

Г.М. Минкабирова, С.А. Абдуллаев**УВЕЛИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В МОЧЕ КРЫС ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ ИЛИ ВВЕДЕНИЯ БЛЕОМИЦИНА**

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия. E-mail: saabdullaev@gmail.com

Г.М. Минкабирова – м.н.с.; С.А. Абдуллаев – н.с., к.б.н

Реферат

Цель: Исследование содержания внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) и внеклеточной ядерной ДНК (вк-ядДНК) в моче крыс, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения или цитостатического препарата блеомицина.

Материал и методы: В экспериментах использовались самцы крыс линии Wistar 3-месячного возраста с массой тела 250 г. Облучение крыс проводили на рентгеновской установке в дозах 3, 5 и 8 Гр. Блеомицин вводили внутривентрально в концентрациях 3, 7, и 10 мг/кг. Анализы содержания вк-мтДНК и вк-ядДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени.

Результаты: Результаты анализов показали увеличение уровня количества фрагментов вк-ядДНК и вк-мтДНК в моче крыс после их облучения. Показано, что содержание вк-ядДНК и вк-мтДНК в моче имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения. Так, максимальное количество копий мтДНК и яДНК регистрировалось на 12–24-е часы после воздействия. Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК в 2–3 раза выше по сравнению с вк-ядДНК. Данные анализов содержания вк-ядДНК и вк-мтДНК в моче у крыс после введения блеомицина также показали повышенные их уровни по сравнению с контрольными животными. Показано, что содержание вк-ядДНК и вк-мтДНК имеет линейную зависимость от дозы химиотерапевтического препарата.

Выводы: Таким образом, показана возможность преодоления у животных вк-мтДНК и вк-ядДНК трансрэнального (почечного) барьера и перехода их в мочу после рентгеновского облучения, а также после введения блеомицина. Обнаружена дозовая зависимость выявленных эффектов.

Повышенное содержание внеклеточной ДНК в моче можно рассматривать как потенциальный биомаркер для оценки уровня генотоксического груза при радиационном поражении организма, а также при воздействии других генотоксических агентов.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК в моче, рентгеновское облучение, блеомицин, крысы

Поступила: 14.08.2018. Принята к публикации: 10.07.2019

Введение

Исследования по выявлению молекулярных биомаркеров в биологических жидкостях для неинвазивной диагностики различных патологий являются актуальными. Количественные и структурные изменения циркулирующей внеклеточной ДНК (вк-ДНК) в плазме/сыворотке можно рассматривать в качестве прогностического и диагностического биомаркера при различных патологиях человека [1]. Исследования циркулирующей в биологических жидкостях вк-ДНК как потенциального биомаркера для оценки лучевой реакции животных и человека также остаются достаточно актуальными. Так, в ряде исследований было показано, что в плазме/сыворотке грызунов, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения, обнаруживаются повышенные уровни циркулирующих внеклеточных митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) и ядерной ДНК (вк-ядДНК) [2, 3]. В процессе проведения химиолучевой терапии опухолей выявлено повышение содержания циркулирующих вк-мтДНК и вк-ядДНК в плазме/сыворотке пациентов [4, 5].

Благодаря уникальной характеристике мтДНК, ее повышенной чувствительности к стрессовым воздействиям, эта нуклеиновая кислота представляется более привлекательным биомаркером для оценки лучевой реакции организма. Так, ранее было показано, что в плазме крови облученных мышей и у больных раком легких после завершения лучевой терапии содержание циркулирующей вк-мтДНК значительно выше относительно содержания вк-ядДНК. При этом часть фрагментов вк-мтДНК, регистрируемых в плазме облученных мышей и в плазме пациентов, содержат мутации

[4, 6, 7]. Повышенное поступление циркулирующей вк-ДНК из клеток тканей в кровотоки облученных животных свидетельствует о радиационно-индуцированном усилении клеточной гибели [6, 7]. Известен также ряд фармакологических препаратов, вызывающих клеточную гибель путем повреждения и модификации ДНК. Некоторые из них используются при химиотерапии злокачественных опухолей [8, 9]. Циркулирующие фрагменты вк-мтДНК и вк-ядДНК, поступающие в кровоток у животных, возможно, подвергаются нуклеазной деградацией, но определенная ее часть, защищенная от действия нуклеаз, может оказаться в моче как трансрэнальная ДНК [10].

Моча является традиционно широко используемым материалом, который содержит огромное разнообразие продуктов метаболизма, чрезвычайно удобным для поиска специфических биомаркеров для диагностики различных патологий [11]. Исследования вк-мтДНК и вк-ядДНК в моче для прогностической и диагностической оценки патологии имеют очевидные преимущества относительно исследований с использованием плазмы/сыворотки крови [10, 12]. В настоящее время качественные и количественные изменения яДНК в моче регистрируются у онкологических больных. Так, недавно, появилось сообщение об обнаружении измененной мтДНК в моче пациентов с уротелиальной карциномой [13]. ДНК в моче беременных женщин позволяет определять пол ребенка и диагностировать наличие патологии [14]. Результаты недавнего нашего исследования показали, что в моче у облученных в дозах 3 и 5 Гр крыс наблюдается резкое пострадиационное увеличение количества копий вк-ядДНК и вк-мтДНК [15].

Поэтому настоящее исследование посвящено изучению пострадиационного изменения содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс как облученных в широком диапазоне доз, так и после введения животным клинически применяемых доз блеомицина, химиотерапевтического препарата ДНК-тропного воздействия.

Материал и методы

В работе использовались самцы крыс линии Wistar 3-месячного возраста с массой тела 250 г, полученные из питомника филиала Института биоорганической химии РАН (г. Пушкино). В процессе эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Сбор мочи проводили у крыс, размещенных индивидуально в метаболические клетки (Hatteras Instruments, Cary, NC), снабженных стеклянными контейнерами. На дно контейнера вносили небольшое количество раствора 0,1 моль/л ЭДТА-Na₂. Во всех случаях сбор мочи проводили в вечернее время, начиная с 18.00 ч, при комнатной температуре (22 ± 2 °C) в течение 5,5–6,0 ч до 5,0 мл объема жидкости в контейнере. Мочу отбирали у крыс перед облучением (контрольный сбор мочи) и через 6, 12, 24, 72 ч после облучения.

Облучение животных проводили в центре коллективного пользования – Группе источников излучений Института биофизики клетки РАН на терапевтической рентгеновской установке РТУ-12 (280 кВ, 20 мА), с фильтрами 1 мм Al и Cu при мощности дозы 1 Гр/мин. Другой экспериментальной группе животных вводили внутривенно препарат блеомицин. Сбор мочи осуществляли перед введением блеомицина (контрольный сбор мочи) и через 6, 12, 24, 72, 240 ч после их обработки. Образцы мочи подвергали центрифугированию (3000×g, 10 мин) и затем замораживали при –20 °C до выделения ДНК. Облучение крыс проводили при дозах 3, 5 и 8 Гр. Введение препарата блеомицина проводили в дозах 3, 7 и 10 мг/кг.

ДНК из образцов мочи экстрагировали на микроколонках компании Promega Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (США) согласно инструкциям производителя. Количественное содержание общей ДНК определяли по реакции с Pico Green согласно протоколу производителя (Molecular Probes, Eugene, OR) и последующей регистрацией флуоресценции на приборе Tecan Infinite-200 (Австрия). Анализ содержания яДНК и мтДНК был проведен количественным методом ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan на приборе Prism 7500 (Applied Biosystems, США). Эффективность реакции ПЦР для амплификации яДНК и мтДНК измеряли с использованием стандартных кривых, используя серии разведений с 20, 10, 5, 2, 1, и 0,1 нг общей ДНК печени крыс на реакцию.

В качестве основы для количественного анализа числа копий яДНК и мтДНК использовали пороговое значение цикла (Ct). Анализ ПЦР проводили в трех повторностях для каждого образца ДНК. Для амплификации гена тРНК (73 п. о.) мтДНК использо-

вали следующие праймеры: forward 5'- AAT GGT TCG TTT GTT CAA CGA TT-3'; reverse 5'- AGA AAC CGA CCT GGA TTG CTC-3'; зонд – R6G-AAG TCC TAC GTG ATC TGA GTT-RHQ1. Для амплификации гена GAPDH (80 п. н.) яДНК были использованы следующие праймеры: forward 5'- TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C-3'; reverse 5'-GGC TCT CTC CTT GCT CTC AGT ATC -3'; зонд – FAM-CTG GAC CAC CCA GCC CAG CAA-RTQ1. Праймеры и зонды для мтДНК и яДНК были выбраны с использованием базы данных BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по последовательностям, не допускающим коампликации NUMT-псевдогенов в яДНК [16].

Циклы ПЦР были следующими: 5 мин при 95 °C с последующими 40 циклами (95 °C в течение 30 с, отжиг и удлинение при 60 °C в течение 1 мин). Для каждого варианта эксперимента данные представлены в виде средней величины (для 8 животных) и стандартной погрешности среднего значения ($\pm$ SEM). Статистические различия между показателями, выявленными у интактных животных и в различные сроки после их облучения и введения блеомицина, оценивали с использованием t-теста Стьюдента по стандартной программе GraphPad Prism (версия 5.0). Различия считали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты анализов изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче крыс, собранных до и после их облучения (в дозах 3, 5 и 8 Гр) в разные сроки пострадиационного времени (от 6 до 72 ч) представлены на рис. 1. Эти результаты показывают, что уровни вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс существенно изменяются в зависимости от дозы облучения и пострадиационного времени. Видно, что содержание вк-мтДНК и вк-яДНК в моче после облучения статистически значимо возрастает, достигая максимума на 12–24-е часы пострадиационного времени. При этом одинаковая зависимость изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче в пострадиационный период характерна при облучении крыс во всех исследуемых дозах (рис. 1а–б). В последующие же сроки после облучения (72 ч) наблюдалось значительное понижение количества копий как вк-мтДНК, так и вк-яДНК в моче этих крыс. Зависимости количества вк-мтДНК и вк-яДНК от дозы облучения крыс описывались линейными функциями (рис. 1в).

На рис. 2 показаны результаты количественного анализа содержания внеклеточной яДНК и мтДНК в образцах мочи в разные сроки и дозы после внутрибрюшинного введения крысам блеомицина. Результаты данных исследований показывают, что после внутрибрюшинного введения крысам блеомицина также происходит увеличение содержания фрагментов внеклеточной мтДНК и яДНК, однако менее выраженное по сравнению с экспериментами по облучению крыс. Видно, что статистически значимое повышение содержания вк-ДНК в моче крыс происходит по мере нарастания дозы введенного блеомицина. Так, максимальное количество копий мтДНК и

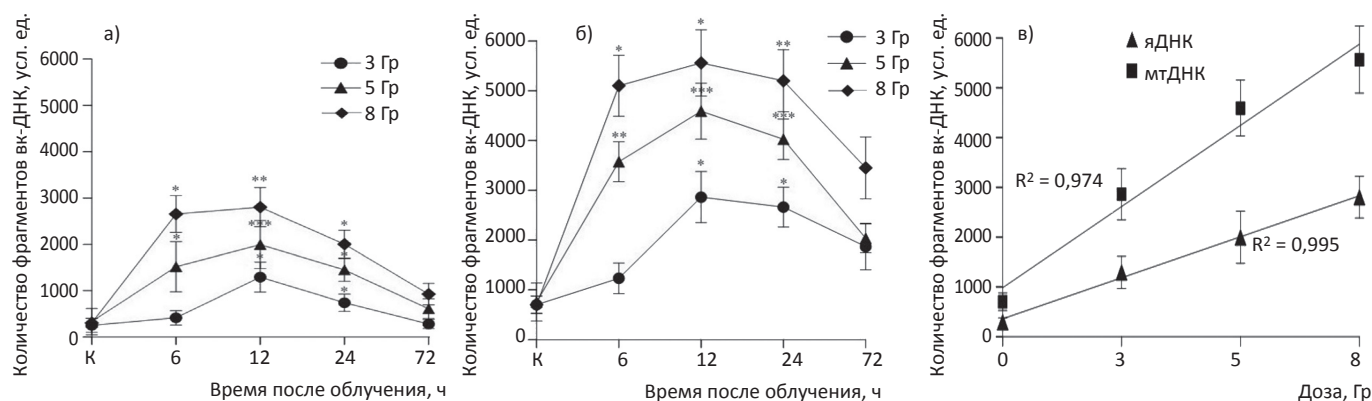


Рис. 1. Содержание фрагментов внеклеточной ДНК в моче крыс до и после воздействия рентгеновского излучения в дозах 3, 5 и 8 Гр. (а) – содержание фрагментов вк-яДНК; (б) – содержание фрагментов вк-мтДНК; (в) – содержание фрагментов вк-ДНК в зависимости от дозы облучения (12 ч); К – контроль (до облучения). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM ($n = 8$). Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,05$ считалось статистически значимым различием

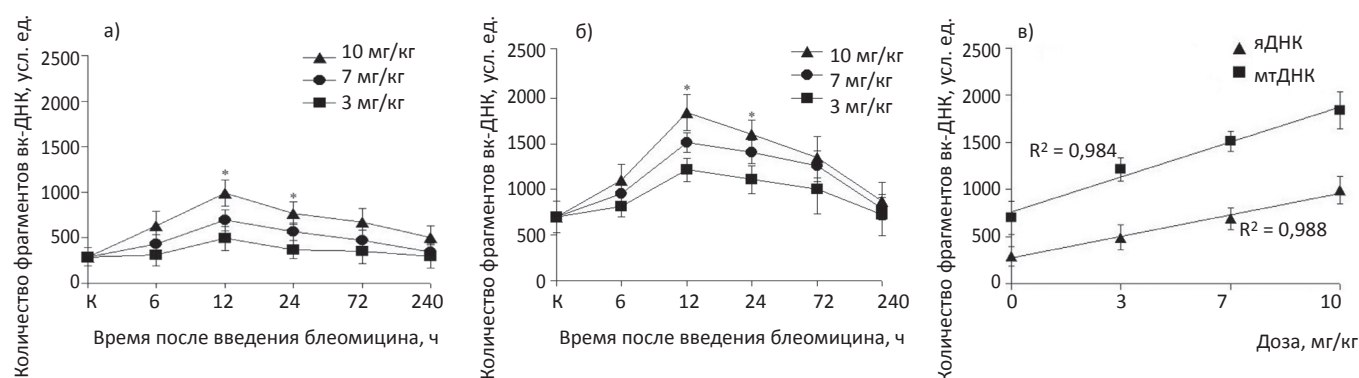


Рис. 2. Содержание фрагментов внеклеточной ДНК в моче крыс до и после введения блеомицина в дозах 3, 7 и 10 мг/кг. (а) – содержание фрагментов вк-яДНК; (б) – содержание фрагментов вк-мтДНК; (в) – содержание фрагментов вк-ДНК в зависимости от дозы введения блеомицина (12 ч); К – контроль (до введения препарата). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM ($n = 8$), $p < 0,05$ (*) считалось статистически значимым

яДНК регистрировалось на 12–24-е часы после введения препарата. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс имеет линейную зависимость от дозы блеомицина (рис. 2в). Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК выше по сравнению таковым вк-яДНК. Можно предполагать, этот результат обусловлен тем, что циркулирующая вк-мтДНК по сравнению с вк-яДНК больше подвержена деградации как в кровотоке, так и после преодоления почечного барьера. Установлено, что циркулирующая вк-яДНК в плазме/сыворотке находится в составе нуклеосом, и, очевидно, больше защищена от нуклеазной деградации, в отличие от вк-мтДНК [17].

Тем не менее, более повышенный уровень вк-мтДНК, по сравнению с вк-яДНК, сохраняется в моче крыс в течение довольно продолжительного пострадиационного времени, а также в группе животных после введения блеомицина. Поэтому увеличение количественного содержания вк-мтДНК в моче крыс после их обработки можно рассматривать как более чувствительный потенциальный биомаркер, характеризующий активацию клеточной гибели в тканях этих животных.

Повышенный уровень вк-мтДНК по сравнению с вк-яДНК в моче крыс, наблюдаемый после облуче-

ния и введения блеомицина, возможно, обусловлен не только активацией апоптоза клеток [17, 18], но и митофагией – селективным удалением поврежденных митохондрий, сопряженным с аутофагией [19, 20].

Закключение

Результаты проведенного исследования показывают, что количественные изменения вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс характеризуются линейной зависимостью от дозы рентгеновского облучения, а также от дозы химиотерапевтического препарата блеомицина. Данные исследования содержания циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот в моче открывают новые возможности рассматривать их как потенциальные биомаркеры для неинвазивной оценки развития лучевой реакции организма и генотоксического действия средств химиотерапии опухолей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00832.

Для цитирования: Минкабиров Г.М., Абдуллаев С.А. Увеличение содержания внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК в моче крыс после рентгеновского облучения или введения блеомицина // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 5. С. 5–8.

DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-5-5-8

Increase of Cell-Free Nuclear and Mitochondrial DNA Content in the Urine of Rats after X-ray Irradiation or Bleomycin Administration

G.M. Minkabirova, S.A. Abdullaev

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia. E-mail: saabdullaev@gmail.com

G.M. Minkabirova – Junior Researcher; S.A. Abdullaev – Research Fellow, PhD Biol.

Abstract

Purpose: To study the content of cell-free mitochondrial DNA (cf-mtDNA) and cell-free nuclear DNA (cf-nDNA) in urine of rats exposed to ionizing radiation, and after injection of a cytostatic drug bleomycin.

Material and methods: Wistar male rats aged 3 months were used in the experiments. Rats were irradiated at a doses of 3, 5, and 8 Gy. Bleomycin was administered intraperitoneally in concentrations of 3, 7, and 10 mg/kg. The DNA content was measured by real-time PCR.

Results: The results showed an increase in the level of the number of cf-nDNA and cf-mtDNA fragments in urine of irradiated rats. It was shown that the content of cf-nDNA and cf-mtDNA has a linear dependence on the X-ray dose. Thus, the maximum number of mtDNA and nDNA copies was recorded for 12–24th hours after irradiation. The number of PCR amplification products of cf-mtDNA is 2–3 times higher than those of cf-nDNA. Data analysis of the content of cf-nDNA and cf-mtDNA in rat urine after introduction of bleomycin also showed elevated levels compared with control animals. It was shown that the content of cf-nDNA and cf-mtDNA has a linear dependence on the dose of the chemotherapeutic drug.

Conclusion: Thus, it has been shown that it is possible to overcome the transrenal (renal) barrier in animals with cf-mtDNA and cf-nDNA and pass them into the urine after X-ray irradiation, as well as after the administration of bleomycin. The dose dependence of the identified effects was found. The increased content of cell-free DNA in the urine can be considered as a potential biomarker for assessing the level of genotoxic load during radiation damage to the body, as well as when exposed to other genotoxic agents.

Key words: *cell-free DNA in urine, X-ray irradiation, bleomycin, rats*

Article received: 14.08.2018. Accepted for publication: 10.07.2019

REFERENCES

- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014; 6(224). 224ra24.
- Zhang L, Zhang M, Yang S, et al. A new biosimetric method: branched DNA-based quantitative detection of B1 DNA in mouse plasma. *Br J Radiol*. 2010;83:694-701.
- Zhang M, Zhang B, Guo Y, et al. Alteration of circulating mitochondrial DNA concentration after irradiation. *Adv Exp Med Biol*. 2013;765:371-7.
- Strelkova IYu, Abdullaev SA, Snigireva GP, et al. Share of extracellular mutated mitochondrial DNA increases in plasma of lung cancer patients following radiotherapy. *Biomed Khim*. 2010;56:517-25. (in Russian).
- Sun W, Sun Y, Zhu M, et al. The role of plasma cell-free DNA detection in predicting preoperative chemoradiotherapy response in rectal cancer patients. *Oncol Rep*. 2014;31:1466-72.
- Abdullaev SA, Anishchenko ES, Gaziev AI. Mutant copies of mitochondrial DNA in tissues and plasma of X-rays exposed mice. *Radiats Biol Radioecol*. 2010;50(3):318-28. (in Russian).
- Abdullaev SA, Antipova VN, Gaziev AI. Extracellular mutant mitochondrial DNA content is sharply elevated in the blood plasma of irradiated mice. *Mol Biol (Mosk)*. 2009;43(6):1063-9. (in Russian).
- Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res*. 2015;97:122-30.
- Oberoi HS, Nukolova NV, Kabanov AV, Bronich TK. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65:1667-85.
- Umansky SR, Tomei LD. Transrenal DNA testing: progress and perspectives. *Expert Rev Mol*. 2006;6:155-63.
- Bouatra S, Aziat F, Mandal R, et al. The human urine metabolome. *PLoS ONE*. 2013;8(9) e73076.
- Liu H, Ma Y, Fang F, et al. Wild-type mitochondrial DNA copy number in urinary cells as a useful marker for diagnosing severity of the mitochondrial diseases. *PLoS ONE*. 2013;8(6) e67146.
- Dasgupta S, Shao C, Keane TE, et al. Detection of mitochondrial deoxyribonucleic acid alterations in urine from urothelial cell carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2012;131:158-64.
- Umansky SR. From transrenal DNA to stem cell differentiation: an unexpected twist. *Clinical Chem*. 2009;55:602-4.
- Abdullaev SA, Minkabirova GM, Bezlepkin VG, et al. Cell-free DNA in the urine of rats exposed to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys*. 2015;54:297-304.
- Malik AN, Shahni R, Rodriguez-de-Ledesma A, et al. Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;412:1-7.
- Holdenrieder S, Stieber P. Clinical use of circulating nucleosomes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46:1-24.
- Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann NY Acad Sci*. 2001;945:239-49.
- Kim I, Lemasters JJ. Mitophagy selectively degrades individual damaged mitochondria after photoirradiation. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:1919-28.
- Zhang J. Autophagy and mitophagy in cellular damage control. *Redox Biology*. 2013;1:19-23.

For citation: Minkabirova GM, Abdullaev SA. Increase of Cell-Free Nuclear and Mitochondrial DNA Content in the Urine of Rats after X-ray Irradiation or Bleomycin Administration. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(5):5-8. (in Russian).

DOI: 10.12737/1024-6177-2019-64-5-5-8