

*Г.В.Бондарь, В.Х.Башеев, Ю.В.Думанский, О.В. Кайряк*

## НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ЭРИТРОЦИТАХ: РОЛЬ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ LINE1 В РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ХИМИОТЕРАПИИ

*Донецкий областной противоопухолевый центр, Украина*

**Реферат.** *Обследовано 28 больных раком различных локализаций. Выявлен факт наличия 3-4 высокомолекулярных последовательностей при проведении полимеразной цепной реакции с праймерами к 3' участку L1 в эритроцитарной фракции крови пациентов в случае ответа (полная либо частичная регрессия) на проведение химиотерапии. Аналогичные результаты получены у больных, получавших адъювантную терапию без признаков продолжения болезни в течение 2 лет. Благодаря эндонуклеазной активности, продукты данной последовательности в эритроцитах выполняют функцию деградации внеклеточных нуклеиновых кислот. Не приводит ли проведение химиотерапии у больных с дефектом 3' участка L1 к эскалации генетической нестабильности и опухолевой прогрессии в более быстром темпе? Возможно, этим больным изначально стоит отдавать предпочтение в назначении гормонотерапии? Очевидно, высказанное является основанием для проведения рандомизированных клинических исследований.*

**Ключевые слова:** *ретротранспозоны, внеклеточные нуклеиновые кислоты, химиорезистентность*

Несмотря на интенсивные исследования последних лет в области теоретической и клинической онкологии, некоторые аспекты опухолевого роста остаются недостаточно изученными. Основными гносеологическими причинами существующего состояния являются фрагментарность теоретических исследований и отсутствие связи с клиникой. Сложившаяся ситуация напоминает положение, существовавшее в науке о Земле накануне эпохи Великих географических открытий.

Одним из белых пятен на карте современной молекулярной и клинической онкологии является феномен внеклеточных нуклеиновых кислот. Вторым белым пятном служит наше недостаточное знание роли повторяющихся последовательностей нуклеиновых кислот как на клеточном, так и на организменном уровне. Наконец, третьей полоской "terra incognita" является осмысление факта наличия нуклеиновых кислот во фракции эритроцитов как в норме, так и при опухолевом росте и определение их физиологического значения.

Внеклеточные нуклеиновые кислоты являются одним из маркеров опухолевого процесса. Тем не менее, до сегодняшнего времени неизученным остается вопрос об источниках внеклеточных нуклеиновых кислот как в норме, так и при патологических состояниях. Несмотря на многочисленные исследования, не обнаружено четкой корреляции между уровнем экстрацеллюлярных нуклеиновых кислот и основными клиническими характеристиками больного при опухолевом росте. Пожалуй, единственным весомым параметром, указанным еще в одной из первых

публикаций по данной проблеме, является зависимость между уровнем внеклеточных нуклеиновых кислот и распространенностью опухолевого процесса. Отмечено снижение концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот при оперативном вмешательстве в радикальном объеме и ответе на проведение химиотерапии и лучевой терапии полными либо частичными регрессиями [17].

В более поздних работах, посвященных исследованию биологии опухолевого роста, с использованием спектрофотометрического метода детекции, отмечен факт наличия на эритроцитах нуклеиновых кислот обоих типов - как ДНК, так и РНК, причем для больных опухолевой болезнью характерен более высокий уровень нуклеиновых кислот в эритроцитарной фракции, по сравнению с пациентами неопухолевой патологии [6]. В то же время при использовании для детекции ДНК метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), как более чувствительного, отмечен рост метилированных последовательностей генов-онкосупрессоров на поверхности форменных элементов крови онкобольных, по сравнению со здоровыми. Метод предложен для ранней диагностики онкозаболеваний [20]. К сожалению, авторами незаслуженно забыт опыт исследований 60-80 годов 20 века. Бохман в одной из своих монографий, ставших классикой, приводит факт наличия неканонических нуклеозидов в сыворотке крови больных раком молочной железы в качестве диагностического критерия.

Ранее считалось, что в клетках высших организмов транскрибируется около 5 % ДНК, соответствующих, в основном, уникальным белковым последовательностям. В настоящий момент известно, что транскрибируется около 70 % генома, в том числе, иногда и прицентромерный гетерохроматин. Любопытно, что транскрипты представлены как с кодирующей, так и с анти-смысловой нитей ДНК [14]. Долгое время считалось, что так называемая "некодирующая ДНК" не несет никакой функциональной нагрузки в клетке и является "генетическим грузом", недаром ее наградили такими эпитетами, как "мусорная", "эгоистичная" ДНК. Однако ряд открытий позволил пересмотреть данное представление.

Роль короткой РНК в регуляции геновой экспрессии была впервые показана на модели гена Lin-4 *Caenorhabditis elegans* [16]. Направляемое РНК метилирование ДНК было открыто в 1994 г. на растениях, инфицированных виридами [19]. Специфическое ингибирование транскрипции искусственно введенной дуплексной РНК было впервые обнаружено в опытах на *S. elegans* в 1998 г. [12]. В дальнейших исследова-

ниях уточнялись детали механизма сайленсинга. Были выявлены белковые комплексы, осуществляющие процессинг дуплексной РНК и образование малых интерферирующих РНК (Dicer, Argonaud), а также комплексы RISC и RITS.

В конце концов "мусорная" ДНК в геноме оказалась регуляторной, определяющей как структуру хроматина, так и генную активность. Ключевым моментом настоящих и будущих исследований в этой области является ответ на вопрос об источниках и условиях образования дуплексной РНК.

Из школьного курса биологии известно, что эритроциты являются безъядерными клетками. Следуя линейной логике, резонно предположить, что в эритроцитах не должно быть и намека на наличие нуклеиновых кислот, а особенно ДНК. Тем не менее, в 1964 г. в мембранах эритроцитов человека была обнаружена двунитевая ДНК [2]. Характерной особенностью этой ДНК является довольно высокое содержание гуанина (Г) и цитозина (Ц) (39-42%), что является основанием для предположения о принадлежности этой ДНК к высококонсервативной ДНК. Однако о функциональной роли этой ДНК до сегодняшнего времени ничего не известно.

Целью работы явился поиск связи представительства ретротранспозонов L1 в эритроцитарной фракции крови онкобольных с клиническими параметрами течения заболевания.

#### М а т е р и а л и м е т о д ы

Обследовано 28 больных раком различных локализаций, в том числе раком молочной железы T1-3N0-2M0-1 - 11, яичников T3cN2-3M0 - 2, меланомой T1-4N0-2M0-1 - 6, толстой кишки T2-3N1-2M - 3, желудка T4N3M0 - 3, легкого T2N2M1 - 1, тела матки T1N0M0 - 1, поджелудочной железы T2N2M0 - 1. Кровь для исследования забиралась до начала лечения либо до начала одного из этапов лечения. Среди обследованных больных 18 человек были пролечены по поводу прогрессирования опухолевого процесса на этапе проявления рецидивов или метастазов. Эффект от химиотерапии оценивался согласно критериям ВОЗ: полная либо частичная регрессия, стабилизация процесса и прогрессирование.

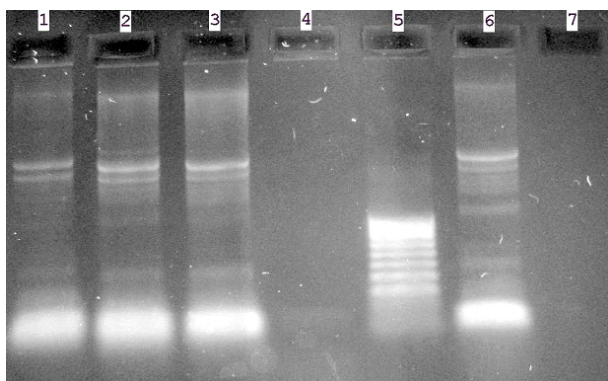


Рис. 1. Анализ амплификата 3' фрагментов L1 в гель-электрофорезе.

П р и м е ч а н и е: дорожки №1,2,3,6 - амплификат эритроцитарной фракции крови больных, ответивших на лечение полной или частичной регрессией, с праймерами к 3' фрагменту L1; дорожка №5 - маркер молекулярной массы 500-50; дорожка №4 - отрицательный контроль; дорожка №7 - проба без нуклеиновых кислот

Ретроспективно были сформированы группы с ответом на лечение (полная либо частичная регрессия) - 7 и с отсутствием результатов лечения - 11. Больные, получавшие химиотерапию в адьювантном режиме без признаков продолжения болезни в течение 2 лет, отнесены также к первой группе. В сформированных группах оценивали наличие либо отсутствие последовательностей, полученных в результате амплификации с праймерами к 5' и 3' L1.

Кровь для исследования забиралась из локтевой вены в количестве 10 мл для получения сыворотки - в сухую стерильную пробирку, для получения эритроцитов - в пробирку, содержащую трилон Б. Выделение нуклеиновых кислот из 100 мкл сыворотки и эритроцитов осуществляли путем сорбции на 100 мкл мелкодисперсного стекла с последующей трехкратной отмывкой соевым буфером, содержащим этанол. ПЦР проводилась на программируемом термоциклере "Appl biosystems". Праймеры для ПЦР синтезированы ЗАО "Синтол" (Москва). Были использованы праймеры для участков 5' и 3' элемента LINE собственного дизайна. Режим амплификации был следующий: горячий старт, денатурация при 95 40 с, отжиг праймеров при 58 40 с, элонгация при 74 60 с (всего 35 циклов). Продукты ПЦР-амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле. Для оценки величин продуктов ПЦР использовали маркеры молекулярной массы ДНК.

Статистическую обработку результатов осуществляли путем применения критерия Вилконсона.

#### Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и е

Современные семейства повторов L1 произошли от одного общего предшественника. В секвенированных геномах человека, мыши и крысы присутствует более 500 000 копий повторов L1 [15]. Последовательность L1 кодирует 2 белка и имеет, соответственно, 2 открытых рамки считывания ORF1 и ORF2. ORF1 расположена ближе к 5' концу последовательности, кодирует белок массой 40 кДа, обладающий способностью связываться с однонитевой РНК. ORF2 распола-

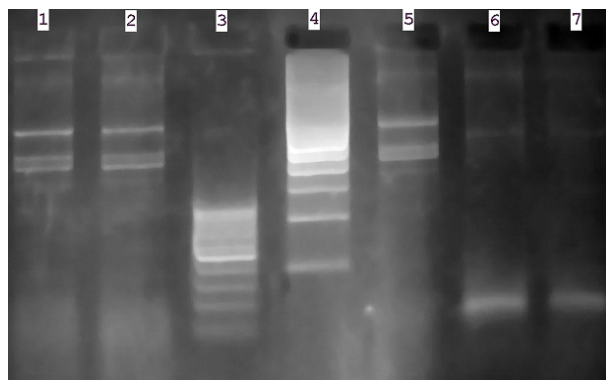


Рис. 2. Анализ амплификата 5' и 3' фрагментов L1 в гель-электрофорезе.

П р и м е ч а н и е: дорожки №1,2,5 - амплификат эритроцитарной фракции крови больных с праймерами к 5' фрагменту L1; дорожки №6 - амплификат эритроцитарной фракции крови больного со стабилизацией процесса, с праймерами к 3' фрагменту L1; дорожки №7 - амплификат эритроцитарной фракции крови больного с прогрессированием на фоне лечения с праймерами к 3' фрагменту L1; дорожка №3 - маркер молекулярной массы 500-50; дорожка №4 - маркер молекулярной массы 2000-200

гается правее ORF1 и является матрицей для белка 150 кДа с активностями эндонуклеазы. Механизм инкорпорации ретротранспозонов в геномную ДНК детально описан [7].

Функции L1 повторов в клетке и на уровне макроорганизма во многом являются загадкой. Известно, что активные ретротранспозоны способствуют рекомбинации и могут быть вовлечены в такие процессы, как репарация поврежденной ДНК, одним из этапов которой является рекомбинация [18]. В то же время рекомбинация является одним из пусковых моментов нестабильности генома, приводя к делециям и дупликациям, которые являются несовместимыми с нормальной жизнедеятельностью клетки [11]. Кроме того, ретротранспозоны, возможно в кооперации с ALU повторами, участвуют в ремоделировании структуры хроматина, переводя эухроматиновые участки в гетерохроматиновые. Наиболее хорошо изученным феноменом, демонстрирующим участие L1 повторов в регуляции генной экспрессии, является импринтинг X-хромосомы у самок млекопитающих [10]. Распределение L1 повторов на X-хромосоме неравномерно. Область, с которой транскрибируется РНК, определяющая импринтинг второй X-хромосомы в женских соматических клетках, обогащена L1, в то время как районы, не подвергающиеся инактивации, обеднены L1 повторами. Предполагают, что обогащение L1 повторами участков аутосом также определяет состояние хроматина и таким образом определяет генную экспрессию [8]. Наконец, активация ретротранспозонов наблюдается при опухолевом росте. Таким образом, функция повторов L1 неоднозначна.

В нашем исследовании выявлен факт наличия 3-4 высокомолекулярных последовательностей при проведении ПЦР с праймерами к 3' участку L1 в эритроцитарной фракции пациентов в случае ответа (полная либо частичная регрессия) на проведение химиотерапии (рис. 1). Аналогичные результаты получены у больных, получавших адьювантную терапию без признаков продолжения болезни в течение 2 лет. Амплификаты к 5' участку L1 в эритроцитарной фракции пациентов в исследуемых группах не отличались (рис. 2). Целью и смыслом проведения химиотерапии при опухолевом росте является индукция программированной клеточной гибели в опухолевых клетках. Продукты распада опухолевой ткани, в конечном счете, попадают в кровоток и идентифицируются в виде апоптотических телец. Львиную долю нуклеиновых кислот сыворотки составляют продукты опухолевой природы [13]. Также отмечен факт образования лейко-тромбоцитарных и тромбо-эритроцитарных розеток при опухолевом росте. Известно, что нуклеиновые кислоты обладают мутагенным действием, оказывают стимулирующее либо ингибирующее влияние на иммунную систему в зависимости от последовательности и профиля метилирования и связи с белковыми комплексами. Известен факт передачи "злокачественности" нуклеиновыми кислотами, благодаря которому осуществляется трансфекция [7]. Упаковка в клеточную мембра-

ну предохраняет нуклеиновые кислоты от действия нуклеаз. Апоптотические тельца опухолевой природы, циркулирующие в кровотоке, могут прикрепляться и затем фагоцитироваться лейкоцитами. Трансфецированные лейкоциты являются переносчиками нуклеиновых кислот опухолевого происхождения, формируя преметастатические ниши и способствуя, тем самым, появлению рецидивов и метастазов [1]. В предыдущей работе показано, что при неблагоприятном течении заболевания в лейкоцитах онкобольных содержится большее количество нуклеиновых кислот, чем в группе с хорошим прогнозом. Более того, при отсутствии ответа на химиотерапию наблюдается рост количества нуклеиновых кислот в лейкоцитарной фракции [3]. Применение препаратов кальция способствует образованию эритроцитарных розеток с апоптотическими тельцами [4, 5].

В случае нормального функционирования эндогенных эритроцитарных эндонуклеаз в составе L1 внеклеточные нуклеиновые кислоты опухолевой природы расщепляются и, возможно, подвергаются редактированию, уничтожая или искажая смысл первоначальной нуклеиновой последовательности. Таким образом, в норме осуществляется один из заключительных аккордов в фуге под названием "гомеостаз".

Проведенное исследование ставит больше вопросов, чем дает ответов.

Первый вопрос относится к происхождению L1 в эритроцитарной фракции. С одной стороны, в эритроцитах может происходить процесс обратной транскрипции с кольцевых цитоплазматических L1 РНК, оставшихся в эритроците после стадии "выбрасывания" ядра из клетки-предшественника в костном мозге. С другой стороны, донором L1 РНК и ДНК могут быть лимфоциты, для которых описан феномен прижизненного "выброса" нуклеиновых кислот [9, 2].

Второй вопрос относится к месту утилизации внеклеточных нуклеиновых кислот. Наиболее вероятным органом для этого является селезенка.

Наконец, имеет ли смысл проведение химиотерапии больным с неадекватно функционирующей системой эндогенных нуклеаз в составе L1? Не приводит ли проведение химиотерапии у таких больных к эскалации генетической нестабильности и опухолевой прогрессии в более быстром темпе? Возможно, этим больным изначально стоит отдавать предпочтение в назначении гормонотерапии? Очевидно, вышесказанное является основанием для проведения рандомизированных клинических исследований с учетом молекулярно-биологических критериев.

Таким образом, во фракции нуклеиновых кислот эритроцитов человека содержатся высокомолекулярные двунитевые последовательности, характерные для ретротранспозонов L1. Благодаря эндонуклеазной активности, продукты данной последовательности в эритроцитах выполняют функцию деградации внеклеточных нуклеиновых кислот. Впервые отмечена положительная корреляция между отсутствием высокомолекулярных фрагментов при проведении ПЦР

с праймерами к 3' последовательности L1 в эритроцитарной фракции крови онкобольных и отсутствием эффекта (полные и частичные регрессии) при проведении химиотерапии.

V.G. Bondar, V.Kh. Basheev, Yu.V. Dumanskiy, O.V. Kajrjak

### **Nucleic acids in Erythrocytes: Role of Line 1 Retrotransposones in Resistance to Chemotherapy**

There have been examined 28 patients with various localizations of tumor. There have been revealed presence of 3-4 high molecular sequences during polymerase chain reaction with primers to the 3' part L1 in the erythrocyte fraction of the patients' blood in the case of a response (complete or partial regression) to chemotherapy. Similar results have been obtained in cases with patients receiving adjuvant therapy without further signs of disease within two years. Due to endonuclease activity products of this sequence in erythrocytes function as degradation of extracellular nucleic acids. Does not chemotherapy in patients with defective 3' part of L1 section lead to escalation of genetic instability and tumor progression at a faster rate? Perhaps these patients should first prefer medication of hormone therapy? Obviously, the above mentioned is the basis for randomized clinical tests (Arch. Clin. Exp. Med.— 2013.—Vol.22, №1. — P. 39-42).

**Keywords:** retrotransposones, extracellular nucleic acids, chemoresistance

Г.В. Бондар, В.Х. Башеев, Ю.В. Думанский, О.В. Кайряк

### **Нуклеїнові кислоти в еритроцитах: роль ретротранспозонів line 1 в резистентності до хіміотерапії**

Обстежено 28 хворих на рак різних локалізацій. Виявлений факт наявності 3-4 високомолекулярних послідовностей при проведенні полімеразної ланцюгової реакції з праймерами до 3' ділянки L1 в еритроцитарній фракції крові пацієнтів у випадку відповіді (повна або часткова регресія) на проведення хіміотерапії. Аналогічні результати отримані у хворих, які одержували ад'ювантну терапію без ознак продовження хвороби протягом 2 років. Завдяки ендонуклеазній активності продукти даної послідовності в еритроцитах виконують функцію деградації позаклітинних нуклеїнових кислот. Чи не призводить проведення хіміотерапії у хворих з дефектом 3' ділянки L1 до ескалації генетичної нестабільності та пухлинної прогресії в більш швидкому темпі? Можливо, цим хворим з початку лікування варто віддавати перевагу в призначенні гормонотерапії? Очевидно, вищесказане є підставою для проведення рандомізованих клінічних досліджень (Арх. клініч. експ. мед.— 2013.— Т.22, №1.— С. 39-42).

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. *Закурдеева И.Г.* Диссеминированная меланома кожи (обзор литературы) / И.Г. Закурдеева, А.Ф. Цыб // Сибирский онкологический журнал. — 2011. — № 1 (43). — С. 70-76.
2. Минимальные клинические рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO). — Москва. — 2011. — С. 294-297
3. *Михнин А.Е.* Злокачественная меланома кожи: поиск стандартов лечения / А.Е. Михнин, А.С. Барчук // Практическая онкология. — 2001. — № 4 (8). — С. 69-72.
4. *Носов Д.А.* Возможности химиотерапии диссеминированной меланомы / Д.А. Носов, А.М. Гарин // Русский медицинский журнал. — 2013. — № 1. — С. 1-5.
5. *Парсункова К.А.* Цитокиновый профиль на фоне вакцинотерапии у больных диссеминированной меланомой кожи / К.А. Парсункова, И.Н. Михайлова, Н.Н. Петенко [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции "Опухоли кожи и мягких тканей". — С.-Пб. — 2009. — С. 31-34.
6. Стандарти діагностики і лікування онкологічних хворих. Наказ Міністерства охорони здоров'я України "Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю онкологія" від 17.09.2007 № 554.
7. *Atkins M.B.* High-dose recombinant interleukin-2 therapy for patients with metastatic melanoma: Analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993 / M.B. Atkins, M.T. Lotze, J.P. Dutcher [et al.] // J. Clin. Oncol. — 1999. — Vol. 17, No. 3. — P. 2105-2116.
8. *Bedikian A.Y.* Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: The Oblimersen Melanoma Study Group / A.Y. Bedikian, M. Millward, H. Pehamberger [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2006. — Vol. 24, No. 1. — P. 4738-4745.
9. *David F.* Double-Blind Randomized Phase 2 Study of the Combination of Sorafenib and Dacarbazine in Patients With Advanced Melanoma. A Report From the 11715 Study Group / F. David, M. Dermott, J.A. Sosman, [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2008. — Vol. 26, No. 7. — P. 2178-2185.
10. *Davis E.* Ectopic Tbx2 expression results in polyploidy and cisplatinresistance / E. Davis, H. Teng, B. Bilican [et al.] // Oncogene. — 2008. — Vol. 27, No. 7. — P. 976-984.
11. *Gogas H.* The role of taxanes in the treatment of metastatic melanoma / H. Gogas, D. Bafaloukos, A.Y. Bedikian // Melanoma research. — 2004. — Vol. 14, No. 5. — P. 415-420.
12. *Gollob J.A.* Role of Raf kinase in cancer. Therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction / J.A. Gollob, S. Wilhelm, C. Carter [et al.] // Pathway Semin.Oncol. — 2006. — Vol. 33. — P. 392-406.
13. *Hersh E.M.* Phase 3, randomized, open-label, multicenter trial of nab-paclitaxel (nab-P) versus dacarbazine (DTIC) in previously untreated patients with metastatic malignant melanoma (MMM) / E.M. Hersh // Presented at: Society for Melanoma Research Congress; Nov. 8-11, 2012; Hollywood, Calif.
14. *Nilufer J.S.F.* Taxanes: Promising Anti-Cancer Drugs / J.S.F. Nilufer, D. Zhi, W. Ya-lan // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. — 2011. — Vol. 12. — P. 837-851.
15. *Ribas A.* Hepatotoxicity with Combination of Vemurafenib and Ipilimumab / A. Ribas, F. Stephen Hodi, M. Callahan [et al.] // Engl. J. Med. — 2013. — Vol. 368, No. 3. — P. 1365-1366.
16. *Rosenberg S.A.* Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cancer using high dose bolus interleukin-2 / S.A. Rosenberg, J.C. Yang, S.L. Topalian [et al.] // JAMA. — 1994. — Vol. 271, No. 1. — P. 907-913.
17. *Wilhelm S.* Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer / S. Wilhelm, C. Carter, M. Linch [et al.] // Nat. Rev. Drug Discov. — 2006. — Vol. 5. — P. 835-844.
18. *Whang-Peng J.* Polyploidy in malignant melanoma / J. Whang-Peng, P. Chretien, T. Knutsen // Cancer. — 2006. — Vol. 25, Issue 5. — P. 1216-1223.

Надійшла до редакції: 4.07.2013 р.