

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.346; 618.19-006-085

©Коллектив авторов

ДОЛЯ МУТАНТНОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПОВЫШАЕТСЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКИХ ПОСЛЕ РАДИОТЕРАПИИ

И.Ю. Стрелкова¹, С.А. Абдуллаев¹, Г.П. Снигирева², В.Г. Безлепкин¹, А.И. Газиев^{1}*

¹Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3; тел.: (4967)731886, факс: (4967)330553, эл. почта: aigaziev@gmail.com

²ФГУ Российский научный центр рентгенорадиологии Минздравсоцразвития, Москва

Количественные и качественные изменения циркулирующей внеклеточной ДНК (вк-ДНК) плазмы крови рассматриваются как маркеры для диагностики и прогнозирования характера развития опухолевых патологий. Мы исследовали содержание мутантных копий циркулирующей внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) в плазме крови у 8 больных раком легких до и после проведения радиотерапии, а также у здоровых доноров молодого и пожилого возраста. Обнаружено, что в плазме здоровых пожилых доноров доля мтДНК с мутациями (в составе общей циркулирующей ДНК) значительно больше, чем у молодых доноров. В плазме больных раком легких (в возрасте 70-76 лет) до проведения радиотерапии наблюдается существенное повышение доли вк-мтДНК с мутациями, по сравнению с таковой у здоровых доноров пожилого возраста. После проведения курса радиотерапии у пациентов, страдающих раком легких отмечено двукратное увеличение доли вк-мтДНК с мутациями в составе общей циркулирующей ДНК плазмы. Вероятно, в значительной мере это обусловлено высвобождением мутантных копий ДНК из гибнущих клеток опухолей и клеток поврежденных радиационным воздействием нормальных тканей.

Ключевые слова: рак легких, внеклеточная мтДНК плазмы, радиотерапия, мутации, CEL-I эндонуклеаза, расщепление гетеродуплексов.

ВВЕДЕНИЕ. Во многих исследованиях количественные и качественные изменения циркулирующей внеклеточной ДНК (вк-ДНК) плазмы (сыворотки) крови рассматриваются как дополнительные маркеры для неинвазивного диагностирования и прогнозирования различных опухолевых патологий [1-4]. Эти же изменения циркулирующей вк-ДНК могут быть использованы также для оценки эффективности терапии онкологических заболеваний у пациентов [5-7]. Однако, использование внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) в качестве маркера имеет существенные преимущества относительно ядерной ДНК (ядДНК) [8, 9]. Это обусловлено тем, что мтДНК характеризуется рядом особенностей, отличных от яДНК, в структурной организации и функционировании. Так, соматические клетки человека содержат несколько тысяч копий мтДНК размером около 16,5 т.п.н., несущих гены, кодирующие белки системы дыхательной цепи. Для физических и химических генотоксических агентов мтДНК является более уязвимой мишенью клетки по сравнению с яДНК. При воздействии на клетки повреждающих агентов в мтДНК образуется в 10-50 раз больше повреждений (мутаций), чем в соразмерном фрагменте яДНК. В митохондриях ограничено функционируют различные системы репарации ДНК. В отличие от яДНК, мтДНК не содержит некодируемые последовательности (за исключением участка D-loop), транскрибируется как единый полицистронный блок, и любые нарушения в ней могут быть патогенетическими [10, 11]. Эти особенности и могут обеспечить преимущества мтДНК, как более чувствительного маркера оценки

* - адресат для переписки

генотоксических эффектов средств терапии опухолей, чем яДНК. Поэтому в процессе радио-химиотерапии опухолей можно ожидать больше изменений как в количественном содержании циркулирующей вк-мтДНК, так и в частоте мутаций в ней по сравнению с вк-яДНК плазмы крови пациентов.

Настоящая работа посвящена определению содержания мутантных копий циркулирующей вк-мтДНК в плазме крови больных раком легких до и после проведения радиотерапии. Для анализа мутаций использовали ферментативный метод, основанный на расщеплении CEL-I эндонуклеазой участков ДНК с неспаренными основаниями.

МЕТОДИКА.

Пациенты, доноры. Получение образцов ДНК. Периферическая кровь была получена от 8 пациентов в возрасте 70-76 лет с диагнозом рак легкого, госпитализированных в отделении лучевой терапии ФГУ “Российского научного центра рентгенорадиологии” Росмедтехнологий, г. Москва. Забор крови пациентов производился до начала и после окончания курса радиотерапии. Кровь в объёме 1 мл собирали в пробирки, содержащие EDTA, и сразу центрифугировали 10 мин при 16000 g [12]. Плазму собирали и общую ДНК (ядерную и митохондриальную ДНК) из нее выделяли с помощью магнитных сорбентов с использованием набора реагентов, полученных от ООО “Лаборатория Изоген” (Москва) как описано [13]. ДНК растворяли в ТЕ буфере (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ Na₂EDTA, pH 8,0). Количественное содержание ДНК определяли по реакции с реагентом Pico Green согласно протоколу производителя (“Molecular Probes”, США) с регистрацией флуоресценции на приборе Tecan Infinite 200 (Австрия). В качестве контроля были использованы образцы ДНК, полученные из плазмы крови здоровых пожилых доноров (60-79 лет), а также молодых доноров в возрасте 21-27 лет.

ПЦР-амплификация, получение гетеродуплексов и их обработка CEL-I эндонуклеазой. ПЦР-амплификацию участка размером 2066 п.н. (в позиции 4155-6220) мтДНК проводили в составе общей циркулирующей вк-ДНК плазмы онкологических пациентов и контрольных доноров. Реакционная смесь ПЦР (общий объем 25 мкл) содержала: 75 мМ Трис-HCl, pH 8,8, 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 250 нМ каждого праймера, 0,01% твин-20. В реакционную смесь вводили 1 нг ДНК и 1 суммарную единицу смеси *Taq*- и *Pfu*-полимераз (“Fermentas”, Литва). После первичной денатурации ДНК-матриц при 94°C в течение 12 мин ПЦР проводили в режиме 35 циклов: денатурация 1 мин при 94°C, отжиг 1 мин при 58°C и элонгация 1,5 мин при 72°C, после которых - завершающая инкубация 8 мин при 72°C. Были использованы праймеры: SC-C for (5'-CAA CTC ATA CAC CTC STA TGA-3') и SC-C rev (5'-AGG TAA GAG TCA GAA GCT TAT G-3') [14], синтезированные в ЗАО “Синтол” (Москва). ПЦР проводили на программируемом термоциклере “Терцик” ЗАО “НПФ -ДНК-Технология” (Москва). Продукты ПЦР-амплификации во всех случаях контролировали электрофорезом в полиакриламидном геле с окраской азотнокислым серебром. После завершения реакции все продукты ПЦР образцов ДНК были доведены, добавлением ТЕ буфера, до одинаковой концентрации.

Для получения гетеродуплексов смешивали равные объёмы (по 10 мкл) ПЦР-ампликонов вк-мтДНК плазмы пациента (полученной до и после радиотерапии) и молодого донора. Аналогичным образом получали смеси ПЦР-ампликонов вк-мтДНК плазмы пожилого и молодого доноров, а также ПЦР-ампликонов от двух молодых доноров. Смеси нагревали при 98°C (в течение 10 мин) и для гибридизации ДНК медленно охлаждали до 40°C при скорости снижения температуры 1°C/мин. Затем образцы выдерживали 45 мин при комнатной температуре [15, 16].

Далее к аликватам (10 мкл) растворов гетеродуплексов добавляли 2,5 единиц активности (0,5 мкл) CEL-I эндонуклеазы (Transgenomic, Omaha) и 5 мкл 10 мМ Трис-HCl буфера, pH 8,0, содержащего 2,0 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 3 мМ дитиотретола, 0,005% Тритон X-100, 0,3% глицерин, 0,4 мкг/мл альбумина сыворотки крупного рогатого скота. Смесь инкубировали при 40°C в течение 60 мин.

Реакцию останавливали добавлением 0,5 мкл 150 мМ раствора Na_2EDTA (pH 8,0). По 7 мкл реакционной смеси использовали для гель-электрофореза в 1% агарозе. В качестве маркера использовали MassRuler Express DNA Ladder Mix, Forward, ready-to-use, 100 – 10000; Fermentas, Inc., Catalog # SM1293 (ДНК-маркер, позволяющий быстро и корректно оценивать размеры фрагментов ДНК на дорожках геля и количество каждого из них в диапазоне 12 от 100 до 10000 п.н.; состоит из 12 продуктов). Электрофорез проводили в 100 мМ Трис-HCl буфере (pH 8,0), содержащем 80 мМ борной кислоты, 1 мМ Na_2EDTA и 1 мкг бромида этидия. Интенсивность флуоресценции полос ДНК на электрофореграммах (на УФ-трансиллюминаторе) была регистрирована с помощью гель-документирующей системы (Alpha Imager, Alpha Innotech), снабженной цифровой CCD камерой и программным обеспечением. Регистрировали относительную флуоресценцию полос на дорожках гелей. Вычисляли долю суммарной флуоресценции полос (продуктов нуклеазной рестрикции), отщепившихся в результате действия CEL-I эндонуклеазы, по отношению к интегральной интенсивности полос ДНК на гелях (% расщепления гетеродуплексов) [15, 16]. Результаты, полученные по группам при анализах количества продуктов, отщепленных CEL-I эндонуклеазой от гетеродуплексов, обрабатывали статистически. Различия между величинами, полученными для каждой из групп считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На электрофореграммах (рис. 1 и 2) видно, что CEL-I эндонуклеаза частично расщепляет гетеродуплексы, полученные путем гибридизации ПЦР-ампликонов вк-мтДНК плазмы пациентов (и доноров такого же возраста) с ПЦР-ампликонами мтДНК молодых людей. Однако существенного CEL-I эндонуклеазного расщепления гетеродуплексов, полученных путём смешения отдельных ПЦР-ампликонов мтДНК плазмы двух индивидуумов - молодых доноров, в данном случае не регистрируется (рис. 2).

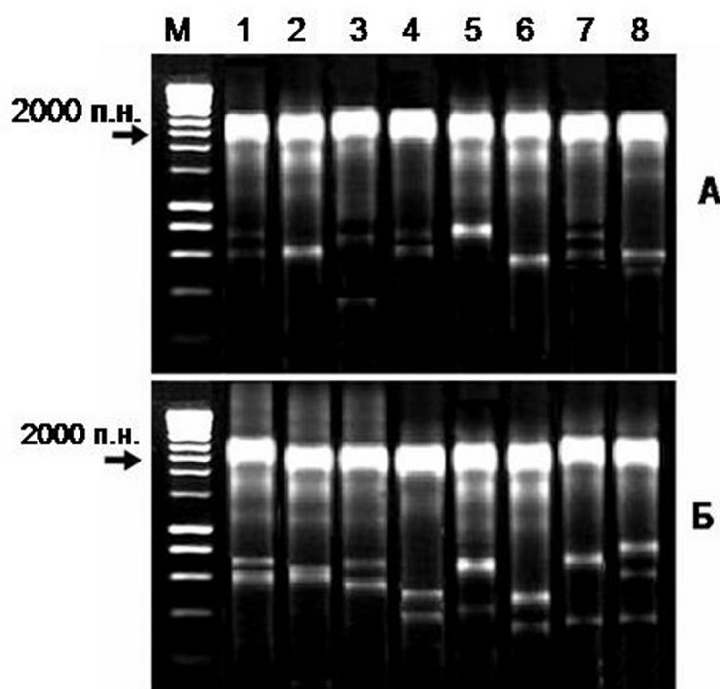


Рисунок 1.

Расщепление CEL-I эндонуклеазой гетеродуплексов, полученных смешением ПЦР-ампликонов мтДНК плазмы крови молодых доноров и пациентов, страдающих раком легких, до (А) и после (Б) прохождения курса радиотерапии. М - здесь и на рисунке 2 - маркер размеров фрагментов ДНК (MassRuller Express DNA Ladder Mix, 100 - 10000, Fermentas, Inc.; см. Методика).

1-8 - условные номера пациентов (1 - 2202, 2 - 2205, 3 - 2208, 4 - 2220, 5 - 2233, 6 - 2358, 7 - 2316, 8 - 2321).

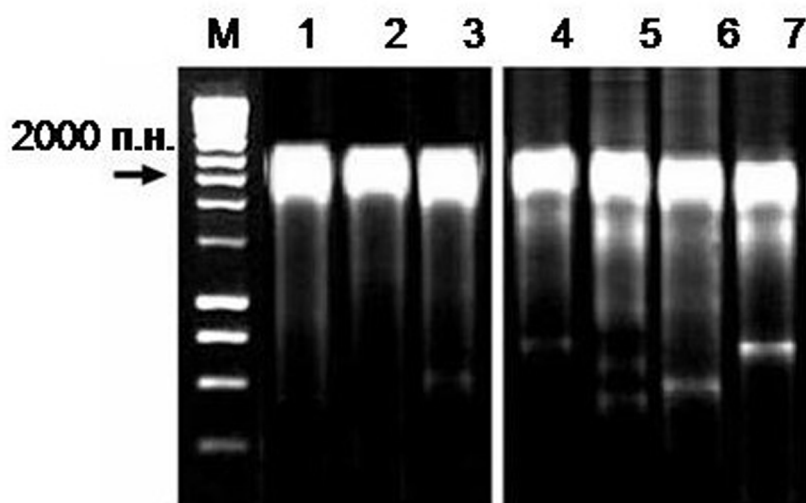


Рисунок 2.

Расщепление CEL-I эндонуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК плазмы крови доноров разных возрастов. 1-3 - гетеродуплексы, полученные смешением ампликонов мтДНК плазмы двух молодых доноров; 4-7 - гетеродуплексы, полученные смешением ампликонов мтДНК плазмы молодых и пожилых доноров; М- маркер размеров фрагментов ДНК.

Значительное CEL-I эндонуклеазное расщепление гетеродуплексов, полученных путем смешения ПЦР-ампликонов вк-мтДНК плазмы пациентов (или пожилых доноров) и молодых людей, может служить доказательством локализации мутаций на амплифицируемом участке мтДНК. На рисунке 1 представлены электрофореграммы продуктов расщепления гетеродуплексов, полученных из ПЦР-ампликонов вк-мтДНК, выделенных из плазмы пациентов до и после проведения курса радиотерапии. На этих электрофореграммах можно видеть, что гетеродуплексы, полученные из ампликонов вк-мтДНК плазмы пациентов, прошедших курсы радиотерапии, больше подвержены CEL-I эндонуклеазному расщеплению, чем гетеродуплексы, полученные из ампликонов вк-мтДНК плазмы тех же пациентов до проведения курса радиотерапии.

Количественная регистрация флуоресценции полос на электрофореграммах позволила определить процент продуктов, отщепившихся в результате действия CEL-I эндонуклеазы, по отношению к интегральной интенсивности полос ДНК на гелях (% расщепления гетеродуплексов). Результаты независимых повторных анализов продуктов (средних и индивидуальных - на каждого пациента), отщепляемых CEL-I эндонуклеазой от гетеродуплексов, представлены в таблице. Данные количественного анализа показывают, что процент расщепления CEL-I эндонуклеазой гетеродуплексов, полученных гибридизацией ПЦР ампликонов вк-мтДНК плазмы молодых людей и ПЦР-ампликонов вк-мтДНК пациентов до и после проведения курса радиотерапии, значительно различается. Полученные результаты не дают возможность количественной оценки (в абсолютных значениях) частоты мутаций во вк-мтДНК плазмы крови. Однако, регистрируемый в данных анализах процент суммарного количества продуктов, отщепленных CEL-I эндонуклеазой от гетеродуплексов, можно принять соответствующим числу мутантных копий амплифицируемого участка мтДНК. Данные анализов позволяют полагать, что в плазме пациентов после проведения им курса радиотерапии доля мутантных копий вк-мтДНК в общей циркулирующей ДНК увеличилась.

Таблица. Проценты расщепления CEL-I эндонуклеазой гетеродуплексов*, полученных путем гибридизации ПЦР-ампликонов мтДНК плазмы пациентов и молодых доноров (средние индивидуальные данные из 3-4 анализов).

№ пациента	до проведения радиотерапии	после проведения радиотерапии
2202	5,33	12,08
2205	6,76	13,15
2208	6,21	12,43
2220	6,42	12,75
2233	7,24	13,53
2258	7,13	13,05
2316	5,81	10,85
2321	6,18	11,47

Примечание: * - в реакции с CEL-I эндонуклеазой использовались одинаковые количества гетеродуплексов.

На рисунке 3 даны обобщенные сравнительные данные количественных анализов CEL-I эндонуклеазного расщепления гетеродуплексов, полученных введением ампликонов вк-мтДНК молодых, пожилых доноров и пациентов до и после проведения радиотерапии. Эти данные показывают, что количество отщепляемых CEL-I эндонуклеазой продуктов от гетеродуплексов вк-мтДНК плазмы пожилых доноров и гетеродуплексов вк-мтДНК плазмы больных раком легких, до проведения им курса радиотерапии, существенно различаются ($p < 0,01$). Процент CEL-I эндонуклеазного расщепления гетеродуплексов с вк-мтДНК онкологических пациентов гораздо больше, чем у пожилых доноров. Здесь же можно видеть, что процент CEL-I эндонуклеазного расщепления гетеродуплексов с вк-мтДНК плазмы доноров пожилого возраста также значительно выше, чем процент расщепления гетеродуплексов, полученных из ПЦР-ампликонов вк-мтДНК молодых доноров.

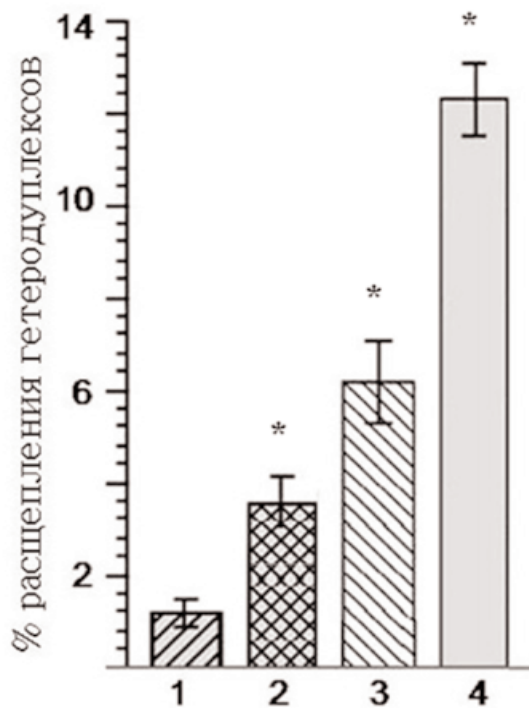


Рисунок 3.

Процент CEL-I эндонуклеазного расщепления гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК плазмы крови молодых (1), пожилых (2) доноров и пациентов, страдающих раком лёгких, до (3) и после радиотерапии (4). Во всех случаях получение гетеродуплексов проводилось путем смешения указанных ПЦР-ампликонов (1-4) с ампликонами мтДНК плазмы молодых доноров. * - значения достоверно различаются ($p < 0,05$) в сравнении с группой молодых здоровых доноров.

По результатам количественных анализов мы видим также, что процент расщепления CEL-I эндонуклеазой гетеродуплексов с вк-мтДНК, выделенных из плазмы онкологических пациентов, после проведения им курса радиотерапии, в два раза выше по сравнению с данными, полученными у этих же пациентов до проведения радиотерапии. Эти данные свидетельствуют о поступлении в кровотоки пациентов, после проведения радиотерапии рака легких, повышенного количества мутантных копий вк-мтДНК.

Таким образом, результаты анализов указывают, что доля мутантных копий вк-мтДНК в составе общей циркулирующей ДНК плазмы пациентов, больных раком легких, выше, чем у здоровых пожилых доноров, и её величина, после проведения курса радиотерапии, значительно возрастает.

Среди множества методов, используемых для скрининга неизвестных мутаций и вариаций полиморфизма ДНК, наиболее чувствительным и эффективным в настоящее время принято рассматривать метод, основанный на использовании CEL-I эндонуклеазы, расщепляющей гетеродуплексы ДНК с неспаренными основаниями [15, 17, 18]. Ранее нами было показано, что метод может быть использован и для выявления неизвестных мутаций мтДНК, индуцируемых ионизирующей радиацией [16, 19]. Важнейшим этапом выявления мутаций методом CEL-I эндонуклеазы в данном случае является получение гетеродуплексов продуктов ПЦР-амплификации одного и того же участка мтДНК плазмы онкологических пациентов (или пожилых доноров) и плазмы молодых доноров. Участки, содержащие неспаренные основания (возникшие за счет мутаций в мтДНК пациентов или пожилых доноров), в этих гетеродуплексах являются субстратными точками для CEL-I эндонуклеазы. Поскольку CEL-I эндонуклеаза расщепляет только гетеродуплексы, содержащие неспаренные основания, количество отщепляемого продукта от всех гетеродуплексов можно условно считать соответствующим числу мутантных копий мтДНК.

Полученные данные указывают, что в плазме крови больных раком легких (возраст 70-76 лет) и у здоровых доноров пожилого возраста доля мутантных копий мтДНК в составе общей циркулирующей ДНК значительно больше, по сравнению с таковым у молодых доноров. Однако количество мутантных молекул вк-мтДНК в плазме онкологических пациентов статистически достоверно превышает значения, выявленные у здоровых пожилых доноров. Более того, в плазме у онкологических пациентов, после проведения курса радиотерапии, в два раза увеличилось количество мутантных копий в составе общей циркулирующей вк-ДНК плазмы крови. Согласно литературным данным, при различных онкологических заболеваниях, в том числе при раке лёгкого, обнаруживается повышение содержания циркулирующей ядерной ДНК в плазме пациентов [1, 20, 21]. А после проведения эффективной терапии опухолей наблюдается снижение концентрации общей циркулирующей вк-ДНК в плазме этих пациентов [3, 12].

Что касается литературных данных по исследованию изменений количественного содержания циркулирующей вк-мтДНК в плазме/сыворотке онкологических больных, то они довольно противоречивы [1, 3, 9]. Вместе с тем, в ряде исследований показано, что, в отличие от клеток тканей здоровых людей, для клеток различных опухолей характерно содержание мтДНК с высокой частотой мутаций [3, 4, 22, 23]. В наших анализах мы регистрировали повышенный уровень мутантных копий вк-мтДНК в составе циркулирующей ДНК плазмы больных раком легких до прохождения ими курса радиотерапии и у здоровых пожилых доноров, по сравнению с молодыми донорами. Это, скорее всего, указывает, что повышение уровня мтДНК с мутациями в плазме связано не только с онкогенезом, но и с накоплением мутаций в мтДНК со старением организма. Как известно, один из современных постулатов о механизмах старения важнейшую роль отводит накоплению структурных изменений в мтДНК. И хорошо доказано, что со старением организма наблюдается увеличение

частоты мутаций и делеций в мтДНК [17, 35]. Возможно, в результате автофагии клеток (или митофагии) [24], происходит высвобождение мутантных молекул мтДНК из клеток опухолей и нормальных тканей, с последующим их поступлением в кровоток.

После проведения курса радиотерапии, доля мутантных копий вк-мтДНК в составе общей циркулирующей ДНК существенно повышается у пациентов. В недавних наших исследованиях было показано, что у мышей, подвергнутых радиационному воздействию (всего тела), обнаруживается резкое повышение количества мутантных копий в тканях. И эти мутантные копии мтДНК (во внеклеточной форме) в пострadiационном периоде могут поступать в кровоток [16, 19]. Можно полагать, что при проведении радиотерапии рака лёгких (локальное облучение опухоли) наблюдаемое повышение доли мутантных копий вк-мтДНК в общей циркулирующей ДНК, прежде всего, обусловлено поступлением в кровоток мтДНК из гибнущих опухолевых клеток. В это наблюдаемое повышение, возможно, вносит вклад также повреждение клеток нормальных тканей. В пострadiационный период (после воздействия сублетальных доз радиации) может продолжаться активное закрепление мутаций в мтДНК клеток тканей. Как известно, в клетках тканей (в том числе в постмитотических тканях), независимо от их пролиферативной активности, мтДНК, в отличие от яДНК, может реплицироваться в течение всей жизни организма [10, 11]. Более того, в отличие от репликативного синтеза яДНК, репликация мтДНК не блокируется в облученных клетках [25]. Повышенному мутагенезу мтДНК также способствует также низкая эффективность систем репарации ДНК в митохондриях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Мы исследовали содержание мутантных копий циркулирующей внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) в плазме крови 8 больных раком легких до и после проведения радиотерапии, а также здоровых доноров молодого и пожилого возраста. Результаты исследования показывают, что использованный нами ферментативный метод, основанного на расщеплении CEL-I эндонуклеазой гетеродуплексов ДНК, несущих неспаренные основания, позволяет провести скрининг мутаций в циркулирующей вк-мтДНК плазмы крови человека.

Обнаружено, что в плазме здоровых пожилых доноров доля мтДНК с мутациями (в составе общей циркулирующей ДНК) значительно выше, чем у молодых доноров. С другой стороны, в плазме больных раком лёгких (в возрасте 70-76 лет) до проведения радиотерапии наблюдается существенное повышение доли вк-мтДНК с мутациями, по сравнению с таковой у здоровых доноров пожилого возраста. После проведения курса радиотерапии по стандартной схеме у пациентов с раком легких происходит двукратное увеличение доли вк-мтДНК с мутациями в составе общей циркулирующей ДНК плазмы.

Более высокий уровень циркулирующей вк-мтДНК с мутациями в плазме пациентов после радиотерапии, возможно, является результатом двух составляющих. Первая – это высвобождение из опухолевых клеток молекул мтДНК, которые несут повышенный уровень “спонтанных” мутаций. Вторая – поступление в кровоток молекул мтДНК с мутациями, возникшими *de novo* в клетках после их радиационного повреждения. Поступление вк-мтДНК с мутациями в кровоток может быть обусловлено не только продолжающейся клеточной гибелью [2], но и селективной элиминацией копий мтДНК с мутациями из клеток тканей. Элиминация мтДНК с мутациями из клеток может происходить в результате митофагии митохондрий, несущих поврежденные и мутантные копии ДНК [24]. Повышенное содержание циркулирующей внеклеточной мтДНК с мутациями в плазме крови можно рассматривать как потенциальный маркер для оценки результативности радиотерапии опухолей, уровня генотоксического груза при радиационном поражении организма и воздействия других генотоксических агентов. Однако для этого требуется продолжение исследований.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”. Авторы выражают благодарность за помощь в работе Е.А. Кузнецовой и Н.П. Сироте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pathak A.K., Bhutani M., Kumar S., Mohan A., Guleria R. (2006) Clin. Chem., **52**, 1833-1842.
2. Fleischhacker M., Schmidt B. (2007) Biochim. Biophys. Acta, **1775**, 181-232.
3. Газиев А.И., Шайхаев Г.О., Корнев С.В. (2008) Вопросы онкологии, **54**, 545-554.
4. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A., Romans K., Goodman S., Li M., Thornton K., Agrawal N., Sokol L., Szabo S.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Diaz L.A. (2008) Nature Med., **14**, 985-990.
5. Chan K.C., Leung S.F., Yeung S.W., Chan A.T., Lo Y.M. (2008) Clin. Cancer Res., **14**, 4141-4145.
6. Deligezer U., Eralp Y., Akisik E.E., Akisik E.Z., Saip P., Topuz E., Dalay N. (2008) Clin. Chem. Laboratory Med., **46**, 311-317.
7. Cheng C., Omura-Minamisawa M., Kang Y., Hara T., Koike I., Inoue T. (2009) Cancer Sci., **100**, 303-309.
8. Ellinger J., Albers P., Möller S.C., Von Ruecker A., Bastian P.J. (2009) BJU International, **104**, 48-52.
9. Kohler C., Radpour R., Barekati Z., Asadollahi R., Bitzer J., Wight E., Burki N., Diesch C., Holzgreve W., Zhong X.Y. (2009) Mol. Cancer, **8**, 105-109.
10. Shadel G.S., Clayton D.A. (1997) Annu. Rev. Biochem., **66**, 409-435.
11. Wallace D.C. (2005) Annu. Rev. Genet., **39**, 359-407.
12. Chiu R.W., Chan L.Y., Lam N.Y., Tsui N.B., Ng E.K., Rainer T.H., Lo Y.M. (2003) Clin. Chem., **49**, 719-726.
13. Stemmer C., Beau-Faller M., Pencreach E., Guerin E., Schneider A., Jaqmin D., Quoix E., Gaub M., Oudet P. (2003) Clin. Chem., **49**, 1953-1955.
14. Taylor R.W., Taylor G.A., Durham S.E., Turnbull D.M. (2001) Nucleic Acids Res., **29**, e74.
15. Qiu P., Shandilya H., D'Alessio J.M., O'Connor K., Durocher J., Gerard G.F. (2004) Biotechniques, **36**, 702-707.
16. Абдуллаев С.А., Антипова В.Н., Газиев А.И. (2009) Мол. биология, **43**, 1063-1069.
17. Voskarides K., Deltas C. (2009) J. Mol. Diagn., **11**, 311-318.
18. Pagniez-Mammeri H., Lombes A., Brivet M., Ogier-de Baulny H., Landrieu P., Legrand A., Slama A. (2009) Mol. Genet. Metab., **96**, 196-200.
19. Гуляева Н.А., Абдуллаев С.А., Малахова Л.В., Антипова В.Н., Безлепкин В.Г., Газиев А.И. (2009) Генетика, **45**, 949-956.
20. Paci M., Maramotti S., Bellesia E., Formisano D., Albertazzi L., Ricchetti T., Ferrari G., Annessi V., Lasagni D., Carbonelli C., De Franco S., Brini M., Sgarbi G., Lodi R. (2009) Lung Cancer, **64**, 92-97.
21. Yoon K.A., Park S., Lee S.H., Kim J.H., Lee J.S. (2009) J. Mol. Diagn., **11**, 182-185.
22. Chatterjee A., Mambo E., Sidransky D. (2006) Oncogene, **25**, 4663-4674.
23. Dasgupta S., Yung R.C., Westra W.H., Rini D.A., Brandes J., Sidransky D. (2009) PLoS ONE, **4**(8), e5333.
24. Zhang J., Kundu M., Ney P.A. (2009) Methods Enzymol., **452**, 227-245.
25. Cleaver J.E. (1992) Radiat. Res., **131**, 338-344.

Поступила: 27. 01. 2010.

**SHARE OF EXTRACELLULAR MITOCHONDRIAL DNA WITH A MUTATIONS
INCREASES IN THE PLASMA OF PATIENTS LUNG CANCER AFTER RADIOTHERAPY**

I.Y. Strelkova¹, S.A. Abdullaev¹, G.P. Snigireva², V.G. Bezlepkin¹, A.I. Gaziev¹

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Puschino, Moscow Region, ul. Institutskaya, 3; tel.: (4967)731886; fax: (4967)330553; e-mail: aigaziev@gmail.com

²Russian Scientific Center of Roentgen-Radiology, Ministry of Health and Social Development, Russia

Quantitative and qualitative changes in circulating extracellular DNA (ec-DNA) of blood plasma are considered as markers for diagnosis and prognostic of tumor pathology. We investigated the content of mutant copies of the circulating extracellular mitochondrial DNA (ec-mtDNA) in blood plasma (using the enzymatic method, based on the cleavage of DNA with unpaired bases by CEL-I endonuclease) in 8 patients with lung cancer before and after radiotherapy, as well as in healthy young and elderly donors. It was found that in the plasma of healthy elderly donors share of ec-mtDNA with mutations (consisting of total circulating DNA) is much greater, than that of young donors. On the other hand, in the plasma of lung cancer patients (aged 70-76 years) before radiotherapy a substantial increase in the share of ec-mtDNA with mutations, compared with that of healthy elderly donors. Following radiotherapy, patients with lung cancer found a twofold increase of the proportion of ec-mtDNA with mutations in the total circulating plasma DNA. This increase is largely, perhaps due to the release of ec-mtDNA with mutations from dying tumor cells and cells damaged by normal tissues.

Key words: lung cancer, extracellular mitochondrial DNA in blood plasma, radiotherapy, mutations, CEL-I endonuclease, splitting of heteroduplexes.