

На правах рукописи

ТАМКОВИЧ СВЕТЛАНА НИКОЛАЕВНА

**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ
В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

03.00.04 биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук



Новосибирск, 2005 г.

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

Научный руководитель:

к.б.н. Лактионов Павел Петрович

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор Чердынцева Надежда Викторовна

к.б.н. Синицына Ольга Ивановна

Ведущая организация: Институт клинической иммунологии СО РАМН

Защита состоится « 3 » февраль 2006 г. в 10⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « 29 » декабрь 2005 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
д.х.н. Фёдорова О.С.



2006 А
59.5

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

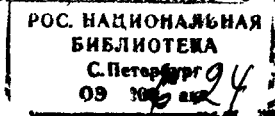
Актуальность проблемы. В последние годы было установлено, что вне клеток, и прежде всего в плазме крови животных и человека в норме и при патологиях, присутствуют эндогенные внеклеточные дезокси- и рибонуклеиновые кислоты. Поскольку в составе циркулирующих нуклеиновых кислот крови онкологических больных вне зависимости от локализации опухоли присутствуют онкоспецифические последовательности, а в крови беременных циркулируют нуклеиновые кислоты плода, внеклеточные нуклеиновые кислоты находят применение в качестве неинвазивного материала для медицинской диагностики.

Биологическая роль циркулирующих нуклеиновых кислот в настоящее время не ясна, однако исследование процессов, обеспечивающих появление и циркуляцию внеклеточных нуклеиновых кислот в крови, и изучение биологических эффектов, вызываемых внеклеточными нуклеиновыми кислотами, позволит получить новые данные о биологической значимости феномена циркулирующих нуклеиновых кислот и механизмах патогенеза рака и аутоиммунных заболеваний.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлась: 1). Разработка количественных методов анализа внеклеточных нуклеиновых кислот; 2). Исследование особенностей циркуляции дезоксирибонуклеиновых и рибонуклеиновых кислот в крови здоровых доноров и онкологических больных; 3). Исследование факторов, влияющих на циркуляцию в крови внеклеточных нуклеиновых кислот.

Научная новизна и практическая ценность работы. Для исследования концентраций циркулирующих нуклеиновых кислот крови разработан эффективный метод выделения нуклеиновых кислот из биологических жидкостей при помощи сорбции нуклеиновых кислот на модифицированном мелкодисперсном стекле, пригодный для определения концентрации выделенных нуклеиновых кислот при помощи флуоресцентных красителей – Hoechst 32258 и SYBR Green II.

Впервые показано, что в крови здоровых доноров основную часть внеклеточных нуклеиновых кислот составляют нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью форменных элементов крови. При помощи флуоресцентного анализа установлено, что в крови больных злокачественными опухолями молочной железы отсутствуют циркулирующие нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью



форменных элементов крови, а концентрация внеклеточной ДНК в плазме достоверно отличается от таковой у здоровых доноров. В крови больных с доброкачественными опухолями молочной железы концентрация связанных с поверхностью клеток крови нуклеиновых кислот не отличается от таковой у здоровых доноров. Для определения протеазной и дезоксирибонуклеазной активности крови разработаны два иммуноферментных анализа. С их помощью было впервые показано, что увеличение протеазной активности в крови сопровождается уменьшением концентрации нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью форменных элементов крови, а уменьшение дезоксирибонуклеазной активности крови приводит к увеличению концентрации циркулирующих дезоксирибонуклеиновых кислот в плазме крови. Таким образом, протеазная и дезоксирибонуклеазная активность крови влияют на концентрацию и распределение циркулирующих нуклеиновых кислот в кровотоке.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации получено 4 Российских патента, опубликовано 7 статей и 30 тезисов. Результаты работы были представлены на конференциях “Radioisotopes and their applications” (Узбекистан, 2002), “Biology and Biochemistry of Extracellular Nucleic Acids” и “Новые диагностические и лечебные технологии в онкологии” (Россия, 2003), “Circulating nucleic acids in plasma and serum and serum proteomics” (США, 2003), “29th Meeting of the Federation of the European Biochemical Societies” (Польша, 2004), “Современное состояние и перспективы развития экспериментальной и клинической онкологии” (Россия, 2004), “Петровские чтения – 2005”, “Биотехнология и онкология”, “Новые технологии в онкологической практике”, “The International conference on chemical biology” и “Фундаментальные науки – медицине” (Россия, 2005), International summer school for postdoctoral scientists and advanced students “Chemistry meets Biology” (Греция, 2005), 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference (Болгария, 2005), “Circulating nucleic acids in plasma and serum and serum proteomics” (Англия, 2005).

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 156 страницах, содержит 15 рисунков и 13 таблиц. Библиография включает 240 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка метода выделения внеклеточных нуклеиновых кислот

Наиболее перспективными методами определения концентраций внеклеточных нуклеиновых кислот являются флуоресцентные методы, основанные на использовании флуоресцентных красителей, специфичных для ДНК или РНК. Для определения концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот флуоресцентным методом были оттестированы различные методы выделения нуклеиновых кислот.

Поскольку по данным ряда авторов циркулирующая ДНК плазмы крови может быть фрагментирована, эффективность выделения ДНК оценивали по введенной в образец плазмы крови радиоактивно меченой ДНК (200 - 500 п.н.). Эффективность удаления примесей, влияющих на флуоресценцию образца, оценивали по флуоресценции образцов выделенных ДНК с интеркалирующим красителем Hoechst 33258 (табл. I).

Таблица I. Выделение экзогенной ³²P-меченой ДНК

% выделенной ДНК/усл.ед. флуоресценции Hoechst добавленная ДНК, мкг/мл			Способ пробоподготовки
1	5	50	
40±11/ 76	41±7/ 86	50±13/ 90	выделение ДНК из плазмы фенольным методом
87±4/ 115	83±3/ 120	82±4/ 118	метод выделения ДНК после осаждения комплексов белков с SDS (1)
76±4/ 78	74±5/ 81	74±4/ 80	(1), с последующей обработкой 4М KClO ₄
77±8/ 104	82±6/ 109	77±6/ 111	(1), с последующей обработкой смесью хлороформ:изоамиловый спирт
70±5/ 75	77±4/ 385	78±4/ 3908	выделение ДНК из плазмы сорбцией на мелкодисперсном стекле (Sigma, S-5631)
96±3/ 100	96±2/ 500	98±2/ 5019	выделение ДНК из плазмы сорбцией на модифицированном стекле

В таблице для % выделенной ДНК указан доверительный интервал для $P < 0,05$.

Наиболее оптимальным был метод выделения ДНК из плазмы крови сорбцией на стеклянные частицы (Sigma, S-5631). Для увеличения выхода ДНК на основе метода сорбции на мелкодисперсном стекле был разработан и запатентован метод выделения нуклеиновых кислот на модифицированном мелкодисперсном стекле, позволяющий увеличить эффективность выделения ДНК из плазмы крови и довести ее до 96-98 % (табл. 1).

При сравнении эффективности выделения РНК из мембрано-цитозольной фракции эукариотических клеток разработанным методом и методом выделения РНК экстракцией белков смесью фенол-хлороформ, с последующим спиртовым переосаждением (1), методом гомогениной экстракции фенол гуанидиновой смесью (2), показано, что выделение РНК сорбцией на модифицированном стекле (3) также является оптимальным (табл. 2).

Для определения концентрации внеклеточной ДНК был использован флуоресцентный краситель Hoechst 33258. Калибровочная кривая флуоресценции комплексов этого красителя с ДНК была линейна в диапазоне 10-1000 нг/мл. Чувствительность флуоресцентного анализа составила 10 нг/мл, достоверность - 95 %, коэффициент вариации - менее 5 %. Концентрацию внеклеточной РНК определяли в присутствии ДНК при помощи флуоресцентных красителей Hoechst 33258 и SYBR Green II. Достоверность анализа РНК составила 90 % в диапазоне концентраций нуклеиновых кислот от 10 до 1000 нг/мл, коэффициентом вариации составил 10 %.

Таблица 2. Сравнение различных методов выделения РНК

Способ выделения	Время выделения, ч	Эффективность выделения	
		³² P-меченая тРНК (100 н.), %	РНК, выделенная из 10 ⁶ клеток линии А431, (мкг)
1	2	25	26
2	2.5	7	13
3	0.3	86	32

Внеклеточные нуклеиновые кислоты в плазме и связанные с поверхностью клеток крови здоровых доноров

Ранее было показано, что в присутствии двухвалентных катионов металлов ДНК может эффективно связываться с поверхностью липосом и клеточных мембран. Кроме того, известно, что на цитоплазматических мембранах форменных элементов крови экспонированы белки, связывающие нуклеиновые кислоты.

Для элюции внеклеточных нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью форменных элементов крови через ионные мостики, клетки крови отмывали 0.01 М фосфатным буфером, 0.15 М NaCl, (pH 7.5), содержащим 5 мМ ЭДТА (ФБ-ЭДТА элюат). Для отделения нуклеопротеиновых комплексов от клеточной поверхности клетки обрабатывали 0.125 % раствором трипсина в условиях, не приводящих к лизису клеток (трипсиновый элюат).

Образцы крови здоровых доноров были получены из Центральной Клинической Больницы Советского района г. Новосибирска и 333 Общевойсковой Военного Госпиталя Концентрацию внеклеточных нуклеиновых кислот в образцах крови определяли в двух независимых экспериментах, используя для выделения нуклеиновых кислот в каждом эксперименте по 1 мл плазмы, 2 мл ФБ-ЭДТА элюата и 0.5 мл трипсинового элюата. Половину выделенных внеклеточных нуклеиновых кислот 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 внеклеточных нуклеиновых кислот пересчитаны на 1 мл исходной крови. С учетом объемов плазмы и элюатов, минимальный уровень детекции внеклеточных нуклеиновых кислот в крови составлял для плазмы 8 нг/мл крови, для ФБ-ЭДТА элюата 40 нг/мл крови и 20 нг/мл крови для трипсинового элюата.

Концентрация внеклеточной ДНК в плазме здоровых доноров детектировалась в 70 % образцов, составляя у мужчин 16 ± 7 нг/мл крови, а у женщин 15 ± 13 нг/мл крови (для $P = 0.95$, табл. 3). Внеклеточная РНК в плазме была обнаружена в трети образцов и составила 36 нг/мл крови у женщин и 126 нг/мл крови у мужчин (табл. 4). Несмотря на то, что в некоторых образцах нуклеиновые кислоты по данным флуоресцентного анализа не обнаруживались, методом ПЦР анализа наличие ДНК и РНК было подтверждено во всех образцах.

Таблица 3. Циркулирующие ДНК в крови здоровых доноров и больных с опухолями молочной железы*

диагн. ноз.		Внеклеточная ДНК* в плазме	Связанные с поверхностью клеток внеклеточные ДНК*				Суммарные связанные внеклеточные ДНК* крови
			ФБ-ЭДТА элюат		Трипсиновый элюат		
			Эритроциты	Лейкоциты	Эритроциты	Лейкоциты	
Норма	М	167 ^а 11 (73%) ^в	298 (70-780) ^б 8 (53%) ^в	682 (70-2030) ^б 10 (67%) ^в	92 (20-460) ^б 15 (100%) ^в	246 (50-1890) ^б 14 (95%) ^в	1030 (210-2250) ^б 15 (100%) ^в
	Ж	15±13 ^а 14 (70%) ^в	57 (40-100) ^б 13 (65%) ^в	88 (40-320) ^б 11 (55%) ^в	296 (30-870) ^б 17 (85%) ^в	88 (20-320) ^б 17 (85%) ^в	430 (80-900) ^б 20 (100%) ^в
Фибро-аденома молочной железы		204 (16-765) ^б 19 (86%) ^в	349 (51-902) ^б 9 (41%) ^в	166 (40-470) ^б 11 (50%) ^в	289 (20-622) ^б 10 (45%) ^в	163 (20-952) ^б 17 (77%) ^в	328 (20-1470) ^б 18 (82%) ^в
Рак молочной железы		259 (10-1296) ^б 31 (94%) ^в	83 (40-120) ^б 3 (9%) ^в	0 ^б 0 (0%) ^в	0 ^б 0(0%) ^в	79 (20-138) ^б 2 (6%) ^в	82 (20-138) ^б 5 (15%) ^в

* Концентрация циркулирующей ДНК представлена на мл крови

^а Доверительный интервал для P < 0.05

^б Среднее значение (диапазон) мл

^в Встречаемость

Таблица 4. Циркулирующие РНК в крови здоровых доноров и больных с опухолями молочной железы*

диагноз		Внеклеточная РНК* в плазме	Связанные с поверхностью клеток внеклеточные РНК*				Суммарные связанные внеклеточные РНК* крови
			ФБ-ЭДА элюат		Трипсиновый элюат		
			Эритроциты	Лейкоциты	Эритроциты	Лейкоциты	
Норма	М	126 (120-140) ^а 5 (33%) ^б	186 (40-380) ^а 12 (80%) ^б	422 (100-1340) ^а 9 (60%) ^б	169 (20-810) ^а 12 (80%) ^б	227 (50-990) ^а 13 (87%) ^б	770 (90-2280) ^а 15 (100%) ^б
	Ж	36 (14-60) ^а 7 (35%) ^в	97 (40-220) ^а 7 (35%) ^б	81 (40-140) ^а 10 (50%) ^б	57 (20-90) ^а 3 (15%) ^б	48 (20-100) ^а 4 (20%) ^б	100 (30-440) ^а 11 (45%) ^в
Фибро-аденома молочной железы		34 (15-45) ^а 3 (27%) ^б	130 ^а 1 (9%) ^б	70 (50-90) ^а 2 (18%) ^в	22 (10-30) ^а 3 (27%) ^в	46 (20-80) ^а 5 (45%) ^б	81 (30-220) ^а 7 (64%) ^б
Рак молочной железы		121 (30-290) ^а 5 (25%) ^б	0 ^а 0 (0%) ^б	0 ^а 0 (0%) ^в	0 ^а 0 (0%) ^б	140 ^а 1 (5%) ^в	140 ^а 1 (5%) ^б

* Концентрация циркулирующей РНК представлена на 1 мл крови

^а Среднее значение (диапазон) пг/мл

^б Встречаемость

Было обнаружено, что в крови здоровых доноров основная часть (более 90 %) внеклеточных нуклеиновых кислот связана с поверхностью форменных элементов крови (*табл. 3,4*). При этом даже если в плазме внеклеточные нуклеиновые кислоты не были выявлены, значительное количество нуклеиновых кислот было обнаружено на поверхности клеток крови.

В целом, общая концентрация связанных с поверхностью клеток нуклеиновых кислот была значительно выше у мужчин. Суммарная концентрация связанных дезокси- и рибонуклеиновых кислот в крови у мужчин составляла в среднем 1800 нг/мл, а у женщин 530 нг/мл крови. Средняя концентрация ДНК, связанной с клетками крови мужчин (1030 нг/мл) примерно 2,5 раза выше, чем у женщин (430 нг/мл) (*табл. 3*), а концентрация внеклеточной связанной РНК достоверно отличается от концентрации РНК связанной с поверхностью клеток крови у здоровых женщин (770 и 100 нг/мл соответственно, $P < 0.001$ при сравнении выборок по критерию Манна-Уитни) (*табл. 4*).

Исходя из представленных данных о корреляции концентрации циркулирующих нуклеиновых кислот на поверхности клеток с полом, становится ясно, что при исследовании уровня внеклеточных нуклеиновых кислот при различных патологиях необходимо учитывать пол пациента.

Особенности циркуляции внеклеточных нуклеиновых кислот у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы

Для исследования особенностей циркуляции внеклеточных нуклеиновых кислот в крови онкологических больных был выбраны опухоли молочной железы, поскольку рак молочной железы занимает первое место среди всех онкологических заболеваний женщин.

Были исследованы образцы крови первично обратившихся больных Маммологического отделения Новосибирского областного онкологического диспансера со злокачественными и доброкачественными (фиброаденома) опухолями молочной железы.

У больных с фиброаденомой молочной железы распределение связанных с поверхностью клеток крови внеклеточных нуклеиновых кислот аналогично здоровым донорам (*табл. 3,4*). Концентрация внеклеточной ДНК в плазме крови превышает норму у 82 % больных, и в среднем составляет 204 нг/мл крови, достоверно отличаясь от концентрации ДНК в плазме здоровых доноров ($P < 0.01$ при сравнении выборок по критерию Манна-Уитни) (*табл. 3*). Внеклеточная РНК в

плазме крови была обнаружена в плазме крови 3-х пациентов из 11 (27 %) в средней концентрации 34 нг/мл крови (*табл. 4*).

У 85 % больных раком молочной железы концентрация внеклеточной ДНК в плазме по сравнению с нормой является достоверно повышенной ($P < 0.001$ при сравнении выборок по критерию Манна-Уитни) и в среднем не превышает 259 нг/мл крови (*табл. 3*). Встречаемость и концентрации внеклеточной РНК в плазме крови раковых больных близки к здоровым донорам: у 25 % больных раком груди обнаружена внеклеточная РНК (*табл. 4*). Также как и в более ранних исследованиях нами не было выявлено зависимости в концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот плазмы от тяжести заболевания (коэффициент корреляции ≤ 0).

В крови больных раком молочной железы внеклеточные нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью форменных элементов крови, обнаружены лишь в 20 % образцов, причем в небольших концентрациях (*табл. 3,4*).

Таким образом, при раке молочной железы значительно изменяется соотношение между циркулирующими нуклеиновыми кислотами в плазме крови и внеклеточными нуклеиновыми кислотами, связанными с клеточной поверхностью форменных элементов крови. Отсутствие внеклеточных нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью клеточных элементов крови у больных уже на ранних стадиях развития опухоли позволяет надеяться на разработку ранней скрининговой диагностики рака молочной железы, основанной на измерении соотношения свободно циркулирующих и связанных с поверхностью форменных элементов крови внеклеточных нуклеиновых кислот крови. Очевидно, что для точной онкодиагностики необходим анализ онкоспецифических последовательностей ДНК, включающий анализ метилирования генов онкогенеза, анализ онкоспецифических мутаций в протоонкогенах или исследование микросателлитной ДНК.

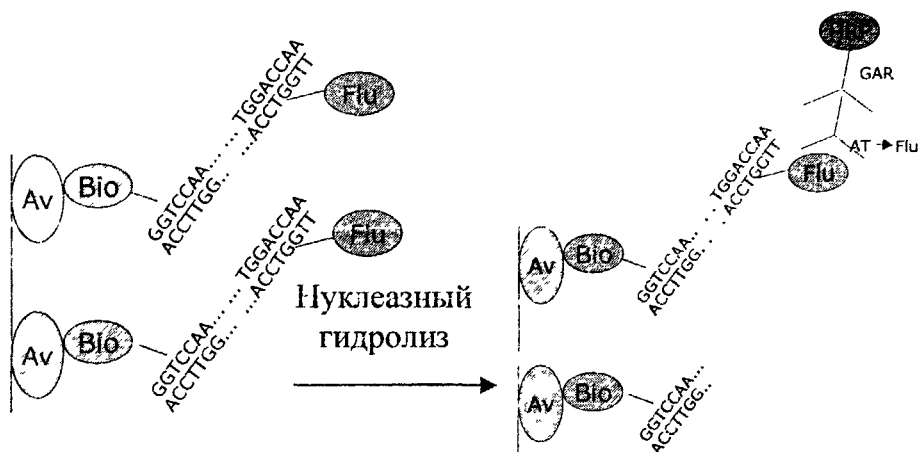
Обнаружение значительного количества связанных с поверхностью форменных элементов крови циркулирующих нуклеиновых кислот позволяет использовать их в качестве исходного материала для выявления онкоспецифических последовательностей в пуле циркулирующих нуклеиновых кислот.

Исследование факторов, влияющих на длительность циркуляции внеклеточных нуклеиновых кислот

Дезоксирибонуклеазная активность и циркулирующая ДНК крови

Для оценки уровня дезоксирибонуклеазной активности крови нами был разработан анализ, основанный на гидролизе ДНК фрагмента длиной 974 п.н., модифицированного остатками флуоресцеина и биотина, для введения которых были использованы модифицированные по 5-ому положению одного из тимидинов биотинином (прямой) и флуоресцеином (обратный) праймеры, используемые для получения ПЦР фрагмента гена 18 S рибосомальной РНК (рис. 1). Было показано, что остаток биотина в полученном ампликоне эффективно связывается с авидином, сорбированным на 96-луночные иммунологические планшеты, а антитела против флуоресцеина связываются с остатком флуоресцеина в составе ДНК. Для построения калибровочной кривой фрагменты ДНК инкубировали с авидином, заранее сорбированным на планшет, и затем добавляли разведения ДНКазы I (1000 ед. акт/мл) от 10^{-2} до 10^{-5} . Негидролизованые фрагменты ДНК выявляли при помощи специфических антител против флуоресцеина с последующей иммунопероксидазной детекцией иммунных комплексов.

Рис. 1. Схема иммуноферментного анализа для определения дезоксирибонуклеазной активности крови



Чувствительность иммуноаналитической системы составляет 0.004 ед. акт. ДНКазы I/мл образца. Воспроизводимость метода составила не менее 95 %. Рабочий диапазон иммуноаналитической

системы находился в пределах от 0.2 до 2.3 опт.ед. Коэффициент вариации в каждой точке составил менее 4 % (рис.2).

Было показано, что в плазме крови здоровых женщин ДНКазная активность составляет $0,13 \pm 0,13$ ед. акт/мл, а у мужчин - $0,15 \pm 0,14$ ед. акт/мл крови.

В крови больных раком молочной железы на фоне повышенной концентрации ДНК в плазме наблюдается достоверное понижение активности дезоксирибонуклеаз в крови по сравнению со здоровыми донорами ($P < 0.05$). Влияние дезоксирибонуклеазой активности плазмы крови на концентрацию внеклеточной ДНК оценивали при помощи определения коэффициента корреляционного отношения, который составил $0,68 \pm 0,62$ при $P < 0,05$, что демонстрирует зависимость концентрации циркулирующей ДНК от активности дезоксирибонуклеаз крови.

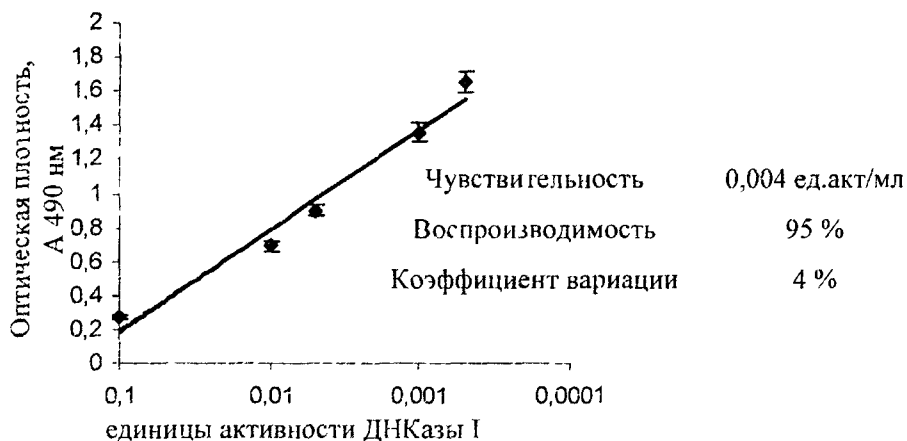


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения дезоксирибонуклеазной активности методом иммуноферментного анализа

Протеазная активность и циркулирующая ДНК крови

Для оценки уровня активности протеаз крови нами был разработан анализ, основанный на использовании отличающихся по гидрофильности биотинилированных пептидов из структуры мембранного белка человека рецептора CD34 и антител против этих пептидов. Было показано, введенный в пептиды остаток биотина эффективно связывается с авидином и пептиды доступны для протеаз и связывания с антителами (рис. 3).

Протеазную активность образцов плазмы крови и ФБ-ЭДТА элюатов определяли по калибровочным кривым для различных разведений протеиназы К. Для построения калибровочной кривой пептиды инкубировали с авидином, заранее сорбированным на планшете, и затем добавляли разведения протеиназы К (34 ед. акт./мл) от 10^{-2} до 10^{-8} . Негидролизованые пептиды выявляли при помощи специфических антител против пептидов с последующей иммунопероксидазной детекцией иммунных комплексов (рис. 4).

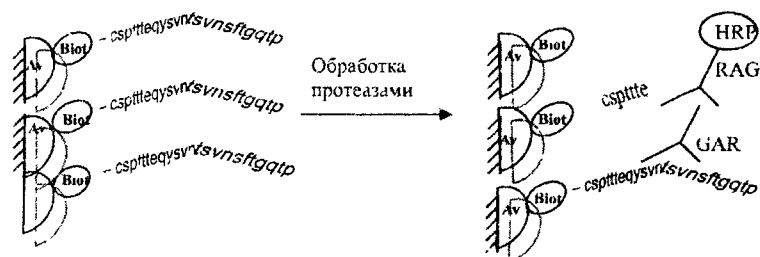


Рис. 3. Схема иммуноферментного анализа для определения протеазной активности в крови

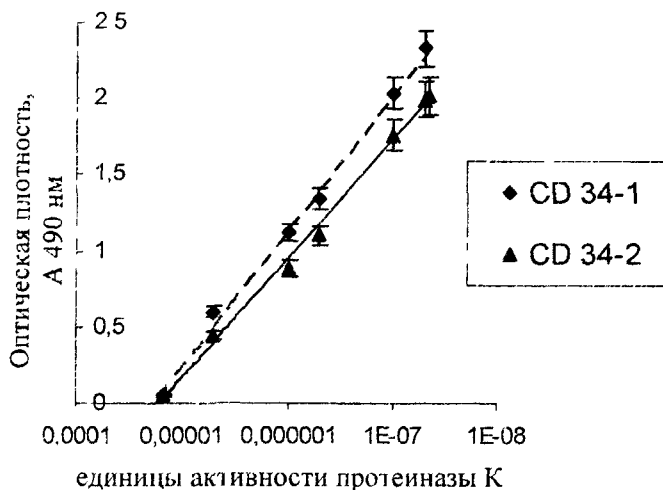


Рис. 4. Калибровочные кривые для определения протеазной активности методом иммуноферментного анализа против пептидов CD34-1 и CD34-2.

Чувствительность такого анализа составила $5 \cdot 10^{-7}$ ед. акт. протеиназы К. Рабочий диапазон иммуноаналитической системы находился в пределах от 0.3 до 2.3 опт.ед. Коэффициент вариации в каждой точке составил менее 6 %.

Исследование протеазной активности крови с использованием в качестве субстрата гидрофильного пептида CD-34-1 не выявило достоверных отличий протеазной активности крови здоровых доноров от протеазной активности крови больных с опухолями молочной железы, анти-CD34-1 протеазная активность не коррелировала с концентрацией внеклеточной ДНК в крови.

Влияние анти-CD34-2 протеазной активности плазмы крови здоровых доноров на концентрацию внеклеточной ДНК оценивали при помощи определения коэффициента корреляционного отношения, который составил $0,54 \pm 0,53$ при $P < 0,05$. У больных раком молочной железы обнаруживается достоверное повышение данной активности в крови по сравнению с больными доброкачественными опухолями молочной железы ($P < 0,05$ при сравнении выборок по критерию Манна-Уитни). При сравнении анти-CD34-2 протеазной активности в элюатах с поверхности клеток крови здоровых доноров и больных раком молочной железы было обнаружено увеличение протеолитической активности в крови на фоне уменьшения количества связанных с поверхностью форменных элементов крови циркулирующих нуклеиновых кислот. Таким образом, активность протеаз в крови влияет на перераспределение нуклеиновых кислот в крови при развитии патологии.

Выводы:

1. Разработан метод выделения внеклеточных нуклеиновых кислот при помощи сорбции нуклеиновых кислот на модифицированном мелкодисперсном стекле, пригодный для измерения их концентрации при помощи флуоресцентных красителей Hoechst 33258 и SYBR Green II. Эффективность выделения ДНК из плазмы крови длиной 200-500 п.н. составляет не менее 96 %, эффективность выделения РНК длиной 96 н. составляет не менее 85 %.
2. При помощи комбинации методов - выделения нуклеиновых кислот на модифицированном стекле и определения концентрации ДНК и РНК при помощи флуоресцентных красителей - исследовано распределение внеклеточных нуклеиновых кислот в крови

здоровых доноров. Показано, что основную часть внеклеточных нуклеиновых кислот крови составляют нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью форменных элементов.

3. Исследованы особенности циркуляции внеклеточных нуклеиновых кислот в крови больных с опухолями молочной железы. Показано, что по данным флуоресцентного анализа в крови больных злокачественными опухолями молочной железы, отсутствуют циркулирующие нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью форменных элементов крови, а концентрация внеклеточной ДНК в плазме достоверно отличается от таковой у здоровых доноров. В крови больных с доброкачественными опухолями молочной железы концентрация связанных с поверхностью клеток крови нуклеиновых кислот не отличается от таковой у здоровых доноров. Полученные данные свидетельствуют о возможности ранней неинвазивной дифференциальной диагностики опухолей молочной железы, основанной на измерении концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот.
4. Разработана система иммуноферментного анализа, пригодная для изучения протеазной активности в крови. Показано, что при увеличении протеазной активности в крови уменьшается концентрация нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью форменных элементов крови. Таким образом, протеазная активность крови влияет на перераспределение внеклеточных нуклеиновых кислот.
5. Разработана система иммуноферментного анализа, пригодная для изучения дезоксирибонуклеазной активности в крови. Показано, что при уменьшении дезоксирибонуклеазной активности в крови увеличивается концентрация циркулирующих дезоксирибонуклеиновых кислот. Таким образом, дезоксирибонуклеазная активность влияет на концентрацию внеклеточной ДНК в крови.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

Статьи:

1. P.P. Laktionov, S.N. Tamkovich, E.Yu. Rykova, O.E. Bryzgunova, A.V. Starikov, N.P. Kuznetsova, V.V. Vlasov. Free and cell surface bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients. Ann. N. Y. Acad Sci. 2004, V. 1022, P. 221-227.
2. S.N. Tamkovich, P.P. Laktionov, E.Yu. Rykova, V.V. Vlasov. Simple and rapid procedure suitable for quantitative isolation of low and high molecular weight extracellular nucleic acids. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004, V. 23, P. 873-877.
3. P.P. Laktionov, S.N. Tamkovich, E.Yu. Rykova, O.E. Bryzgunova, A.V. Starikov, N.P. Kuznetsova, S.V. Sumarokov, S.A. Kolomiets, N.V. Sevostianova, V.V. Vlasov. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004, V. 23, P. 879-883.
4. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю., Стариков А.В., Скворцова Т.Э., Кузнецова Н.П., Пермякова В.И., Власов В.В. Уровень внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме крови здоровых доноров и больных с опухолями молочной железы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005, Т. 139, С. 462-464.
5. S.N. Tamkovich, O.E. Bryzgunova, E.Yu. Rykova, V.I. Permyakova, V.V. Vlasov, P.P. Laktionov. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. Clin. Chem. 2005, V. 51, P. 1317-1319.
6. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Брызгунова О.Е., Стариков А.В., Рыкова Е.Ю., Кузнецова Н.П., Пермякова В.И., Власов В.В. Уровень внеклеточных нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью форменных элементов крови в диагностике рака молочной железы. Молекулярная медицина. 2005, Т. 2, С. 46-50.
7. Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е., Рыкова Е.Ю., Колесникова Е.В., Шелестюк П.И., Лактионов П.П., Власов В.В. Циркулирующие нуклеиновые кислоты в крови больных раком желудка и толстой кишки Биомедицинская химия, 2005, Т. 51. С. 321-328.

Патенты:

1. Лактионов П.П., Тамкович С.Н., Симонов П.А., Рыкова Е.Ю., Власов В.В. Способ выделения дезоксирибонуклеиновых кислот. Патент на изобретение № 2232768.
2. Лактионов П.П., Тамкович С.Н., Симонов П.А., Рыкова Е.Ю., Власов В.В. Способ выделения рибонуклеиновых кислот. Патент на изобретение № 2232810.

3. Лактионов П.П., Тамкович С.Н., Рыкова Е.Ю., Морозкин Е.С., Власов В.В. Способ ранней диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. Патент на изобретение № 2251696.
4. Лактионов П.П., Скворцова Т.Э., Тамкович С.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В.В. Способ ранней диагностики заболеваний, связанных с нарушением функционирования генетического аппарата клетки. Патент на изобретение № 2249820.

Подписано к печати 28 декабря 2005г.
Тираж 100 экз. Заказ № 1723.
Отпечатано "Документ-Сервис", 630090,
Новосибирск, Институтская 4/1, тел. 335-66-00

2006A
595

№ - - 595