

УДК: 577.113

**ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ:
ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ФУНКЦИИ. МИНИОБЗОР****Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев,****Н.У. Танкибаева, В.В. Койков***1. Государственный медицинский университет, г. Караганда,
Республика Казахстан, muravlev@inbox.ru**2. Медицинский университет, г. Астана, Республика Казахстан*

Новые исследования последних 10–15 лет установили тенденцию взаимосвязь количества и динамики содержания внеклеточных нуклеиновых кислот (вкНК) с развитием ряда патологических процессов. Ядерный материал, представленный ДНК и РНК и обнаруживаемый в кровотоке, дифференцируется по происхождению, типам и концентрации. Изучение динамических изменений показателей вкНК может привести к более глубокому пониманию механизмов развития онкопатологии, тяжелых хронических заболеваний, нарушений регуляции гемостаза, аспектов врожденного и приобретенного иммунитета.

Ключевые слова: внеклеточные нуклеиновые кислоты, происхождение, функции.

**CIRCULATING NUCLEIC ACIDS: ORIGIN AND FUNCTIONS.
MINIREVIEW****L.E. Muravleva, V.B. Molotov-luchansky, D.A. Klyev,****N.U. Tankibaeva, V.V. Koikov***The state medical university, Karaganda, muravlev@inbox.ru**Medical university, Astana, Republic Kazakhstan*

New researches of last 10-15 years have established interrelation of amount and changes of the contents of extracellular nucleic acids (ecNA) with development of some pathological processes. The nuclear material which is submitted of DNA and RNA and found out in a blood-groove, is differentiated by origin, types and concentration. Studying of dynamic changes of parameters eNA can lead to deeper understanding of mechanisms of development oncological processes, hard chronic diseases, infringements of regulation of a hemostasis, aspects of the congenital and got immunity.

Key words: extracellular nucleic acids, origin, functions.

Присутствие в крови внеклеточных или циркулирующих нуклеиновых кислот (вкНК) было открыто в 1948 г. Mandel и Metais [6]. Позднее вкНК были обнаружены в плазме, сыворотке крови и моче. В крови здоровых лиц вкНК обнаружива-

ются в свободном виде, а также сорбированными на форменных элементах [1, 2].

Циркулирующие нуклеиновые кислоты представлены как ДНК, так и РНК. Многочисленными исследованиями, выполненными в различных научных центрах, было

показано, что определение уровня вкДНК позволяет диагностировать различные формы опухолевого процесса, оценить степень его выраженности или риск метастазирования [7,8,9]. Открытие внеклеточной фетальной ДНК, а позже и вкРНК в крови беременных женщин способствовало разработке новых подходов для определения пола плода и его RhD-статуса. Предложены новые способы пренатальной диагностики хромосомных болезней, а также осложнений течения беременности [10-12].

РНК, циркулирующие в крови здоровых людей, являются частью открытой недавно сети некодирующих регуляторных РНК, основная функция которых быть посредниками между ДНК и белками. А. Chajut et al. [13] показано присутствие микроРНК, относящихся к семейству малых некодирующих регуляторных РНК, в крови здоровых лиц и больных колоректальным раком. Проанализировано 350 микроРНК, и 22 из них предложено использовать в качестве потенциальных биомаркеров для раннего выявления колоректального рака. Определение микроРНК представляет интерес для диагностики лимфомы и метастазирующей карциномы простаты [14].

В настоящее время установлено, что содержание циркулирующих нуклеиновых кислот меняется при диабете, инфаркте миокарда, системной красной волчанке, ревматоидном артрите, гломерулонефрите, гепатите и других патологических состояниях [8,15,16]. Предложено использование определения вкДНК плазмы крови как прогностического маркера у пациентов с различными травмами [17]. Отме-

чено появление вкРНК из миоцитов в результате их повреждения [18].

Deligezer и соавт. [19] указывают на присутствие фрагментированной нуклеосомной ДНК в крови больных лимфомой и множественной миеломой. Об увеличении уровня нуклеосом, которые высвобождаются в кровь из умирающих клеток при разных патологических состояниях, сообщается в других исследованиях [20, 21]. Определение нуклеосом в циркулирующей крови предложено использовать для диагностики, определения стадии и мониторинга лечения рака [19].

Остается открытым вопрос о происхождении вкНК в крови как в условиях нормы, так при патологии. Так, Зайцев В.Г., Скворцов В.В. обсуждают три основные процессы, которые могут приводить к появлению вкДНК в крови: некроз, апоптоз и высвобождение из неповрежденных клеток. Нормальные клетки могут выделять синтезированные ДНК в виде нуклеопротеинов или в форме гетеродуплексов ДНК-РНК [3].

Впервые выделение ДНК из активированных лимфоцитов показано Rogers JC and colleagues [22], которые продемонстрировали, что культивированные лимфоциты в присутствии фитогемоагглютинаина или антигена выделяют ДНК в окружающую среду. В обзоре Н.О. Туаевой и З.И. Абрамовой приведено достаточно подробное описание экспериментов, подтверждающих возможность эвакуации ядерного материала из лимфоцитов [4]. Циркулирующие ДНК могут иметь и гемопозитическое происхождение, поступая в кровяной ток по завершению дифференцировки эритробластов [23]. Попадание

фрагментов ДНК в кровь может быть следствием вступления в апоптоз достаточно большого числа клеток, что приводит к нарушению процессов элиминации апоптотических телец. Результатом апоптоза опухолевых клеток объясняют увеличение вкДНК в крови больных [24].

В то же время имеются фактические данные, которые не подтверждают данное предположение. Например, радиотерапия, химиотерапия опухолей увеличивают клеточную смерть путем апоптоза. Но при этом количество циркулирующей ДНК в крови снижается [24, 25]. Maniesh van der Vaart и Piet J. Pretorius также высказывают сомнения в апоптотическом происхождении вкДНК. Апоптотические клетки быстро поглощаются фагоцитами или соседними клетками, при этом ДНК апоптотических клеток полностью расщепляется ДНК-зой II в лизосомах. Это означает, что фрагменты ДНК удаляются и не могут попадать в кровоток [26].

Vishnu Swarup, M.R. Rajeswari выводят происхождение вкНК крови здоровых людей как результат апоптоза лимфоцитов и других ядродержащих клеток. При раке апоптоз, как источник вкНК маловероятен, так как опухолевые клетки проявляют устойчивость к этому виду клеточной смерти. Низкий уровень вкНК в крови здоровых людей поддерживается высокой активностью ДНК-з, но у больных с онкопатологией наблюдается снижение активности этих ферментов [27]. За счет апоптоза объясняется и появление вкРНК в крови. A. I. Scovassia et al. [28] показано, что при апоптозе помимо фрагментации ДНК в ядре происходит реорганизация рибонуклеопр-

теинового (РНП) комплекса, участвующего в транскрипции и процессинге. В результате образуются агрегаты, которые авторы называют гетерогенные эктопические РНП-производные структуры. Эти структуры затем движутся в цитоплазму и обнаруживаются в апоптотических тельцах.

Tamkovich S.N. и соавт. [29] указывают, что вкДНК могут происходить из нескольких источников: в результате клеточной смерти, в процессе созревания эритроцитов и тромбоцитов, а также в результате активной секреции нуклеиновых кислот во внеклеточное пространство. Эритроциты в процессе созревания эвакуируют ДНК во время миграции из костного мозга через стенку сосуда в кровь. Хотя ядра эритроцитов быстро фагоцитируются стромальными макрофагами, часть ДНК может избежать фагоцитоза и оказаться в циркуляции. Также в крови может присутствовать и НК возбудителей. В крови беременных женщин источниками фетальной ДНК являются апоптоз клеток трофобласта, плаценты и гемопоэтические клетки [1, 25].

M.Weil et al., считают, что вкНК появляются в крови на финальных стадиях дифференциации эритроцитов, кератиноцитов, которые сопровождается распадом хроматина и эвакуацией ядерного материала из клеток [30]. Maniesh van der Vaart и Piet Pretorius указывают, что вкДНК, выделенная из крови здоровых людей, отличается по своим характеристикам от ДНК из апоптотических клеток и других мертвых клеток. Они полагают, что живые клетки поддерживают небольшую равновесную концентрацию вкДНК путем секреции последней в кровь. Эта ДНК удаляется из системы циркуляции,

возможно, путем захвата другими клетками с последующей инкорпорацией в геном клеток-реципиентов. В условиях патологии скорость клеточной гибели превышает способность фагоцитов поглощать и разрушать ДНК, что и повышает уровень последней в системе циркуляции. В случае рака дополнительные порции ДНК секретируются в кровь живыми опухолевыми клетками [26].

Некроз может быть причиной появления внеклеточной ДНК в плазме крови, хотя маловероятно, что некротические клетки обеспечивали значительную часть ДНК в плазме у здоровых людей.

В исследованиях *in vivo* и *in vitro* с использованием клеточной культуры Jurkat показано, что скорость высвобождения НК из апоптотических или некротических клеток значительно меняется в присутствии макрофагов, при действии гормонов, некоторых химических препаратов, а также в условиях воспаления [31-36]. Ning Jiang и соавт. высказали предположение, что интенсивная гибель клеток индуцирует апоптоз макрофагов, который ведет к высвобождению ядерного материала как поглощенных, но не до конца переваренных клеток, так и самих макрофагов. Именно этим, по мнению авторов, объясняется появление в кровотоке как вкДНК, так и нуклеосом [31].

Не ясен механизм удаления вкНК из крови. Считается, что вкНК разрушаются ДНК-зами или поглощаются клетками печени или другими клетками. Получены свидетельства о возможности интеграции вкНК в геном клеток-реципиентов. Этот феномен требует изучения и объяснения, хотя высказано предположение, что вкДНК участвует

в гомологичной рекомбинации с геномной ДНК. Этот процесс может корректировать мутации, для чего внешние фрагменты ДНК используются как референс-молекулы [37].

В этом аспекте хотелось бы остановиться на обсуждении представлений о роли вкНК. D. S. Pisetsky высказано мнение, что ДНК, присутствующая во внеклеточном пространстве, может обладать иммунологической активностью, причем как самостоятельно, так и в составе иммунных комплексов и влиять на врожденный иммунитет [38]. Исследованиями Fischer S. et al. [39] показано, что вкРНК *in vivo* и *in vitro* индуцирует усиление проницаемости, действуя через сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). Исследования проводились на различных клеточных культурах. РНК, но не ДНК, запускала сигнальный каскад, связывая VEGF с нейрофилином-1 с последующим фосфорилированием рецептора VEGF, активацией фосфолипазы C и высвобождением внутриклеточного кальция.

Вызывают несомненный интерес результаты исследования, показавшие участие вкРНК в работе системы коагуляции. В качестве прокоагулянтного кофактора РНК запускает контактную фазу активации коагуляции и вносит вклад в образование тромба. У мышей с моделью артериального тромбоза вкРНК ассоциирована с образованием тромба, богатого фибрином. Обработка РНК-зами задерживала возникновение окклюзивного тромбоза [40].

Высказано предположение о влиянии вкНК на биомеханику потока крови [5], хотя данная гипотеза не имеет серьезной аргументации.

Margraf S et al. высказано предположение о нейтрофильных внеклеточных ловушках («neutrophil extracellular traps», NETs) как о новом иммунном ответе во врожденном иммунитете. Эти ловушки состоят из свободной ДНК нейтрофильного происхождения, комплекса ДНК/гистонов и нейтрофильных белков, таких как миелопероксидаза. Обсуждается роль NETs в механизмах антимикробной и антибактериальной защиты. [40, 41].

Таким образом, обобщая результаты данных исследований, можно сказать, что новый вектор научных поисков, позволит расширить наши представления о механизмах развития и прогрессирования многих тяжелых хронических заболеваний, раскрыть новые аспекты механизмов гемостаза, репарации клеток и тканей при коагулопатических расстройствах и травмах. Это позволит оптимизировать подходы к диагностике, прогнозу и терапии патологических состояний.

Список литературы

1. Токарева, А. Г. и др. // Медицинская генетика — 2007. — Том 6, N 8. — С. 24–28.
2. Тамкович С. Н. и др. // Молекулярная медицина — 2005. — №2. — С. 46–50.
3. Зайцев В.Г., Скворцов В.В. // РМЖ. Онкология. — 2009. — Т.17. — N 13 (352). — С. 864–866.
4. Туаева Н.О., Абрамова З.И. // Ученые записки Казанского государственного университета. — 2007. — Т. 149, кн.2. — С. 24–32.
5. Туаева Н.О. и др. // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия: Естественные науки. — 2008. — Т.150. — № 2. — С. 59–70.
6. Mandel P and Metals P. // Acad Sci. — 1948. — 142. — P. 241–243.
7. Lui YY, Dennis YM. // Clin Chem Lab Med. — 2002. — 40(10). — P. 962–968.
8. Tong YK, Lo YM. // Clin Chim Acta. — 2006. — 363 (1–2). — P. 187–96.
9. Urbanova M et al. // Cellular & Molecular Biology Letters. — 2010. — V. 15, N 2. — P. 242–259.
10. Chan AK et al. // Ann Clin Biochem. — 2003. — 40(Pt 2). — P. 122–130.
11. Hung E C W et al. // J Clin Pathol. — 2009. — 62. — P. 308–313.
12. Tsang JC, Lo YM. // Pathology. — 2007. — 39(2). — P. 197–207.
13. Chajut A. et al. // J Clin Oncol. — 2009. — 27 (suppl; abstr e15040).
14. Hung E. C. W. et al. // J Clin Pathol. — 2009. — 62. — P. 308–313.
15. Swaminathan R, Butt AN. // Ann N Y Acad Sci. — 2006. — 1075. — P. 1–9;
16. Pisetsky DS. // Rheum Dis Clin North Am. — 2004. — 30. — P. 575–587.
17. Lo YMD et al. // Clin Chem. — 2000. — 46. — P. 319–323.
18. Preissner K T. // Hamostaseologie — 2008. — 27(5). — P. 373–377.
19. Deligezer U et al. // Experimental and molecular pathology. — 2006. — Vol. 80. — N1. — P. 72–76.
20. Holdenrieder S., Stieber P. // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. — 2009. — V. 46, Issue 1. — P. 1–24.
21. Holdenrieder S et al. // Clin Chem Lab Med. — 2001. — 39. — P. 596–605.
22. Rogers JC et al. // Proc Natl. Acad Sci USA. — 1972. — 69. — P. 1685–1689.
23. Lui YY et al. // Clin Chem. — 2003. — 49. — P. 495–496.

24. Fournie GJ et al. // *Cancer Lett.* — 1995. — 91. — P. 221–227.
25. Zhong X. Y. et al. // *Annals of Hematology.* — 2007. — Volume 86, Number 2 — P. 139–143.
26. Maniesh van der Vaart M., Pretorius P.J. // *Clinical Chemistry.* — 2007. — 53. — P. 2215.
27. Swarup V., Rajeswari M.R. // *FEBS Letters.* — 2007. — 581. — P. 795–799.
28. Scovassia, M. G. et al. // *Biochem. Pharmacol.* — 2008. — 1. — 76 (11). — P. 1440–1450.
29. Tamkovich S.N. et al. // *Molecular Biology.* — 2008. — V. 42, No. 1. — P. 9–19.
30. Weil M et al. // *Curr Biol.* — 1999. — 9. — P. 361–364.
31. Jiang N et al. // *Blood.* — 2003. — 102. — P. 2243–2250.
32. Jiang N, Pisetsky DS. // *Am J Pathol.* — 2004. — 164. — P. 1751–1759.
33. Jiang N, Pisetsky D.S. // *J Leukoc Biol.* — 2005. — 77. — P. 296–302.
34. Choi JJ et al. // *Scand J Immunol.* — 2004. — 60. — P. 159–166.
35. Choi JJ et al. // *Immunology.* — 2005. — 115. — P. 55–62.
36. Pisetsky D.S., Jiang N. // *Scand J Immunol.* — 2006. — 64(3). — P. 200–204.
37. Pisetsky D. S., Fairhurst A.M. // *Autoimmunity* — 2007. — V. 40, N. 4. — P. 281–284.
38. Gahana P B., Swaminathan C // *Annals of the New York Academy of Sciences.* — 2008, vol. 1137. — P. 1–6.
39. Pisetsky D. S. // *The Proceedings of the American Thoracic Society.* — 2007. — 4. — P. 258–262.
40. Fischer S. et al. // *The FASEB Journal.* — 2009. — 23. — P. 2100–2109.
41. Deindl E. et al. // *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* — 2009. — Vol. 46. — P. 461–466.
42. Margraf S et al. // *Shock* — 2008 — V 30 — Issue 4 — P. 352–358.