

**Методические рекомендации по лабораторной диагностике состояния
переутомления и перетренированности спортсменов на основе анализа
количества циркулирующих в крови ДНК**

Москва 2013

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение.....	3
1. Механизм образования циркулирующих в крови ДНК.....	5
2. Методы определения циркулирующих в крови ДНК.....	22
3. Влияние однократной физической нагрузки на уровень циркулирующих в крови ДНК.....	26
4. Влияние длительной физической нагрузки на уровень циркулирующих в крови ДНК.....	30
Заключение.....	31

Введение

Повышенные физические нагрузки у спортсменов нередко приводят к утомлению, состоянию переутомления и перетренированности. Это способствует длительному напряжению функциональных систем организма, накоплению усталости и недовосстановления организма, что рано или поздно влечет за собой развитие перетренированности.

Для выхода из этого состояния требуется уже не несколько дней, а значительно более продолжительный промежуток времени (недели и месяцы). Иммунохимические и биохимические маркеры не обладают достаточной специфичностью и являются более информативными для мониторинга уже наступившего состояния переутомления и перетренированности, чем для ранней диагностики.

Одним из перспективных маркеров, которые могут быть использованы для разработки ранней диагностики и прогнозирования переутомления и перетренированности, являются циркулирующие ДНК крови. Установлено, что небольшие количества ДНК могут обнаруживаться в плазме крови человека. Интерес к циркулирующим в крови ДНК возрос после того, как выяснилось, что количество ее может существенно возрастать после выполнения физических нагрузок различной интенсивности и длительности, что возможно учитывать как ранний признак состояния переутомления и перетренированности.

Это придало совершенно четкое практическое значение дальнейшему изучению циркулирующих нуклеиновых кислот в спорте. Циркулирующая ДНК может появляться в кровотоке в результате гибели ядродержащих клеточных элементов, созревания эритроцитов и тромбоцитов, а также активной секреции нуклеиновых кислот во внеклеточное пространство.

В состоянии покоя содержание циркулирующей ДНК составляет 1,32-18,01 пкг/мкл, в то время как сразу после физической нагрузки ее уровень

достигает $334.4 \pm 139,41$ пкг/мкл. Предполагается, что если в результате длительных нагрузок уровень цДНК не возвращается к исходным значениям в течение суток после последней тренировки (в момент отдыха), тогда у спортсмена наблюдается синдром перетренированности, который сопровождается апоптозом и некрозом клеток.

Таким образом, анализ количества циркулирующих в крови ДНК для лабораторной диагностики состояния переутомления и перетренированности спортсменов может повысить эффективность подготовки и реабилитации спортсменов.

1. Механизм образования циркулирующих в крови ДНК

До определенного времени считалось, что ДНК находится только в клеточных структурах: преимущественно в ядрах клеток и некоторое количество - в митохондриях, где она исполняет роль носителя генетической информации. К настоящему времени уже установлено, что небольшие количества ДНК обнаруживаются и вне клеток, прежде всего в плазме крови животных и человека. Интерес к внеклеточным ДНК неизмеримо возрос после того, как выяснилось, что количество ее может существенно возрастать при ряде заболеваний и предпатологических состояний, что возможно учитывать как ранний признак соответствующих патологий. Это придало совершенно четкое практическое значение дальнейшему изучению циркулирующих нуклеиновых кислот.

Циркулирующая ДНК может появляться в кровотоке в результате гибели ядросодержащих клеточных элементов, созревания эритроцитов и тромбоцитов, а также активной секреции нуклеиновых кислот во внеклеточное пространство. Кроме того, при развитии инфекционных заболеваний в крови пациентов обнаруживаются нуклеиновые кислоты возбудителей. Уровень экзогенной ДНК в кровообращении больных, как правило, не превышает нескольких десятков пкг/мл, что слишком мало по сравнению с приводимыми в литературе данными для нормального содержания внеклеточной ДНК (до 60 нг/мл). При беременности уже на первом месяце в кровотоке матери появляется фетальная ДНК, обнаружение которой открывает новые возможности для неинвазивной пренатальной диагностики.

Одним из известных механизмов появления циркулирующие ДНК в кровотоке может быть процесс образования и созревания постклеточных структур крови - тромбоцитов и эритроцитов. В кровотоке эритроциты функционируют в течение всего периода своей жизни (100-120 суток), а

затем разрушаются макрофагами селезенки, печени и красного костного мозга. В процессе созревания эритроцита, когда клетка находится в составе эритробластного островка или мигрирует через стенку кровеносных сосудов костного мозга в кровоток, происходит выталкивание ядра. За счет ежедневного обновления эритроцитов в составе ядер в кровь попадает значительное количество ДНК, которая в основной массе быстро фагоцитируется макрофагами стромы, но часть ДНК может оставаться циркулировать в кровотоке. Менее представлены в крови тромбоциты - безъядерные постклеточные структуры, образующиеся в результате фрагментации участков цитоплазмы мегакариоцитов. Тромбоциты циркулируют в крови в течение 5-10 суток, после чего фагоцитируются макрофагами, преимущественно в селезенке и легких.

Одним из простых объяснений появления внеклеточных нуклеиновых кислот в крови могут быть постоянно идущие в организме процессы отмирания клеток и деградации их хроматина. Таким образом, в первую очередь источником внеклеточной ДНК крови может быть некроз или апоптоз ядродержащих клеточных элементов крови или эндотелиальных клеток. Апоптоз - наиболее широко представленная форма программируемой клеточной смерти, которая приводит к ежедневной гибели части клеток. Примерный подсчет показывает, что в организме человека в результате апоптоза деградирует 1-10 г ДНК в сутки. Апоптотические клетки и апоптотические тельца поглощаются и перевариваются макрофагами, дендритными или эндотелиальными клетками. Возможно, часть апоптотических телец избегает этой участи и попадает в кровь.

В норме некроз распространен значительно меньше, чем апоптоз. Некроз может индуцироваться тяжелыми необратимыми повреждениями, такими как затянувшаяся ишемия, высокие дозы ионизирующего излучения, высокая температура и обработка агентами, которые повреждают клеточную мембрану или блокируют продукцию энергии в клетке. Некроз

характеризуется конденсацией хроматина, увеличением размера клетки с ее последующим лизисом. Поскольку в норме некротические клетки в основном не обнаруживаются, этот тип клеточной гибели не может обеспечивать появление значительной части ДНК в плазме, хотя он часто наблюдается при развитии опухолей, вероятно, как результат недостаточной васкуляризации.

В то же время некроз не может рассматриваться как основной источник внеклеточной ДНК у онкологических больных, поскольку высокие концентрации циркулирующей в крови ДНК зачастую наблюдаются не только на последней стадии с обширными метастазами, но и на первом этапе развития опухоли. Тем не менее в некоторых случаях, например при травме, некроз может вносить значительный вклад в генерацию циркулирующих ДНК крови. Действительно, обнаружена достоверная корреляция увеличения концентрации циркулирующей в крови ДНК в зависимости от тяжести травмы у пациентов.

Позднее высказано предположение, что появление ДНК в крови онкологических больных может быть связано не только с процессом апоптоза, но и с активной секрецией ДНК. По-видимому, ДНК могут появляться и циркулировать в крови как в результате формирования постклеточных структур крови и гибели клеток, так и путем секреции во внеклеточное пространство. Однако следует отметить, что механизмы, обеспечивающие активную секрецию внеклеточных ДНК, окончательно не выяснены, так же, как и вклад каждого из процессов в появление циркулирующих нуклеиновых кислот во внеклеточной среде.

Предполагается, что короткий срок циркуляции олигонуклеотидов в крови может быть связан не только с разрушающим действием сывороточных нуклеаз, но и с быстрым выведением олигомеров из циркуляции и перераспределением по органам и тканям. Отмечается двухступенчатый характер выведения олигонуклеотидов из кровеносного русла. Первый этап характеризуется высокой скоростью снижения

концентрации в крови олигонуклеотидов со временем полужизни менее 30 минут. Второй этап - это длительная циркуляция в крови олигомера в низкой концентрации, со временем полужизни 20-40 часов. Современные данные о длительности циркуляции внеклеточной ДНК полностью их подтверждают: время полужизни фетальной ДНК в кровотоке родившей женщины составляет 16 минут, а полное ее выведение достигается за 2 часа.

Исследования фармакокинетики олигонуклеотидов показали, что за первые сутки с мочой выводится около 30% введенного материала. Действительно, недавно обнаружены опухолеспецифические нуклеиновые кислоты не только в крови, но и в моче больных с новообразованиями, локализованными вдали от мочевыводящих путей.

После обнаружения циркулирующей ДНК в крови человека и животных были предприняты попытки выявить корреляцию между концентрацией внеклеточной ДНК и развитием ряда патологических состояний. Для определения концентрации внеклеточной ДНК в плазме/сыворотке крови использовали разнообразные методы, в связи с чем данные о концентрации циркулирующей ДНК в норме значительно варьируют. Наиболее достоверными представляются данные последних исследований, в которых концентрацию ДНК определяли при помощи флуоресцентных красителей и количественной ПЦР. Литературные данные позволяют сделать вывод, что в норме концентрация циркулирующей ДНК не должна превышать 50-60 нг/мл плазмы/сыворотки, а увеличение концентрации до 100 нг/мл и выше может указывать на возможное развитие патологии.

Интерес к внеклеточной ДНК плазмы крови в настоящее время все более возрастает, что связано с прогностической и диагностической значимостью этого показателя при лучевом облучении, онкологических, аутоиммунных заболеваниях, неврологических расстройствах и посттравматическом синдроме. При перечисленной патологии существенно

изменяются не только концентрация, но и фракционный состав внеклеточной ДНК: появление в плазме крови ее низкомолекулярных фрагментов зачастую возникает во время развития рака, инсульта, при ишемических процессах.

Доказано появление низкомолекулярной фракции ДНК в плазме крови при лучевой патологии уже через несколько часов после воздействия ионизирующих излучений, причем с прямо пропорциональной зависимостью прироста фракции от дозы воздействия и снижением при улучшении состояния больного. Кроме того, отмечена диагностическая значимость концентрации циркулирующей в крови ДНК при оценке тяжести травмы. Обнаруженная достоверная корреляция уровня внеклеточной ДНК с тяжестью травмы позволяет прогнозировать возможность травматического шока и оценить степень тяжести травмы.

Уровень циркулирующей ДНК в крови возрастает при развитии аутоиммунной патологии, причем концентрация ДНК в плазме больных системной красной волчанкой, находящихся в состоянии ремиссии, не отличается от нормы, а значительное повышение концентрации циркулирующей ДНК отмечено только у пациентов с активной формой заболевания.

Относительно невысоким уровнем свободной ДНК в сыворотке больных характеризуются вирусные заболевания, в частности гепатиты В и С. Поэтому прогностическую значимость может иметь, по-видимому, измерение уровня ДНК в сыворотке крови больных гепатитом лишь в динамике заболевания.

Активно разрабатываются методики исследования циркулирующие ДНК у онкологических больных. Уровень циркулирующей ДНК возрастает также при развитии целого ряда онкологических заболеваний. Некоторые исследователи предлагают использовать концентрацию циркулирующей в крови ДНК для дифференцированного диагноза доброкачественных и злокачественных опухолей желудочно-кишечного происхождения,

утверждая, что при злокачественных опухолях, по сравнению с доброкачественными, концентрация ДНК значительно повышается (412 ± 63 и 118 ± 14 нг/мл соответственно).

Этим данным противоречат работы ряда авторов, в которых показано, что уровень циркулирующей ДНК при развитии патологии по сравнению с нормой достоверно повышается уже на ранних стадиях заболевания, однако четкой корреляции между концентрацией ДНК в плазме крови онкологических больных и клиническим течением заболевания не прослеживается. Корреляции между концентрацией циркулирующей ДНК и локализацией опухоли не найдено, однако при метастазах в крови наблюдается более высокое содержание циркулирующей ДНК.

По-видимому, определение концентрации ДНК в крови может быть использовано для мониторинга эффективности хирургического лечения и/или радио-, химио- или гормонотерапии. При этом наибольший интерес вызывает именно динамика изменения уровня циркулирующих нуклеиновых кислот, а не единичное значение их концентрации в крови. Возрастание концентрации циркулирующих ДНК позволяет сделать заключение о прогрессировании заболевания, в частности о появлении метастазов.

Для повышения диагностической ценности были предприняты попытки связать концентрацию и форму циркуляции ДНК с развитием патологии. Оказалось, что концентрация циркулирующих в крови нуклеосом коррелирует с клиническим статусом пациента после химио- и радиационной терапии. Поскольку большинство лекарств, применяемых в химиотерапии, индуцируют апоптоз в опухолевых и отчасти в нормальных клетках, по содержанию нуклеосом в крови пациентов возможен мониторинг эффективности специфической терапии злокачественных образований.

Исследование распределения циркулирующей ДНК в крови больных раком молочной железы и желудочно-кишечного тракта показало, что при развитии данной патологии на фоне повышения концентрации

циркулирующей ДНК в плазме происходит достоверное снижение концентрации дезоксирибонуклеиновых кислот, связанных с поверхностью форменных элементов крови, по сравнению со здоровыми донорами.

По-видимому, изменение распределения циркулирующей ДНК в крови онкологических больных характерно для злокачественных новообразований, и данные о концентрации циркулирующей ДНК в плазме крови и на поверхности клеток могут быть использованы для дифференциальной диагностики опухолей. При этом очевидно, что для точной постановки диагноза необходим анализ онкоспецифических последовательностей циркулирующих ДНК, а связанные с поверхностью циркулирующие ДНК могут быть использованы наряду с циркулирующей ДНК плазмы для ПЦР-диагностики рака.

Выявлено значительное увеличение концентрации циркулирующие ДНК у недоношенных новорожденных и у новорожденных с перинатальной патологией, описано влияние циркулирующие ДНК на изменения иммунного статуса новорожденных при перинатальных поражениях.

В 1997 году впервые было продемонстрировано присутствие фетальной внеклеточной ДНК в плазме и сыворотке беременных женщин. Данное открытие способствовало интенсивному изучению плодной ДНК в качестве потенциального маркера для неинвазивной пренатальной диагностики. Метод измерения концентрации циркулирующие ДНК плода в крови матери основывался на обнаружении последовательности Y-хромосомы (SRY) методом количественной ПЦР в реальном времени. Была прослежена положительная связь между сроком беременности и уровнем фетальной циркулирующей ДНК. Биологические основы, благодаря которым происходит увеличение концентрации циркулирующие ДНК матери и плода с развитием беременности, остаются неясными. К этому приводит усиление трансплацентарного транспорта нуклеиновых кислот или интенсификация пролиферативных / апоптотических процессов в самой плаценте.

Существует мнение, что повышение концентрации внеклеточной фетальной ДНК в материнской циркуляции происходит вследствие возможной редукции выведения ДНК из организма матери, причиной чего могут быть различные физиологические изменения функций органов выделения женщины в течение беременности. Доказано, что в плазме крови беременных женщин циркулируют более длинные молекулы ДНК, чем в плазме небеременных женщин. При этом молекулы фетальной ДНК в целом короче, чем материнской ДНК, и более фрагментированы.

Предполагается, что фетальная ДНК попадает в кровь матери путем транспорта через плаценту фетальных клеток, которые быстро разрушаются иммунной системой матери и в результате лизиса клеток плаценты и прямого выброса ДНК плода в кровь матери. Фетальная ДНК обнаруживается уже на первых неделях развития плода (у 80% беременных женщин она обнаруживается на 28й день после зачатия). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что фетальная ДНК появляется в крови матери раньше времени формирования системы кровообращения плода. В настоящее время многие работы подтверждают, что источником циркулирующие ДНК плода в материнском кровотоке являются клетки трофобласта.

Роль циркулирующих (внеклеточных) ДНК в развитии патологий

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. 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.

РНК, циркулирующие в крови здоровых людей, являются частью открытой недавно сети некодирующих регуляторных РНК, основная функция которых быть посредниками между ДНК и белками. A. Chajut et al. 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.

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. Предложено использование определения вкДНК плазмы крови как прогностического маркера у пациентов с различными травмами. Отмечено появление вкРНК из миоцитов в результате их повреждения.

Deligezer и соавт. 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. Определение нуклеосом в циркулирующей крови предложено использовать для диагностики, определения стадии и мониторинга лечения рака.

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.

Впервые выделение ДНК из активированных лимфоцитов показано Rogers JC и соавт., 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. Циркулирующие ДНК могут иметь и гемопозитическое происхождение, поступая в кровотоки по завершению дифференцировки эритробластов. 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.

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. Maniesh van der Vaart и Piet J. Pretorius также высказывают сомнение 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 кровотоки.

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. За счет апоптоза объясняется и появление вкРНК в крови. А. I. Scovassia et al. показано, что при апоптозе помимо фрагментации ДНК в ядре происходит реорганизация рибонуклеопротеинового (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. 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.

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. 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.

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. 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.

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.

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. Исследованиями

Fischer S. et al. 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].

Высказано предположение о влиянии вкНК на биомеханику потока крови, 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.

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.

Циркулирующие ДНК и опухолевые процессы

Современные исследования дают цифры содержания цДНК порядка единиц и десятков нг/мл. Так, Власов с соавт. указывают, что содержание в плазме крови здоровых людей циркулирующих свободных молекул ДНК составляет от 1,8 до 35 нг/мл, а Леон с соавт. предлагают считать нормальным диапазоном концентраций цДНК 0–50 нг/мл. Примеры определения уровня цДНК у здоровых людей суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Содержание циркулирующей ДНК в плазме (сыворотке) крови здоровых доноров

Год публикации	Число обследованных	Биологический материал	Содержание цДНК, нг/мл
1977	55	Сыворотка	13±3 референтный диапазон 0–50
1981	58	Плазма	<10 (47 чел.) 10–54 (11 чел.)
1983	–	Сыворотка	14 (среднее)
1987–1989	50	Плазма	Не обнаруживается
1999	17	Плазма	0–45
2007	–	Плазма	1,8–35

Однако надо иметь в виду, что получаемые величины могут сильно отличаться в зависимости от используемых методов выделения и детекции ДНК. Так, просто использование двух разных методов выделения цДНК из одних и тех же образцов плазмы может приводить к результатам, отличающимся в 1,9–5,2 раза.

Низкий уровень циркулирующих нуклеиновых кислот, по логике вещей, должен поддерживаться нуклеазами, однако содержание ДНК–азы I в плазме 3,2–18,4 нг/мл, что кажется недостаточным для эффективного контроля. Видимо, у здоровых людей низкое содержание циркулирующей ДНК может поддерживаться при участии ДНК–азы периферических сосудов.

Начиная с работы Тана с соавт., опубликованной в 1966 г., многие исследователи изучали возможность использования цДНК в качестве биомаркера при самых разнообразных заболеваниях – системной красной волчанке, инфаркте миокарда, преэклампсии, инсульте, синдроме Дауна и

т.д. С 1977 г., после публикации работы, особенно интенсивно развиваются исследования применимости цДНК в лабораторной медицине онкологических заболеваний.

Источники циркулирующей ДНК

Три основных процесса могут приводить к появлению в крови цДНК клеток организма: (1) некроз клеток, например лейкоцитов; (2) апоптоз клеток, в т.ч. опухолевых; (3) высвобождение ДНК из неповрежденных клеток (как нормальных, так и опухолевых). Важно отметить значимость последнего источника цДНК. В свое время было убедительно продемонстрировано, что ни апоптозом, ни некрозом нельзя полностью объяснить присутствие ДНК в плазме крови. По-видимому, лишь незначительные или следовые количества цДНК могут иметь происхождение из некротизированных клеток. В то же время существенная часть цДНК представлена двухцепочечными молекулами длиной от 180 до 1000 пар нуклеотидов (пн), что весьма характерно для фрагментов, образующихся в процессе развития апоптоза клеток.

С другой стороны, достаточно давно известно, что в культуре как нормальные, так и трансформированные клетки способны выделять и ДНК, и РНК в окружающую среду. Интересно, что преимущественно вовне выделяются только что синтезированные молекулы нуклеиновых кислот, причем часть из них секретруется в виде нуклеопротеинов или в форме гетеродуплексов ДНК–РНК. В сыворотке крови человека по крайней мере часть молекул цДНК присутствует также в форме аналогичных нуклеопротеинов или комплексов с РНК. В настоящее время происхождение части цДНК в плазме (сыворотке) крови человека путем высвобождения из живых клеток не вызывает сомнения.

Опухолевая ДНК в плазме (сыворотке) крови

Содержание цДНК в плазме (сыворотке) крови пациентов, страдающих от онкологических заболеваний, подвержена очень высокой вариабельности.

В разных исследованиях была обнаружена неодинаковая распространенность повышенных уровней цДНК у пациентов с раковыми заболеваниями: 27%, 50%, 66%. При этом при одних формах рака содержание цДНК обычно было выше, чем у здоровых доноров, при других, например раке легких, обычно укладывалось в пределы нормы.

Проведение курса радиотерапии приводило к значительному снижению содержания цДНК у 66–90% пациентов с лимфомами, раком легких, яичников, матки и цервикальными опухолями и лишь у 16–33% пациентов с глиомой, колоректальными опухолями или раком молочной железы. Таким образом, кажется, что определение цДНК может быть хорошим маркером онкологических заболеваний. Однако при этом важно помнить, что повышение уровня цДНК не является специфичным именно для рака, а может наблюдаться и при ряде иных заболеваний человека.

Как же выяснить, является ли присутствующая в плазме (сыворотке) крови цДНК опухолевой? Принципиально можно предложить четыре основных подхода: (1) выявление ДНК со сниженной стабильностью цепей, характерной для опухолевой ДНК; (2) обнаружение маркеров специфических онкогенов; (3) обнаружение специфических мутаций опухолевых супрессоров в цДНК; (4) выявление специфических микросателлитных маркеров.

Оценка нестабильности цепей была первым методом, позволившим обнаружить в плазме крови цДНК специфически опухолевого происхождения, однако эти исследования были выполнены на ограниченной группе пациентов (37 человек). Этот метод, сыгравший такую важную роль на начальном этапе исследований, сейчас представляет небольшой интерес, поскольку снижение стабильности молекул цДНК не является признаком, абсолютным только для опухолевых заболеваний. Аналогично неспецифичной оказалась и повышенная устойчивость опухолевой ДНК к некоторым видам ДНК-аз.

Онкогены представляют собой гены, белковые продукты которых могут приводить к опухолевой трансформации клеток сами по себе или в комбинации с другими факторами. Известно несколько десятков онкогенов, которые обычно ассоциированы с определенными формами опухолей. Так, специфические точечные мутации в генах семейства *ras* были выявлены в цДНК от пациентов с гематопозитическими опухолями, колоректальным раком и раком поджелудочной железы, причем в некоторых случаях еще до появления клинических признаков заболевания.

Опухолевые супрессоры в норме кодируют белки, предотвращающие неконтролируемую пролиферацию клеток или вызывающие апоптоз в клетках с сильно поврежденным геномом. Инактивация этих механизмов в результате мутаций в генах опухолевых супрессоров ведет к автономной пролиферации как основному компоненту опухолевой трансформации и к увеличению генетической гетерогенности как необходимому условию последующей прогрессии опухоли. Чаще всего мутации затрагивают такой ген опухолевого супрессора, как *p53*.

Микросателлиты в эукариотическом геноме представляют собой множественные (часто – более сотни) повторы очень коротких (из 2–6 нуклеотидов) участков последовательности ДНК. Микросателлиты более или менее случайно разбросаны по геному, проявляют заметную нестабильность и могут легко мутировать, изменяя число своих повторов в геноме. Определенные формы микросателлитной нестабильности, – например утрата генетической гетерозиготности (Loss of Heterozygosity – LOH), т.е. утрата участка хромосомы, несущей соответствующий аллель, или, наоборот, по

2. Методы определения циркулирующих в крови ДНК

Циркулирующие ДНК в первую очередь необходимо выделить из свежих образцов крови, не допуская процессов разрушения лейкоцитов сразу после забора биоматериала. Цельная венозная кровь сначала центрифугируется и выделяется плазма. Циркулирующие ДНК обычно выделяют из плазмы с помощью коммерческих наборов.

Для определения концентрации циркулирующей ДНК применяют ПЦР в реальном времени. Метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ; Real Time PCR) представляет собой проведение полимеразной цепной реакции с регистрацией накопления ДНК в ходе реакции. Данный метод занимает лидирующие позиции среди методов, используемых в научно-исследовательских и диагностических лабораториях. Регистрация накопления продуктов ПЦР в ходе реакции позволяет избежать отдельной стадии определения результатов, исключить контаминацию. Для регистрации накопления ДНК применяют детектирующие амплификаторы – термоциклеры, оборудованные флуоресцентным детектором, позволяющим детектировать репортерную флуоресценцию в реакционных пробирках. Результатом работы прибора является информация о зависимости уровня репортерной флуоресценции от цикла амплификации. В качестве флуоресцентных меток можно использовать интеркалирующие флуоресцентные агенты, меченые флуоресцентными агентами праймеры, меченые флуоресцентными агентами олигонуклеотиды и различные комбинации этих методов.

Разновидности флуоресцентных меток для ПЦР-РВ. Интеркалирующие флуоресцентные агенты связываются с двухцепочечной ДНК, в результате чего значительно возрастает уровень флуоресценции. Наиболее часто используемым красителем данного типа является SYBR Green. Недостатком интеркалирующих красителей является их неспецифичность. Меченые

олигонуклеотидные пробы используют в технологиях TaqMan, Molecular Beacons и LightCycler.

TaqMan ПЦР основан на использовании 5'-эксонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-пробы, меченные на 5'-конце флуоресцентным красителем, а на 3'-конце – фосфатной группой и гасителем флуоресценции. Пробы комплементарны участку амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу. При отжиге праймеров проба количественно связывается с комплементарным участком ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибридного с пробой, начинает расщеплять пробу за счет 5'-эксонуклеазной активности. В результате флуоресцентная метка отделяется от гасителя, и ее свечение может быть детектировано. Таким образом, увеличение флуоресценции будет прямо пропорционально количеству наработанного ПЦР-продукта.

Molecular Beacons отличается от TaqMan тем, что концы пробы (на которых находятся соответственно метка и тушитель флуоресценции) комплементарны друг другу. В результате, при температуре отжига праймеров они образуют шпильку, с петлей комплементарной матрицы. При гибридизации пробы с матрицей вторичная структура разрушается, флуоресцентная метка и тушитель расходятся в разные стороны, и флуоресценция от метки может быть детектирована.

В методике Light Cycler используется две пробы, меченные флуоресцентной меткой. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3'-конце первой пробы, ко второму флуорофору, находящемуся на 5'-конце второй пробы, который происходит в том случае, когда расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида, то есть при специфичной гибридизации проб на матрице. В

связи с высокой трудоемкостью отладки методов с использованием меченых праймеров и олигонуклеотидов, для исследовательской деятельности наиболее целесообразным является использование метода с интеркалирующим красителем.

Аллель-специфичная ПЦР-РВ. Принцип аллель-специфичной ПЦР-РВ заключается в том, что Taq-полимераза с различной эффективностью достраивает полностью и частично комплементарную матрицу последовательность. Для идентификации аллелей проводят ПЦР с праймерами, каждый из которых полностью совпадает только с одним из вариантов последовательности. Вариабельный нуклеотид располагают в 3'-концевой части аллель-специфичного праймера. Таким образом, если анализируемый образец содержит только один вариант последовательности (то есть гомозиготен по данному полиморфизму), продукт, синтезируемый с полностью комплементарного матрицы праймера, образуется в ПЦР существенно раньше, нежели продукт с частично некомплементарного праймера. Если же анализируют гетерозиготный образец, и тот, и другой праймер сработает примерно одинаково.

Для большинства вариантов метода принципиальным является использование в ПЦР ферментов, лишенных 3'-экзонуклеарной активности. Разница в количестве продукта с каждого из аллель-специфичных праймеров определяется на первых циклах реакции, поскольку различие вносит лишь отжиг праймеров на исходную молекулу ДНК. Накопление уже образовавшихся ПЦР-фрагментов для каждой пары аллель-специфичных праймеров идет с равной скоростью, так как продукт уже полностью комплементарен праймерам.

Процедура проведения ПЦР в реальном времени. Примерный состав оборудования и расходных материалов для проведения ПЦР в реальном времени: Детектирующий термоциклер ДТ-96 («ДНК-технология», Россия), стрипы для ПЦР-РВ PCR-0208-C («AXYGEN SCIENTIFIC», США), «Набор

реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I и пассивного референсного красителя ROX» («Синтол», Россия), ДНК-маркеры для полиакриамидного и агарозного гелеэлектрофореза «O`GeneRuler» («Fermentas», Канада), праймеры.

В пре-ПЦР боксе в соответствии с рекомендациями производителя готовят две реакционных смеси для ПЦР-РВ: с праймером 1 и комплементарным; с праймером 2 и комплементарным. Смеси раскапывают по 18,5 мкл в оптически прозрачные стрипы для ПЦР-РВ по два дубля на каждый аллель. Для предотвращения испарения рабочей смеси, в каждую лунку добавляют по 10 мкл масла для ПЦР. В ПЦР-лаборатории в лунки стрипов раскапывают по 6,5 мкл препарата ДНК. Четыре лунки из 96 используют в качестве отрицательного контроля – вместо образца ДНК в них добавляют 6,5 мкл деионизованной H₂O. Стрипы устанавливают в детектирующий термоциклер, где происходит амплификация по соответствующей программе. После амплификации проводят анализ кривых плавления.

3. Влияние однократной физической нагрузки на уровень циркулирующих в крови ДНК

Имеется незначительное число работ, в которых оценивалась концентрация цДНК до и сразу после однократной физической нагрузки. На рис. 1 отражены результаты этих работ. Ниже дано их описание.

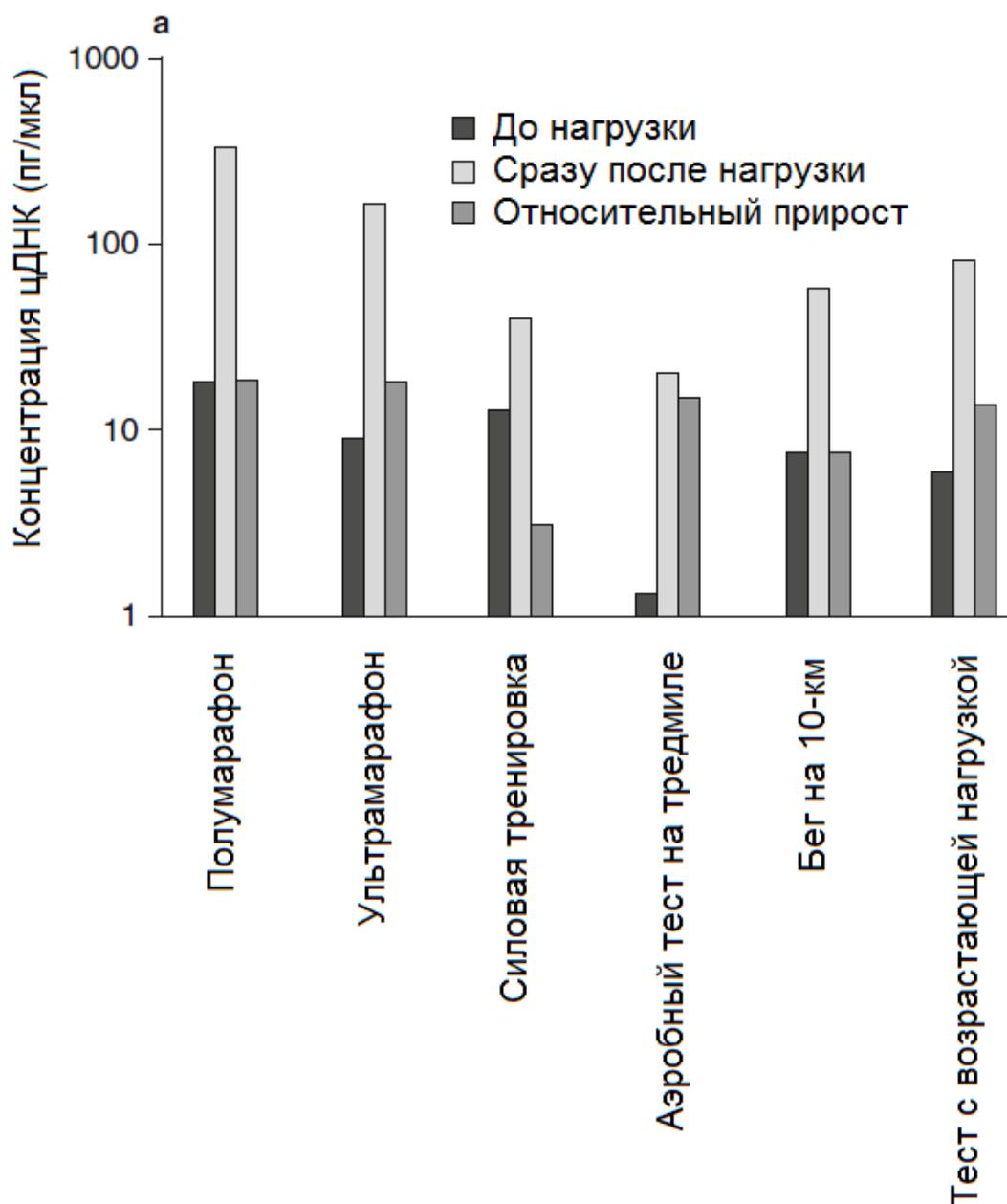


Рис. 1. Средние значения концентрации циркулирующей ДНК при выполнении однократных физических нагрузок разной интенсивности и длительности.

Если содержание циркулирующей ДНК в покое составляет 1,32-18,01 пкг/мкл, то сразу после аэробной физической нагрузки (двухчасовой полумарафон) ее уровень может достичь $334,4 \pm 139,41$ пкг/мкл. При этом через 2 часа после финиша уровень цДНК падает до $30,44 \pm 18,99$ пкг/мкл (Atamaniuk et al. 2004).

В другой работе Atamaniuk и соавторы (2008) определяли уровень циркулирующей ДНК у 14 спортсменов, которые пробежали в течение 6 часов ультрамарафонскую дистанцию. Сразу после нагрузки уровень циркулирующей ДНК у них достиг $162,5 \pm 201,4$ пкг/мкл (17-кратное увеличение). Несмотря на то, что концентрация цДНК снизилась через 2 часа после нагрузки, тем не менее, она оставалась на более высоком уровне, чем в покое ($30.9 - 171.4$ пкг/мкл). Окончательное снижение концентрации цДНК до уровня покоя произошло лишь через 24 часа после нагрузки ($9.0 - 5.6$ пкг/мкл).

Atamaniuk и соавт. (2008) предположили, что повышение концентрации цДНК в этих двух исследованиях было вызвано повреждением на тканевом, клеточном и молекулярном уровне, связанным с окислительным стрессом после длительной аэробной нагрузки. Это было подтверждено повышением уровня миоглобина и мочевой кислоты через 2 часа после нагрузки (Atamaniuk et al. 2004). Механизмом образования цДНК явился апоптоз лейкоцитов, что подтвердилось увеличением экспрессии генов про- и антиапоптотических генов и белков теплового шока (Atamaniuk et al. 2008).

Таким образом, анализ цДНК можно применять для определения наличия и степени клеточного повреждения, вызванного физической нагрузкой.

В 2010 г. Atamaniuk и соавт. оценили влияние однократной силовой тренировки на уровень цДНК у 12 здоровых профессиональных штангистов. До тренировки уровень цДНК составил 12.95 ± 4.42 пкг/мкл; сразу после нагрузки он возрос до 40.77 ± 31.94 пкг/мкл, а на 2 час восстановления достиг

исходного уровня (11.38 ± 4.18 пкг/мкл). При этом уровень цДНК положительно коррелировал с концентрацией гипоксантина – маркера окислительного стресса.

В работе Fatouros и соавт. (2010) определяли уровень цДНК до и после аэробной нагрузки на тредмилле у 11 тренированных мужчин. До нагрузки уровень цДНК составил 1.66 пкг/мкл, сразу после нагрузки - 20.13 пкг/мкл. Через час после нагрузки уровень цДНК снизился почти до исходных значений. Это говорит о том, что циркулирующие ДНК обладают укороченным периодом полураспада. В среднем этот период составляет 16,3 минуты (Lo et al. 1999). На основании данных по кинетике других биомаркеров повреждения (креатинкиназа, С реактивный протеин, мочевиная кислота), которые к 24 часу после нагрузки продолжали повышаться, Fatouros и соавт. (2010) предположили, что механизмы образования цДНК и маркеров повреждения разобщены и независимы друг от друга.

Beiter и соавт. (2011) провели анализ концентрации цДНК у 53 спортсменов, которые пробежали 10 км с интервалами по 1 км. Уровень цДНК повысился с 7.53 пкг/мкл до 56.95 пкг/мкл. Вместе с тем, в группе бегунов были обнаружены значительные индивидуальные различия в концентрации цДНК. Интересно отметить, что уровень цДНК не коррелировал с полом, возрастом и индексом массы тела спортсменов.

В другой работе, результаты которой были опубликованы в той же статье, Beiter и соавт. (2011) провели тест с постепенно возрастающей нагрузкой на тредмилле (11 мужчин и 1 женщина, все спортсмены-бегуны). В среднем испытуемые выполняли нагрузку в течение 19,3 мин. Исходный уровень цДНК в среднем в группе составил 6.02 пкг/мкл, а сразу после нагрузки - 82.66 пкг/мкл. Через 30 минут после нагрузки уровень цДНК все еще был на высоком уровне (24.75 пкг/мкл). Анализ митохондриальной и геномной ДНК выявил, что весь пул цДНК был ядерного происхождения. При этом значительный прирост цДНК начался с 15 минуты после начала

теста и достиг максимума с 20 минуты после начала теста и до 10 минуты восстановления. Авторы предположили, что в основе появления в крови цДНК лежит следующий механизм. Дефицит кислорода и высокий уровень лактата вызывают повышение уровня реактивных форм кислорода, что инициирует выход ДНК из нейтрофилов.

Таким образом, одним из перспективных маркеров, которые могут быть использованы для разработки ранней диагностики и прогнозирования переутомления и перетренированности, являются циркулирующие ДНК крови.

4. Влияние длительной физической нагрузки на уровень циркулирующих в крови ДНК

Первым влияние длительной физической нагрузки (12 недель) на уровень циркулирующих в крови ДНК оценил Fatougos и соавторы (2006). Величина и продолжительность нагрузки были такими, что в конце эксперимента ими был зафиксирован синдром перетренированности у испытуемых. Его установили путем определения стандартных маркеров синдрома перетренированности и мышечного повреждения (С-реактивный протеин, креатинкиназа, мочевиная кислота) в конце 9 недели и определения падения мощности нагрузки в конце 12 недели. Уровень цДНК определяли в самом начале эксперимента в покое, а также через 96 часов после завершения 3-недельного этапа эксперимента.

Концентрация циркулирующих в крови ДНК в покое у испытуемых составила $1,66 \pm 0,73$ пкг/мкл, в конце 1-го этапа (3 неделя) $7,58 \pm 1,21$ пкг/мкл; в конце 2-го этапа (6 неделя) – $15,31 \pm 2,17$ пкг/мкл; в конце 3-го этапа (9 неделя) $31,98 \pm 6,15$ пкг/мкл; и в конце 4-го этапа (12 неделя) – $3,95 \pm 1,56$ пкг/мкл. Соответственно, концентрация маркеров синдрома перетренированности и мышечного повреждения (С-реактивный протеин, креатинкиназа, мочевиная кислота) в наибольшей степени повысилась в конце 3-го периода. Авторы предположили, что если в результате длительных нагрузок уровень цДНК не возвращается к исходным значениям в течение суток после последней тренировки (в момент отдыха), тогда у спортсмена наблюдается синдром перетренированности, который сопровождается апоптозом и некрозом клеток.

Таким образом, циркулирующие в крови ДНК были обозначены как маркеры воспаления и синдрома перетренированности.

Заключение

Повышенные физические нагрузки у спортсменов нередко приводят к утомлению, состоянию переутомления и перетренированности. Это способствует длительному напряжению функциональных систем организма, накоплению усталости и недовосстановления организма, что рано или поздно влечет за собой развитие перетренированности. Для выхода из этого состояния требуется уже не несколько дней, а значительно более продолжительный промежуток времени (недели и месяцы). Иммунохимические и биохимические маркеры не обладают достаточной специфичностью и являются более информативными для мониторинга уже наступившего состояния переутомления и перетренированности, чем для ранней диагностики. Одним из перспективных маркеров, которые могут быть использованы для разработки ранней диагностики и прогнозирования переутомления и перетренированности, являются циркулирующие ДНК крови. Интерес к циркулирующим в крови ДНК возрос после того, как выяснилось, что количество ее может существенно возрасти после выполнения физических нагрузок различной интенсивности и длительности, что возможно учитывать как ранний признак состояния переутомления и перетренированности. В состоянии покоя содержание циркулирующей ДНК составляет 1,32-18,01 пкг/мкл, в то время как сразу после физической нагрузки ее уровень достигает $334.4 \pm 139,41$ пкг/мкл. Предполагается, что если в результате длительных нагрузок уровень цДНК не возвращается к исходным значениям в течение суток после последней тренировки (в момент отдыха), тогда у спортсмена наблюдается синдром перетренированности, который сопровождается апоптозом и некрозом клеток. Таким образом, анализ количества циркулирующих в крови ДНК для лабораторной диагностики состояния переутомления и перетренированности спортсменов может повысить эффективность подготовки и реабилитации спортсменов.