

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

УДК 577.1:612.014.481+616.831-005.1+616.24]-07

©Васильева, Зинкин

### ЗНАЧЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

*И.Н. Васильева<sup>1\*</sup>, В.Н. Зинкин<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>СПбНИИ Фтизиопульмонологии Росздрава, 191036 Санкт-Петербург,  
Лиговский пр., 2-4; факс: (812)297-66-31; эл. почта: nicolaivasiliev@hotmail.com

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский испытательный институт  
военной медицины МО РФ, 127083 Москва,  
Петровско-Разумовская аллея, д.12 А

Низкомолекулярная ДНК появляется в плазме крови через несколько часов после воздействия ионизирующего излучения и её количество пропорционально зависит от дозы. Клонирование показало, что обогащение нуклеотидами С + G и особенности первичной структуры характеризуют способность низкомолекулярной ДНК к образованию стабильных нуклеосом. ДНК, выделенная после облучения в принципиально различных дозах 8 и 100 Гр различается не только количественно, но и по содержанию динуклеотидов CpG и CpT, что указывает на её происхождение из различных участков генома. Впервые установлено, что воздействие низкочастотного шума приводит к значительному повышению содержания низкомолекулярной ДНК в плазме крови. Инсульты характеризуются увеличением содержания этой ДНК в течение 3 дней после начала острого периода с различной динамикой выделения при ишемическом и геморрагическом типах; при ишемии низкомолекулярная ДНК обнаружена в спинномозговой жидкости. Хроническая обструктивная болезнь лёгких в период ремиссии впервые отмечена снижением уровня низкомолекулярной ДНК плазмы крови, в отличие от хронического необструктивного бронхита. Четкая закономерность образования и особенности структуры низкомолекулярной фракции ДНК плазмы крови позволяют считать её универсальным количественным показателем апоптоза, позволяющим дифференцировать принципиально различные состояния организма.

**Ключевые слова:** низкомолекулярная ДНК, ионизирующее облучение, нуклеосомная организация, низкочастотный шум, ишемический инсульт, хроническая обструктивная болезнь лёгких, апоптоз.

---

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Исследование циркулирующих в плазме крови человека и животных нуклеиновых кислот началось с публикации Mendel и Metais в 1948 году [1], обнаруживших небольшие количества ДНК в бесклеточной части крови. Затем внеклеточная ДНК была определена при различных патологических состояниях, включая онкологию [2, 3], пренатальные заболевания [4], травму [5], аутоиммунные заболевания [6] и инсульты [7]. Развитие методов неинвазивной диагностики вызвало бурный всплеск исследований в области циркулирующих нуклеиновых кислот. Кровью снабжаются все системы организма, и внеклеточная ДНК может поступать в кровяное русло от любого внутреннего органа, различаясь в содержании и составе у здоровых и больных. При многих неясных вопросах относительно предназначения и механизмов происхождения внеклеточных нуклеиновых кислот их исследование при различных заболеваниях имеет диагностическое и прогностическое значение.

Инкубация препаратов очищенной ДНК с кровью и другими биологическими жидкостями приводит к быстрому гидролизу ДНК [8], однако в норме в крови поддерживается определенная концентрация внеклеточной ДНК [5]. Одним из факторов, обеспечивающих циркуляцию ДНК, может быть её упаковка в окруженные мембраной апоптотические тельца [9].

ДНК плазмы крови состоит в основном из низкомолекулярной фракции, молекулы которой содержат 160-180 пар нуклеотидов (п.н.) [2, 3, 10]. Появление в бесклеточной части крови низкомолекулярной фракции ДНК, размеры которой сопоставимы с величиной нуклеосомы, связывают с фрагментацией хроматина в процессе апоптоза [11]. Учитывая несомненное диагностическое значение исследуемого показателя, полагают, что в скором времени содержание низкомолекулярной (нуклеосомной) ДНК будет стандартизировано, автоматизировано и сертифицировано для применения в клинике [12].

Апоптоз является генетически контролируемым физиологическим процессом, призванным очищать ткани от клеток, оказавшихся бесполезными и даже вредными для организма [13], и характеризуется сложной регуляцией и множественностью путей реализации [14]. Механизм апоптоза лежит в основе патогенеза многих заболеваний [15], разделяемых на болезни, связанные с усилением апоптоза (ишемические повреждения) и болезни, обусловленные его ингибированием (онкологические, ревматоидные и др.).

К экспериментальным состояниям, сопровождающимся усилением апоптоза, прежде всего относится воздействие ионизирующих излучений. Установлено, что увеличение содержания внеклеточной ДНК крови с возрастанием дозы облучения происходит преимущественно за счёт низкомолекулярной фракции [10]. В случае, если лечение эффективно, содержание нуклеосомной ДНК достоверно возрастает в начале лечения. По изменению содержания нуклеосомной ДНК в сыворотке крови больных судят об эффективности терапии злокачественных новообразований [12]. Показано, что воздействие шума сопровождается усилением процессов апоптоза в слуховых органах крыс, определяемых на уровне генной экспрессии и деградации клеток с характерной фрагментацией хроматина [16]. Содержание внеклеточной низкомолекулярной ДНК при акустических воздействиях ранее не определялось, как и в случаях пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК). Известно лишь, что в плазме крови больных геморрагической и ишемической формами инсульта концентрация циркулирующей ДНК различается в ранние, до 6 ч, сроки от начала

заболевания [7]. Ещё меньше известно о содержании низкомолекулярной ДНК в случае заболеваний и состояний, связанных с ингибированием процессов апоптоза. По последним данным, к таким заболеваниям относят хроническую обструктивную болезнь лёгких (ХОБЛ) [17, 18].

Содержание внеклеточной низкомолекулярной ДНК предполагается использовать в качестве неспецифического диагностического показателя патологического состояния, связанного с протеканием процессов апоптоза в организме. Цель работы – оценить значение внеклеточной низкомолекулярной ДНК для диагностики некоторых патологических состояний у человека, а также у экспериментальных животных, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения и низкочастотного шума.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты проводили на белых беспородных крысах с массой тела 200-250 г. Животных облучали  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$  на аппарате ИГУР в дозах 8 Гр, 20 Гр, 50 Гр и 100 Гр. Мощность дозы составляла 1,6 Гр/мин. Через 5 ч после облучения животных декапитировали. Кровь собирали в полиэтиленовые чашечки, содержащие 75 мкл 0,5М ЭДТА (рН 7,3). Для анализа объединяли кровь от 3 животных.

Крыс подвергали однократному (в течение 17 мин) и многократному (13 недель по 5 дней в неделю 1 раз в день по 17 мин) воздействию шума с уровнем звукового давления (УЗД) 120 и 150 дБ и максимумом спектра в области низких частот на лабораторной установке с использованием электродинамического излучателя “JBL 2225” (США) в качестве акустического генератора. Животных декапитировали через 1 сут и 7 сут после однократного и через 1 сут после многократного действия генератора.

Клинические исследования выполнены в клинике нервных болезней Военно-Медицинской Академии. Кровь брали у стационарных больных, мужчин в возрасте 46-67 лет с острыми нарушениями мозгового кровообращения (ОНМК) через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после начала острого периода. Пациенты были разделены на две группы по 8 человек в каждой в зависимости от типа ОНМК: геморрагического и ишемического. Спинномозговую жидкость получали при люмбальной пункции от 38 больных с ишемическим типом ОНМК, поступивших в различные сроки от начала заболевания (2-24 ч, 2-7 сут, 2-3 недели, более 3 недель).

Кроме того, в плановом порядке обследованы больные хроническим бронхитом – 51 мужчина, жители Санкт-Петербурга в возрасте 42-75 лет, наблюдавшиеся от 7 до 25 лет в НИИ пульмонологии с чётко верифицированными диагнозами. Образцы крови собрали от 31 больного ХОБЛ и 20 больных ХНБ (хронический необструктивный бронхит) в период клинической ремиссии. Обследованы также семьи больных и собраны образцы крови родственников первой линии пациентов с ХОБЛ – 19 человек и ХНБ (хронический необструктивный бронхит) – 23 человека в возрасте 26-76 лет. Все обследуемые (и больные и их родственники) дали информированное согласие на участие в исследовании. Родственники обеих групп не предъявляли жалоб на состояние здоровья и были клинически здоровы в период обследования. Кровь у обследуемых в количестве 3 мл брали путём венепункции в пробирки, содержащие 0,5М ЭДТА.

Плазму отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 810 g и 4°C. Для полного удаления форменных элементов плазму центрифугировали дважды при 2200 g по 15 мин. Нуклеиновые кислоты выделяли методом фенольной экстракции. Осадки нуклеиновых кислот растворяли в деионизированной воде из расчёта 1 мкл на 1 мл плазмы крови.

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ В ДИАГНОСТИКЕ

Раствор нуклеиновых кислот хранили для дальнейших исследований при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Полученный препарат инкубировали с РНКазой и анализировали методом электрофореза в градиенте полиакриламидного геля (2/16%) в 0,04 М Трис-ацетатном буфере (рН 7,7) содержащем 0,1 М ЭДТА [19, 20]. Для идентификации исследуемых фракций использовали маркеры-рестрикты PBR322/BspR1 и  $\lambda/\text{Alu1}$ , наносимые в количестве 1 мкг/мкл. Гели фотографировали в проходящем УФ на пленку микрат 300 при диафрагме 4, выдержке 10-30 с и красном светофильтре. Содержание ДНК определяли путём сравнения со стандартами.

Участки геля, содержащие низкомолекулярную фракцию ДНК от 6 животных, вырезали и из них элюировали ДНК с помощью 1 М раствора ацетата аммония (рН 8,0). Очищенную низкомолекулярную ДНК клонировали в клетках *E. coli* (штаммы TG1 и XL1), используя фазмиду BLUESCRIPT M13+ (“Stratagene”, США). Для создания ДНК линейной формы с двухцепочечными (тупыми) концами её обрабатывали рестриктазой SmaI (“Биолаб”, Россия). Чтобы избежать самолигирования в последующих процедурах, 5'-концы плазмиды обрабатывали бактериальной щелочной фосфатазой (“Биолаб”) из расчёта 0,5 ед. на 10 мкг. Поскольку концевые участки отдельных молекул клонируемой ДНК могли оказаться одноцепочечными, вторую цепь достраивали Кленовским фрагментом ДНК-полимеразы I (“Amersham”, Великобритания). Повреждённые 5'-концы ДНК обрабатывали полинуклеотидкиназой фага T4 (“Amersham”) из расчёта 50 ед. активности на 100 нг ДНК. Низкомолекулярную ДНК лигировали с векторной (фазмидной) ДНК из расчёта 20-50 нг вектора на 50-200 нг фрагмента ДНК, концентрация лигазы (“Amersham”) составляла 0,1 ед./мкл. Приготовленные компетентные клетки *E. coli* трансформировали методом теплового шока, подращивали в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$  с добавлением 1 мл стерильной YT-среды и высевали на YT-агар, содержащий ампициллин. Рекомбинантную ДНК секвенировали по Сэнгеру [20] с использованием дезоксирибонуклеотидов (“Amersham”), секвеназы (“Биолаб”), оборудования и реактивов для электрофореза Макрофор (LKB) на базе Центра Биотехнологии, Москва.

Компьютерный анализ выполняли по программе DNASIS (версия 5.1) с привлечением всех подразделений банка данных DDBJ, включая бактерии, вирусы и фаги.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни для несвязанных выборок. Для прогнозирования биологического эффекта от дозы облучения использован регрессионный анализ.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

*Содержание низкомолекулярной ДНК в плазме крови облучённых крыс.* В плазме крови облучённых животных появляется низкомолекулярная фракция ДНК с величиной фрагментов 160-180 п.н., что соответствует размеру моноклеосомы. Ранее проведенные исследования показали, что при взятии крови в различные сроки, от 1 ч до 7 сут, максимальные концентрации ДНК в плазме наблюдаются через 5 ч после облучения [10]. Настоящее исследование позволило выявить, что количество низкомолекулярной ДНК через 5 ч после облучения в таких принципиально различных дозах, как 8 и 100 Гр (табл. 1) существенно различается и составляет  $53,2 \pm 15,5$  нг/мл и  $338,5 \pm 49,9$  нг/мл, соответственно ( $p < 0,02$ ). Поскольку известно, что облучение в указанных дозах приводит к различным формам лучевой болезни, исследуемый показатель уже через 5 ч позволяет дифференцировать принципиально различные состояния организма.

Таблица 1. Содержание низкомолекулярной фракции ДНК плазмы крови через 5 ч после облучения животных (нг/мл).

Контрольная группа	Доза облучения (Гр) в подопытной группе (n=7)					
	2	4	8	20	50	100
5,5±1,5	11,9±5,7	25,5±7,5*	53,2±15,5*	138,6±28,6*	271,6±42,4*	338,5±49,9*

Примечание. Здесь и в других таблицах данные представлены в виде средней ± ошибка средней.  
\*- прирост содержания достоверен (p<0,02).

Согласно полученным данным, при увеличении дозы облучения от 2 до 20 Гр наблюдается прямая пропорциональная зависимость роста содержания низкомолекулярной ДНК от дозы облучения, которая описывается линейным уравнением, в диапазоне доз облучения от 20 до 100 Гр зависимость приобретает логарифмический характер:

$$y = -1,25 + 6,95x, \quad 1 < x < 20.$$

$$y = -231,29 + 125,30 \ln x,$$

где y - количество низкомолекулярной ДНК в плазме крови животных (нг/мл),  
x - доза облучения (Гр).

Оба уравнения соответствуют полученным результатам с высокой степенью достоверности ( $R^2=0,99$ ). Используя полученные уравнения, можно прогнозировать дозу облучения животных, ориентируясь на содержание низкомолекулярной ДНК в плазме крови.

*Клонирование низкомолекулярной ДНК плазмы крови облученных крыс.* Анализ более 60 выделенных клонов показал, что длина фрагментов низкомолекулярной ДНК после облучения крыс в дозе 8 Гр находилась в пределах 123-180 п.н. и соответствовала длине нуклеосомной ДНК. После облучения в дозе 100 Гр длина фрагментов ДНК варьировала больше, от 80 до 400 п.н. Это могло быть связано с наличием значительных повреждений ДНК (одно- и двунитевые разрывы) после воздействия в дозе 100 Гр. Длинные фрагменты могли образоваться за счет лигирования коротких под действием ферментов, используемых для клонирования. Например, участок клона RNBP11 длиной 280 п.н., соответствующий 25-156 п.н., оказался гомологичным гену лактатдегидрогеназы А, другой участок, 129-260 п.н. в обратной ориентации, оказался гомологичным повторяющемуся элементу В1 (данные банка EMBL). По-видимому, этот клон состоит из двух различных частей. Поскольку фрагментов такой длины не было в составе исходной ДНК, он образовался путем слипания двух молекул.

Были секвенированы 26 клонов, из них 14 клонов низкомолекулярной ДНК плазмы крови крыс, облученных в дозе 8 Гр, и 12 клонов – в дозе 100 Гр. Анализ данных с использованием программы DNASIS показал, что все полученные клоны имеют различную последовательность нуклеотидов (рис. 1). Поиск по банку данных DDBJ позволил обнаружить 99–70% гомологии имеющимся в банке последовательностям (табл. 2). Клоны RNBP-53, -43 и -14 оказались гомологичными с вероятностью 92-99% LINE элементам крыс, RNBP-32 и -42 – Alu-повторам, RNBP2 содержит (CA)<sub>n</sub> повтор (СpG-островок), RNBP11 – поли А последовательность, два других фрагмента ДНК относятся к мультикопийным рибосомальным генам. Другие последовательности относятся к различным кодирующим и не кодирующим участкам генома.

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ В ДИАГНОСТИКЕ

А

RNBP31 GCCTTTGAGT GATTTGATGT AGTCTTTGAT GTACCTTTTG TAGGCCTCTT CTGTGAAGC GGTGGTTC  
 GACAATGTCA ACACTGGTGA CTGCTGGACTTTCCATACC TCGCCCTCCG ACCTTCAGAG GAAGCATTTT CACCAATGAG  
 TGAATCATTG ATGGTACCCT CTGTTCTACT GACC  
 RNBP32 CTTCCTCACTT CTGGTTGATC CCCTACTCAC TGTATAGTGG ACAAGAGAGA CATTGAGATA AGGTCTAGC  
 ACTATGTGTA TCCATCCATG TGTGGAATGG GCTAATCACC TTTGAGTAA  
 RNBP33 CCACAACCAG CAATCAGCT CATCTCTGTC TAAGCAGCAT TTGGATTTT CCTTCCTGGG CCTTCAGAGC  
 CTCACCCAGT TTCTCATACC TTCCACCCCG AAGGTCACGC AGAGTGCCAG AGAGCCAGGG CAGAACCGBA  
 GTCAGCCAGT CATCAGCCCCA ATC  
 RNBP36 AGCAAATCCC CTTATGTGT GCCAACACAA AGTAGTACAA TGGAAACCTC CAGGAATCTA TAAGGGTGAC  
 CTTAAGACTT GTAGTAGTGG GGGATGTTGA GCCTGAACAA CCGCTTCCTT TAACCAGTGA AGACTTTTAC  
 TGGAGGAATT AGGACATCAT TGGAGCCCTA AAACCATAAA C  
 RNBP42 AGTTTTGAAA CAGAAACCAG CTCTCTGGGT TGAATAATAG CTGTGAAAAG GCCTCTGCTT GAGGATTGCT  
 GAGGATTGCT TTCTCTTACC TCTATACACT GTGAGTCTT CTCTGTCTTA ACTCGTAGAG AAGCCGGTGT  
 GTATCTGTAT TAACAT  
 RNBP43 CCTTGAACC TCTGGTTGCT TGGCATTGTT GTTCATAAGG GGTCTCGAGC TCCTTCAAGC TCCTTCCAGT  
 CTTTCTCTGA GGGGGTCCC TTCCAGTTC ACTGGTTTGC TGCTGGCATT CCCCTCTGTA TTTGCTGTAT TCTGG  
 RNBP44 CCTTGTCTCC CATTCCTC CTCTGGGTG TGGCTGCCAT ACTGCTGGT  
 CCTGTGGGGG TGGTCCAGG CCCATCTC ACCTGCTTCT GGATGTGGGT CAGCCTCTGT TTGCAGAGGC  
 TTGGGCATGG CATCGAAGAC  
 RNBP47 GATTCTCAAC AATTCTAAGA TGTTAATCT TTAATTACAT CCTTCTCTGG  
 ACAGTGGCAG CACCTGAAGG ACCCTGCTAG AACTGAGCAG CCAGATGGCA CAGCAGCAAC ACCCTTTTGT  
 TACAATTAAG AAAC  
 RNBP52 CCTTTTCTG TGATAACTCC CGTTTGTGTC AAGTTGACAC ACAAACCAG  
 CCAGTACACT ACCTCCTACC ATTAACCAGT TCACCCAGGC CCTGAATCAG CAAACAGCTA CCCAGCTACT  
 TAAGCTTGGC CCCAAGTTCA GGCCAGAGAC AAAGCAGG  
 RNBP53 CTCCAGCAT ATGATCAAAT ACGATTTGA AACTAGATCT TGNCTTTTCT GGTGTGTTG GATATTCAT  
 GTTATTTTTG GTGGGAGAAAT TGGGCTCCGA TGGTCCATG TAGTCTGGT TCTGTGTTCT TGGGTTCTG  
 CGCTTGCCTC TCGCCATCAG ATATCTCTA GTGTTACTTT GTTCT  
 RNBP54 ATCAGATGCT CAAGCCAGGC CTGTGTAGTC TTCTTCCCCTG ATCCAGATAG AACCTCAGC  
 TACCTCTCA GCACCTGTC TACATGCCAC CATGCTCCC ACTATGACAA TAATTAGATT AAACCTCTGA  
 ACTGTAAGCC AGCCCAATT AAATGAGTT  
 RNBP56 CCCCACCTT GCCTGTGAG CACAGTAGAG CTGGCCCTGG TGGTATAAGC CACAGAGAGC CCAACTGAGT  
 GTGAGAGCAG TTGAGCTGCC CCAGCCCTT GTGCT  
 RNBP57 TCCCTCACT ATTTNCTTA TTCTGAGAGA GTCCTCCCT GACCATTCCA TAAAATTTG CCACCCCTC  
 CCAACCCCTC CCTCCC  
 RNBP82 CACAAGTCAT GCAGCTCTGG TGAGAACAA CTGGTGATCC TAATCAAAGA ACAAGCCCAT AGCACTCTTA  
 AACTTAAAT TCAGTGGGGG TGGTGTGGGG GTAGGGAAT ATAGATCAGT GTGGGAGTGA CTCCTAAGTA  
 GCAGACCTCT CCTACA

Б

RNBP2 CCTGTGTTGC GTGCGTACAC ACACACACAC ACACACACAC ACAGAGACAG AGACAGACAG A  
 RNBP4 CCCATGATGT GAAGCTGGTT CTTAAACAGC ACAGTGTCCC TTCTAATTTG TTCTGCAAGT GCAAAGGCTC  
 AGAAGTGGAT GTTGAACCGC ATCAAGTGAG GTGCCTATTG TTCAATTTAA ATTCCCTG  
 RNBP6 CAAGCGGTAC TGATATAACA GCATCTCTG GCCGCTCTGT TTACAATAAC TAGGAAGAAA AAAATAAGCC  
 CTATTTTAG TGTGTTTATC TTTTATGTC ACCAGGTACC GTCACCAGT GCAGACAGGA ACAGGCTATT  
 CTGCGGGAG TGGGCGCC  
 RNBP9 TATTAATTC CATTTGTGCG GTCCATGCTG TTGCCCATG ATTCCACATC ACCTGTCTCT CCTTCTATGT  
 CCTTCTATGT CTGATGGGCC CTTTGGAGTC TGGCAATGAT CTGTCCCTCT ACTCTTTGAA TCTATCATCC  
 TATTGATGTA CCTGGCATG AGA  
 RNBP10 CCTTTTCTA ACTAGGGAGC TAGGATGCTG TAGCCAGAGC CTTCTGCCCC TTGACACCCC CCACCCCCC  
 ACCCCTCTGATCACCAGGCTCTCATCAGT CAAAACAAGC CTGCCCTGTG  
 ACAGTGTTTACTAAAAGTGTACTCTCAGACT  
 RNBP11 TGATTAGTTT TTTGTTTTGT TTTGTTTTGT TTTGTTTTGAT ATTTGAGTGT TTGAGACAGG GTTCACTAG  
 GGGTCTGGT TGTCTGGAA CCCACTCTGT AGACCAGGCT GGCCTCAAAC TCAGAGACCT GCCTGCCTCT  
 GCCTCCCAAG TGCTGTGACT CTGAGTTGCC TGTGCAGCTG TTGAAGAGGG AGACAAAAGC AGGTTAAGAA  
 CAAGAGCAAG CATGAGGAGA AACAGGTGAG TAGCTGTTCT CCTACACATG CCTCTCTGAG AGCATCTACA GC  
 RNBP13 CACATGGAAG GGAAGAGGA ACGATTGATA AACTCTCTCA GCCATTGGGG ACCTAGAGCG GTTTTTCCGC  
 CTGGTCCAG GCTCCCGTGG GGTCTAGAGG TAGCCACTTG CGGATAGCAA ACGTACAGAG GTTGGGGATT GTCGAA  
 RNBP14 CTGAATGGGT GTTCTTCAAG TCTCAGTTT AATCTTTGCC TCTCCCTCC CAGCCAAGG TATTTCTTTT  
 CCTCATTTAA AGAAGGAGTG AAGCATTAC ATTTTGTATCA TCCGTCTTGA GTTTGGTTT TCTAGGGAT  
 CTAGGGTAAAT TC  
 RNBP16 CCTTTTTTCG CTGGAGTTAG GTCTGTGGAT CTCTGACAGG AATTGGCACT GCTGTGCACT GCTGTGACG  
 CAACTCTCCT ACACACAG TGGTCTAGGT GAGTTTTACC ACCTGCCTAA ACCCCAGGA GGCCCTCC  
 RNBP17 TATAGAGTCT ACATAGCACA TTTGCTTAGG AGAAACCCCA TCTATCCTCC TACTTCCATC CCCAGAACTC  
 ATGTGACGA TGTACATA ACCTAAACCA GTGAATGTT TCTGACGTCA CAG  
 RNBP18 CCTTCAAAGT CCTTCAACG CCTCTGATGG AGGCCATGG CATGTGTCCA TCAGACCTTC TCTATCTTTT  
 ACATTTCCAT GTGTGACATA AAAGTCATAA GCCCTGCCTG GCTGGAATTG TTG  
 RNBP66 AGAAAGGTGG CTTCGAGAGG TCCTGTGCC ATGTTAGAAA CCCCTAAGAG GGCTTCTGAA AGGCCTACCA  
 CGCTGTGCCA AGGTTCACTG  
 TGGAGAGAGG GGCCACGGG TGGAGGTTG TGGTGTCTGG GAAGCGCCGA  
 GGACACAGTC CATG

Рисунок 1.

Последовательность нуклеотидов клонированной ДНК плазмы крови крыс  
 после облучения в дозе (А) - 8 Гр, (В) - 100 Гр.

Таблица 2. Идентичность последовательностей клонов низкомолекулярной ДНК плазмы крови облучённых крыс известным последовательностям банка DDBJ.

ПИИФР клона	Число п.н.	Степень гомологии	Индекс гена	Название гена	Часть гена
<b>Доза облучения – 8 Гр</b>					
RNBP53	185	99% 185 п.н.	AC098697	ДНК крысы	интор RNHA21
RNBP47	134	98% 134 п.н.	AC117118	ДНК крысы	нерасшифрованный участок
RNBP43	155	92% 168 п.н.	BX511204	Участок хромосомы 1 крысы	интор L1Rn2
RNBP44	140	90% 168 п.н.	AC157761	Участок хромосомы 5 мыши	кодированная область
RNPB52	158	89% 103 п.н.	AC123293	ДНК крысы	кодированная область
RNBP33	163	86% 165 п.н.	AL805423	Участок хромосомы 4 мыши, ген нейробластомы	кодированная область
RNBP57	86	86% 96 п.н.	AC092431	Участок хромосомы 2 человека	мРНК
RNBP31	184	84% 199 п.н.	BC086358	Опухолевый белок крыс	кодированная область
RNBP54	169	83% 169 п.н.	AL513352	ДНК мыши	инторный элемент
RNBP56	115	79% 114 п.н.	AC119995	Участок хромосомы 3 мыши	инторный элемент
RNBP82	156	79% 114 п.н.	AC119995	Участок хромосомы 3 мыши	интор RMER113
RNBP32	131	76% 63 п.н.	AC012410	Участок хромосомы 8 человека	интор семейства Alu
RNPB36	181	75% 157 п.н.	AL691424	Участок хромосомы 10 мыши	кодированная область
RNBP42	146	70% 125 п.н.	AC124484	ДНК мыши	интор семейства Alu
<b>Доза облучения – 100 Гр</b>					
RNBP9	155	99% 155 п.н.	AC115236	ДНК крысы	нерасшифровано
RNPB14	152	99% 152 п.н.	AC128031	ДНК крысы	интор L1RN
RNBP2	71	92% 72 п.н.	AL928912	Участок хромосомы 2 мыши, ген обязательного рецептора	интор (CA) <sub>n</sub>
RNBP6	158	85% 159 п.н.	AC133183	Участок хромосомы 12 мыши	нерасшифровано
RNBP13	148	84% 148 п.н.	AC142100	Участок хромосомы 18 мыши	интор MalP
RNBP16	139	83% 133 п.н.	AC159195	Участок хромосомы 13 мыши	нерасшифровано
RNBP11	282	82% 180 п.н.	AC165146	Участок хромосомы 14 мыши	некодированная часть
RNPB66	154	79% 125 п.н.	BC010721	Рибосомальный белок S3 мыши	мРНК
RNBP10	151	78% 70 п.н.	AL355611	Рибосомальный белок хромосомы 12 человека	элементы инторов
RNBP18	123	76% 123 п.н.	AC105408	Участок хромосомы 15 мыши	
RNBP17	123	75% 79 п.н.	AC103416	ДНК крысы	некодированная часть
RNBP4	128	74% 88 п.н.	BC14772	Ген эрицитетамид- деацетилазы мыши	мРНК

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ В ДИАГНОСТИКЕ

Для проведения компьютерного анализа нуклеосомной организации внеклеточной низкомолекулярной ДНК облученных крыс использована программа распознавания сайтов формирования нуклеосом в последовательностях ДНК эукариот. Программа основана на методе дискриминантного анализа с использованием частот встречаемости динуклеотидов. Функция распознавания построена на основании анализа выборок нуклеосомных сайтов и случайных последовательностей. Приближение значения распознающей функции к 1 означает увеличение способности анализируемой последовательности к позиционированию нуклеосом. Нуклеосомная упаковка ДНК отдельных генов и участков генома способна характеризовать их функцию. Исследование фрагментов геномной ДНК с применением этой программы показало, что низкие значения функции обнаружены для экзонов и промоторов, а также для гиперчувствительных к нуклеазам сайтов хроматина. В случае экзонов низкие значения могут быть связаны с нагрузкой генетического кода, в случае участков промоторов – с доступностью регуляторной ДНК для транскрипционных факторов. Переход от экзонов к интронам отмечен ростом значений распознающей функции, подтверждая их роль для упаковки хроматина. Компьютерный анализ показал способность фрагментов внеклеточной низкомолекулярной ДНК к образованию достаточно стабильных нуклеосом (рис. 2). В определённых участках последовательность нуклеотидов соответствует нуклеосомным сайтам, высокие значения распознающей функции обусловлены связью этой ДНК с другими ядерными компонентами, например, РНК. Пониженные значения распознающей функции определяют доступность отдельных участков для воздействий.

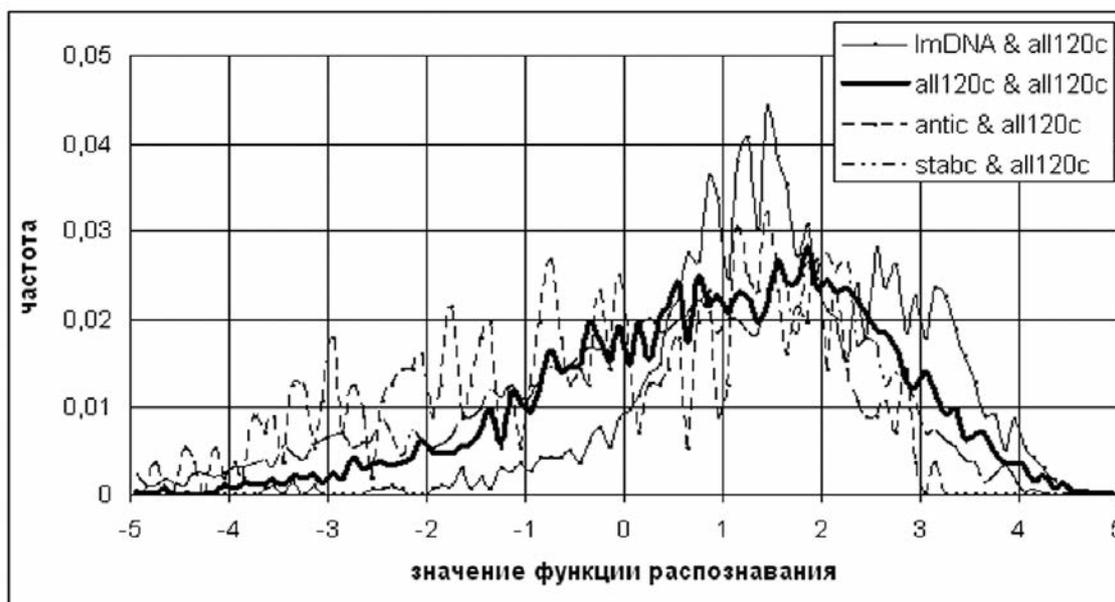


Рисунок 2.

Компьютерный анализ нуклеосомной организации низкомолекулярной ДНК плазмы крови облучённых крыс.

По оси абсцисс - значение функции распознавания; по оси ординат - частота встречаемости.

LmDNA - низкомолекулярная ДНК; all120c - известные последовательности в составе нуклеосом; antic - последовательности, препятствующие образованию нуклеосом; stabc - нуклеосомные последовательности генома крыс.

Результаты исследования нуклеотидного состава клонированной ДНК указывают на отсутствие достоверной разницы в содержании каждого из 4 нуклеотидов в составе ДНК, выделенной после облучения животных в дозах 8 и 100 Гр. Среднее содержание нуклеотидов составляет соответственно: А – 23,0 и 25,0%, С – 27,2 и 26,1%, G – 21,3 и 22,7% и Т – 28,5 и 26,2%. Известно, что распределение нуклеотидов в геномной ДНК отличается от случайного. Содержание комплементарных нуклеотидов G и C (G/C-пар) в геноме крыс составляет 43,9% [21, 22]. Содержание G/C-пар в исследуемой ДНК оказалось повышенным и составило в среднем 48%.

Различия были выявлены лишь при анализе распределения динуклеотидов в низкомолекулярной ДНК (рис. 3). В ДНК генома крыс среднее содержание динуклеотида CpG составляет 1,2%, а CpT – 7,0% [23, 24]. В случае случайного распределения оно соответствовало бы усреднённой величине 6,2%. В ДНК, выделенной от животных, облученных в дозе 8 Гр, содержание динуклеотида CpG составило 0,7%, а CpT – 9,6%. После облучения в дозе 100 Гр эти величины составляли 1,7% и 7,8%, соответственно.

Клонированная низкомолекулярная ДНК плазмы крови облученных животных принадлежит к ДНК генома, имея при этом некоторые особенности.

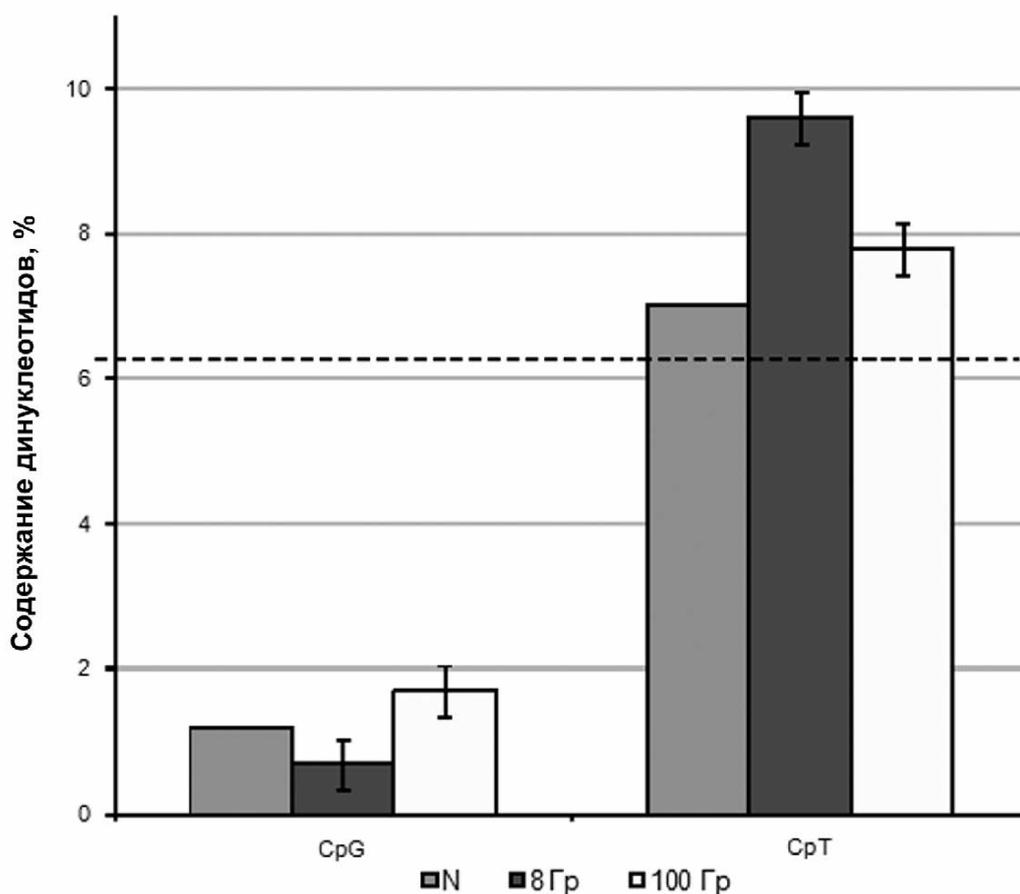


Рисунок 3.

Относительное содержание динуклеотидов CpG и CpT клонированной низкомолекулярной ДНК плазмы крови крыс.

По оси ординат - содержание динуклеотидов в %; по оси абсцисс - динуклеотид (в контроле, после облучения 8 Гр и 100 Гр).

### НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ В ДИАГНОСТИКЕ

*Содержание низкомолекулярной ДНК в плазме крови крыс после воздействия низкочастотного шума.* Экспериментальные исследования позволили установить, что через 1 сут после однократного воздействия низкочастотного шума уровень низкомолекулярной ДНК существенно ( $p < 0,05$ ) увеличился в плазме крови обеих подопытных групп, независимо от УЗД (табл. 3).

Таблица 3. Содержание (нг/мл) низкомолекулярной фракции ДНК в плазме крови белых крыс после воздействия низкочастотного шума ( $n=8$ ).

Воздействие	Время исследования после окончания	Контрольная группа	Подопытная группа и УЗД (дБ)	
			120	150
Однократное	1 сут	11,0±5,4	84,7±30,9*	83,5±23,7* $p > 0,05$
	7 сут		90,3±18,8*	40,4±6,3* $p < 0,05$
Многokратное	1 сут	17,7±1,7	644,6±89,2*	395,6±99,9* $p < 0,05$

Примечание: \* - отличие от контроля  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ -различие между группами достоверно.

Спустя 7 сут после окончания воздействия уровень низкомолекулярной ДНК остался практически на прежнем достоверно ( $p < 0,05$ ) высоком уровне в группе животных, подвергшихся действию низкочастотного шума с УЗД 120 дБ, а во второй группе крыс (УЗД 150 дБ) концентрация этого показателя понизилась, оставаясь выше ( $p > 0,05$ ) контрольных величин. Многократное воздействие низкочастотного шума приводило к значительному увеличению ( $p < 0,05$ ) уровня низкомолекулярной ДНК в плазме крови обеих подопытных групп. В группе животных, подвергшихся действию шума с УЗД 120 дБ, содержание низкомолекулярной ДНК достигло 644,58±89,21 нг/мл, и было существенно ( $p < 0,05$ ) выше, чем в группе крыс с УЗД 150 дБ.

Полученные данные свидетельствуют о развитии патологических процессов, связанных с гибелью клеток после воздействия низкочастотного шума.

*Содержание низкомолекулярной ДНК в плазме крови и спинномозговой жидкости больных с острым нарушением мозгового кровообращения.* Исследования в клинике показали, что в плазме крови больных ОНМК в течение трёх суток после начала заболевания наблюдалось повышение уровня низкомолекулярной ДНК (табл. 4).

Таблица 4. Содержание (нг/мл) низкомолекулярной фракции ДНК в плазме крови больных с ОНМК ( $n=8$ ).

Тип ОНМК	Время от начала ОНМК (часы)					
	3	6	12	24	48	72
Ишемический	43,3±6,59	32,0±9,9	38,0±5,8	77,8±9,9*	52,0±11,2	24,7±9,2
Геморрагический	81,5±21,7*	53,0±13,6	27,0±7,5	28,0±9,34	7,1±2,9	0,0

Примечание: \* - прирост содержания достоверен ( $p < 0,05$ ).

При ишемическом типе ОНМК выявлено повышение уровня низкомолекулярной ДНК в плазме крови у больных в течение всего периода исследования. Спустя 3 ч от начала заболевания её содержание увеличивалось до 43,3 нг/мл, достигая максимальных значений 77,8 нг/мл через 24 ч, а через 72 ч величина оставалась повышенной 24,7 нг/мл.

При геморрагическом типе ОНМК динамика появления низкомолекулярной ДНК в плазме крови больных отличалась. Через 3 ч от начала заболевания её уровень достиг максимальных значений – 81,5 нг/мл, с последующим постепенным снижением вплоть до полного исчезновения из кровяного русла через 72 ч.

В первые часы сосудистой катастрофы уровень низкомолекулярной ДНК в плазме крови при геморрагической форме инсульта достоверно выше, чем при ишемической ( $p < 0,05$ ), приведённые данные соответствуют литературным [7]. Диагностическая ценность предложенного показателя очевидна и определяется необходимостью в объективных критериях, позволяющих различать типы инсульта.

Исследование спинномозговой жидкости производили у больных с ишемическим характером ОНМК, поскольку известно, что в этом случае отсутствует примесь крови в ликворе. Анализ спинномозговой жидкости в разные периоды заболевания позволил выявить внеклеточную низкомолекулярную ДНК в количестве 71,9 нг/мл ( $p < 0,001$ ) ликвора у больных в течение первых суток от начала инсульта. В последующие периоды от 7 суток до трёх недель её присутствие обнаружить не удалось.

*Содержание низкомолекулярной ДНК в плазме крови пациентов с хроническими заболеваниями бронхолегочной системы.* У больных различными формами хронического бронхита в период ремиссии содержание низкомолекулярной ДНК также различается (табл. 5).

Таблица 5. Содержание низкомолекулярной ДНК плазмы крови больных с хроническими заболеваниями бронхолегочной системы и их родственников (нг/мл).

Статистические показатели	Содержание низкомолекулярных ДНК		Категория обследуемых
	ХОБЛ	ХНБ	
<b>Критерий Манна-Уитни</b>	<b>7,8 ± 2,0</b>	<b>23,5 ± 5,9*</b>	<b>больные</b>
<b>Количество наблюдений</b>	<b>7,8 / 3,8 – 11,7/ n=31</b>	<b>23,5 / 11,0 – 36,1/* n=20</b>	
<b>Критерий Манна-Уитни</b>	<b>22,9 ± 6,2**</b>	<b>28,4 ± 6,8</b>	<b>родственники</b>
<b>Количество наблюдений</b>	<b>22,9 / 19,9 – 25,9/** n=19</b>	<b>28,4 / 9,3 – 37,5/ n=23</b>	

Примечание: \* - различие в строке достоверно ( $p < 0,02$ ); \*\* - различие в столбце достоверно ( $p < 0,02$ ).

В группе с тяжелой формой болезни (ХОБЛ) среднее значение внеклеточной низкомолекулярной ДНК составило 7,8±2,0 нг/мл плазмы крови, что достоверно ( $p < 0,02$ ) ниже, чем в группе больных хроническим необструктивным бронхитом (ХНБ; 23,5±5,9 нг/мл). Отметим, что оба эти значения невысоки в сравнении с данными, полученными при других патологиях [4, 6]. В ряде случаев содержание низкомолекулярной ДНК в крови пациентов было настолько незначительным, что не определялось

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ В ДИАГНОСТИКЕ

используемыми в работе методами и оценивалось как нулевое. Такие случаи в группе больных ХОБЛ составили 38%, в то время как в группе больных ХНБ их число уменьшилось до 21%.

Обследование групп здоровых родственников пациентов с ХОБЛ и ХНБ свидетельствовало о сохранении этой тенденции. Число случаев с “нулевым” содержанием ДНК в случае ХОБЛ составило 21%, а в случае ХНБ – 18%. Среднее содержание исследуемого показателя в группе родственников больных ХОБЛ составило  $22,9 \pm 6,2$  нг/мл, в 1,24 раза ниже, чем в группе родственников больных ХНБ –  $28,4 \pm 6,8$  нг/мл плазмы крови (табл. 5), различие недостоверно. Данные свидетельствуют в пользу генетической природы выявленных отклонений.

ДНК после облучения животных в дозах 8 и 100 Гр ДНК выделяется в плазму крови из различных типов клеток. Поиск по банку данных (табл. 2) позволил обнаружить больше значимых гомологий с ДНК, клонированной после облучения в дозе 8 Гр, чем в дозе 100 Гр. Более 90% гомологии выявлено у 36% клонов, содержащих ДНК, выделенную после облучения в дозе 8 Гр и у 25% – в дозе 100 Гр. Вызывает интерес обнаружение фрагмента, потенциально способного к образованию Z-ДНК в составе клона RNBП2 и вырожденного гомолога поли (А)-участка в клоне RNBП11. Вероятность обнаружения таких фрагментов достаточно велика; так, 1 из 10 клонов ДНК, выделенной из сыворотки крови больного системной красной волчанкой, гомологичен клону RNBП2 [23]. ДНК плазмы крови здорового донора содержит 21% LINE элементов, онкологического больного – 8% [24]. В данном исследовании клоны, содержащие фрагменты LINE-элементов, составили 11,6%.

Содержание G/C-пар в исследуемой ДНК составило 48%. Известно, что ДНК [8, 21-23, 25], выделенная из бесклеточной части крови здорового донора, онкологического пациента и больных системной красной волчанкой, также обогащена G/C-парами (43-51% при среднем их содержании в геноме человека 38%). Такое содержание G/C-пар характерно для ДНК, находящейся в составе нуклеосом [26, 27]. Применение компьютерного анализа позволило подтвердить способность низкомолекулярных фрагментов ДНК к образованию стабильных нуклеосом. Фактор дозы облучения в данном случае роли не играл.

Различия в распределении динуклеотидов низкомолекулярной ДНК, выделенной после облучения животных в дозах 8 и 100 Гр, могут быть связаны с её происхождением из различных видов клеточных популяций. Динуклеотидом CpG обогащены участки, прилегающие к 5'-регионам большинства генов, в неметилованном состоянии они активируют прилегающий ген [28].

Результаты исследования свидетельствуют о принципиальной возможности использования количественного определения низкомолекулярной ДНК в качестве биодозиметрического показателя. Существенным преимуществом представляется информативность предложенного показателя, поскольку он применим к широкому диапазону доз облучения (от 1 до 100 Гр). Существуют различные предположения о механизмах выделения ДНК в циркуляцию, но наиболее вероятная причина появления низкомолекулярной ДНК в крови – программируемая гибель клеток при облучении с последующей межнуклеосомной деградацией хроматина. Согласно данным литературы [29], причиной быстрой гибели клеток после воздействия ионизирующего облучения является апоптоз с участием полифункционального белка p53. Если активность репарационных систем недостаточна для восстановления

повреждений, белок р53 взаимодействует с белками, модулирующими апоптоз, защищая организм от появления клеток с повреждениями генома.

Впервые установлено, что острое воздействие высокоинтенсивного низкочастотного шума сопровождается повышением уровня низкомолекулярной ДНК в плазме крови крыс, соответствующее сверхлетальной дозе облучения. Известно, что ДНК имеет небольшое время циркуляции в плазме крови [4]. Значительные количества низкомолекулярной ДНК через неделю после акустического воздействия свидетельствуют о продолжающейся гибели клеток, вызванной исследуемым фактором. В данном случае, как и в случае длительного акустического воздействия, количество низкомолекулярной ДНК, обнаруженное после воздействия с УЗД 120 дБ, достоверно превышает обнаруженное после воздействия с УЗД 150 дБ. Последствием длительного действия низкочастотного шума является 3-5-кратное возрастание содержания низкомолекулярной ДНК.

Известно, что острое воздействие высокоинтенсивного низкочастотного шума сопровождается структурными и клеточными нарушениями, которые сводятся к геморрагическим проявлениям в лёгких [30] и сопровождаются массивной гибелью клеток. Увеличение содержания внеклеточной низкомолекулярной ДНК может быть вызвано прямым воздействием низкочастотных акустических колебаний на органы, клетки и ткани, а также на структуры ДНК, приводящим к их возмущению [31], нарушению хромосом [32] и активации белка р53 [33]. Многократное акустическое воздействие вызывает структурные изменения, характерные для очаговой эмфиземы лёгких, которые сохраняются на протяжении длительного времени [30] и могут служить структурной основой для развития обструктивного бронхита. Образование низкомолекулярной фракции ДНК вызвано гибелью клеток [11], и её обнаружение через 1 неделю после воздействия можно связать с гипоксией, сопровождающей указанные морфологические изменения.

Обнаружение сходных количеств низкомолекулярной ДНК в плазме крови и спинномозговой жидкости больных с ишемическим типом ОНМК спустя 24 ч от начала болезни свидетельствует о её выделении из гибнущих путём апоптоза клеток головного мозга формирующегося очага ишемии и согласуется с предположением о роли апоптоза в развитии ишемического инсульта. Значительная концентрация и длительность циркуляции внеклеточной низкомолекулярной ДНК могут служить показателем масштаба повреждения в остром периоде инсульта, и, возможно, определять временные границы “терапевтического окна”, на протяжении которого ишемия считается в наибольшей мере обратимой. При геморрагическом типе ОНМК источником появления низкомолекулярной ДНК может быть гибель клеток крови, которая происходит при формировании тромба непосредственно в сосудистом русле в результате выраженной стрессорной реакции, характерной для данной патологии.

Пониженные значения исследуемого показателя у больных ХОБЛ в состоянии ремиссии соответствуют представлениям об ингибировании процесса апоптоза в механизме патогенеза этого заболевания за счёт усиления выживания клеток путём мобилизации генов митогенного каскада [34, 35]. Известно, что в основе активации клеточного цикла лежит экспрессия белка Ras, соединяющего сигнальный путь рецепторов факторов роста с каскадом MAP-протеинкиназ, активирующих митоз. Такой путь регуляции задействован в клетках дыхательного эпителия в ответ на воздействие воздушных загрязнителей [35]. В настоящее время показано, что соматические мутации

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ В ДИАГНОСТИКЕ

RAS и EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), как врождённые, так и приобретенные, ассоциируются с ХОБЛ и способствуют развитию злокачественных новообразований активированием мутантных аллелей K-ras [36, 37]. Точечные мутации гена K-ras, обнаруживаемые в циркулирующей ДНК, определяются не только у онкологических больных, но в ряде случаев и у здоровых. Здесь уместно говорить о предрасположенности к развитию заболеваний [38]. Данные индивидуального анализа родственников больных ХОБЛ поддерживают представления о генетической природе возникновения этого заболевания.

Таким образом, полученные в эксперименте данные по определению внеклеточной низкомолекулярной ДНК можно использовать в качестве биодозиметрического показателя после облучения в широком диапазоне доз, в качестве критерия действия низкочастотного шума на организм и гигиенического нормирования воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Данные, полученные в клинике, подтверждают информативность предложенного показателя не только для прогноза тяжести состояния у неврологических больных и для диагностики типа ОНМК, но и в дифференциальной диагностике хронических бронхитов. Дальнейшие исследования в этой области позволят объяснить причины возникновения ряда заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mendel P., Metais P. (1948) C. R. Acad. Sci. Paris., **142**, 241-243.
2. Belohkvostov A.S., Zelenkova N.K. (1978) Cancer Lett., **5**, 351-356.
3. Stroun M., Anker Ph., Lyautey J., Lederrey Ch., Maurice P.A. (1987) Eur. J. Cancer Clin. Oncol., **23**, 707-712.
4. Lo D., Zhang J., Loung T., Lau T., Chang A., Hjelm N. (1999) Am. J. Hum. Genet., **64**, 218-224.
5. Chen D., Pan Sh., Zhang Sh., Huang P., Xia W., Xie E., Gu B., Wang F., Xu J., Xu T., Lu., Yang D., Lu Sh. (2011) in: Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (Gahan P.B., ed.) Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, pp.171-182.
6. Herrmann M., Leitmann W., Krapf E.F., Kalden J.R. (1989) In: Molecular and Cellular Mechanisms of Human Hypersensitivity and Autoimmunity, N.Y., Vol. 105, pp.147-157.
7. Rainer T.H., Lam N.Y.L. (2006) Ann. N.Y. Acad. Sci., **1075**, 271-277.
8. Show J.-P., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B. (1991) Nucleic Acids Res., **19**, 747-750.
9. Halicka H.D., Bedner E., Darzynkiewicz Z. (2000) Exp. Cell Res., **250**, 248-256.
10. Vladimirov V.G., Belokhvostov A.S., Sherlina S.S., Vasilyeva I.N., Voskresensky A.M. (1992) J. Rad. Biol., **62**, 667-671.
11. McConkey D.J., Zhivotovsky B., Orrenius S. (1996) Molec. Aspects. Med., **17**, 1-110.
12. Holdenrieder S., Stieber P. (2009) Crit. Rev. Clin. Lab Sci., **46**, 10-24.
13. Скулачев В.П. (1999) Биохимия, **64**, 1679-1688.
14. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. (2000) Биохимия, **65**, 1029-1046.
15. Thompson C.B. (1995) Science, **267**, 1456-1462.

16. *Hu B.H., Cai Q., Manohar S., Jiang H., Ding D., Coling D.E., Zheng G., Salvi R.* (2009) *Neuroscience*, **161**, 915-925.
17. *Potton E., McCaughan F., Janes S.* (2009) *Respir. Med.*, **5**, 34-37.
18. *Turner M., Chen Y., Krewski D.* (2007) *Am. J. Respir. Med.*, **176**, 285-290.
19. *Владимиров В.Г., Васильева И.Н.* (1997) в: Ферменты и нуклеиновые кислоты (Лызлова С.Н., Владимиров В.Г., ред.). Изд. С.-Петербург. ун-та., С-Петербург, с. 111-147.
20. *Маниатис Т., Фритч Э., Сэмбрук Дж.* (1982) Методы генной инженерии: Молекулярное клонирование (пер.с англ.), Мир, М.
21. *Skalka A., Fowler A.V., Hurwitz J.* (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 588-595.
22. *Jabbari K., Caccio S., Barros J.P.P., Desgres J., Bernardi G.* (1977) *Gene*, **205**, 109-118.
23. *Van Helden P.D.* (1985) *J. Immunol.*, **134**, 177-179.
24. *Van der Vaart M., Pretorius P.J.* (2008) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1137**, 92-97.
25. *Van der Vaart M., Semenov D.V., Kuligina E.V., Richter V.A., Pretorius P.J.* (2011) in: *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum* (Gahan P.B., ed.) Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, pp. 29-33.
26. *Adams R., Burdon R.* (1985) *Molecular biology of DNA methylation.* Springer-Verlag. N.Y.
27. *Tillo D., Huges T.R.* (2009) *BMC bioinformatics*, **10**, 442-452.
28. *Cooper D.N., Gerber-Auber S.* (1985) *Cell Differ.*, **3**, 199-205.
29. *Mathieu J., Richard S., Ballester B., Chancerelle J., Assad W., Multon E.* (1999) *Ann. Pharm. Fr.*, **57**, 314-323.
30. *Зинкин В.Н., Свидовый В.И., Палишкина Е.Е.* (2009) в: Медицина Труда. Здоровье работающего населения: достижения и перспективы. СПб МАПО, С.-Петербург, с. 53-55.
31. *Нечипуренко Ю.Д., Полозов Р.В., Нечипуренко Д.Ю., Ильичева И.А., Головкин М.В., Панченко Л.А., Гроховский С.Л.* (2010) Компьютерные исследования и моделирование, **20**, 419-428.
32. *Плужников Н.Н., Владимиров В.Г., Зинкин В.Н., Вобликов И.В., Васильева И.Н., Родионов Г.Г., Малышева И.В., Жаковко Е.Б., Шарова Л.А., Шибанов Е.А.* (2001) Радиационная биология. Радиоэкология, **41**, 67-72.
33. *Zhou Y., Ding D., Zheng H., Zheng G., Shen X., Zhang Q., Salvy R.* (2011) *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ton Jinq Wai Ke Za Zhi.* [Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery], **46**, 54-58.
34. *Atkas H., Cai H., Cooper G.M.* (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 3850-3857.
35. *Li J., Ghio A.J., Cho S.-H., Brinckerhoff C.E., Simon S.A., Liedtke W.* (2009) *Env. Health Perspectives.*, **117**, 400-409.
36. *Anderson G.P., Bozinovski S.* (2003) *Trends in Pharmacol. Sci.*, **24**, 71-76.
37. *Modhaddam S.J., Li H., Cho S.-N., Dishop M.K., Wistuba I.I., Ji L., Kurie J.M., Dickey B.F., DeMayo F.J.* (2009) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **40**, 443-453.
38. *Fleischhaker M., Schmidt B.* (2007) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1775**, 181-232.

Поступила: 19. 08. 2011.

**THE VALUE OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT DNA OF BLOOD PLASMA IN THE DIAGNOSTIC OF THE PATOLOGICAL PROCESSES OF DIFFERENT GENESIS**

*I.N. Vasilyeva<sup>1</sup>, V.N. Zinkin<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>St.-Petersburg Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology, Ligovsky pr., 2-4, St.-Petersburg, 191036 Russia; fax: (812)297-66-31; e-mail: nicolaivasiliev@hotmail.com

<sup>2</sup>State Scientific Research Tested Institute of Military Medicine, DM RF, Petrovsko-Razymovskaya allea 12 A, Moscow, 127083 Russia

The low-molecular-weight DNA appears in blood plasma of irradiated rats, and its content correlates directly with the irradiation dose. Cloning has shown, that enrichment of low-molecular-weight DNA with G+C content and features of its nucleotide sequences point to its ability to form rather stable nucleosomes. DNA obtained after irradiation of rats with principally different doses 8 and 100 Gy differed not only quantitatively, but also by content of the dinucleotides CpG and CpT; this suggests their origin from different sites of genome. For the first time it has been shown that exposure to low-frequency noise results in an increase of the contents of blood plasma low-molecular-weight DNA. In stroke patients blood concentrations of this DNA increased 3 days after the beginning of the acute period, and dynamics of its excretion differs in ischemic and hemorrhagic forms; in the case of ischemia low-molecular-weight DNA appears in cerebrospinal fluid. The chronic obstructive pulmonary disease in the state of remission is characterized by the decline of the level of low-molecular-weight DNA in the blood plasma unlike in the case of the chronic nonobstructive bronchitis. The clear dependence between formation and special features of the low-molecular-weight DNA fraction in blood plasma makes it possible to consider the low-molecular fraction as an universal index of apoptosis, which allows to distinguish basically different conditions of the body.

**Key words:** low-molecular-weight DNA, ionizing radiation, nucleosomes, low-frequency noise, ischemic cerebrovascular accident, chronic obstructive pulmonary disease, apoptosis.