

Псевдогени L1 еритроцитарної фракції крові у хворих із злоякісними пухлинами

Ю. В. Думанський¹, О. В. Кайряк²

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

²Донецький національний медичний університет, Лиман, Україна

Ключові слова: злоякісні пухлини, некодуючі послідовності ДНК, псевдогени L1, хіміорезистентність, молекулярно-генетичні критерії ефективності хіміотерапії

Вступ

Злоякісні пухлини, на жаль, не втрачають лідируючих позицій в структурі захворюваності в переважній більшості країн світу. Водночас розкид результатів лікування онкологічних хворих при ідентичних поширеності, віці, гістологічному варіанті пухлини і тактиці лікування часто значний. Тому останнім часом спостерігається тенденція до пошуку молекулярно-генетичних особливостей, які можуть істотно впливати як на перебіг захворювання, так і на результат лікування, що проводиться, у онкохворих. Водночас ці дослідження вимагають значних фінансових витрат, деякі з них не виправдовують покладених на них надій, бо препарати, що розробляються, виявляються малоефективними при застосуванні в клініці.

Якщо ретроспективно простежити розвиток хіміотерапії, то вимальовується закономірність між відкриттями в галузі молекулярної генетики і появою нових лікарських препаратів, що поповнюють арсенал засобів протипухлинної терапії. Незважаючи на існуючі успіхи як в дослідженнях з біології пухлинного зростання, так і в лікуванні пацієнтів, наразі існує безліч невирішених проблем.

Метою роботи є пошук молекулярно-генетичних критеріїв безпосередньої ефективності хіміотерапії і чинників, що впливають на зміну спектру циркулюючих нуклеїнових кислот регуляторної природи в організмі хворого.

Матеріал та методи

Обстежено 31 пацієнта із злоякісними пухлинами різних локалізацій, зокрема раком молочної залози T1-3N0-2M0-1 — 12, яєчників T3cN2-3M0 — 2, меланою T1-4N0-2M0-1 — 6, товстої кишки T2-3N1-2M — 3, шлунка T4N3M0 — 3, легені T2N2M1 — 2, тіла матки T1N0M0 T2N2M0 — 1, гортані T2N0M0 — 2. Кров для дослідження забиралася до початку лікування або до початку одного з етапів лікування. Серед обстежених хворих 21 було проліковано з приводу прогресування пухлинного

процесу на етапі прояву рецидивів або метастазів. Ефект від хіміотерапії оцінювався згідно з критеріями Всесвітньої організації охорони здоров'я: повна або часткова регресія, стабілізація процесу та прогресування. Ретроспективно були сформовані групи з відповіддю на лікування (повна або часткова регресія) — 9 та з відсутністю результатів лікування — 12. Хворі, які отримували хіміотерапію в ад'ювантному режимі без ознак продовження хвороби протягом 5 років, віднесені також до першої групи. У сформованих групах оцінювали наявність або відсутність послідовностей, отриманих в результаті ампліфікації з праймерами 5' і 3' L1.

Кров для дослідження забиралася з ліктьової вени в кількості 2,5 мл в пробірку, що містить Трилон Б. Виділення нуклеїнових кислот з 100 мкл еритроцитів здійснювали шляхом лізису клітин розчином, що містить гуанідинтіоціанат, сорбції нуклеїнових кислот на 100 мкл щільно подрібненого стерильного скла, з наступним триразовим відмиванням сольовим буфером, що містить етанол. З сорбенту нуклеїнові кислоти витягали шляхом інкубації зі 100 мкл деіонованої бідистильованої води на шейкері при кімнатній температурі протягом 10 хв. Заключним етапом виділення нуклеїнових кислот було центрифугування протягом 1 хв при 14 000 обертів на центрифугі «Еппендорф». Супернатант, в якому зосередились нуклеїнові кислоти, відбирався та розфасовувався для зручності подальшої роботи в кількості, необхідній для постановки 1 проби полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у чисті автоклавовані пробірки «Еппендорф» по 5 мкл. Виділені нуклеїнові кислоти зберігалися при температурі -20°C . ПЛР проводилася на програмованому термоциклері «Applied Biosystems». Праймери ПЛР синтезовані ЗАТ «Синтол». Були використані праймери для ділянок 5' та 3' елемента LINE1. Режим ампліфікації був такий: гарячий старт, денатурація при 95°C 40 с, відпал праймерів при 58°C 40 с, елонгація при 72°C 60 с (15 циклів), 95°C — 40 с, 55°C — 40 с,

74 °C — 60 с. Продукти ПЛР-ампліфікації розділяли на 1,5% агарозному гелі, пофарбованому бромистим етидієм. Для оцінки величин продуктів ПЛР використовували маркери молекулярної маси ДНК. Електрофорез проводили при напрузі струму 5 В/см протягом 30 хв у камері для електрофорезу, заповненій боратним буфером, підігрітим до 37 °C. Візуалізацію гелів проводили в ультрафіолетовому світлі на транслюмінаторі, документували шляхом фотозйомки.

Статистичну обробку результатів здійснювали шляхом використання критерію Вілкоксона [6].

Результати та обговорення

У всіх випадках повної чи часткової регресії нами зареєстровано кілька фрагментів ДНК в еритроцитарній фракції периферичної крові під час проведення ПЛР з праймерами до 3' ділянки L1. Молекулярна маса фрагментів становила від 500 п. н. до 2000 п. н. В одному випадку (хвора Е., Са яєчників ТЗсNxM0) до початку хіміотерапії фрагменти були відсутні, але з'явилися до початку 3-го курсу хіміотерапії. Клінічно до 3-го курсу хіміотерапії у хворої не спостерігалися ознаки асцити (дані ультразвукового дослідження), та у проєкції великого сальника раніше пальпований пухлинний конгломерат не визначався. Виявлення ДНК в еритроцитарній фракції крові здавалося б парадоксом, оскільки еритроцити людини є без'ядерними клітинами. Проте у підручнику з генетики, автором якого є І. Гершкович [4], виданому 1968 р. видавництвом «Наука», наводиться факт наявності ДНК в еритроцитах: «У мембранах еритроцитів людини була виявлена двониткова ДНК (L. Philipson, O. Zetterqvist, 1964). Ця ДНК має молекулярну вагу близько 1 000 000, вміст Г+Ц становить у ній приблизно 39–42%. Її однорідність, а також можливе і високе співвідношення А+Т/Г+Ц дозволяє вважати, що це не просто випадково адсорбована ДНК». Абзацом нижче наведено висловлювання Т. М. Sonneborn (1963): «Важке завдання майбутнього полягає у визначенні... того, яким чином специфічне всмоктування, орієнтація та активація мігруючих молекул призводять до зримого морфогенезу та стабільної клітинної організації, що визначається генетично».

Феномен позаклітинних нуклеїнових кислот останнім часом привертає увагу фахівців, які працюють у галузі онкології та акушерства. З'явився навіть термін «рідка біопсія» [5, 21, 22]. Методи дослідження позаклітинних нуклеїнових кислот приваблюють малоінвазивністю і можуть бути використані для моніторингу перебігу пухлинної хвороби та проведення скринінгу з метою формування груп ризику онкопатології [9].

Позаклітинні нуклеїнові кислоти відіграють вирішальну роль у пухлинній прогресії, забезпечуючи такі аспекти біології пухлинного росту, як висока здатність до інвазії, метастазування, «поневолення» імунної системи та переорієнтація її діяльності з підтримки зростання нормальних тканин на поширення пухлини. Гарною ілюстрацією цього положення є робота М. Yang et al. [30]. Спільна трансфекція пухлинних клітин miR223, напрацьованої активними макрофагами, та позаклітинних везикул

пухлинної природи збільшували інвазивний потенціал клітин-донорів. У піонерських роботах Р. Anker et al. показана здатність лімфоцитів до прижиттєвого викиду нуклеїнових кислот [12]. В імунології в 1970–80 рр. склалося уявлення, що імунна відповідь неможлива без клітинної кооперації та передачі інформації між клітинами [3]. Месенджерами міжклітинних взаємодій імунної відповіді є нуклеїнові кислоти [11]. До теперішнього часу цей напрямок трансформувався в поняття інформаційного обміну між різними тканинами, що формують багатоклітинний організм. Безумовно, провідні позиції у регуляції диференціювання соматичних нелімфоїдних тканин належать імунній системі, однією з функцій якої є підтримка клітинного та тканинного гомеостазу макроорганізму [2, 3]. Загальновідомо, що основними складовими гомеостазу тканин є апоптоз і проліферація, баланс між якими визначає гармонію тканинної архітектури.

На цей час ми далекі від повного розуміння законів функціонування геному в нормі та при патології. Проте починають вимальовуватись окремі закономірності, що дозволяють виявити перспективні напрямки подальших досліджень. Використовуючи аналогічні поняття з інших галузей природничих наук, у молекулярній біології останніх років з'явився термін «темна матерія геному», яким позначають РНК послідовностей, що не кодують, з невідомою або мало вивченою функцією. Зміна парадигми в оцінці ролі некодуючих послідовностей ДНК від «сміттевої» [23] до регуляторної [17] переорієнтувала пріоритети досліджень у галузі молекулярної біології від оцінки вкладу окремих генів у той чи інший патологічний процес до вивчення некодуючих послідовностей геному.

L1 є однією з затребуваних послідовностей, що повторюються, в геномі людини, становлячи близько 18% від усіх некодуючих геномних структур [18]. Найбільший рівень експресії L1 у людини спостерігається у ранньому ембріогенезі. Одним з шляхів регуляції активності гену є ступінь його метилювання: чим вона вище, тим менш активним є ген. Ступінь метилювання L1, що визначає активність транскрипції послідовності у трофобласті, значно нижча, ніж у деяких зрілих тканинах (лімфоцитах). Кількість копій L1 становить приблизно 500 000 на геном. Тим не менш, функціонально активними є близько 100 L1 послідовностей. Не може бути, щоб 499 900 неактивних в геномі послідовностей L1 не були потрібні для реалізації клітинних фізіологічних процесів.

Характерною рисою неактивних копій L1 є їх усиченість із 5' кінця. Насправді такі усичені копії L1 є псевдогенами функціонально активного транскрипта. Якщо раніше псевдогени розглядалися як «вмираючі гени» [10], що є «сировиною для еволюції», то в останнє десятиліття з'явилися роботи, що показали участь псевдогенів у регуляції генної активності. Псевдогени є джерелом ендегенних малих РНК [20], можуть служити санлейсерами шляхом сорбції на ДНК функціонально активного гена-попередника таргетних ендегенних антисмислових РНК, оскільки

саме з псевдогенів часто переписуються антисмислові транскрипти [25]. Антисмислові транскрипти L1 можуть служити також як довгі некодуєчі РНК, задіяні в імпринтингу і моноалельній експресії. Крім того, псевдогени здатні адсорбувати на себе пул ендогенних регуляторних міРНК, тим самим підвищуючи експресію батьківського гена. Щодо функції псевдогенів L1 на рівні організму, можна припустити таке: усічені з 5' кінця псевдогени L1 довжиною до 2000 п. н. зберігають активність ендонуклеази. Ендогенні ендонуклеази здійснюють розривання молекули нуклеїнової кислоти, без чого неможливі такі життєво важливі процеси як редуплікація, рекомбінація, репарація, апоптоз [1]. У геномі людини налічується близько 3500 копій лівого сегмента L1 і 100 000 — правого, де локалізується відкрита рамка зчитування для ендонуклеази та ревертази [8]. Ендонуклеази мають різну специфічність відносно до одониткової, двониткової, метильованої або неметильованої нуклеїнової кислоти. Органом, у якому найрідше розвиваються епітеліальні злоякісні пухлини у ссавців, є дванадцятипала кишка. У вмісті дванадцятипалої кишки дуже висока концентрація ДНКаз і РНКаз, що виділяються підшлунковою залозою. Концентрація позаклітинних нуклеїнових кислот у біологічних рідинах зворотно пропорційна вмісту як екзо-, так і ендонуклеаз [24]. Але для виконання своєї функції ендонуклеази мають бути викинуті із клітини. 3' послідовність виконує «важливі регуляторні функції на посттранскрипційному та трансляційному рівнях експресії еукаріотичних генів, беручи участь у процесингу мРНК, контролюючи їх стабільність і локалізацію транскриптів в клітині» [7]. Цілком ймовірно, що усічені з 5' кінця фрагменти L1, нездатні до транспозицій внаслідок зміненої структури 5' ділянки, але маючи послідовність, що кодує ендонуклеазу, будучи «викинутими» з клітини і осів на поверхні еритроцитів, розрізають на дрібніші фрагменти позаклітинні нуклеїнові кислоти, що мають меншу імуногенність і здатні здійснити при попаданні в клітину-мішень таргетний сайленсинг репортерного гена за механізмом, аналогічним малим ендогенним РНК. Іншим припущенням може бути те, що ендонуклеази подрібнюють пухлинну нуклеїнову кислоту до фрагментів, здатних активувати вроджений та набутий імунітет, індукуючи імунну відповідь. Так звучить один із заключних акордів у фузі під назвою ГОМЕОСТАЗ.

Традиційно експансія повномірних L1 у геномі при злоякісних утвореннях фахівцями розцінюється як несприятливий прогностичний фактор, що посилює генетичну нестабільність шляхом підвищення рівня рекомбінацій, делецій, інсерцій [16, 29]. Повномірний L1 містить 5'UTR, дві відкриті рамки зчитування (ORF1 і ORF2). «Життєвий цикл» L1 повтор можна розбити на 3 періоди.

Перший крок здійснюється РНК полімеразою 2, що використовує промотор L1 для транскрипції РНК.

Зворотна транскриптаза, як і більшість полімераз, потребує РНК-затравки з вільним 3'ОН кінцем. Ретровірус використовують як РНК-затравку одну з молекул транспортної РНК [10]. Важливою

особливістю вторинної структури РНК-затравки є наявність ділянок «петля на стеблі», а в петлі обов'язковою умовою є наявність одного або кількох неканонічних нуклеотидів [8], що показують відмінність цієї структури від шпильок, задіяних у процесингу мікроРНК. Таким чином ферментам процесингу мікроРНК показується, що це не їхній субстрат. До вільного 3'ОН кінця РНК-затравки ревертаза приєднує дезоксирибонуклеотиди, утворюючи (–) ланцюг ДНК, який термінується на 5' кінці РНК матриці. Потім слідує звільнення від РНК.

У другому періоді життєвого циклу з РНК L1 транслюються 2 протеїни: ORF1p, що має здатність зв'язуватися з одонитковою РНК, і ORF2p, що має властивості ендонуклеази та зворотної транскриптази. Водночас в авторитетному посібнику з молекулярної генетики [8] є фраза, що, незважаючи на наявність двох відкритих рамок зчитування в L1, білки, які кодуються даною послідовністю, не ідентифіковані. Показано також, що продукт ORF1 має функцію шаперону по відношенню до нуклеїнової кислоти [29].

У третьому періоді здійснюється зворотна транскрипція в таргетну ДНК з консенсусною послідовністю ДНК-господаря 5'TTTTAA3', причому 3' гідроксильна група використовується як праймер зворотної транскрипції [26].

У численних дослідженнях нуклеїнових кислот, виділених як безпосередньо з тканини пухлини пацієнтів, так і при використанні ліній клітинних культур, що перевиваються, показано підвищення активності транспозицій L1 [7]. Послідовності, що повторюються, регулюють активність структурних генів шляхом появи альтернативних промоторів, сайтів термінації транскрипції та сплайсингу. Вбудовування мобільних елементів у нових ділянках ДНК призводить до порушення роботи структурних генів та асоційоване з генетичними синдромами.

Інсерції L1 відіграють певну роль у пухлинній прогресії, оскільки здатні активувати онкогени та інактивувати гени-онкосупресори. Lee et al. описали 183 інсерції L1 у клітинах пухлин простати, товстої кишки та яєчників. Гіпометилування промотору L1 описано при мієломній хворобі, хронічному мієлоїдному та хронічному лімфолейкозі. Гіпометилування L1 послідовності описано як один із доклінічних проявів пухлинної хвороби при колоректальному раку, наслідком чого є порушення «правильної» генної експресії, характерної для епітелію товстої кишки [27]. Гіпометилування L1 зареєстровано також при уротеліальному та гепатоцелюлярному раку [19, 28], раку передміхурової залози [13], ендокринних варіантах пухлин підшлункової залози та карциноїдних пухлинах [14]. Генетичну нестабільність клітини L1 індукують шляхом гомологічної та негомологічної рекомбінацій, делецій, транслокацій. При дослідженні рівня метилування 48 зразків нормальної та пухлинної тканини, взятих у пацієнтів з недрібноклітинним раком легені, виявлено достовірно значуще зниження рівня метилування L1 та ALU повторів у пухлинній тканині порівняно з нормою, причому більш виражене зниження рівня метилування характерне для повторів L1. Гіпометилування

повторів обох типів корелювало з виразністю генетичної нестабільності [15].

Обмеження генетичної нестабільності

Традиційно «викидання» частини генетичного матеріалу з клітини спостерігається при диференціюванні імунотоксичних клітин, коли відбувається реорганізація геному при V(D)J реаранжуванні. Ця модифікація має цікаву особливість: делеція частини VJ спейсера запобігає реаранжуванню інших імуноглобулінових генів, тобто забороняє в цій клітині стан генетичної нестабільності. Здавалося б, природа могла вирішити проблему конструювання РНК зрілого гена імуноглобуліну шляхом сплайсингу. Можливо, такі варіанти й існували в минулому, але літопис скам'янілостей не зміг зафіксувати цієї події і довести її до наших днів. Проте відбір підтримав такий варіант диференціювання, у якому відбувається делеція частини V(D)J спейсера. У спейсері може бути послідовність для генів, розташованих по ходу транскрипції з функцією репресора. Делетована послідовність спейсера може використовуватися як довга некодуєча РНК, що здійснює імпринтинг, так і для процесингу ендегенних малих РНК, що праймують антисмисловою нитку при синтезі фрагментів Оказакі. Важливою умовою адекватного функціонування клітини є асиметричне метилювання смислової та антисмислової ниток молекули ДНК. Саме ця умова забороняє проліферацію. Малі РНК екранують антисмисловою нитку при нанесенні малюнка метилювання підтримуючою метилтрансферазою під час редуплікації, тим самим обмежуючи рівень проліферації. Проліферація можлива лише у разі нанесення метилазою симетричного візерунка метилому.

Література:

1. Александрович Н. И., Ванюшин Б. Ф. Ендонуклеази та апоптоз у тварин. *Успіхи біологічної хімії*. 2012. № 52. С. 63–96.
2. Бабаєва А. Г. Ще раз про морфогенетичну, або будівельну функцію лімфоцитів. *Вісник рос. академії природничих наук*. 2010. № 4. С. 70–74.
3. Вершигора А. Є. Основи імунології. Київ: Вища школа, 1980. 503 с.
4. Гершкович І. Генетика. М.: Наука, 1968. 698 с.
5. Кондратова В. М., Ботезату І. В., Шелепов В. П., Ліхтенштейн А. В. Позаклітинні нуклеїнові кислоти як маркери пухлинного росту. *Рос. біотерапевтичний журнал*. 2013. № 12 (3). С. 3–10.
6. Мінцер О. П., Угаров Б. М., Власов В. В. Методи обробки медичної інформації. Київ: Вища школа, 1982. 160 с.
7. Патрушев Л. І., Коваленко Т. Ф. Функції некодуєчих послідовностей геному ссавців. *Успіхи біологічної хімії*. 2014. № 54. С. 39–102.
8. Сінгер М., Берг П. Гени та геноми (у двох томах). М.: Світ, 1998. 1 – 376 с. 2 – 391 с.
9. Тамкович С. М., Власов В. В., Лактіонов П. П. Циркуючі ДНК крові та їх використання у медичній діагностиці. *Молекулярна біологія*. 2008. № 42 (1). С. 12–23.
10. Хесін Р. Б. Непостійність геному. М.: Наука, 1985. 472 с.
11. Чумак А. А. Роль «іmunної РНК» у процесах імунітету та алергії при туберкульозі. *Імунологія та алергія*. Київ, 1979. С. 17–21.
12. Anker P., Stroun M., Maurice P. A. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an vitro system. *Cancer Res*. 1975. Vol. 35, No 9. P. 2375–2382.
13. Cho N. Y., Kim B. H., Choi M., Yoo E. G., Moon K. S., Cho Y. M., Kim D., Kang G. H. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and ALU repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J. Pathology*. 2007. Vol. 211, No 3. P. 269–277.
14. Choi I. S., Estecio M. R., Nagano Y., Kim D. H., White J. A., Yao J. C., Issa J. P., Rashid A. Hypomethylation of LINE-1 and ALU in well-differentiated neuroendocrine tumors (pancreatic endocrine tumors and carcinoid tumors). *Mol Pathology*. 2007. Vol. 20, No 7. P. 802–810.
15. Daskalos A., Nikolaidis G., Xinarianos G., Savvari P., Cassidy A., Zakopoulou R., Kotsinas A., Gorgoulis V., Field J. K., Liloglou T. Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in

- non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*. 2009. Vol. 124. P. 81–87.
16. Goodier J. L., Cheung L. E., Kazazian H. H. Mapping the LINE1 ORF1 protein interactome reveals associated inhibitors of human retrotransposition. *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 41, No 15. P. 7401–7419.
 17. International human genome consortium. Initial sequencing an analysis of the human genome. *Nature*. 2001. Vol. 409. P. 860–921.
 18. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of human genome. *Nature*. 2004. Vol. 431. P. 931–945.
 19. Jurgens B., Schmitz-Drager B. J., Schulz W. A. Hypomethylation of L1 LINE-1 sequences prevailing in human urothelial carcinoma. *Cancer Res*. 1996. Vol. 56. P. 5698–5703.
 20. Kalyana-Sundaram S., Kumar-Sinha Ch., Shankar S., Robinson D. R., Wu Yi-Mi, Cao X., Asangani I. A., Kothari V., Prensner J. R., Lonigro R. J., Iyer M. K., Barrette T., Shanmugam A., Dhanasekaran S. M., Palanisamy N., Chinnaiyan A. M. Expressed pseudogenes in the transcriptional landscape of human cancers. *Cell*. 2012. Vol. 149, No 7. P. 1622–1634.
 21. Lo Y., Chan K., Sun H., Chen E. Z., Jiang P., Lun F. M., Zheng Y. W., Leung T. Y., Lau T. K., Cantor C. R., Chiu R. W. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science Translational Medicine*. 2010. Vol. 2. P. 61ra9.1
 22. Majer S., Bauer M., Magnet E., Strele A., Giegerl E., Eder M., Lang U., Pertl B. Maternal urine for prenatal diagnosis — an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester. *Prenat. Diagn*. 2007. Vol. 27. P. 1219–1223.
 23. Orgel L., Crick F. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*. 1980. Vol. 284. P. 604–607.
 24. Redzic J. S., Balaj L., Kristan E., van der Vos K. E., Breakefield X. O. Extracellular RNA mediates and marks cancer progression. *Semin. Cancer Biol*. 2014. Vol. 28. P. 14–23.
 25. Roberts T. C., Morris K. V. Not so pseudo anymore: pseudogenes as therapeutic targets. *Pharmacogenomics*. 2013. Vol. 14, No 16. P. 2023–2034.
 26. Rodic N., Burns K. H. Long interspersed element-1 (LINE-1): passenger or driver in human neoplasms? *PLoS Genetics*. 2013. Vol. 9. e1003402, P. 1–5.
 27. Suter C. M., Martin D. I., Ward R. L. Hypomethylation of retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int. J. Colorectal Dis*. 2004. Vol. 19. P. 95–101.
 28. Takai D., Yagi Y., Habib N., Sugimura T., Ushijima T. Hypomethylation of LINE-1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Japan. J. Clin. Oncol*. 2000. Vol. 30. P. 306–309.
 29. Xue B., He L. An expanding universe of the non-coding genome in cancer biology. *Carcinogenesis*. 2014. Vol. 35, No 6. P. 1–8.
 30. Yang M., Chen J., Su F., Yu B., Su F., Lin L., Liu Y., Huang J. D., Song E. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol. Cancer*. 2011. Vol. 10. P. 1–13.

УДК 616-006,6:616.155.1:575.162

doi: 10.33149/VKP.2024.03.09

UA Псевдогени L1 еритроцитарної фракції крові у хворих із злоякісними пухлинами

Ю. В. Думанський¹, О. В. Кайряк²

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

²Донецький національний медичний університет, Лиман, Україна

Ключові слова: злоякісні пухлини, некодуючі послідовності ДНК, псевдогени L1, хіміорезистентність, молекулярно-генетичні критерії ефективності хіміотерапії

Вступ. На жаль, злоякісні пухлини продовжують лідувати у всьому світі у структурі захворюваності та смертності поряд із патологією серцево-судинної системи. Існує чітка кореляційна залежність між відкриттями у галузі молекулярної біології та появою нових лікарських препаратів. Тому виявлення нових критеріїв чимочутливості та резистентності дозволить індивідуалізувати лікування пацієнтів.

Метою роботи є пошук молекулярно-генетичних критеріїв безпосередньої ефективності хіміотерапії та параметрів, що впливають на спектр циркулюючих нуклеїнових кислот регуляторної природи в організмі хворого.

Матеріал та методи. Обстежено 31 хворого на злоякісні пухлини різних локалізацій. Нуклеїнові кислоти із фракції еритроцитів виділяли на дрібнодисперсному склі. ПАР проводили з праймерами до 5' та 3' ділянок L1.

Результати та обговорення. Наведено дані про реєстрацію 3' фрагментів псевдогенів L1 в еритроцитарній фракції периферичної крові всіх онкохворих, що відповіли на хіміотерапію повною або частковою регресією. Вперше висловлена гіпотеза про молекулярний механізм диференціювання соматичних клітин, зокрема і пухлинних (лікувальний патоморфоз), шляхом екскреції РНК псевдогенів L1 прекомітованими до тканини лімфоцитами, посттранскрипційної модифікації в еритроцитах, горизонтальної передачі у тканину-мішень та сайленсингу аномально активованих репортерних генів. Не виключена можливість функціонування псевдогенів L1 в еритроцитах в якості ендонуклеази, що нарізає циркулюючу позаклітинну РНК на більш дрібні фрагменти, що мають меншу імуногенність і здатність здійснити при попаданні в клітину-мішень таргетний сайленсинг репортерного гена за механізмом, аналогічним малим ендогенним РНК. Еритроцитарні фрагменти L1 з ендонуклеазною активністю можуть забезпечувати «постачання» імунній системі фрагментів циркулюючих пухлинних нуклеїнових кислот, здатних запустити як вроджену, так і адаптивну імунну відповідь.

Висновки. Вперше у всіх хворих, які відповіли на хіміотерапію повною або частковою регресією, а також у

пацієнтів, які отримували хіміотерапію в ад'ювантному режимі без продовження хвороби в термін фактичного спостереження 5–6 років, в еритроцитарній фракції периферичної крові зареєстровано 3–4 фрагменти 3' послідовності L1 молекулярною масою від 500 до 2000 п. н.

Враховуючи відсутність ампліфікації до 5' фрагменту та їхній розмір, що становить менше третини повноцінного L1, ці послідовності відносяться до псевдогенів L1.

Найбільш імовірним джерелом L1 псевдогенів є лімфоцити, бо такі самі фрагменти 3' послідовності зареєстровані в лейкоцитарній фракції хіміочувливих хворих. Можливо, прижиттєва екскреція лімфоцитами цих послідовностей забезпечує контроль за диференціюванням та балансом між проліферацією та апоптозом у тканині-мішені.

Висловлено припущення про можливість «замісної терапії» лімфоцитів хіміорезистентних хворих молекулярними структурами, виявленими у хіміочувливих хворих, шляхом векторної трансфекції лімфоцитів синтезованими *in vitro* послідовностями. У разі успіху цей підхід дозволив би вирішити проблему лікарської стійкості.

EN L1 pseudogenes of the erythrocyte blood fraction in patients with malignant tumors

Yu. V. Dumansky¹, O. V. Kayryak²

¹R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Donetsk National Medical University, Lyman, Ukraine

Key words: malignant tumors, non-coding DNA sequences, L1 pseudogenes, chemoresistance, molecular genetic criteria for the effectiveness of chemotherapy

Introduction. Unfortunately, malignant tumors continue to lead the world in the structure of morbidity and mortality, along with the pathology of the cardiovascular system. There is a clear correlation between discoveries in the field of molecular biology and the emergence of new drugs. Therefore, the new criteria for chemosensitivity and resistance will make it possible to individualize the treatment of patients.

The aim of the work is to search for molecular genetic criteria for the immediate effectiveness of chemotherapy and parameters that influence the spectrum of circulating nucleic acids of a regulatory nature in the patient's body.

Materials and methods. We examined 31 patients with malignant tumors of different localizations, separated the nucleic acids from the erythrocyte fraction on fine glass, and used primers for the 5' and 3' regions of L1 to do PCR.

Results and discussion. We present data on the registration of 3' fragments of L1 pseudogenes in the peripheral blood erythrocyte fraction of all cancer patients who responded to chemotherapy with either complete or partial regression. For the first time, we put forward a hypothesis regarding the molecular mechanism of differentiation of somatic cells, including tumor cells (therapeutic pathomorphosis), through the RNA excretion of L1 pseudogenes by lymphocytes precommitted to the tissue, post-transcriptional modification in erythrocytes, horizontal transmission to the target tissue, and silencing of abnormally activated reporter genes. It's possible that L1 pseudogenes function in erythrocytes as an endonuclease that cuts circulating extracellular RNA into smaller fragments that are less immunogenic and capable of carrying out targeted silencing of a reporter gene when they enter a target cell, using a mechanism similar to small endogenous RNAs. Endonuclease-active erythrocyte L1 fragments can provide the immune system with fragments of circulating tumor nucleic acids that can trigger both innate and adaptive immune responses.

Conclusions. For the first time, 3–4 fragments of the 3' sequence L1 with molecular weight from 500 to 2000 bp were found in all patients who responded to chemotherapy with complete or partial regression, as well as in patients who received adjuvant chemotherapy without the disease continuing during an actual follow-up period of 5–6 years.

We classify these sequences as L1 pseudogenes due to their lack of amplification to the 5' fragment and their size, which is less than a third of the full L1.

Since the leukocyte fraction of chemosensitive patients contains exactly the same fragments of the 3' sequence, lymphocytes are the most likely source of L1 pseudogenes. It is possible that the intravital excretion of these sequences by lymphocytes controls differentiation and the balance between proliferation and apoptosis in the target tissue.

It has been suggested that it is possible to conduct "replacement therapy" of lymphocytes of chemoresistant patients with molecular structures identified in chemosensitive patients by vector transfection of lymphocytes with sequences synthesized *in vitro*. If successful, this approach could solve the problem of drug resistance.