

## ПОЗАКЛІТИННІ ФРАГМЕНТИ ДНК ТА ДНК-азна АКТИВНІСТЬ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ІЗ ТРАНСПЛАНТОВАНОЮ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА НА ФОНІ БАГАТОРАЗОВОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ НИЗЬКИМИ ДОЗАМИ

М. М. МАРЧЕНКО, Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. О. ШМАРАКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;  
e-mail: igor\_shmarakov@mail.ru

*Исследовали фракционный состав внеклеточной ДНК (вкДНК) и активность сывороточных ДНК-аз крови в процессе роста опухоли, трансплантированной крысам после предварительного многократного облучения их в низких дозах. В сыворотке крови облученных животных обнаружено гетерогенные фрагменты этой нуклеиновой кислоты и высокий уровень активности ДНК-аз. Четкость размеров фрагментов высокомолекулярной гомогенной фракции вкДНК облученных и необлученных опухоленосителей, а также наличие их уже на первых этапах опухолевого роста, независимо от активности сывороточных ДНК-аз, показывают, что эта фракция появляется не случайно. Предварительное многократное облучение крыс низкими дозами влияет на изучаемые показатели только в начале роста новообразования.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: внеклеточная ДНК, ДНК-азы сыворотки крови, карцинома Герена, низкие дозы радиации.*

**П**озаклітинні нуклеїнові кислоти, які беруть участь у регуляції внутрішньогеномних перебудов під час диференціації клітин [1, 2], здатні переносити між ними інформацію [3, 4]. В низці робіт переконливо доведено, що вихід ДНК із клітин назовні є активним процесом, який не пов'язаний з їхньою загибеллю [1–3]. Однак деякі дослідники пояснюють наявність позаклітинних нуклеїнових кислот у сироватці крові як наслідок процесів відмирання клітин за апоптозу та(або) некрозу [5]. Особливу увагу привертають нуклеїнові кислоти, які виявлено в сироватці крові за пухлинного росту [5–9] і рентгенівського опромінення організму [1, 10], що зберігають при цьому матричну активність [11]. Пухлинній позаклітинній ДНК (пкДНК) належить значна роль у процесах депресивного впливу пухлини на організм [12, 13] та пригніченні його резистентності [14].

Можливо, первинним бар'єром, роль якого полягає в елімінації депресивних факторів нуклеїнової природи, є ДНК-ази сироватки крові.

Метою роботи було дослідити зміну фракційного складу пкДНК та активності сироваткових ДНК-аз у процесі росту пухлини, трансплантованої щурам, на фоні попереднього багаторазового опромінення тварин у низьких дозах.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були самки білих безпородних щурів з масою тіла 110–130 г. В роботі використано 95 щурів (повторність експери-

ментів – 6-кратна). Опромінення проводили впродовж 7 днів (сумарна доза радіації – 25,3 мКл/кг) на рентгенівській діагностичній установці 12П6 («Lachema», Чехія) за напруги 80 кВ, силі струму 40 мА, шкірно-фокусній віддалі – 40 см, потужності дози – 1Р/с ( $2,5797 \cdot 10^{-4}$  Кл/кг) з використанням фільтрів 0,5 мм Cu. Через одну добу після припинення опромінення тварин було розділено на групи: опромінені щури без пухлини (контроль); опромінені щури, яким на першу добу після опромінення трансплантували карциному Герена за методикою, описаною у статті [15], та неопромінені пухлиноносії. Контролем слугували інтактні щури. Евтаназію дослідних тварин проводили під легким ефірним наркозом на 7-, 14-, та 21-у добу після трансплантації пухлини. Сироватку одержували центрифугуванням крові (1000 г, 15 хв). Із сироватки крові стандартним фенольним методом виділяли пкДНК, після чого її електрофоретично розділяли в 0,85%-му агарозному гелі методом, описаним у статті [16]. Активність лужної та кислої ДНК-аз (ЕС 3.1.21.1 – дезоксирибонуклеаза I, ЕС 3.1.22.1 – дезоксирибонуклеаза II) оцінювали за приростом світлопоглинання ( $\lambda = 260$  нм) кислоторозчинної фракції, одержаної після інкубації (температура – 37 °С) субстратної ДНК із сироваткою крові [17], і виражали в одиницях активності ферменту на 1 мг білка. За одиницю вважали таку активність, яка зумовлює збільшення поглинання світла супернатантом на 0,001 за 1 хв і за певних умов

інкубації. Одержані результати обробляли статистично.

**Результати та обговорення**

На електрофоретичних спектрах пкДНК сироватки крові щурів-пухлиноносіїв виявлено 2 фракції з неоднаковою електрофоретичною рухливістю (рис. 1). До першої гомогенної фракції належать фрагменти ДНК з довжиною близько 21 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.), у той час як до другої – гетерогенні фрагменти завдовжки до 2 т.п.н. Варіабельність фракційного складу пкДНК залежить від стадії росту пухлини: на початкових етапах його виявляється лише гомогенна високомолекулярна фракція, а в логарифмічну та стаціонарну фази росту пухлини ідентифіковано гетерогенну і високомолекулярну фракції (рис. 1).

Поява цих фрагментів під час активного росту пухлини, можливо, пов'язана з інгібуванням ДНК-аз сироватки крові, які в нормі розщеплюють такі продукти деградації нуклеїнової кислоти. Для експериментального підтвердження цього припущення було проведено визначення активності ДНК-аз на різних етапах росту карциноми Герена. Одержані дані свідчать про зниження активності досліджуваних ферментів у процесі росту новоутворення (рис. 2, 3).

З одержаних даних випливає, що фракційний склад пкДНК змінюється не лише якісно, але й кількісно: вміст низькомолекулярних фрагментів підвищується з ростом новоутворення на фоні стабільного рівня гомогенної фракції.

Хоча з даних літератури відомо, що пкДНК, яку виявлено в сироватці крові онкологічно хворих, утворюється саме в пухлинних клітинах [7, 9, 11], однак механізм її надходження у кров

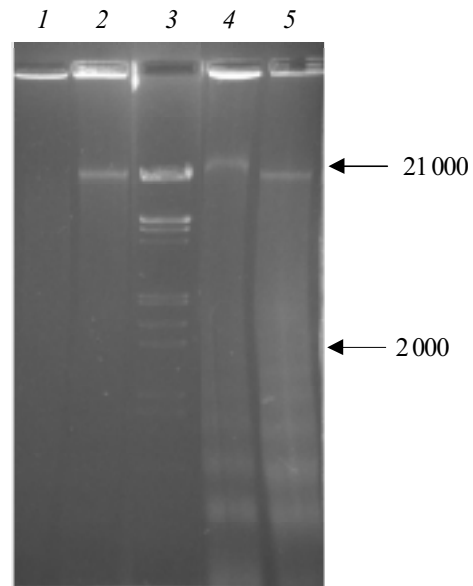


Рис. 1. Електрофореграма препаратів ДНК сироватки крові щурів із карциномою Герена: 1 – контроль; 2, 4, 5 – препарати ДНК, одержані із сироватки крові щурів-пухлиноносіїв відповідно на 7-, 14- та 21-у добу після трансплантації карциноми Герена; 3 – маркерний препарат ( $\lambda$  ДНК / EcoRI + Hind III).

залишається нез'ясованим. Деякі автори схильні стверджувати, що сироваткові пкДНК продукуються апоптичними та некротичними клітинами [5], в той час як інші вважають її продуктами ампліфікації певних генів трансформованих клітин, зумовленої нестабільністю їхнього геному [10, 18–20].

Виявлена в наших дослідженнях чітка виз-

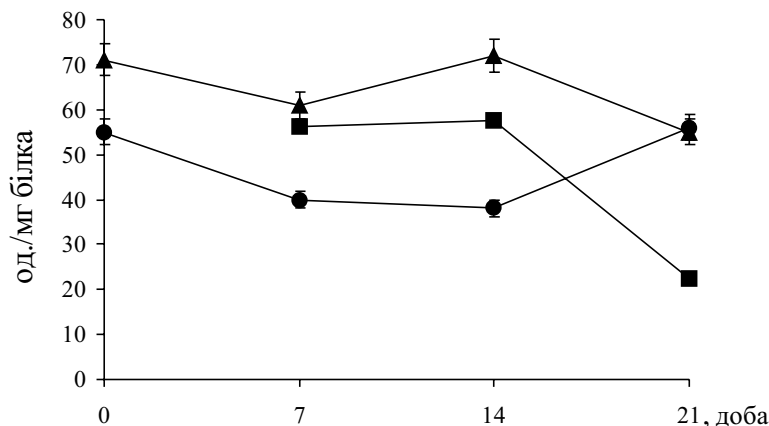


Рис. 2. Динаміка активності кислій ДНК-ази сироватки крові неопромінених щурів-пухлиноносіїв (крива ▲), опромінених щурів без пухлин (крива ■) та щурів із трансплантованою їм карциномою Герена після опромінення (крива ●).

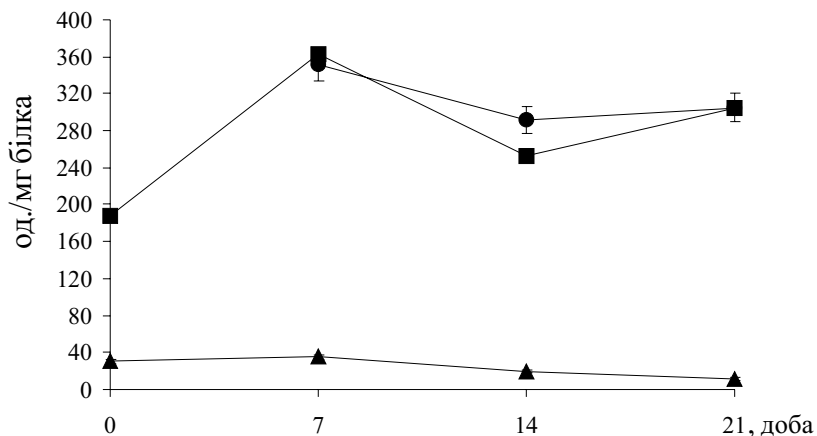


Рис. 3. Динаміка активності лужної ДНК-ази сироватки крові неопромінених щурів-пухлиноносіїв (крива ▲), опромінених щурів без пухлин (крива ■) та щурів із трансплантованою їм карциномою Герена після опромінення (крива ●).

наченість довжини фрагментів гомогенної фракції ставить під сумнів їхнє походження з некротичних клітин. Крім того, не можна ототожнювати появу фрагментів цієї фракції також із деструкційними процесами, оскільки вони б видалялися із кров'яного руслу після розщеплення сироватковими ДНК-азами.

Під час дослідження фракційного складу пкДНК опромінених щурів виявлено високомолекулярні фрагменти – від 21 т.п.н., які характеризувались гетерогенністю і неоднаковими розмірами (рис. 4). Спостерігається також підвищення активності сироваткової лужної ДНК-ази (рис. 3), що й зумовлює відсутність низькомолекулярної фракції та гетерогенність високомолекулярних фрагментів як продукту ферментативної деградації ДНК більших розмірів. Зі збільшенням періоду після опромінення тварин спостерігається зниження рівня пкДНК. Так, починаючи із сьомої доби експерименту, на електрофореграмах виявляються лише її слідові кількості (рис. 4).

За росту карциноми Герена, прищепленої опроміненим щурам, спостерігається подібна електрофоретична картина, як і у пухлиноносіїв, що не зазнали впливу опромінення. Ідентичні електрофореграми пкДНК виявлено лише з 14-ї доби експерименту, тобто в період активного росту новоутворення. До цього часу в сироватці крові опромінених пухлиноносіїв ідентифіковано лише слідові кількості їх. Незначний рівень пкДНК на початкових етапах росту пухлини після її прищеплення та за відсутності дії радіації свідчить, що активовані ДНК-ази сироватки (рис. 2, 3) ефективно гідролізують пкДНК. Проте в період активного росту новоутворення навіть підвище-

ний рівень ДНК-азної активності не впливає на її елімінацію. Крім цього, на електрофореграмі спостерігається поява чіткої високомолекулярної фракції, як і у випадку з неопроміненими пухлиноносіями (рис. 5).

Гетерогенність фрагментів пкДНК, які ідентифіковано в сироватці опромінених щурів, та високий рівень активності сироваткових ДНК-аз підтверджують утворення цієї нуклеїнової кислоти внаслідок гідролітичного розщеплення клітинної ДНК. Але чіткі розміри фрагментів

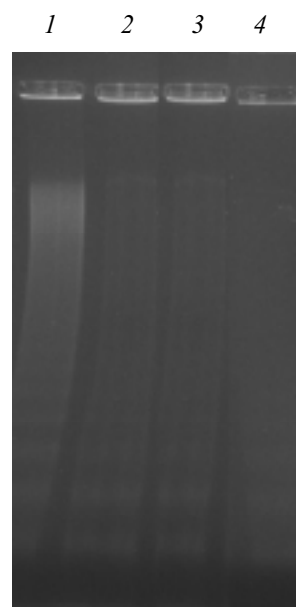


Рис. 4. Електрофореграма фрагментів ДНК сироватки крові опромінених щурів. 1, 2, 3, 4 – препарати ДНК, одержані із сироватки щурів відповідно на 1-, 7-, 14- та 21-у добу експерименту.



Рис. 5. Електрофореграма фрагментів ДНК сироватки крові щурів із трансплантованою карциномою Герена на фоні рентгенівського опромінення: 1, 2, 3 – препарати ДНК, одержані із сироватки крові щурів відповідно на 7-, 14- та 21-у добу після трансплантації карциноми Герена.

високомолекулярної гомогенної фракції пкДНК, виявленої в сироватці опромінених та неопромінених пухлиноносіїв, та наявність їх на перших етапах пухлинного росту незалежно від активності сироваткових ДНК-аз, свідчать, що вони утворюються не випадково. Згідно з результатами наших досліджень, пкДНК, зокрема її високомолекулярну гомогенну фракцію, слід розглядати, як один із механізмів агресивності пухлинної тканини за її депресивного впливу на організм.

З одержаних результатів впливає, що багаторазове опромінення щурів у низьких дозах перед прищепленням їм карциноми Герена впливає на досліджувані показники лише на початкових етапах росту новоутворення. В період активного росту пухлини динаміка їх визначається процесами онкогенезу.

## EXTRACELLULAR FREE DNA FRAGMENTS AND DNase ACTIVITY IN BLOOD SERUM OF RATS WITH TRANSPLANTATED GUERIN'S CARCINOMA AGAINST A BACKGROUND OF FRACTIONATED X-IRRADIATION

*M. M. Marchenko, G. P. Kopylchuk,  
I. O. Shmarakov*

Yury Fedkovych Chernivtsi National University,  
Ukraine;  
e-mail: igor\_shmarakov@mail.ru

### S u m m a r y

The fraction composition of extracellular free DNA (cfDNA) and activity of serum DNases in blood of rats with the tumor transplanted against a background of the low-dose X-irradiation were investigated. Heterogeneous fragments of cfDNA and high level of DNase activity were revealed in the serum of irradiated rats. The definite sizes of high-molecular homogenous fraction of cfDNA, which is observed in the serum of irradiated and unirradiated rats with tumor, and its presence from the first stages of tumor growth independent of serum DNases activity show, that the emergence of this fraction is not accidental. Previous fractionated irradiation makes influence on the investigation data only on the primary stages of tumor growth.

**К е у w o r d s:** free DNA, serum DNases, Guerin's carcinoma, low doses of radiation.

1. Белохвостов А. С., Лебедев С. Н., Шерлина С. С. // Радиобиология. 1987. 27, № 4. С. 505–509.
2. Васильев В. К. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1984. № 2. С. 165–167.
3. Васюхин В. И., Липская Л. А. // Мол. биология. 1991. 25, № 2. С. 405–412.
4. Янева И. С., Федоров Н. А. // Биохимия. 1990. 55, вып. 4. С. 745–753.
5. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D. // Cancer Res. 2001. 61. P. 1659–1665.
6. Leon S., Shapiro B. // Ibid. 1977. 37, N 3. P. 646–650.

7. Ziegler A., Zangemeister-Wittke U., Stahel R. // *Cancer Treat. Rev.* 2002. **22**. P. 255–271.
8. Silva J., Dominguez G., Garcia J. // *Cancer Res.* 1999. **59**. P. 3251–3256.
9. Sidransky D. // *Nature*. 2002. **2**. P. 210–219.
10. Vladimirov V. G., Belokhvostov A. S., Sherlina S. S. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1992. **62**, N 6. P. 667–671.
11. Моляка Ю. К., Бозезану І. В., Потапова Г. І. // *Вестн. РАМН*. 2000. № 7. С. 24–27.
12. Белохвостов А. С., Войтенков Б. О. // *Успехи соврем. биол.* 1983. **95**, № 2. С. 255–271.
13. Шевчук Н. А. // *Вопр. мед. химии*. 2001. № 4. С. 439–448.
14. Козак В. В., Шляховенко В. А., Юхименко М. Д. // *Эксперим. онкология*. 1986. **8**, № 2. С. 54–57.
15. Марченко М. М., Копильчук Г. П., Григор'єва О. В. // *Доп. НАН України*. 2000. № 3. С. 192–195.
16. *Молекулярная клиническая диагностика. Методы* / Под. ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. М.: Мир, 1999. 558 с.
17. Коваленко Г. А., Гальвита А. В. // *Вопр. вирусологии*. 2001. № 2. С. 29–32.
18. Сухова Т. И., Сердюк О. И., Алехина Р. П. // *Мол. биология*. 1996. **30**, вып. 3. С. 552–563.
19. Garcia-Olmo D., Ontanon J., Martinez E. // *Blood*. 2000. **95**, N 2. P. 724–725.
20. De la Taille A., Chen M., Burchardt M. // *Cancer Res.* 1999. **59**. P. 5461–5463.

Отримано 27.11.2003