

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

УДК ВМ 07-337

©Коллектив авторов

ФРАГМЕНТЫ ТРАНСКРИБИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ РИБОСОМНОГО ПОВТОРА В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК – МАРКЕР ГИБЕЛИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА

Н.Н. Вейко^{1}, Н.В. Булычева¹, О.А. Рогинко², Р.В. Вейко¹, Е.С. Ершова¹,
О.А. Коздоба², В.А. Кузьмин³, А.М. Виноградов³, А.А. Юдин², А.И. Сперанский⁴*

¹ГУ Медико-генетический научный центр, РАМН, 115478 Москва,
ул. Москворечье, д.1, ribgene@rambler.ru

²Центральная клиническая больница РАН, 117593, Москва, Литовский бульвар, д. 1а

³Институт биохимической физики им. Н.Н. Эмануэля РАН, 119334, Москва,
ул. Косыгина, д. 4

⁴ГУ Институт ревматологии РАМН, 115522, Москва, Каширское шоссе, д. 34а

Предложен новый способ оценки уровня гибели клеток в организме человека при острых и хронических патологических процессах, которые сопровождаются усиленным апоптозом и/или некрозом клеток. Способ основан на анализе свойств внеклеточной ДНК (вкДНК) сыворотки (плазмы) периферической крови, таких как концентрация вкДНК, концентрация фрагментов транскрибируемой области рибосомного повтора (ТОрДНК), содержание ТОрДНК в составе вкДНК, и анализе факторов, влияющих на элиминацию вкДНК из организма (нуклеазная активность крови, выработка и связывание антител с ДНК). Показано, что при остром инфаркте миокарда (ОИМ) в крови в среднем в 5 раз по сравнению с нормой (здоровые доноры) возрастает концентрация вкДНК и в 12 раз - концентрация ТОрДНК. При хроническом течении ишемической болезни сердца (ИБС) концентрация вкДНК существенно не отличается от нормы, но выявляется повышенное содержание ТОрДНК в составе вкДНК (в 4,8 раза) и увеличенная концентрация ТОрДНК в сыворотке (в 7 раз). Вероятной причиной накопления ТОрДНК во вкДНК является обнаруженная ранее устойчивость ТОрДНК к двуниевым разрывам, вносимым эндонуклеазами крови. При остром и хроническом течении ИБС значительно увеличена нуклеазная активность крови и повышено количество антител к фрагментам ТОрДНК, большая часть которых связана с вкДНК. Высказывается предположение, что фрагменты ТОрДНК могут быть не только маркерами усиленной гибели клеток при определенной патологии, но и выступать в роли факторов стресс – сигнализации при ответе организма на гибель клеток.

Ключевые слова: рибосомные гены, внеклеточная ДНК (cell free DNA), эндонуклеазная активность, острый инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца.

ВВЕДЕНИЕ. При некоторых формах патологии и при повреждающих клетки внешних воздействиях, как правило, увеличивается количество гибнущих клеток организма. Фрагменты ДНК погибших клеток поступают в кровь и могут быть определены в плазме или сыворотке. Эта ДНК получила название внеклеточной ДНК (вкДНК) или свободно циркулирующей ДНК (cell free DNA). Анализ вкДНК оказался информативным в онкологической практике, в пренатальной диагностике, в травматологии и т.д. [1]. Исследования направлены

* - адресат для переписки

НОВЫЙ МАРКЕР ГИБЕЛИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА

на развитие нетравматичных методов как для определения мутаций в конкретных последовательностях генома опухоли или плода, так и для определения уровня гибели клеток в организме.

Концентрация вкДНК является маркером гибели клеток при процессах, которые сопровождаются апоптозом и/или некрозом большого числа клеток организма в короткие промежутки времени. Например, при развитии острого инфаркта миокарда (ОИМ) уровень гибели клеток можно оценить, определив концентрацию вкДНК [2], которая заметно возрастает в первые часы после инфаркта. Однако, при накоплении в крови значительных количеств вкДНК, в организме активируются механизмы, направленные на удаление из кровообращения вкДНК. Так, при ОИМ одновременно с увеличением концентрации вкДНК, в крови наблюдается значительное возрастание эндонуклеазной активности [3], приводящее к деградации вкДНК. Низкомолекулярные фрагменты вкДНК реутилизируются клетками или выводятся почками. Наряду с этим, вкДНК может выводиться из организма в виде иммунных комплексов с антителами, которые, как известно, вырабатываются к фрагментам вкДНК [4].

При развитии длительного хронического процесса, например, при ишемической болезни сердца (ИБС), не осложненной ОИМ, концентрация вкДНК не всегда является маркером уровня гибели клеток организма, поскольку активированные системы элиминации снижают количество циркулирующей в организме вкДНК, даже если уровень гибели клеток увеличен по сравнению с нормой. Ранее авторами было обнаружено, что ДНК человека содержит участки, повышенно устойчивые к фрагментации при накоплении однонитевых разрывов, вносимых эндонуклеазами и повреждающими агентами различной природы. Одна из таких последовательностей генома человека – транскрибируемая область рибосомного повтора (ТОрДНК) [5]. Благодаря устойчивости к образованию двунитевых разрывов, высокомолекулярные фрагменты ТОрДНК накапливаются во вкДНК крови даже в условиях повышенной нуклеазной активности [6]. Мы предположили, что ТОрДНК может служить маркером гибели клеток организма при неострых процессах, которые на ранней стадии клинически не всегда проявляются.

Цель данной работы заключается в проверке высказанного предположения и разработке подходов к оценке характера патологического процесса в случае ИБС и ОИМ по изменению состава вкДНК и по изменению количественных характеристик факторов, влияющих на элиминацию вкДНК из организма. В результате проведенного исследования показано, что определение в сыворотке крови больных ИБС концентраций вкДНК и ТОрДНК, содержания ТОрДНК во вкДНК, эндонуклеазной активности и титра антител к фрагментам вкДНК позволяет сделать выбор в пользу одного из состояний: (1) длительно протекающий хронический процесс, при котором развиваются компенсаторные реакции, направленные на элиминацию избытка вкДНК (ИБС), или (2) переход хронического процесса в острый, при котором гибнет большое количество клеток за короткий промежуток времени (ИБС, осложненная ОИМ).

МЕТОДИКА. Для настоящего исследования использовали сыворотку больных, находящихся на обследовании и лечении в кардиологическом отделении Центральной клинической больницы РАН. Все больные длительно страдали ИБС и артериальной гипертонией 2 и 3 степени. После клинического отбора были сформированы две подгруппы больных: (1) больные острым инфарктом миокарда, который развился на фоне ИБС (4 мужчины и 3 женщины, средний возраст больных – 78 ± 7 лет); (2) больные хронической ишемической болезнью сердца (6 мужчин и 5 женщин, средний возраст больных 75 ± 7 лет). В качестве отрицательного контроля использовали группу практически здоровых доноров (11 мужчин и 7 женщин в возрасте от 21 до 76 лет, средний возраст 38 ± 16 лет, см. рис. 1). Сыворотку периферической крови получали не позднее, чем через 3 часа после развития ОИМ.

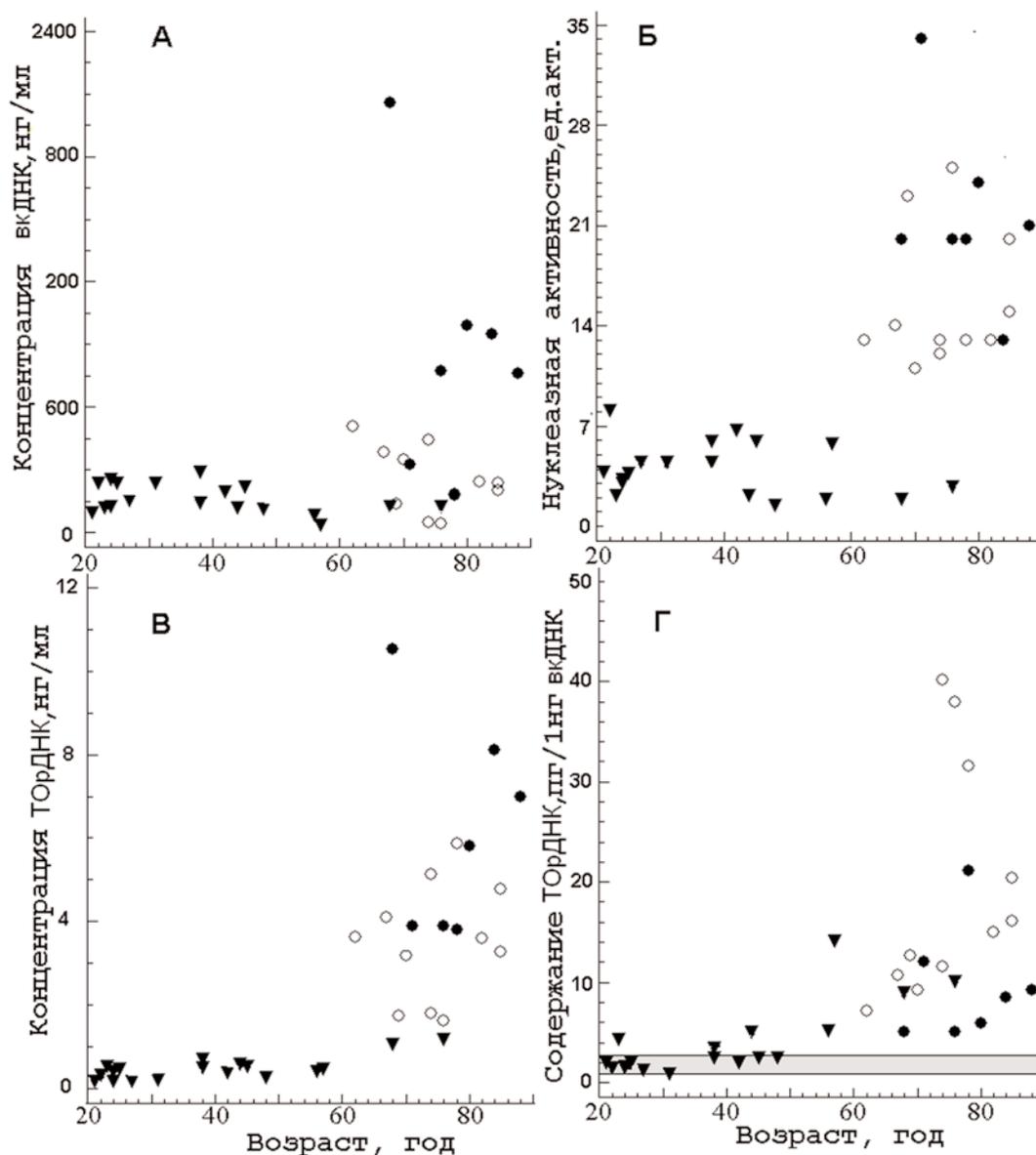


Рисунок 1.

Изменение концентрации вкДНК сыворотки (А), нуклеазной активности (Б), концентрации ТОРДНК (В) и содержания ТОРДНК в составе вкДНК (Г) в зависимости от возраста индивида. Обозначения: здоровые люди (черные треугольники), больные хронической формой ИБС (светлые кружки), больные ОИМ (черные кружки). Заштрихованная область (Г) – обозначены интервалы варьирования содержания ТОРДНК в составе геномной ДНК человека.

Определение концентрации вкДНК в сыворотке. К 0,5 мл сыворотки (для каждого образца – две параллельные пробы) добавляли 100 мкл лизирующего буфера (0,25 М ЭДТА, 5% лаурилсаркозилат натрия) и РНКазу А (75 мкг/мл), инкубировали 1 час при 37°C. Добавляли протеиназу К (200 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 24–48 часов. Далее проводили стандартную процедуру фенольной экстракции. При хорошем протеиназном гидролизе обязательно должен отсутствовать белый осадок на границе раздела фаз,

НОВЫЙ МАРКЕР ГИБЕЛИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА

в противном случае выход вкДНК снижается. ДНК осаждали этанолом в присутствии носителя (tРНК *E. coli*) и 2 М ацетата аммония, осадок промывали 75% водным раствором этанола. ВкДНК растворяли в 30 мкл воды.

Измерение концентрации вкДНК проводили стандартным методом флуоресценции связанного с ДНК красителя Hoechst 33528 на приборе “LS 55” (“PerkinElmer”, Англия). Чтобы избежать влияния возможных белковых примесей на флуоресценцию вкДНК в комплексе с красителем, флуоресценцию измеряли до и после исчерпывающего гидролиза вкДНК ДНКазой 1. Относительная стандартная ошибка метода измерения концентрации составляет 3%. Относительная стандартная ошибка определения концентрации вкДНК в сыворотке определяется, в основном, процедурой выделения ДНК и составляет $12 \pm 5\%$ от измеряемой величины.

Определение концентрации ТОрДНК в сыворотке крови проводили методом нерадиоактивной количественной дот-гибридизации выделенной и денатурированной щелочью вкДНК с биотинилированным зондом на ТОрДНК (плаزمид р18S-рДНК, вектор рВR322, вставка: участок от 515 до 5321 нуклеотида, HSU 13369, GeneBank). Все особенности методики описаны ранее [7]. Для воспроизводимости результатов важен тип фильтра (Hybond ExtraС, “Amersham”, Англия). Для каждого образца вкДНК на фильтр наносили 5–7 пятен. Биотин выявляли с помощью конъюгата стрептавидин – щелочная фосфатаза (“Sigma”, США). Использовали субстрат для фосфатазы BCIP в присутствии NBT, который образует нерастворимый осадок (“Sigma”). Для построения калибровочной зависимости, связывающей количество последовательности в пробе и гибридационный сигнал, использовали два стандартных фрагментированных образца геномной ДНК с определенным ранее содержанием ТОрДНК [8]. Внесено только одно изменение. Интегральную интенсивность окрашенных пятен (гибридационный сигнал) определяли компьютерным анализом изображения фильтра с помощью специально написанной одним из авторов на языке Delphi программы “Images 6.0”. Программа позволяет определить среднее значение и стандартное отклонение интенсивностей пятен для каждого образца ДНК. Показана хорошая линейная корреляция ($k = 0,98$, $p < 0,001$, $n = 32$) между ранее используемым спектрофотометрическим методом определения интенсивности осадка [8] и методом, примененным в данной работе. Количество ТОрДНК в нанесенной пробе вкДНК рассчитывали на всю транскрибируемую область (фрагмент длиной 13314 п.н.). Относительная стандартная ошибка метода определения количества ТОрДНК в образце составляет 7–10%. Ошибка в определении концентрации ТОрДНК в сыворотке составляет $15 \pm 5\%$ и определяется процедурой выделения вкДНК.

Содержание ТОрДНК в 1 нг вкДНК вычисляли путём деления значений концентрации ТОрДНК в сыворотке на концентрацию вкДНК. Для определения стандартной ошибки измерения содержания ТОрДНК суммировали экспериментальные погрешности, определенные при анализе концентраций вкДНК и ТОрДНК в одном и том же образце сыворотки. Относительная стандартная ошибка определения содержания ТОрДНК во вкДНК варьировала от 15 до 25% от полученных значений.

Определение нуклеазной активности проводили с использованием модельного субстрата – комплекса однострессовой ДНК с 30-звенным олигонуклеотидом, содержащим на 5'-конце флуоресцентную группу (5(6)-карбокситиофламин), а на 3'-конце тушитель флуоресценции (ВНQ1, “Синтол”, Москва, РФ). При эндонуклеазном гидролизе наблюдается увеличение флуоресценции красителя. Метод подробно описан ранее [9]. Для калибровки использовали стандартный раствор ДНКазы 1. Калибровочная кривая связывает величину разгорания флуоресценции красителя с концентрацией ДНКазы 1 в растворе. Результат приводится в единицах ДНКазной активности. 1 единица соответствует активности ДНКазы 1, взятой в концентрации 1 нг/мл (1 час, 37°C).

Относительная стандартная ошибка метода – 5%. Параллельно нуклеазную активность определяли с помощью метода радиальной диффузии, который хорошо зарекомендовал себя при анализе нуклеазной активности крови больных с ОИМ [3]. Была получена хорошая корреляция ($p < 0,01$) между значениями, определенными с помощью двух методов.

Определение содержания антител к ДНК человека и к ТОрДНК в сыворотке.

Использовали стандартную методику, разработанную ранее [10]. Полистирольные планшеты фирмы Costar обрабатывали протаминсульфатом для увеличения сорбции ДНК. Мишенью для антител служила геномная ДНК, ограниченно фрагментированная с помощью ДНКазы 1, и линейаризованная плазида р18S-рДНК, содержащая фрагмент ТОрДНК. Антитела, связавшиеся с ДНК, выявляли с помощью вторичных антител к Fc-фрагментам иммуноглобулина G, конъюгированных с пероксидазой хрена (ООО “Вектор-бест”, Новосибирск, РФ). Пероксидазную активность выявляли стандартной реакцией с тетраметилбензидином. Поглощение (450 нм) измеряли на приборе “Эффос 9305”, РФ. В качестве контроля использовали стандартизированную сыворотку, полученную от нескольких здоровых доноров, взятую в последовательных разведениях. За единицу содержания антител принимали активность стандартизированной сыворотки в соответствующем разведении, оценённую по светопоглощению в относительных единицах. Относительная стандартная ошибка метода $8 \pm 6\%$. Общее количество антител в сыворотке определяли после исчерпывающего гидролиза вкДНК в сыворотке ДНКазой 1, методика описана в [4].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Statgraphics. Средние значения величин сравнивали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ. У больных ОИМ и хронической ИБС, а также у практически здоровых доноров из сыворотки периферической крови была выделена и очищена от примесей РНК и белков внеклеточная ДНК. Определены свойства вкДНК сыворотки: общая концентрация фрагментов, концентрация ТОрДНК в сыворотке, весовое содержание фрагментов ТОрДНК в 1 нг вкДНК. Системы элиминации вкДНК из организма охарактеризованы двумя параметрами – эндонуклеазной активностью сыворотки и содержанием свободных и связанных с вкДНК антител к геномной ДНК человека и к фрагментам ТОрДНК. Определенные трудности возникли с выбором контрольной группы. Поскольку ИБС – заболевание, ассоциированное с возрастом, то разумно было бы в контрольную группу включить доноров того же возраста, что и больные (лица старше 60 лет). С другой стороны, после 60 лет в организме даже практически здоровых людей могут иметь место скрытые и очень разнообразные хронические процессы, ассоциированные со старением (атеросклероз, артриты, иммунные нарушения и т.д.), которые сопровождаются увеличением гибели клеток без клинических проявлений. Чтобы оценить вклад в изменение свойств вкДНК больных основного заболевания (ИБС), в контрольную группу были включены здоровые люди разного возраста (от 21 до 76 лет).

Концентрация вкДНК в сыворотке крови. На рисунке 1А приводится зависимость от возраста концентрации вкДНК в сыворотке здоровых доноров, больных хронической ИБС и ОИМ. В таблице даны интервалы варьирования и средние значения концентраций, определенные для контрольной группы (строка №1 в табл., на рис. 1А - треугольники), для всей группы больных ИБС (строка №4 в табл.), отдельно, для больных с ОИМ (№ 3 в табл., чёрные кружки на рис. 1А) и больных хронической ИБС (№2 в табл., светлые кружки на рис. 1А). В контрольной группе концентрация вкДНК варьируют от 34 до 287 нг/мл сыворотки. Наблюдается тенденция к снижению концентрации вкДНК с возрастом донора (коэффициент линейной регрессии, $k = -0,46$, $p = 0,08$, $n = 18$). Анализ литературных данных о концентрации вкДНК здоровых людей выявил различия значений этого параметра в работах разных авторов, что связано с использованием

НОВЫЙ МАРКЕР ГИБЕЛИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА

разных методов определения концентрации ДНК. При применении метода флуоресценции комплексов ДНК с красителем определяемые концентрации вкДНК выше [11], чем при использовании метода количественной ПЦР [2]. На наш взгляд, при использовании метода ПЦР для определения общей концентрации вкДНК и концентрации отдельных ее последовательностей не учитываются некоторые факторы. Во-первых, вкДНК содержит значительное количество одно- и двунитевых разрывов, которые влияют на количество нарабатываемых фрагментов. Количество разрывов в анализируемом фрагменте и в контрольном фрагменте может быть различным. Нуклеазная активность крови различных индивидов варьирует, что приводит к неодинаковой фрагментации образцов вкДНК. Во-вторых, для калибровки используется образец геномной ДНК, выделенной из клеток. Однако ряд данных [6, 12], в том числе и настоящее исследование, указывают на то, что по содержанию различных последовательностей вкДНК отличается от геномной (ядерной) ДНК одного и того же индивида. Содержание анализируемого фрагмента во вкДНК может в несколько раз отличаться от содержания в ядерной ДНК. Метод определения общей концентрации вкДНК с помощью флуоресценции также не свободен от недостатков. В ходе анализа мы установили, что примерно 10% образцов вкДНК содержат примеси гликопротеина, который взаимодействует с красителем. Во избежание ошибок в определении концентрации вкДНК, анализ флуоресценции комплекса ДНК-краситель проводили до и после исчерпывающего гидролиза вкДНК ДНКазой 1.

Таблица. Средние значения и интервалы варьирования концентраций вкДНК и ТОрДНК в сыворотке, содержания ТОрДНК в 1 нг вкДНК, эндонуклеазной активности (НА) сыворотки крови здоровых и больных ИБС людей.

№	Состояние	Концентрация вкДНК, нг/мл	Концентрация ТОрДНК, нг/мл	Содержание ТОрДНК, пг/нг вкДНК	НА, ед. акт.
1	Физиологическое (здоровые люди, n=18)	34 – 287 (161 ± 70)	0,2 – 1,2 (0,5 ± 0,3)	0,9 – 14,1 (4,0 ± 3,6)	1,5 – 8,1 (4,0 ± 1,9)
2	Хроническая патология (ИБС, n=11)	42 – 509 (252 ± 154)	1,6 – 5,9 (3,5 ± 1,4)	7,1 – 40,2 (19,3 ± 1,8)	11,0 – 25,0 (15,6 ± 4,8)
3	ИБС, осложненная ОИМ (n=7)	180 – 2054 (862 ± 608)	3,8 – 10,5 (6,1 ± 2,6)	5,0 – 21,1 (9,6 ± 5,7)	13,0 – 34,0 (21,7 ± 6,3)
4	Все больные ИБС (n=18)	42 – 2054 (489 ± 488)	1,6 – 10,5 (4,5 ± 2,3)	5,0 – 40,2 (18,0 ± 6,1)	11,0 – 34,0 (18,0 ± 6,1)

Примечание: в скобках приведены средние величины ± стандартное отклонение.

У больных хронической формой ИБС средние значения концентраций вкДНК достоверно не отличаются от концентраций вкДНК в сыворотке здоровых доноров ($t = 2,18 < 2,77$, $p = 0,03$, $Df = 27$). У больных ОИМ концентрация вкДНК увеличена в несколько раз по сравнению со здоровыми донорами ($t = 4,97 > 2,8$, $p \ll 0,001$, $Df = 23$) и больными хронической формой ИБС ($t = 3,2 > 2,9$, $p = 0,005$, $Df = 16$). Таким образом, значимое повышение количества вкДНК наблюдается только в сыворотке больных ОИМ, когда в короткий срок происходит гибель большого числа клеток организма. Аналогичный вывод сделали авторы работы [2], предложив использовать концентрацию вкДНК в качестве маркера ОИМ.

Чтобы определить являются ли погибшие кардиомиоциты основным источником вкДНК при хронической ИБС и ОИМ, мы сравнили значения концентраций вкДНК и активности классических маркёров некротического синдрома (сердечные тропонины и МВ фракция креатинфосфокиназы, МВКФК). Не было обнаружено значимых корреляций между значениями концентрации вкДНК и содержанием в сыворотке крови каждого из перечисленных белков. Однако следует отметить, что высокие концентрации вкДНК при ОИМ (более 300 нг/мл, для 6 больных из 7) соответствуют присутствию в крови повышенных количеств, как минимум, одного из биомаркеров. У больного ОИМ с низкой концентрацией вкДНК (180 нг/мл сыворотки) содержание маркеров было в пределах нормы.

Эндонуклеазная активность (НА) крови – один из основных факторов, способствующих уменьшению концентрации вкДНК. На рисунке 1Б приведены значения НА, полученные для здоровых доноров и для больных ИБС, в таблице – средние значения НА в указанных группах. В контрольной группе не наблюдается зависимости НА от возраста. Для всех больных ИБС характерно увеличение НА по сравнению с контролем ($t = 9,3 > 3,6$, $p \ll 0,001$, $Df = 34$). Максимально высокие значения НА определяли в сыворотках больных с ОИМ (рис. 1Б, табл.), однако средние значения НА у больных хронической ИБС и ОИМ различаются недостоверно ($t = 2,2 < 3,2$, $p = 0,05$, $Df = 16$). На рисунке 2 приводятся зависимости концентрации вкДНК от значений НА в группе здоровых доноров (А) и в группе больных ИБС (Б). Зависимости очень различаются. Для 17 из 18 доноров наблюдается положительная линейная корреляция между НА и концентрацией вкДНК ($k = 0,68$, $p = 0,002$, $n=17$). У одного донора (обозначен как №18) высокие значения НА соответствовали очень низкой концентрации вкДНК (34 нг/мл). В группе больных ИБС концентрации вкДНК не зависят от НА ($k = 0,08$, $p = 0,8$, $n=18$). Полученный результат можно объяснить тем, что у здоровых людей уровень экспрессии эндонуклеаз или белков-ингибиторов эндонуклеазной активности, по-видимому, регулируется количеством вкДНК, циркулирующей во внеклеточном пространстве. Чем больше количество вкДНК, тем выше уровень активности эндонуклеаз. При патологическом процессе, сопровождающимся гибелью клеток, количество вкДНК возрастает, стимулируя увеличение НА до предельных значений (20–35 ед. акт.), характерных для данного организма. Дальнейшее увеличение количества вкДНК, в том числе и при переходе хронического процесса (хроническая коронарная недостаточность) в острый (ОИМ) не приводит к существенному росту НА.

Концентрация в сыворотке крови фрагментов ТОрДНК. Рибосомный повтор человека (42999 п.н., рис. 3), представленный в геноме человека тандемными повторами (300–700 копий в диплоидном ядре), содержит транскрибируемую область и нетранскрибируемый межгенный спейсер. Повтор локализован в коротких плечах акроцентрических хромосом (13, 14, 15, 21 и 22). Транскрибируемая область включает гены рРНК и 4 спейсера (см. рис. 3). На рисунке 1В и в таблице приведены данные о концентрации ТОрДНК в сыворотке крови. Концентрация ТОрДНК в крови здоровых людей варьирует от 0,2 до 1,2 нг/мл сыворотки, причем наблюдается корреляция с возрастом донора ($k = 0,74$, $p < 0,001$, $n=18$). У больных ИБС концентрация ТОрДНК в крови повышается ($t = 7,5 > 3,6$, $p \ll 0,001$, $Df = 34$). Особенно высокие количества

НОВЫЙ МАРКЕР ГИБЕЛИ КЛЕТКИ ОРГАНИЗМА

ТОрДНК (7 – 10 нг/мл) детектируются в сыворотке некоторых больных ОИМ (рис. 1В), однако различия между средними значениями концентраций ТОрДНК для больных хронической формой ИБС и ОИМ недостоверны ($t = 2,5 < 3,6$, $p = 0,03$, $Df = 16$). Таким образом, в отличие от общей концентрации вкДНК, концентрация ТОрДНК повышена не только при остром, но и при хроническом течении заболевания.

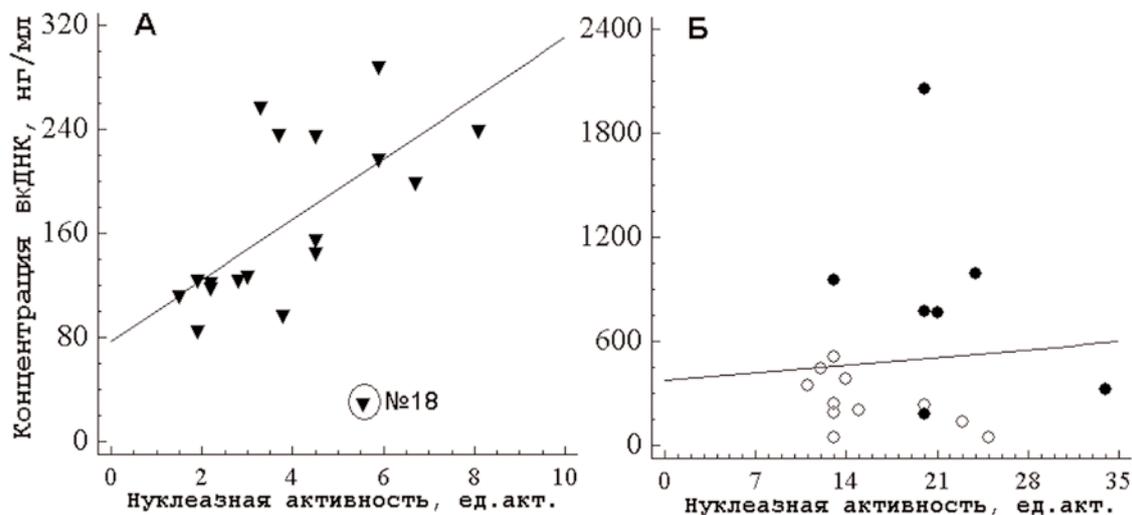


Рисунок 2.

Зависимость концентрации вкДНК от значений нуклеазной активности в сыворотке для здоровых (А) и больных ИБС (Б) людей. Обозначения – см. рис.1. Кругом обведена точка для донора № 18, который отличался по свойствам вкДНК от всей выборки и не был включен в регрессионный анализ.

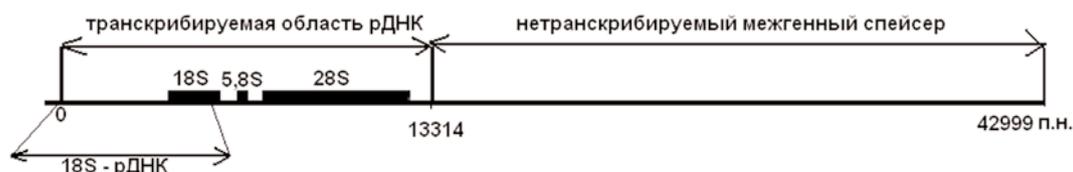


Рисунок 3.

Схема рибосомного повтора человека и используемый в работе зонд на ТОрДНК.

Мы проанализировали, как связаны между собой концентрации вкДНК и ТОрДНК в группе здоровых доноров и больных ИБС (рис. 4А,Б). У здоровых людей концентрации ТОрДНК в сыворотке не зависят от общей концентрации фрагментов вкДНК ($k = -0,04$, $p = 0,9$, $n = 18$). Для больных хронической формой ИБС наблюдается более выраженная зависимость количества ТОрДНК в сыворотке от общего количества фрагментов вкДНК ($k = 0,54$, $p = 0,09$, $n = 11$). У больных ОИМ высокие концентрации ТОрДНК обусловлены прежде всего увеличением общей концентрации вкДНК ($k = 0,89$, $p < 0,01$, $n = 7$).

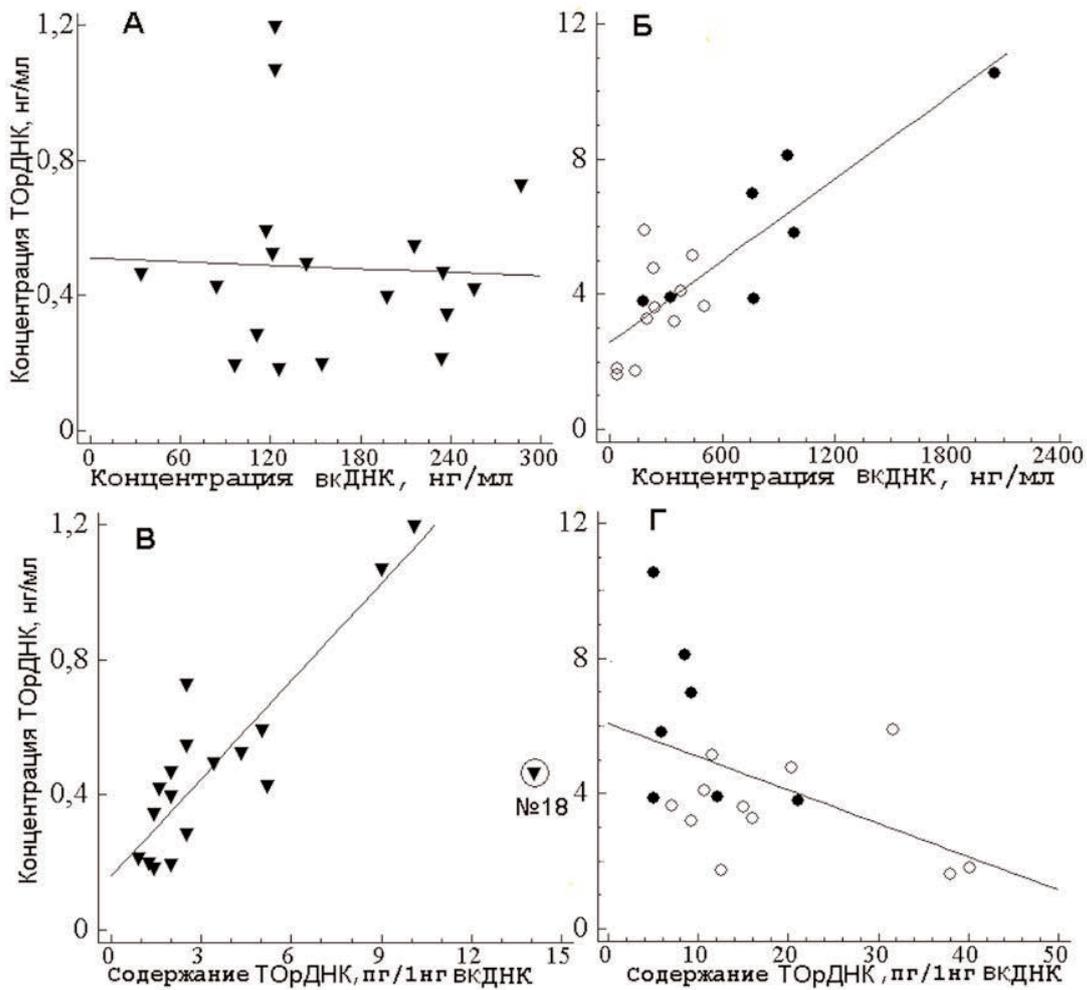


Рисунок 4.

Зависимость концентрации ТОрДНК в сыворотке здоровых (А,В) и больных ИБС (Б,Г) людей от концентрации вкДНК (А, Б) и от содержания ТОрДНК в 1 нг вкДНК (В, Г). Обозначения – см. рис. 1. Кружком обведена точка для донора № 18, который отличался по свойствам вкДНК от всей выборки и не был включен в регрессионный анализ.

Содержание фрагментов ТОрДНК в составе вкДНК. Этот параметр интересен тем, что позволяет проанализировать изменения состава вкДНК по сравнению с составом ДНК, функционирующей в клеточном ядре. На рисунке 1Г и в таблице приведены данные о содержании ТОрДНК во внеклеточной ДНК здоровых доноров и больных ИБС людей. На рисунке показана область варьирования содержания ТОрДНК в составе геномной ДНК, выделенной из ядра клетки. Согласно нашим данным [7], в геноме человека содержание ТОрДНК изменяется от 0,90 до 2,90 пг на 1 нг геномной ДНК (среднее $1,78 \pm 0,40$, $n = 286$). Интервалы варьирования содержания ТОрДНК в составе вкДНК гораздо шире (рис. 1Г): у здоровых людей - от 0,9 до 14 пг/нг вкДНК, причем с возрастом этот показатель увеличивается ($k = 0,77$, $p < 0,001$, $n = 18$). У всей группы больных ИБС содержание ТОрДНК варьирует от 5 до 40 пг/нг вкДНК. У больных ОИМ средние значения содержания ТОрДНК во вкДНК ниже, чем у больных хронической формой ИБС (рис. 1Г, табл.). Таким образом, при неостром процессе, в том числе и при старении, наблюдается обогащение вкДНК фрагментами ТОрДНК. При развитии ОИМ содержание ТОрДНК снижается. Для 17 из 18 здоровых доноров (рис. 4В) прослеживается значимая положительная корреляция между содержанием ТОрДНК во вкДНК и концентрацией ТОрДНК в сыворотке ($k = 0,89$,

НОВЫЙ МАРКЕР ГИБЕЛИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА

$p < 0,0001$, $n = 17$). Для донора №18 наблюдали аномально высокие значения содержания ТОрДНК на фоне высоких значений НА и низких концентраций вкДНК (см. рис. 2А). Для больных ИБС (рис. 4Г) обнаружена слабо выраженная отрицательная зависимость между концентрацией ТОрДНК в сыворотке крови и содержанием ТОрДНК во вкДНК ($k = -0,47$, $p = 0,05$, $n = 18$). Очевидно, что концентрации ТОрДНК в сыворотке крови здоровых людей определяются не общим количеством вкДНК, но зависят от содержания ТОрДНК в составе вкДНК.

Антитела к тотальной ДНК и к фрагментам ТОрДНК в сыворотке крови.

Образование иммунных комплексов с антителами – один из путей элиминации фрагментов вкДНК из организма. Ранее мы показали, что сыворотка крови человека содержит антитела к ТОрДНК, которые по свойствам отличаются от антител к геномной ДНК при аутоиммунной патологии. При этом не было обнаружено специфичных антител к другим анализируемым повторам генома человека (гистоновые гены или сателлит III). Антитела циркулируют в крови в свободном состоянии и в комплексе с фрагментами вкДНК [4].

Количество свободных антител мы оценили методом ИФА на полистирольных носителях (рис. 5А). В качестве мишени использовали неденатурированные образцы геномной ДНК или линейаризованную плазмиду p18S-рДНК, содержащую фрагмент ТОрДНК (рис. 3). Общее количество антител к ДНК и ТОрДНК было определено после исчерпывающего гидролиза вкДНК сыворотки ДНКазой 1 (рис. 5Б). Как следует из рис. 5А, количества свободных антител к геномной ДНК и к ТОрДНК в образцах сыворотки здоровых людей и больных ИБС существенно не различаются. Общее содержание антител, однако, существенно выше в сыворотке больных ИБС, чем в сыворотке здоровых доноров. В комплексе с вкДНК больных ИБС находится $(61 \pm 5)\%$, $n = 18$, антител, вырабатываемых против суммарной ДНК и $(62 \pm 6)\%$, $n = 18$, антител против фрагментов ТОрДНК. Для здоровых доноров этот показатель в несколько раз ниже: связанные с вкДНК антитела против ДНК – (от 0 до 30%, $n = 5$), антитела против ТОрДНК – $26 \pm 14\%$, $n = 5$.

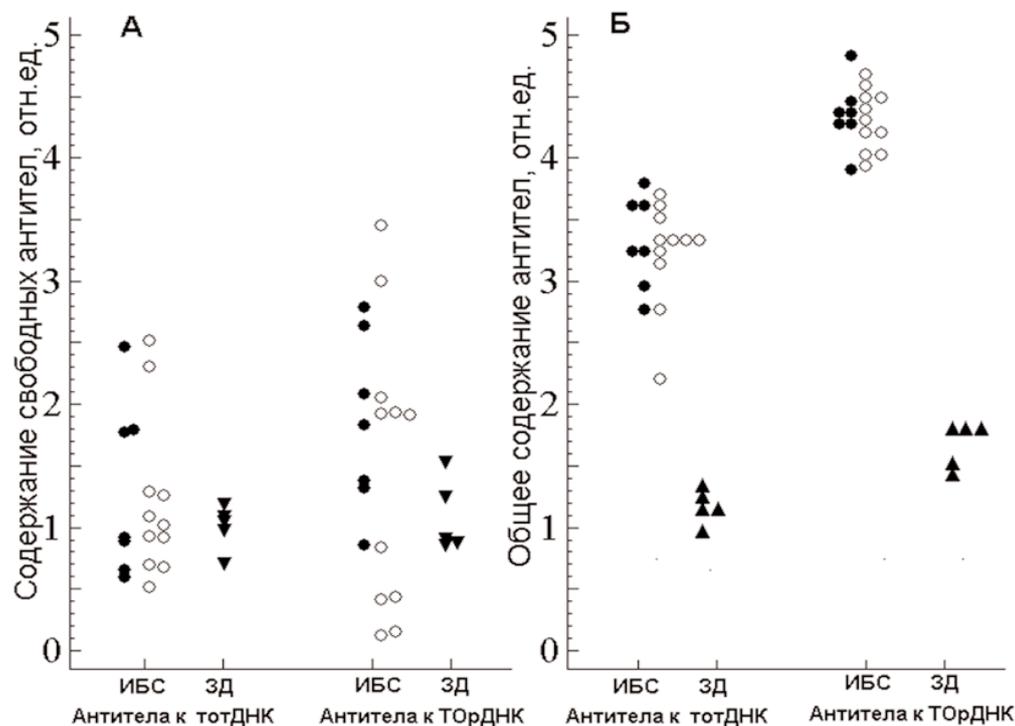


Рисунок 5.

Содержание свободных антител (А) и общее содержание антител (Б) к ДНК и ТОрДНК в сыворотках здоровых (обозначение ЗД на рисунке) и больных ИБС людей (обозначение ИБС). Обозначения – см. подписи к рисунку 1.

У всех больных ИБС количество связанных с вкДНК и количество свободных антител к тотДНК (ТОрДНК) не зависит от общей концентрации вкДНК, концентрации ТОрДНК или нуклеазной активности. Наблюдается отрицательная корреляция между содержанием ТОрДНК во вкДНК и свободными антителами к тотальной ДНК ($k = -0,50$, $p = 0,017$, $n = 18$) или ТОрДНК ($k = -0,53$, $p = 0,02$, $n = 18$) и положительная зависимость между содержанием ТОрДНК и долей связанных антител к ДНК ($k = 0,41$, $p = 0,09$, $n = 18$) или ТОрДНК ($k = 0,51$, $p = 0,03$, $n = 18$). Таким образом, увеличенное содержание ТОрДНК в составе вкДНК сопоставимо с увеличением связывания антител сыворотки с ТОрДНК и тотДНК. Иными словами: чем сильнее изменяется состав вкДНК, тем большее количество антиДНК - антител сыворотки связывается с этой ДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. Одной из важнейших характеристик гомеостаза является поддержание определённого соотношения между пролиферацией и гибелью клеток – фундаментальными характеристиками высших организмов, необходимыми для нормального развития и функционирования. Осуществляемая в норме физиологическая гибель клеток чаще всего реализуется через энергозависимую реакцию – апоптоз. При течении патологического процесса, сопровождающегося клеточной активацией, либо при действии внешних повреждающих факторов усиливается доля гибнущих клеток за счёт апоптоза и/или некроза. Появление в крови маркёров клеточной гибели является результатом преобладания процессов гибели над процессами репарации тканей при патологическом процессе, что само по себе важно как для дополнительной характеристики патологического процесса, так и для коррекции тактики лечения патологического процесса. Выявление маркёров клеточной гибели должно всегда трактоваться с учетом направленности патологического процесса: динамики его течения, выраженности остроты состояния либо хронизации.

С точки зрения интенсивности гибели клеток процессы в организме условно можно разделить на три типа: 1. Острое состояние, возникающее в здоровом организме (травма, инфекция и т.д.) или на фоне хронического процесса (инсульт, ОИМ и т.д.). При этих состояниях гибнет много клеток в короткие промежутки времени, и в кровь поступает значительное количество вкДНК. Системы элиминации вкДНК из крови, либо пока не активированы, либо не справляются с возросшей нагрузкой: в крови детектируются увеличенные концентрации всех фрагментов вкДНК (см. схему на рис. 6). 2. Неострый хронический процесс, при котором увеличивается количество гибнущих клеток, однако системы элиминации активируются и компенсируют поступление в кровь избыточных количеств вкДНК (атеросклероз, хронический аутоиммунный процесс и т.д.). Концентрации вкДНК в крови могут не изменяться или даже уменьшаются по сравнению с нормой (рис. 6). 3. Отсутствие явных клинических признаков усиления гибели клеток (практически здоровые доноры).

Как и ожидалось [2], значительное повышение концентрации вкДНК наблюдается только в случае острого процесса (ОИМ). Концентрации вкДНК в крови здоровых доноров достоверно не отличались от концентраций в крови больных ИБС, не осложненной ОИМ. Известно, что с возрастом нарушается равновесие между гибелью клеток и пролиферацией, благодаря усилению апоптоза, однако в группе здоровых людей концентрации вкДНК с возрастом даже немного снижаются.

Ведущая роль в снижении концентрации вкДНК принадлежит эндонуклеазам крови. Показано, что мутации в гене ДНКазы 1, которые сопровождаются снижением активности фермента [13] у больных системной красной волчанкой, способствуют более тяжелому течению заболевания. Показано, что нокаут гена ДНКазы 1 у мышей сопровождается увеличением количества вкДНК и развитием волчаночного синдрома аутоиммунной патологии по типу системной красной волчанки у людей [14]. Активация эндонуклеазной активности крови при увеличении количества вкДНК хорошо прослеживается

НОВЫЙ МАРКЕР ГИБЕЛИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА

в группе здоровых доноров (рис. 2). В наших исследованиях *in vitro* было показано, что некоторые фрагменты ДНК человека при введении в среду культивирования клеток способствуют увеличению НА в лимфоцитах здоровых людей [15]. По-видимому, когда в организме индуцируется процесс, сопровождающийся увеличением количества вкДНК вследствие гибели клеток, возрастает экспрессия генов, приводящих к увеличению НА. При дальнейшем течении заболевания НА достигает максимальных значений и перестает зависеть от количества вкДНК. Повышенный уровень НА (более 10 ед. акт.), даже при небольших концентрациях вкДНК, указывает на возможное наличие в организме процесса, протекающего с значительным повреждением клеток. Таким образом, маркером клеточной гибели может быть сочетание повышенной концентрации вкДНК и повышенной НА, характерное для больных ОИМ. Низкая концентрация вкДНК и низкая НА наблюдается у здоровых доноров. Низкая концентрация ДНК и высокая НА характеризует хронический процесс, сопровождающийся небольшим смещением равновесия между повреждением и репарацией в сторону повреждения.

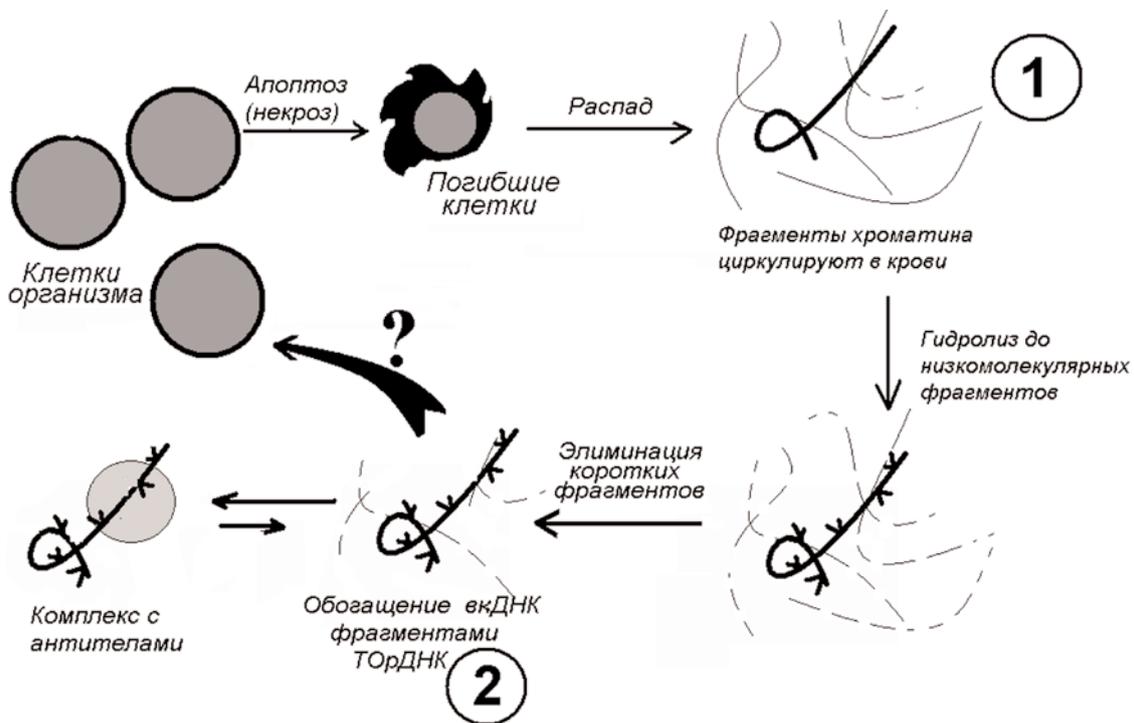


Рисунок 6.

Схема, иллюстрирующая накопление в крови фрагментов ТОрДНК и других, устойчивых к фрагментации последовательностей, при остром состоянии (1) и при хроническом процессе (2), когда активированы системы элиминации вкДНК. Гипотетический фрагмент ТОрДНК на рисунке выделен жирной линией. После действия эндонуклеаз сыворотки фрагмент содержит однонитевые разрывы. Возможно, что накапливающиеся в крови некоторые фрагменты вкДНК являются факторами стресс – сигнализации, которые передают клеткам информацию об увеличении интенсивности процессов гибели клеток в организме (см. текст).

Поскольку отдельно концентрация вкДНК при хроническом процессе не является маркером гибели клеток, мы обратили внимание на другое свойство вкДНК – изменение содержания отдельных последовательностей. Последовательность ТОрДНК выбрана неслучайно. Экспериментально показано, что фрагменты ТОрДНК в составе геномной ДНК человека относительно устойчивы к возникновению двунитевых разрывов [5], возникающих при накоплении одонитевых, вносимых, в том числе и эндонуклеазами. ТОрДНК может накапливаться в составе вкДНК. Это свойство делает ТОрДНК более универсальным маркером гибели клеток, чем тотальная вкДНК.

По сравнению с геномной ДНК, вкДНК и доноров и больных ИБС обогащается ТОрДНК. Среднее содержание ТОрДНК на 1 нг вкДНК у доноров в 2,2 раза, а у больных в 10,1 раза больше, чем среднее содержание в 1 нг геномной ДНК. У здоровых людей содержание ТОрДНК в составе вкДНК увеличивается с возрастом. Максимальное содержание ТОрДНК (в 17-23 раза большее, чем среднее значение для геномной ДНК) наблюдается у больных с неострой формой ИБС, т.е. при хроническом длительном процессе. При развитии ОИМ на фоне хронического течения ИБС содержание ТОрДНК в составе тотальной вкДНК снижается, поскольку в кровь поступает большое количество вкДНК из вновь погибающих клеток. При этом селекция последовательностей вкДНК (обогащение фрагментами ТОрДНК и другими GC- богатыми фрагментами) еще не произошла. Ранее было показано [6], что в вкДНК сыворотки крови больных ревматоидным артритом увеличено содержание ТОрДНК и уменьшено содержание другой, AT – богатой последовательности – сателлита III (1q12). Изменение состава вкДНК плазмы крови мы наблюдали у работников предприятия атомной промышленности, которые подвергались на протяжении длительного времени повреждающему действию ионизирующей радиации [15].

Значительное увеличение концентрации ТОрДНК в крови при ОИМ происходит благодаря двум факторам – увеличенному содержанию ТОрДНК в составе вкДНК, которое имело место до развития ОИМ и резкому возрастанию общего количества вкДНК из погибших во время инфаркта клеток. Концентрация ТОрДНК в крови здоровых людей определяется содержанием этой последовательности в составе вкДНК и не зависит от общей концентрации вкДНК (рис. 4).

Резюмируя все вышесказанное, можно сделать следующие выводы:

(1) Наличие в организме хронического патологического процесса, сопровождающегося постоянной гибелью клеток, можно предположить, если на фоне малых концентраций вкДНК (до 300 нг/мл) наблюдается значительное обогащение вкДНК фрагментами ТОрДНК (свыше 10 пг/нг вкДНК), что сопровождается достаточно высокими значениями нуклеазной активности (более 10 ед. акт.).

(2) Острый процесс, при котором одновременно гибнет большое число клеток, на ранней стадии характеризуется очень высокими концентрациями тотальной вкДНК и сравнительно низкими значениями содержания ТОрДНК во вкДНК.

(3) Если острое состояние развивается на фоне хронической патологии, то маркером может служить высокая концентрация вкДНК и высокая концентрация ТОрДНК на фоне умеренного содержания ТОрДНК в вкДНК и высоких значений нуклеазной активности.

Фрагменты ТОрДНК, циркулирующие в организме, являются не только маркером развития хронического процесса, сопровождающегося гибелью клеток и активацией систем элиминации вкДНК, но могут выступать в роли эндогенных факторов, воздействующих на клетки организма. Помимо устойчивости к фрагментации, эта последовательность обладает другими уникальными свойствами: содержит очень большое количество GC- пар и CpG – динуклеотидов, цитозиновые основания в большинстве копий ТОрДНК метилированы, в отличие от тотальной геномной ДНК и последовательности нетранскрибируемого

НОВЫЙ МАРКЕР ГИБЕЛИ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА

спейсера рибосомного повтора. В составе ТОрДНК обнаружено большое количество сайтов связывания с белками семейства “toll” – рецепторов (TLR9) [6]. Рецепторы узнают неметилированные CpG- мотивы и известны как проводники клеточного ответа на действие бактериальной ДНК [16], который сопровождается активацией фактора транскрипции NF - каппа В, следствием чего является индукция синтеза провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода и азота [17]. Ранее мы показали, что модельные фрагменты ТОрДНК, введенные в среду культивирования выделенных лимфоцитов, стимулируют клетки, вызывая изменения структуры ядер, активацию ядрышка, значительное увеличение синтеза провоспалительных цитокинов - интерлейкина 6 и, в меньшей степени, ФНО-альфа [18]. Влияние фрагментов ТОрДНК не ограничивается только клетками иммунной системы. Наши предварительные данные, полученные в опытах на культивируемых неонатальных кардиомиоцитах крысы, показали, что модельный фрагмент ТОрДНК и фрагменты вкДНК больных ИБС, существенно изменяют сократительную функцию кардиомиоцитов, вызывая в малых концентрациях дозозависимое снижение частоты и амплитуды сокращений клеток в культуре. Таким образом, фрагменты ТОрДНК и, вероятно, другие, пока неизвестные в составе вкДНК последовательности могут являться факторами стресс-сигнализации при интенсификации процессов гибели клеток в организме.

Ранее было обнаружено, что в организме человека вырабатываются антитела, высокоспецифичные к ТОрДНК, которые циркулируют в крови в свободном виде и в виде комплексов с вкДНК [5]. Суммарное содержание антител к ТОрДНК выше в сыворотке больных ИБС, чем в сыворотке здоровых доноров. В комплексе с вкДНК больных ИБС находится большинство антител, вырабатываемых против фрагментов ТОрДНК. Для здоровых доноров этот показатель в 2,4 раза ниже. Прослеживается интересная закономерность: чем сильнее изменяется состав вкДНК больных ИБС (увеличивается содержание ТОрДНК и, возможно, других иммуностимулирующих последовательностей), тем большее количество антиДНК - антител сыворотки связывается с этой вкДНК. По-видимому, в организме действуют механизмы, регулирующие выработку специфических антител к отдельным последовательностям вкДНК в зависимости от содержания этих последовательностей в крови.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине ” 2007 и программы ОХНМ РАН “Биомолекулярная и медицинская химия” 2007.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y.* (2007) *Bioessays*, **29**, 654-667.
2. *Antonatos D., Patsilinos S., Spanodimos S., Korkonikitas P., Tsigas D.* (2006) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1075**, 278-281.
3. *Kawai Y., Yoshida M., Arakawa K., Kumamoto T., Morikawa N., Masamura K., Tada H., Ito S., Hoshizaki H., Oshima S., Taniguchi K., Terasawa H., Miyamori I., Kishi K., Yasuda T.* (2004) *Circulation*, **109**, 2398-2400.
4. *Вейко Н.Н., Костюк С.В., Ермаков А.В., Калашникова Е.А., Рязанцева Т.А., Сперанский А.И.* (2007) *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.*, **144**, 277-282.
5. *Вейко Н.Н., Спитковский Д.М.* (2000) *Радиационная биология. Радиоэкология*, **40**, с.396-404.
6. *Вейко Н.Н., Шубаева Н.О., Иванова С.М., Сперанский А.И., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М.* (2006) *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.*, **143**, 282-285.
7. *Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г., Нурбаев С.Д., Косякова Н.В., Шубаева Н.О., Ляпунова Н.А.* (2003) *Мол. биология*, **37**, 409-419.

8. Вейко Н.Н., Ляпунова Н.А., Богуш А.И., Цветкова Т.Г., Громова Э.В. (1996) Мол. биология, **30**, 1076-1084.
9. Ермаков А.В., Костюк С.В., Еголина Н.А., Малиновская Е.М., Вейко Н.Н., Спитковский Д.М. (2007) Радиационная биология. Радиоэкология, **47**, 133-140.
10. Pisetsky D.S., Gonzalez T.C. (1999) Clin. Exp. Immunol., **116**, 354-359.
11. Vernon S.D., Shukla S.K., Conradt J., Unger E.R., Reeves W.C. (2002) BMC Microbiol., **2**, 2-39.
12. Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Mulcahy H.E., Anker P. (2001) Ann. N.Y. Acad. Sci., **945**, 258-264.
13. Yasutomo K., Horiuchi T., Kagami S., Tsukamoto H., Hashimura C., Urushihara M., Kuroda Y. (2001) Nat. Genet., **28**, 313-314.
14. Napirei M., Karsunky H., Zevnik B., Stephan H., Mannherz H.G., Möry T. (2000) Nat. Genet., **25**, 135-136.
15. Костюк С.В. (2007) Фрагменты рибосомных генов в составе внеклеточной ДНК – факторы стресс – сигнализации. Дисс. канд. мед. наук, ГУ МГНЦ РАМН, Москва.
16. Kyung Y., Tuetken R., Redford T., MaWaldschmidt R., Kirsch J., Krieg A.M. (1998) J. Immunol., **160**, 4755-4761.
17. Klinman D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., Conover J., Krieg A.M. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 879-2883.
18. Вейко Н.Н., Калашникова Е.А., Кокаровцева С.Н., Костюк С.В., Ермаков А.В., Иванова С.М., Рязанцева Т.А., Еголина Н.А., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М. (2006) Бюлл. Экспер. Биол. Мед., **143**, 410-414.
19. Bulicheva N., Veiko N., Fidelina O., Mkrtumova N., Neverova M. (2007) Clinical Chemistry, Abstracts for CNAPS V, **53**, № 10.

Поступила: 02.10. 2007.

RIBOSOMAL REPEAT IN THE CELL FREE DNA AS A MARKER FOR CELL DEATH

*N.N. Veiko¹, N.A. Bulycheva¹, O.A. Roginko², R.V. Veiko¹, E.S. Ershova¹, O.A. Kozdoba²,
V.A. Kuzmin³, A.M. Vinogradov³, A.A. Yudin², A.I. Speranskyi⁴*

¹Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Moskvorechie, 1,
115478, Moscow, Russia; e-mail: ribgene@rambler.ru

²Central clinical Russian Academy of Sciences, Litovskiy bul., 1a. 117593, Moscow, Russia

³Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina ul. 4, Moscow, 119334, Russia

⁴Institute of Rheumatology of Russian Academy of Medical Sciences, Kaschirskoe schosse, 34a,
115522, Moscow, Russia

We have developed a novel method for *in vivo* evaluation of cell death in patients with acute and/or chronic heart diseases, which are accompanied by apoptosis or cell necrosis. The method is based on the analysis of cell free DNA (cfDNA) in the blood serum (or plasma). The major parameters assessed in the method include total concentration of serum cfDNA, concentration of serum ribosomal repeat (rDNA), content of rDNA in total cfDNA, as well as factors of cfDNA elimination, such as nuclease activity and anti-DNA antibody. We demonstrated a fivefold increase in the serum cfDNA concentration and a 12-fold enhancement of serum rDNA concentration in patients with acute myocardial infarction compared with healthy individuals. In chronic coronary ischemia the serum cfDNA concentration was similar to that in the disease-free group. However, the content of rDNA in cfDNA was 4.8-fold higher, and the serum rDNA concentration was increased sevenfold. We hypothesize that one reason for accumulation of rDNA within cfDNA might be the previously reported resistance of rDNA to the ds-fragmentation by serum endonucleases. In both acute and chronic coronary disease the nuclease activity in the serum was substantially higher than that in the healthy cohort. Moreover, the titer of anti-DNA antibodies was elevated, with these antibodies being mostly bound to the cfDNA. Thus, the release of rDNA fragments into the blood not only reflects cellular death in the body but also determines the response of the organism to the disease-associated stress.

Key words: cell free DNA, ribosomal genes, endonuclease activity, acute myocardial infarction, cardiac ischemia.