

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.123.8+616-064

©Коллектив авторов

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОЙ КИШКИ

*С.Н. Тамкович¹, О.Е. Брызгунова¹, Е.Ю. Рыкова¹, Е.В. Колесникова²,
П.И.Шелестюк², П.П. Лактионов¹, В.В. Власов¹*

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8; тел.: (383-2)30-46-54, факс: (383-2)33-36-77; эл. почта: s.tamk@niboch.nsc.ru

² ГУЗ Новосибирский областной онкологический диспансер, 630108, Новосибирск, ул. Плеханова, 2.

Исследованы концентрации внеклеточных дезокси- и рибонуклеиновых кислот (внНК), циркулирующих в плазме и связанных с поверхностью форменных элементов в крови здоровых доноров, а также больных раком желудка и раком толстой кишки. Обнаружено, что при раке желудка и толстой кишки концентрация циркулирующей ДНК в плазме крови возрастает, а концентрация связанной с поверхностью клеток крови внеклеточной РНК уменьшается по сравнению со здоровыми донорами. Показано, что доля циркулирующих внНК плазмы в общем количестве циркулирующих внНК крови достоверно отличается у здоровых доноров и больных раком ЖКТ.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, внеклеточная РНК, адсорбированная на клетках поверхностная циркулирующая ДНК, адсорбированная на клетках поверхностная циркулирующая РНК, рак желудка, рак толстой кишки.

ВВЕДЕНИЕ. Опухоли желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) составляют значительную часть злокачественных новообразований. Позднее выявление этих заболеваний (доля больных раком III стадии, поступающих в стационар, составляет 35,8 %, а VI стадии – 23,1 % [1]) объясняет низкую выживаемость, характерную для этих типов рака. Диагностика рака ЖКТ сильно затруднена, поскольку заболевание имеет сходную с нераковыми заболеваниями ЖКТ симптоматику, и зачастую ранние стадии протекают практически бессимптомно. Методы гастро- и колоноскопии, наряду с гистологическими, рентгенологическими, ультразвуковыми и томографическими методами диагностики высокоэффективны для выявления опухолей ЖКТ, однако мало применимы в ранней диагностике рака, на стадиях предрака, когда еще эффективно оперативное лечение. Очевидно, что выявление специфических маркеров раковой трансформации может быть использовано в онкодиагностике. Для выявления белковых факторов, связанных с развитием рака ЖКТ были разработаны методы иммуноаналитического определения раковоэмбрионального антигена, α -фетопротейна, некоторых сопутствующих онкотрансформации белков острой фазы (орозомукоид, гаптоглобин, α 1-антитрипсин) [1]. Эти методы широко

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НК В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ

используются в практике, хотя и мало применимы для ранней диагностики рака, что связано с поздним появлением белковых онкомаркеров в крови, низкой по сравнению с методами ПЦР-диагностики чувствительностью и разнообразием онкотрансформированных клеток, не все из которых экспрессируют повышенный уровень искомым маркеров.

Одним из подходов к ранней диагностике онкологических заболеваний является исследование циркулирующих в крови внеклеточных нуклеиновых кислот (внНК). Показано, что внНК могут циркулировать в плазме в составе комплексов с белками, липидами, а также способны связываться с поверхностью клеток [2-4]. В плазме крови здоровых доноров концентрация циркулирующей ДНК может достигать 30 нг/мл [5]. Уровень внеклеточной ДНК (внДНК) возрастает при развитии онкологических заболеваний, однако зависимости концентрации внДНК от стадии заболевания не наблюдается [6]. Часть внДНК, циркулирующей в плазме крови раковых больных, имеет опухолевое происхождение [6]. Показано, что даже при наличии в организме опухолей размером в 100-1000 клеток методы ПЦР-анализа позволяют обнаружить в плазме крови онкоспецифические последовательности, характерные для этих клеток [7].

Наряду с внДНК в крови больных раком молочной железы и раком прямой кишки обнаружено наличие онкоспецифических РНК [8,9]. Однако концентрация внеклеточной РНК (внРНК), циркулирующей в плазме крови в норме и при патологии до сих пор не исследована.

В данной работе мы исследовали распределение внеклеточных дезокси- и рибонуклеиновых кислот между плазмой и поверхностью форменных элементов крови, а также концентрации внНК в крови у здоровых доноров и больных с злокачественными опухолями желудочно-кишечного тракта.

МЕТОДИКА. Нами обследовано 25 больных раком желудка и толстой кишки в основном с III и IV стадиями заболевания (классификация TNM). Из обследованных 15 больных раком желудка и 10 – раком толстой кишки.

Исследование венозной крови проводили при поступлении больных в Новосибирский областной онкологический диспансер. Контрольную группу составили 26 здоровых доноров из Центральной клинической больницы СО РАН. Образцы крови хранили при 4°C и обрабатывали в ближайшие 6 часов после забора крови путем венепункции. 3,2 мл крови отбирали в пробирки, содержащие 0,8 мл 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, с 0,15 М NaCl и 50 мМ ЭДТА. Образцы крови разделяли на плазму и фракцию клеток центрифугированием в течение 20 мин при 400 g. Затем измеряли объемы плазмы и клеточной фракции. Суммарную клеточную фракцию каждого образца инкубировали в течение 5 мин при 20°C с 9 объемами 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, 0,15 М NaCl, содержащего 5 мМ ЭДТА (ФБ-ЭДТА) при осторожном перемешивании. Клетки осаждали центрифугированием 15 мин при 400 g, супернатант отбирали для последующего измерения концентрации нуклеиновых кислот (ФБ-ЭДТА фракция). Осадок клеток инкубировали в течение 5 мин при 20°C с равным объемом 0,25 % раствора трипсина ("Sigma", США, T4799) при осторожном перемешивании. Трипсин инактивировали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов ("Sigma", T9003) из расчета 143 мкг ингибитора на 1 мг фермента. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 400 g, супернатант отбирали для последующего измерения концентрации нуклеиновых кислот (трипсиновая фракция).

Жизнеспособность клеток определяли при помощи окрашивания клеток трипановым синим с последующим подсчетом доли окрашенных клеток в камере Горяева. Плазму, ФБ-ЭДТА и трипсиновую фракции хранили в аликвотах при -20°C.

ВнНК из плазмы крови и клеточных элюатов выделяли сорбцией на мелкодисперсном стекле. К 1 мл образца добавляли 2 мл буфера, содержащего 6,75 М гуанидин тиоционат (ГТЦ), 60 мМ ЭДТА, 15 мМ трис-ацетат, pH 6,4 и 3 мг мелкодисперсного стекла [10,11]. После инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре на качалке, добавляли 2,7 мл изопропанола, 7,8 мл буфера,

содержащего 40 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-ацетат, pH 4,5 и 3 мг мелкодисперсного стекла. После инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре на качалке, мелкодисперсное стекло осаждали центрифугированием в течение 30 сек при 1000 g. Супернатант удаляли, осадок мелкодисперсного стекла промывали дважды буфером, содержащим 4,5 М ГТЦ, 40 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-ацетат, pH 6,4, а затем дважды буфером, содержащим 25 % изопропанола, 100 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0. ВнНК элюировали с поверхности мелкодисперсного стекла на качалке в течение 2 мин как описано [10,11]. Выделение нуклеиновых кислот из стандартных образцов ДНК (для построения калибровочной кривой) и исследуемых образцов проводили методом сорбции на мелкодисперсном стекле в одной постановке.

Концентрацию внДНК в анализируемых образцах определяли при помощи флуоресцирующего интеркалирующего красителя Hoechst 33258. Концентрацию внРНК определяли при помощи флуоресцирующего красителя SYBR Green II. Исходя из концентрации ДНК и калибровочной кривой флуоресценции комплексов ДНК с SYBR Green II, определяли вклад флуоресценции ДНК в флуоресценцию измеряемого образца. Флуоресценцию РНК определяли как разницу между суммарной флуоресценцией образца и флуоресценцией ДНК. Концентрацию РНК определяли по калибровочной кривой флуоресценции комплексов РНК с SYBR Green II [12]. Чувствительность флуоресцентного метода измерения концентраций нуклеиновых кислот, определенная как минимальная достоверно определяемая концентрация нуклеиновых кислот, составила для ДНК 10 нг/мл, для РНК – 5 нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Концентрацию внНК в образцах крови определяли в двух независимых экспериментах, используя для выделения внНК в каждом эксперименте по 1 мл плазмы, 2 мл ФБ-ЭДТА элюата и 0,5 мл трипсинового элюата. Половину выделенных внНК использовали для определения концентрации ДНК, половину – для определения концентрации РНК. Поскольку в образцах крови было различное соотношение плазмы и форменных элементов крови, для унификации данных концентрации внНК пересчитаны на 1 мл исходной крови. С учетом объемов плазмы и элюатов, минимальный уровень детекции внНК в крови составлял для плазмы 8 нг/мл крови, для ФБ-ЭДТА фракции 45 нг/мл крови и 20 нг/мл крови для трипсиновой фракции.

Концентрация внДНК в 2 образцах плазмы крови здоровых доноров находится ниже уровня детекции (8 нг/мл), а в остальных образцах не превышает $13 \pm 12,9$ нг/мл крови (табл. 1), что соответствует приводимым в литературе данным [5, 6]. ВнРНК в плазме крови здоровых доноров была обнаружена в 10 из 26 образцов (38 % случаев), а частота обнаружения внРНК в плазме у мужчин и женщин не отличалась. Концентрация внРНК в плазме крови здоровых женщин детектировалась не выше 36 ± 31 нг/мл крови, у мужчин внРНК обнаружена в 3 случаях из 8 в средней концентрации 127 нг/мл крови (табл. 1).

Известно, что на поверхности эукариотических клеток присутствуют белки, способные связывать нуклеиновые кислоты [4]. Нуклеопротеиновые комплексы тоже могут адсорбироваться на поверхности клеток через белковую часть комплекса [2]. В присутствии двухвалентных катионов металлов ДНК может эффективно связываться с поверхностью липосом и клеточных мембран [13]. Адсорбция осуществляется, по-видимому, посредством связывания остатков фосфорной кислоты ДНК с фосфолипидами через двухвалентные катионы металлов [13]. Можно предположить, что аналогичные взаимодействия нуклеиновых кислот могут иметь место и на поверхности мембран клеток крови.

Для элюции внНК, связанных с поверхностью форменных элементов крови была использована двустадийная элюция. На первой стадии, связанные с поверхностью клеток крови нуклеиновые кислоты отмывали ФБ, содержащим хелатирующий агент. Для разрушения комплексов поверхностных белков с нуклеиновыми кислотами обрабатывали клетки раствором трипсина в условиях,

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НК В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ

не вызывающих лизис клеток (см. раздел "Методика").

В крови здоровых доноров основная часть внНК связана с поверхностью форменных элементов крови. При этом даже если в плазме внНК не были выявлены, значительное их количество было обнаружено на поверхности форменных элементов крови. Интересно отметить, что суммарный уровень связанных с клетками крови внеклеточных дезокси- и рибонуклеиновых кислот у мужчин был примерно в 3,7 раза выше, чем у женщин. Концентрация внРНК, связанной с поверхностью клеток, крови у здоровых женщин достоверно отличается от концентрации РНК связанной с поверхностью клеток крови у здоровых мужчин ($p = 0,000465$ при сравнении выборок по критерию Манна-Уитни) (табл. 1). Из полученных данных об уровне внНК в крови здоровых доноров можно сделать вывод, что при сравнении концентрации внНК, связанных с форменными элементами крови, в норме и при развитии патологии необходимо учитывать пол пациента.

Таблица 1. Внеклеточные нуклеиновые кислоты в крови здоровых доноров

№	Пол	ВнНК, циркулирующие в плазме крови, нг/мл		ВнНК, связанные с поверхностью клеток крови, нг/мл				Отношение внНК в плазме/внНК, связанным с поверхностью клеток крови • 10
				ФБ ЭДТА фракция		Трипсиновая фракция		
		ДНК	РНК	ДНК	РНК	ДНК	РНК	
1	М	17	120	1170	310	350	300	0,64
2	М	13	0	380	350	400	280	0,09
3	М	13	0	2110	0	130	90	0,06
4	М	17	140	140	1720	50	290	0,71
5	М	16	0	1750	410	450	130	0,06
6	М	15	0	0	300	230	260	0,19
7	М	15	0	420	350	2010	20	0,05
8	М	0	120	0	100	210	270	2,07
9	Ж	0	38	94	147	315	90	0,59
10	Ж	25	28	0	105	871	21	0,53
11	Ж	8	14	114	71	185	28	0,53
12	Ж	10	53	0	145	540	95	0,54
13	Ж	16	59	96	276	463	100	0,80
14	Ж	25	33	98	354	537	0	0,32
15	Ж	8	28	0	0	203	0	1,63
16	Ж	10	0	110	0	38	0	0,68
17	Ж	10	0	95	0	173	23	0,34
18	Ж	8	0	164	0	20	0	0,44
19	Ж	10	0	0	45	281	0	0,31
20	Ж	10	0	88	50	643	0	0,13
21	Ж	10	0	53	112	706	0	0,11
22	Ж	15	0	45	117	661	0	0,18
23	Ж	20	0	62	0	461	0	0,38
24	Ж	8	0	211	0	85	0	0,27
25	Ж	17	0	46	0	106	0	1,40
26	Ж	20	0	108	0	64	0	1,16

Примечания. Здесь и в таблицах 2 и 3: * - Концентрация ВнНК приведена на 1 мл крови. Концентрация ВнНК ниже чувствительности метода обозначена как 0.

В данной работе нами была проанализирована кровь 15 больных с умеренно-дифференцированной аденокарциномой желудка (7 мужчин и 8 женщин в возрасте от 46 до 76 лет). Все первично поступившие больные имели уже

распространенную стадию рака желудка, поскольку данное заболевание характеризуется скрытым течением и сходной картиной с доброкачественными поражениями воспалительного или функционального характера. У всех пациентов был проведен общий анализ крови и анализ биохимических показателей крови. У больных раком желудка количество эритроцитов снижено в 69 % случаев, гемоглобин - у 4 из 15 пациентов. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) была выше нормы в 85 % случаев. Биохимический анализ крови больных практически не отличался от нормы: общий белок был снижен по сравнению с нормой в 14 % случаев, альбумины - в 29 %, уровень глюкозы повышен в 15 % случаев, мочевины - в 43 %, активность АСТ была повышена в 21 %, активность АЛТ, и уровни калия и натрия плазмы от нормы не отличались. У больных раком толстой кишки общий анализ крови и биохимический анализ крови в целом также не информативны и не коррелируют со стадией заболевания, за исключением повышенной СОЭ (44% случаев) и сниженных уровней эритроцитов (90% случаев) и гемоглобина (55% случаев).

Исследование внНК плазмы показало, что больные раком желудка достоверно отличаются по концентрации внДНК в плазме от здоровых доноров (критерий Манна-Уитни, $p = 0,001691$) (табл. 2). Однако концентрация внНК плазмы не коррелирует с размером опухоли и стадией заболевания.

Таблица 2. Внеклеточные нуклеиновые кислоты в крови больных раком желудка*

№	Пол	Стадия	ВнНК в плазме крови, нг/мл		ВнНК, связанные с поверхностью клеток крови, нг/мл				Отношение внНК в плазме/внНК, связанным с поверхностью клеток крови • 10
					ФБ-ЭДТА фракция		Трипсиновая фракция		
			ДНК	РНК	ДНК	РНК	ДНК	РНК	
1	М	T ₁ N ₀ M ₀	278	0	185	0	948	0	2,45
2	М	T ₂ N ₀ M ₀	426	0	212	0	482	0	6,14
3	М	T ₃ N ₀ M ₁	175	0	435	0	169	0	2,90
4	М	T ₃ N ₁ M ₀	8	39	430	0	48	10	0,08
5	М	T ₃ N ₁ M ₀	14	0	421	0	286	0	0,20
6	М	T ₄ N _x M ₁	527	0	87	0	507	0	8,87
7	М	T ₄ N ₂ M ₁	178	0	397	79	1067	0	1,15
8	Ж	T ₂ N ₀ M ₀	167	0	197	0	326	0	3,19
9	Ж	T ₂ N ₂ M ₀	159	0	198	54	903	0	1,38
10	Ж	T ₂ N _x M ₀	20	10	261	11	186	0	0,66
11	Ж	T ₂ N _x M ₀	194	0	393	0	215	0	3,19
12	Ж	T ₂ N _x M ₀	0	30	17	11	182	33	1,23
13	Ж	T ₃ N ₂ M ₁	30	18	257	0	236	0	0,07
14	Ж	T ₃ N _x M ₀	10	15	10	9	64	0	3,01
15	Ж	T ₄ N ₂ M _x	71	0	264	0	437	0	1,01

У здоровых и онкологических больных концентрации связанной внДНК не отличаются (табл. 1, 2), концентрация внРНК на поверхности клеток крови больных раком желудка достоверно ниже концентрации РНК, связанной с поверхностью клеток крови здоровых доноров, вне зависимости от пола ($p = 0,001771$ при сравнении выборок по критерию Манна-Уитни).

Сходное с больными раком желудка распределение внНК в крови было обнаружено у 10 больных (5 мужчин и 5 женщин в возрасте от 30 до 73 лет) раком толстой кишки (табл. 3). Концентрация внДНК в плазме крови у больных раком толстой кишки была повышена в 80 % случаев по сравнению с нормой и достоверно отличается от концентрации внДНК в плазме здоровых доноров (критерий Манна-Уитни, $p = 0,004721$). ВнРНК в плазме крови детектировалась у 6 пациентов из 10 (табл. 3). При данном типе рака также как и при раке желудка,

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НК В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ

не было обнаружено зависимости концентрации внНК от тяжести заболевания. Уровень внДНК, связанной с клетками крови, по сравнению со здоровыми донорами у мужчин и женщин с аденокарциномой толстой кишки не отличался от нормы, а уровень внРНК был достоверно понижен ($p = 0,047949$ при сравнении выборок по критерию Манна-Уитни) (табл. 3).

Таблица 3. Внеклеточные нуклеиновые кислоты в крови больных раком толстой кишки*

№	Пол	Стадия	ВнНК в плазме крови, нг/мл		ВнНК, связанные с поверхностью клеток крови, нг/мл				Отношение внНК в плазме/внНК, связанным с поверхностью клеток крови • 10
					ФБ-ЭДТА фракция		Трипсиновая фракция		
			ДНК	РНК	ДНК	РНК	ДНК	РНК	
1	М	T ₂ N ₁ M ₀	128	7	0	33	713	0	1,81
2	М	T ₃ N ₀ M ₀	297	0	19	153	2150	0	1,28
3	М	T ₃ N ₁ M ₀	140	9	64	0	438	0	2,97
4	М	T ₄ N ₁ M ₀	102	10	105	27	298	0	2,60
5	М	T ₄ N _x M ₁	0	6	231	20	564	0	0,7
6	Ж	T ₂ N ₀ M ₀	238	0	371	0	1759	0	1,12
7	Ж	T ₃ N ₀ M ₀	81	16	40	22	179	0	4,02
8	Ж	T ₃ N ₁ M ₀	0	52	0	105	505	0	0,85
9	Ж	T ₃ N ₀ M ₁	50	0	110	0	128	0	2,10
10	Ж	T ₃ N ₂ M ₀	204	0	149	0	199	0	5,86

Таким образом, при развитии рака желудка и толстой кишки происходят принципиальные изменения в крови больных: на фоне увеличения СОЭ и нормохромной анемии легкой и средней степеней тяжести, происходят увеличение уровня внДНК в плазме и снижение уровня внРНК, связанной с поверхностью форменных элементов крови. Отличие в концентрации внДНК плазмы и концентрации внРНК на поверхности клеток крови между здоровыми и онкологическими больными позволяет ввести дополнительный характеристический параметр - отношение концентрации циркулирующих внНК плазмы к концентрации связанных с поверхностью форменных элементов крови внНК. Этот параметр позволяет достоверно отличать больных раком ЖКТ от здоровых доноров (критерий Манна-Уитни, $p = 0,000097$ норма/аденокарцинома, $p = 0,000900$ норма/рак толстой кишки, табл. 1-3).

Ранее нами было показано, что в крови больных раком молочной железы отсутствуют внНК, связанные с поверхностью клеток, однако в плазме наблюдается повышенный уровень внДНК [14]. По-видимому, изменение распределения внНК в крови онкологических больных характерно для онкологических заболеваний, а информация о концентрации и распределении в циркуляции внНК может быть использована для выявления онкотрансформации. При этом очевидно, что для точной онкодиагностики необходим анализ онкоспецифических последовательностей циркулирующих ДНК или РНК [9, 15-17], а связанные с поверхностью внНК, могут быть использованы наряду с внНК плазмы для ПЦР-диагностики рака ЖКТ.

Обнаруженное нами уменьшение уровня внНК, связанных с форменными элементами крови, с одновременным увеличением уровня внДНК, циркулирующих в плазме крови, при раке ЖКТ, по-видимому, является следствием изменения активности нуклеаз и протеаз крови. Известно, что повышенный уровень металлопротеаз обеспечивает опухоли ангиогенез и активную инвазию в прилежащие ткани [18], а при некоторых типах рака наблюдается повышенная активность протеаз крови [19,20]. Повреждение белков, связывающих внНК на

поверхности форменных элементов крови, в связи с повышенным уровнем протеаз в крови может приводить к высвобождению связанной фракции внНК в плазму крови. Кроме того, наличие в плазме крови онкологических больных ингибиторов нуклеазной активности [21] может приводить к повышению уровня внНК в плазме крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В результате проведенной работы были исследованы особенности циркуляции внеклеточных дезокси- и рибонуклеиновых кислот в крови здоровых доноров и больных раком желудка и толстой кишки. Показано, что у здоровых доноров суммарный уровень связанных с клетками крови внеклеточных дезокси- и рибонуклеиновых кислот у мужчин существенно выше, чем у женщин, поэтому при анализе концентрации внНК больных необходимо учитывать пол пациента. Больные раком ЖКТ достоверно отличаются по концентрации внДНК в плазме крови от здоровых доноров, однако повышенная концентрация внНК плазмы не коррелирует с размером опухоли и стадией заболевания. Концентрация связанной с поверхностью клеток крови внРНК у онкологических больных уменьшается по сравнению со здоровыми донорами, а доля циркулирующих внНК плазмы в общем количестве циркулирующих внНК крови позволяет достоверно отличать больных раком ЖКТ от здоровых доноров.

На основании полученных данных можно сделать вывод о возможности использования измерения концентрации внНК для формирования групп риска рака ЖКТ. Однако для детальной оценки эффективности метода необходимо исследование больных с не онкологическими заболеваниями ЖКТ. Для точной онкодиагностики, по-видимому, необходим анализ онкоспецифических последовательностей циркулирующих ДНК или РНК [9, 15-17], и связанные с поверхностью внНК, могут быть использованы наряду с внНК плазмы для ПЦР-диагностики рака ЖКТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 141, научно-технической программы Министерства Образования РФ “Фундаментальные исследования высшей школы в области естественных и гуманитарных наук. Университеты России”. УР.07.01.008, РФФИ 03-04-48647а, гранта президента РФ для поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ – НШ-1384.2003.4, гранта Областной Администрации г. Новосибирска в 2004 году.

Авторы также благодарны “Фонду содействия отечественной науке”.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Чиссов В.И., Дарьялова С.Л., (2000) Избранные лекции по клинической онкологии, М.
2. Stroun M., Anker P., Beljanski M., et al. (1978) Cancer Res., **38**, 3546-3554.
3. Andreas J., Wiczorek, Vetry S., et al. (1982) Cancer Res., **47**, 6407-6412.
4. Bennett R.M., Gabor G.T., Merritt M.M. (1985) J. Clin. Invest., **76**, 2182-2190.
5. Steinman C.R. (1975) J. Clin. Invest., **56**, 512-515.
6. Jahr S., Hentze H., English S. (2001) Cancer Res., **61**, 1659-1665.
7. Goessl C., Krause H., Muller M., et al. (2000) Cancer Res., **60**, 5941-5945.
8. Kopreski M., Benco F., Kwak L., Gocke C. (1999) Clin. Cancer Res., **5**, 1961-1965.
9. Dasi F., Lledo S., Garcia-granero E., et al. (2001) Lab. Invest., **81**, 767-769.
10. Лактионов П.П., Тамкович С.Н., Симонов П.А. и др. Способ выделения дезоксирибонуклеиновых кислот. Заявка на изобретение № 2002126328/04(047843). Положительное решение 18.11.2003.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НК В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ

11. Лактионов П.П., Тамкович С.Н., Симонов П.А. и др. Способ выделения рибонуклеиновых кислот. Заявка на изобретение № 2002134341/13(036345). Положительное решение 10.02.2004.
12. Morozkin E.S., Laktionov P.P., Rykova E.Yu., Vlassov V.V. (2003) Anal. Biochem., **322**, 48-50.
13. Беляев Н.Д., Будкер В.Г., Горохова О.Е., Соколов А.В. (1988) Молекул. биол., **22**, 1667-1672.
14. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Yu., et al. (2004) Ann. N. Y. Acad. Sci., **1022**, 221-227.
15. Sorenson G.D. (2000) Clin. Cancer Res., **6**, 2129-2137.
16. Gocke C.D., Benko F.A., Kopreki M.S., McGarrity T.J. (2000) Ann. N.Y. Acad. Sci., **906**, 44-50.
17. Silva J.M., Rodriguez R., Garcia J.M., et al. (2002) Gut, **50**, 530-534.
18. Климов Е.В., Кондакова И.В., Чойнозов Е.Л. (2003) Сиб. онкол. журн., **2**, 62-70.
19. Zucker S., Lysik R.M., Zarrabi M.H., Moll U. (1993) Cancer Res., **53**, 140-146.
20. Farias E., Ranuncolo S., Cresta C., et al. (2000) Int. J. Cancer., **89**, 389-394.
21. Prince W.S., Baker D.L., Dodge A.H., et al. (1998) Clin. Exp. Immunol., **113**, 289-296.

Поступила: 20. 06. 2004 г.

CIRCULATING NUCLEIC ACIDS IN BLOOD OF PATIENTS WITH MALIGNANT TUMORS OF GASTROINTESTINAL TRACT

*S.N. Tamkovich¹, O.E. Bryzgunova¹, E.Yu. Rykova¹, E.V. Kolesnikova², P.I. Shelestuk²,
P.P. Laktionov¹, V.V. Vlassov¹.*

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB of RAS, Lavrentiev ave. 8, Novosibirsk, 630090 Russia; tel.: 7(383-2) 30-46-54, fax. 7(383-2) 33-36-77,

²Novosibirsk Oncological Dispensary, Plachotnogo ave., 2, Novosibirsk, 630108 Russia.

Concentrations of extracellular deoxy- and ribonucleic acids in blood plasma and cell-surface-bound of blood cells were investigated in healthy donors and patients with malignant gastrointestinal tumors. Our results indicate that high concentration of extracellular DNA in blood plasma along with decreased level of extracellular RNA on the surface of blood cells correlate with development of gastrointestinal cancer. Ratio of nucleic acids in plasma to total amount of nucleic acids circulated in blood is a characteristic parameter distinguishing cancer patients from healthy persons.

Key words: blood plasma, blood cells, extracellular nucleic acids, cell-surface-bound nucleic acids, stomach cancer, colorectal cancer.