерозиготности, связанную с изменением локализации генов, и изменения эпигенетической модификации генома, вызванной метилированием промоторов генов.

Мутантный ras был одним из первых генов, обнаруженных в ДНК плазмы крови, при обследовании больных острым миелоидным лейкозом [56]. Выбор гена связан с высокой частотой его мутаций на раннем этапе малигнизации. Значительная часть мутаций сосредоточена в кодонах 12 и 13 второго экзона и кодоне 61 третьего экзона генов K-ras, N-ras и H-ras. Определение трансверсии T-A, вызывающей аминокислотную замену в 15 экзоне гена B-Raf каскада ras, применяют в клинике для мониторинга и лечения больных метастатической меланомой. Уровень внДНК с мутацией повышен в наиболее тяжелых случаях болезни [45]. Мутации во фрагментах 11 и 15 экзонов B-Raf обнаружены в ткани опухоли у 92% больных меланомой, 85% больных дифференцированным раком щитовидной железы, 50% больных раком толстой и прямой кишки, 15% пациентов с саркомой мягких тканей и у 4% больных злокачественными глиомами. В ДНК плазмы крови идентичные мутации выявлены с частотой около 50%, в ДНК слюны — примерно в 25% случаев, причем не отмечаются ложноположительные результаты [5]. Наличие мутации в 12 кодоне K-ras внДНК выявлено у 21,4% больных раком яичника; мутация гена p53 обнаружена во внДНК этих пациенток на поздних стадиях рака; данные изменения внДНКсвидетельствуют о плохом прогнозе [24]. При сравнительно невысокой чувствительности, определение мутаций в внДНК биологических жидкостей имеет высокую специфичность, связанную с отсутствием ложноположительных результатов. Внедрение таких технологий, как аллель-специфическая ПЦР, позволит повысить чувствительность исследования.

Микросателлиты, повторяющиеся последовательности 5–6 нуклеотидов или динуклеотидов в некодирующих областях, используют для определения локализации генов опухолевой супрессии. Потеря гетерозиготности, ассоциированная с маркером D6S1581 в промоторе M6P/IGF2R (ген маннозо-6-фосфат-инсулинподобного рецептора роста 2) и маркером D10S1765 гена

PTEN (PI3K-Akt-сигнальный путь), коррелирует с ответом на химиотерапию и выживаемостью больных раком яичника [37]. Среди лиц азиатской расы у 96,7% обследованных больных с плоскоклеточным раком пищевода обнаружено изменение одного или нескольких микросателлитных повторов в ДНК сыворотки крови. Использование панели из 12 маркеров, которые характеризовали положение p16 на хромосоме 9, p53 на хромосоме 17, DPC4 на хромосоме 18 и APC на хромосоме 5, позволило выявить опухоль на ранней стадии [21]. В сыворотке крови пациентов с плоскоклеточным раком пищевода гиперметилирование промоторов четырех генов — антагонистов Wnt — значимо коррелирует с рецидивом заболевания. Ген Wnt опосредует межклеточную сигнализацию и активацию поверхностных рецепторов окружающих клеток, вызывая траскрипцию факторов регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток [21]. Определение гиперметилирования промотора гена SEPT9 внДНК лежит в основе набора, разработанного для диагностики колоректального рака. Метод, апробированный на когорте из более 5000 пациентов, показал высокую специфичность. Увеличение содержания внДНК, оцениваемое ПЦР, с фрагментами гена β-актина, обнаружено только на IV стадии колоректального рака; оценка полученных после амплификации трех репликатов SEPT9 позволяет диагностировать ранние стадии болезни [22].

Изменения внДНК при лечении злокачественных опухолей

ДНК может выделяться из клеток, гибнущих в результате апоптоза и некроза; клетки выделяют экзосомы, в которых цитоплазма окружена эндоплазматической мембраной. В циркуляции обнаружена митохондриальная ДНК, которая выделяется из гибнущих клеток, но в ряде случаев она катапультируется живыми клетками. ДНК выделяется в виде транспозонов. Существует пул синтезированной ДНК, которая находится в комплексе с РНК и липопротеидами и представляет собой новый цитоплазматический компонент, названный виртосомой [28]. Уровень внДНК в плазме или сыворотке крови отражает процессы апоптоза различных тканей [2]. Большинство применяемых сегодня противоопухолевых препаратов, а также лучевая терапия, вызывают гибель опухолевых клеток в результате апоптоза [8]. Повышение уровня внДНК в сыворотке или плазме крови в ранние сроки после введения противоопухолевых препаратов или облучения может стать информативным тестом определения индивидуальной чувствительности опухоли к химиотерапии или лучевой терапии. ВнДНК можно определять также, например, в асцитической жидкости у больных с канцероматозом брюшины, вызванным диссеминацией рака яичника и опухолей желудочно-кишечного тракта, в качестве теста чувствительности к интраперитонеальной или системной химиотерапии [1, 6].

В настоящее время определение содержания нуклеосомной внДНК успешно применяют для ранней оценки эффективности терапии онкологических больных не только после ее завершения, но и в процессе лечения [33]. Снижение концентрации нуклеосомной внДНК после завершения курса терапии и повышение в процессе лечения позволяет оценить эффективность трансартериальной химиоэмболизациии селективной радиационной терапии с использованием микросфер, меченных Yttrium-90 [26]. У пациентов с метастазами в печени или первичным раком печени наблюдается увеличение концентрации свободных нуклеосом в крови через 4 ч после проведения лучевой терапии, а у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой — через 24–48 ч после цитостатической терапии, что свидетельствует об эффективности лечения [26, 34]. Высокий уровень нуклеосомной внДНК до начала терапии и повышение уровня нуклеосомной внДНК после завершения курсов терапии свидетельствуют о негативном прогнозе [33].

Для изучения клональной эволюции и селекции прогрессирующей опухоли в результате терапии необходима серия биопсий до начала лечения и в различные моменты после проведения курсов терапии. Исследование внДНК больных позволяет избежать инвазии при взятии биопсии и ошибок, связанных с гетерогенностью опухоли. Технология массового параллельного секвенирования экзонов внДНК больных прогрессирующим раком молочной железы, яичников и легких, наблюдавшихся в течение 1–2 лет, позволила выявить увеличение количества мутаций в связи с появлением устойчивости к терапии [42]. Анализ мутантных аллелей внДНК и ДНК опухолевой ткани в ряде случаев показал их идентичность. Кроме случайных мутаций, выделен ряд генов, мутации которых четко ассоциированы с проведением лекарственной терапии. Например, на 20% увеличено появление мутантного аллеля PIK3CA (каталитическая субъединица альфа фосфатидилинозитол-3-киназы) после лечения паклитакселом, на 8% — RB1 (ретинобластома-1) после лечения цисплатином, на 11% — MED1 (медиаторный комплекс, субъединица 1) после лечения тамоксифеном, трастузумабом и лапатинибом, на 24% — GAS6 (ген, специфично останавливающий рост) в тех же случаях. В некоторых случаях были выявлены вновь появившиеся мутантные аллели. Например, обнаружена мутация гена EGRF (вариант

T790M), характеризующая ингибирование связывания клеткой лекарственной формы гефитиниба, и мутация гена p53, появившаяся после лечения этим препаратом [42]. Следовательно, лекарственная терапия приводит к изменению генома прогрессирующей опухоли, что может быть зафиксировано в процессе изучения внДНК.

Заключение

Феномен циркуляции внДНК может быть использован для различных целей в научной и практической онкологии. ВнДНК способна менять биологию клеток, связываясь с рецепторами на поверхности или трансформируя клетки. ВнДНК онкологических больных представляет собой ДНК генома, но имеет некоторые особенности: больше точечных мутаций и меньше фрагментов длинных повторов, чем в ДНК генома. На базе фундаментальных и прикладных исследований внДНК разработаны и уже используются в клинике методы диагностики некоторых злокачественных опухолей. Содержание внДНК увеличивается по мере прогрессирования опухоли, что может использоваться для оценки прогноза, диагностики рецидивирования и метастазирования злокачественных новообразований. Повышение уровня внДНК в плазме или сыворотке крови или асцитической жидкости, как показатель апоптоза опухолевых клеток в результате лечения, дает возможность ранней оценки эффективности химиотерапии или лучевой терапии. Развитие методологии исследования внДНК послужит основой для дальнейшей разработки минимально инвазивной диагностики злокачественных новообразований и определения индивидуальной чувствительности опухоли к противоопухолевым препаратам или лучевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беспалов В.Г., Жабин А.А., Стуков А.Н. и др. Синергизм противоопухолевого действия диоксадэта и цисплатина на модели асцитной опухоли яичника // Сиб. онкол. журнал. — 2013. — № 1. — С. 42–46.
2. Васильева И.Н. Внеклеточная низкомолекулярная ДНК крови в диагностике и лечении различных заболеваний // Медлайн экспресс. — 2013. — № 1. — С. 73–79.
3. Васильева И.Н., Ивчик Т.В., Вознюк И.А. Роль низкомолекулярной фракции ДНК в диагностике патологического процесса при радиационном поражении и некоторых заболеваниях // Мол. медицина. — 2011. — № 5. — С. 132–135.
4. Ермаков А.В., Костюк С.В., Еголина Н.А. и др. Сигнализация между лимфоцитами человека после индукции эффекта свидетеля воздействием ионизирующей радиации в адаптирующих дозах // Радиац. биол. Радиоэкол. — 2007. — Т. 47, № 6. — С. 650–657.
5. Зарецкий А.Р., Рогожина Е.М., Дрозд О.В. и др. Анализ мутаций в генах ras-каскада для диагностики, мониторинга и подбора терапии при некоторых видах злокачественных опухолей: диагностический потенциал и методические особенности // Молекулярная диагностика-2010: Сборник трудов VII Всерос. научно-практ. конф. / Под ред. В.И. Покровского. — М., 2010. — Т. 4. — С. 66–72.
6. Зеленкова Н.К., Белохвостов А.С., Липова В.А. и др. Нуклеиновый фактор в асцитической жидкости при опухолях яичника человека // Вопр. онкол. — 1980. — Т. 26, № 8. — С. 45–48.
7. Зинкин В.Н., Васильева И.Н., Вознюк И.А. Определение внеклеточной низкомолекулярной ДНК в крови как диагностический метод для клинических и экспериментальных исследований // Авиакосм. и экол. мед. — 2011. — Т. 45, № 5. — С. 47–51.
8. Стуков А.Н., Гершанович М.Л., Беспалов В.Г. и др. Классификация противоопухолевых препаратов // Медлайн экспресс. — 2012. — № 2. — С. 20–24.
9. Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е., Рыкова Е.Ю. и др. Циркулирующие нуклеиновые кислоты в крови больных раком желудка и толстой кишки // Биомед. химия. — 2005. — Т. 51, № 3. — С. 321–328.
10. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Брызгунова О.Е. и др. Уровень внеклеточных нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью форменных элементов крови, в диагностике рака молочной железы // Мол. медицина. — 2005. — № 2. — С. 46–50.
11. Adams D.H., Diaz N., Gahan P.B. In vitro stimulation by tumour cell media of [3H]-thymidine incorporation by mouse spleen lymphocytes // Cell Biochem. Funct. — 1997. — Vol. 15. — P. 119–126.
12. Anker P., Lyautey J., Lefort F. et al. Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation // C R Acad Sci III. — 1994. — Vol. 317. — P. 869–874.
13. Anker P., Stroun M. Circulating nucleic acids and evolution // Expert Opin. Biol. Ther. — 2012. — Vol. 12 (Suppl. 1). — P. 113–117.
14. Anker P., Stroun M., Maurice P.A. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown an in vitro system // Cancer Res. — 1975. — Vol. 35. — P. 2375–2382.
15. Beck J., Urnovitz H.B., Riggert J. et al. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals // Clin. Chem. — 2009. — Vol. 55. — P. 730–738.
16. Belokhvostov A.S., Zelenkova N.K. Low-molecular weight nucleic acids in the blood of rats Zajdela's hepatoma // Cancer Lett. — 1978. — Vol. 5. — P. 351–356.
17. Cabral R.E.C., Cabral Neto J.B., Costa Carvalho M.G. Circulating DNA as a biomarker for early detection of cancer: a brief update with an emphasis on lung cancer // Open Lung Cancer J. — 2010. — Vol. 3. — P. 38–44.
18. Casadio V., Calistry D., Salvi S. et al. Urine cell-free DNA integrity as a marker for early prostate cancer diagnosis: a pilot study // Biomed. Res. Int. — 2013. — Vol. 2013. — Article Id 270457.
19. Cherepanova A.V., Bushuev A.V., Duzhak T.G. et al. Ku protein as the main cellular target of cell-surface-bound circulating DNA// Expert Opin. Biol. Ther. — 2012. — Vol. 12 (Suppl. 1). — P. 35–41.
20. Cherepanova A.V., Bushuev A.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-surface-bound DNA inhibits poly (I:C)-activat-

ed IL-6 and IL-8 production in human primary endothelial cells and fibroblasts // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. by P.B. Gahan. — Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011. — P. 207–211.

21. Chorbian S., Ardekani A.M. Non-invasive detection of esophageal cancer using genetic changes in circulating cell-free DNA // Avicenna J. Med. Biotechnol. — 2012. — Vol. 4. — P. 3–13.
22. DeVos T., Tetzner R., Model F. et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer // Clin. Chem. — 2009. — Vol. 55. — P. 1337–1346.
23. Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutants in the plasma of patients with colorectal tumors // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102. — P. 16368–16373.
24. Dobrzycka B., Terlicowski S.J., Kinalski M. et al. Circulating free DNA and p53 antibodies in plasma of patients with ovarian epithelial cancers // Ann. Oncol. — 2011. — Vol. 22. — P. 1133–1140.
25. Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U. et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — V. 105. — P. 16266–16271.
26. Fehr Y., Holdenrieder S., Hoffman R.T. et al. Circulating nucleosomes in cancer patients with liver metastases undergoing selective internal radiation therapy using Yttrium-90 labelled microspheres // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. by P.B. Gahan. — Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011. — P. 91–96.
27. Fleischhaker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — a survey // Biochim. Biophis. Acta. — 2007. — Vol. 1775. — P. 181–232.
28. Gahan P.B. Biology of circulating nucleic acids and possible roles in diagnosis and treatment in diabetes and cancer // Infect. Disord. Drug Targets. — 2012. — Vol. 12. — P. 360–370.
29. Gahan P.B., Stroun M. The virtosome — a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger // Cell Biochem. Funct. — 2010. — Vol. 28. — P. 529–538.
30. Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J. et al. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis // Histol. Histopatol. — 1999. — Vol. 14. — P. 1159–1164.
31. Garcia-Olmo D.C., Dominguez C., Garcia-Arranz M. et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70. — P. 560–567.
32. Garcia-Olmo D.C., Picazo M.G., Toboso I. et al. Quantitation of cell-free DNA and RNA in plasma during tumor progression in rats // Mol. Cancer. — 2013. — Vol. 12:8.
33. Holdenrieder S., Stiber P. Clinical use of circulating nucleosomes // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. — 2009. — Vol. 46. — P. 1–24.
34. Kohles N., Nagel D., Jungst D. et al. The course of circulating nucleosomes in liver cancer patients undergoing transarterial chemoembolization therapy // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. by P.B. Gahan. — Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011. — P. 73–78.
35. Korshunova Y., Maloney R.K., Lakey N. et al. Massive parallel bisulphate pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA // Genome Res. — 2008. — Vol. 18. — P. 19–29.
36. Kostyuk S.V., Ermakov A.V., Alekseeva A.Y. et al. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endotheliocytes // Mutat. Res. — 2012. — Vol. 729. — P. 52–60.
37. Kuhlmann J.D., Schwarzenbach H., Wimberger P. et al. LOH at 6q and 10q in fractionated circulating DNA of ovarian cancer patients is predictive for tumor cell spread and overall survival // BMC Cancer. — 2012. — Vol. 12:325.
38. Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. — 2001. — Vol. 409. — P. 860–921.
39. Lehner J., Stötzer O.J., Ferschibg D.M. et al. Plasma DNA integrity indicates response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally confined breast cancer // Int. J. Clin. Pharm. Ther. — 2013. — Vol. 51. — P. 59–62.
40. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N. et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma // Am. J. Hum. Genet. — 1999. — Vol. 64. — P. 218–224.
41. Morozkin E.S., Loseva E.M., Morozov I.V. et al. A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing // Expert Opin. Biol. Ther. — 2012. — Vol. 12 (Suppl. 1). — P. 11–17.
42. Murtaza M., Dawson S.J., Dana W.Y. et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA // Nature. — 2013. — Vol. 497. — P. 108–112.
43. Ponomareva A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.A. et al. Concentration and distribution of single-copy β-actin gene and LINE-1 repetitive elements in blood of lung cancer patients // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. by P.B. Gahan. — Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011. — P. 41–45.
44. Serrano-Heras G., Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C. Microvesicles circulating in plasma of rats contain DNA. Are these small vesicles a main sours of cell-free DNA in plasma? // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. by P.B. Gahan. — Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011. — P. 234–244.
45. Shinozaki M., O'Day S.J., Kitago M. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy // Clin. Cancer Res. — 2007. — Vol. 13. — P. 2068–2074.
46. Stroun M., Anker P., Lyautey J. et.al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients // Eur. J. Cancer Clin. Oncol. — 1987. — Vol. 23. — P. 707–712.
47. Stroun M., Lyautey J., Lederrey C. et al. Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2001. — Vol. 945. — P. 258–264.
48. Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V. et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2006. — Vol. 1075. — P. 191–196.
49. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease // Science. — 1995. — Vol. 267. — P. 1456–1462.
50. Tillo D., Hughes T.R. G+C content dominates intrinsic nucleosome occupancy // BMC Bioinformatics. — 2009. — Vol. 10:442.

51. Trejo-Becerril C., Perez-Cardenas E., Taja-Chayeb L. et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model // PLoS One. — 2012. — Vol. 7:e52754.
52. Van der Vaart M., Semenov D.V., Kuligina E.V. et al. Advanced analysis of human plasma circulating DNA sequence produced by parallel tagged sequencing on the 454 platform // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / Ed. by P.B. Gahan. — Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011. — P. 35–40.
53. Van Helden P.D. Potential Z-DNA-forming elements in serum DNA from human systemic lupus erythematosus // J. Immunol. — 1985. — Vol. 134. — P. 177–179.
54. Vasilyeva I.N. Low-molecular-weight DNA in blood plasma as an index of the influence of ionizing radiation // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2001. — Vol. 945. — P. 221–228.
55. Vasilyeva I.N., Zinkin V.N. The value of blood plasma low-molecular-weight DNA for diagnostics of pathological processes of different genesis // Biochemistry Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. — 2012. — Vol. 6, No. 3. — P. 278–287.
56. Vasioukhin V., Anker P., Maurice P. et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia // Br. J. Haematol. — 1994. — Vol. 86. — P. 774–779.
57. Vladimirov V.G., Belokhvostov A.S., Sherlina S.S. et al. Extracellular DNA level in the blood of irradiated rats // Int. J. Radiat. Biol. — 1992. — Vol. 62. — P. 667–671.
58. Zaichik A.Sh., Churilov L.P., Utekhin V.J. Autoimmune regulation of genetically determined cell functions in health and disease // Pathophysiology. — 2008. — Vol. 15. — P. 191–207.

Поступила в редакцию 20.05.2013