

**НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЯДЕРНОЙ ДНК В КЛЕТКАХ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ
ПРОВЕДЕНИИ РАДИО-ХИМИОТЕРАПИИ**

Патрушева В.Е.¹, Патрушев М.В.^{1,2}, Ушакова Т.Е.¹, Газиев А.И.¹

¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*
Тел.: (495) 632-78-69

²*Российский Государственный университет им. И.Канта, Калининград*
Тел.: +7 4012 46-63-13

Введение

Радио-химиотерапия – самый распространенный неинвазивный метод лечения онкологических заболеваний. В большинстве случаев средства, применяемые для радио-химиотерапии (РХТ) вызывают повреждения не только опухолевых, но и нормальных тканей, с чем в значительной мере, связано множество побочных эффектов и осложнений у пациентов. Для эффективного использования этих методов, с целью снижения повреждений нормальных тканей чрезвычайно важно отслеживать возможное генотоксическое действие терапевтических агентов на нормальные клетки организма онкологических больных (1). Генотоксическое действие средств терапии опухолей, как на раковые клетки, так и клетки нормальных тканей традиционно оценивается по анализу повреждений, репарации или апоптотической деградации ядерного генома. В последнее время для оценки фармакогеномики различных противоопухолевых агентов, их генотоксического действия на опухолевые и нормальные клетки применяются тест-системы, детектирующие изменения микросателлитных аллельных вариантов хромосомальной ДНК и мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) (2,3).

Микросателлитами называются блоки повторяющихся последовательностей ДНК, длиной 1-6 п.н., которые локализованы по всей протяженности генома человека (9-11). Важнейшая особенность микросателлитов - это высокий уровень индивидуальных вариаций, вследствие происходящих в этих локусах мутаций: $10^{-3} - 10^{-4}$ на поколение (12). Однако, как правило, у индивидуумов с отсутствием ярко выраженных патологий определенный набор аллельных вариантов по подавляющему большинству локусов сохраняется на протяжении всей жизни. Соматические изменения в микросателлитных последовательностях, сопровождающиеся делециями или инсерциями одного или нескольких блоков повторов, были названы «микросателлитной нестабильностью» (МН). Как известно, высокая микросателлитная нестабильность характеризует генетическую изменчивость (мутаторный фенотип) многих опухолей (4,5). Микросателлитная

нестабильность была обнаружена во многих опухолях человека, имеющих как наследственную, так и ненаследственную природу (13-15), и в клинической практике используется как маркер для определения способности ДНК к репарационным процессам (16-19). Анализ высоко полиморфных микросателлитных локусов дает информацию не только об МН, а также позволяет обнаруживать делецию аллелей генов супрессоров в опухолевых клетках. Гены супрессоры опухолей инактивируются мутациями, происходящими в одной аллели гена, с последующей потерей дикой аллели гена. Такое явление получило название «потеря гетерозиготности» (ПГ) (20). Потеря гетерозиготности и МН - это неотъемлемые стадии онкогенеза, их анализ является обязательным при клинической диагностики и рекомендован при молекулярном скрининге различных видов опухолей (21,22). В настоящее время показана взаимосвязь микросателлитных изменений в ДНК и реакции клеток на действие противоопухолевых агентов (6).

Известно что, следствием низкой эффективности систем репарации в мтДНК является большая ее подверженность действию различных химических агентов и ионизирующей радиации (23-29). Повышенное количество повреждений мтДНК и низкая эффективность ее репарации способствуют формированию мутаций мтДНК с частотой в 10-25 раз, превышающей таковую в яДНК (25, 29-31). Кроме того, действие ИР приводит к изменениям репликации мтДНК (34, 35) и элиминации из органелл поврежденных молекул мтДНК без явной деструкции митохондрий (50).

Изменения в мтДНК обнаруживаются в клетках периферической крови человека, подвергнутых радиационному воздействию или после химиотерапии. Так, ионизирующая радиация вызывает образование делеций (4977 п.о.) в мтДНК лимфоцитов периферической крови человека. Появление этих делеций, наряду с определением хромосомных поломок, используются в биологической дозиметрии (7). У пациентов с различными видами опухолей после проведения РХТ в мтДНК клеток крови выявляется повышенная частота мутаций, ведущая к формированию гетероплазии (3,8). Повышенная частота мутаций коррелирует с увеличением продукции АФК в этих клетках. [8].

В настоящей работе мы исследовали уровень МН и количественные изменения мтДНК в периферической крови пациентов с диагнозом: рак молочной железы 2 стадии, до, сразу по окончании и спустя неделю после применения курса (РХТ).

Материалы и методы:

Периферическая кровь была получена методом пассивного забора из вены у пациентов (женщин) с диагнозом 2 стадия рака молочной железы, госпитализированных в радиологическое отделение онкологического диспансера РОНЦ (г. Балашиха, Московская область). Забор крови производился за 7 дней до проведения сеансов РХТ, сразу после проведения указанных процедур и через 7 дней после их завершения. Курс РХТ включал в себя облучение гамма-радиацией (суммарная полученная доза 40 Гр), двукратной введение цитостатических антибиотиков – 5-фторурацила, доксорубина, циклофосфана.

ДНК из крови пациентов выделяли, используя магнитные сорбенты. Кровь смешивали с равным объемом лизирующего буфера, содержащего: 4 М тиоцианата гуанидина, 25 мМ натрия цитрата (рН 7,0), 0.5% саркозил. К аликвоте лизата добавляли 1/10 объема 1М трис-НСI рН 8.0, NaCl до конечной концентрации 1 М и 10-15 мкл магнитных сорбентов. После инкубации в течение 15 мин при 55°C проводили связывание магнитных сорбентов в магнитном поле. Элюцию ДНК с сорбентов осуществляли в ТЕ-буфере в течение 15 мин при 65°C.

Количество митохондриальной ДНК в крови оценивали с использованием метода ПЦР в реальном времени (MX3000, Stratagene, USA). Состав реакции: 10 мМ Tris-НСI рН 8.3, 50 мМ KCl, 0,2 мМ dNTPs, 1,6 мМ Mg²⁺, 250 нМ каждого праймера (см. таблицу 1), 500 нМ зонда, 2 единицы *Taq* ДНК полимеразы. Реакцию проводили в совмещенной дуплексной системе с одновременной регистрацией кинетики амплификации фрагментов мтДНК и ядерного гена *gapdh*.

Таблица 1

Name	Sequence 5'-3'
HumGAPDH-F	GGA CTGAGGCTCCCACCTTT
HumGAPDH-R	GCA TGGACTGTGGTCTGCAA
HumGAPDH-Probe	ROX-CATCCAAGACTGGCTCCTCCCTGC-BHQ2
Hum mtDNA-F	AGGACAAGAGAAATAAGGCC
Hum mtDNA-R	TAAGAAGAGGAATTGAACCTCTGAGTCTAA
Hum mtDNA-Probe	JOE-TTCACAAAGCGCCTTCCCCCGTAAATG-BHQ2

Амплификация STR – локусов TH01, D21S11, FGA, D8S1179, D3S1758 проводилась в описанном буфере, с праймерами, рекомендованными к использованию для проведения молекулярно-генетической идентификации человека (37).

Продукты амплификации STR – локусов разделяли при помощи 8% акриламидного геля-электрофореза и визуализировали с использованием нитрата серебра.

Результаты

Относительную количественную оценку содержания фрагментов мтДНК в крови пациентов оценивали по формуле: $R = E^{-\Delta\Delta Ct}$ (R – относительное количество мтДНК, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{опыт}} - \Delta Ct_{\text{контроль}}$; $\Delta Ct = Ct_{\text{мит ДНК}} - \Delta Ct_{\text{ядДНК}}$). За контрольный, принимали уровень мтДНК пациентов до проведения курса РХТ.

Эффективность реакции оценивали по формуле: $E = 10^{[-1/\text{slope}]}$ x 100%. Где E – эффективность реакции, slope (наклон, крутизна) – величина, зависящая от угла наклона линии регрессии кратных (порядковых) значений ДНК. Расчет результатов, графически представленных на Рис.1 показал, что эффективность реакции при амплификации мтДНК в дуплексной системе равна 50%. Следует отметить, что условия амплификации подбирались таким образом, чтобы, во-первых, совпадали эффективности у митохондриального и ядерного генов, а во-вторых, чтобы увеличить динамический диапазон количественной оценки мтДНК.

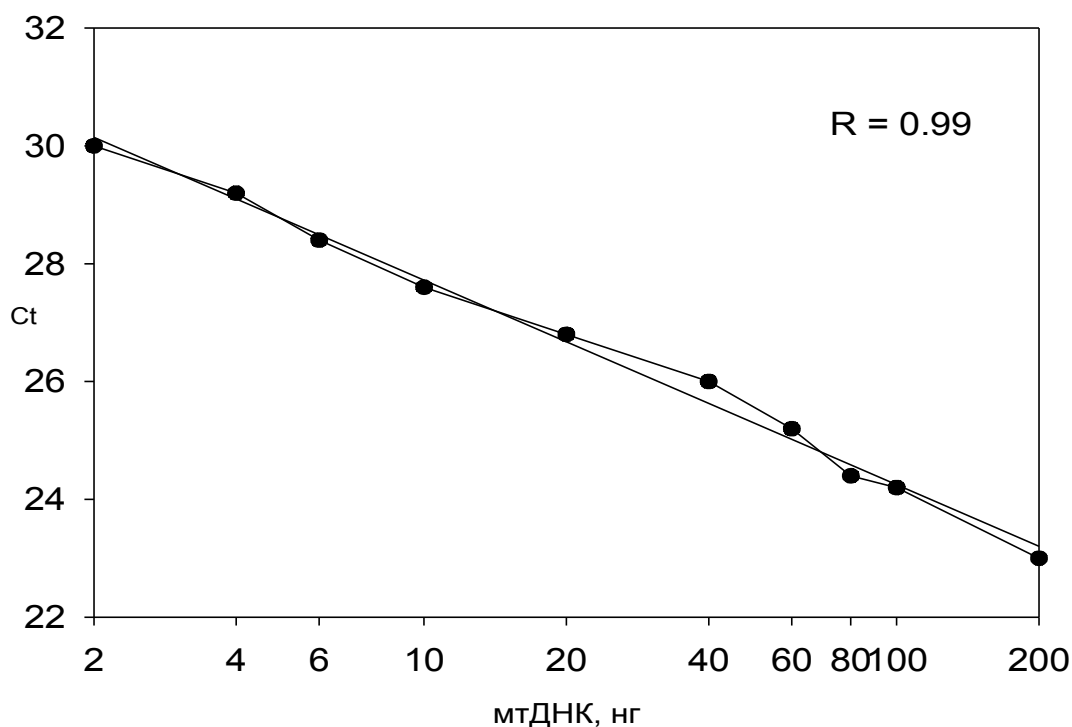


Рис.1 Определение эффективности и динамического диапазона ПЦР. Раститровка фрагмента мтДНК при заякоренном количестве ДНК.

Индивидуальный уровень мтДНК в периферической крови пациентов с опухолью молочной железы перед проведением курса РХТ значительно варьирует (Рис.2). Широкая вариабельность в значениях мтДНК объясняется большими разбросами в возрасте наблюдаемых пациентов, их анамнезе и состоянии на момент проведения процедуры: минимальное количество копий мтДНК обнаружено у пациентов №№ 1 и 14.

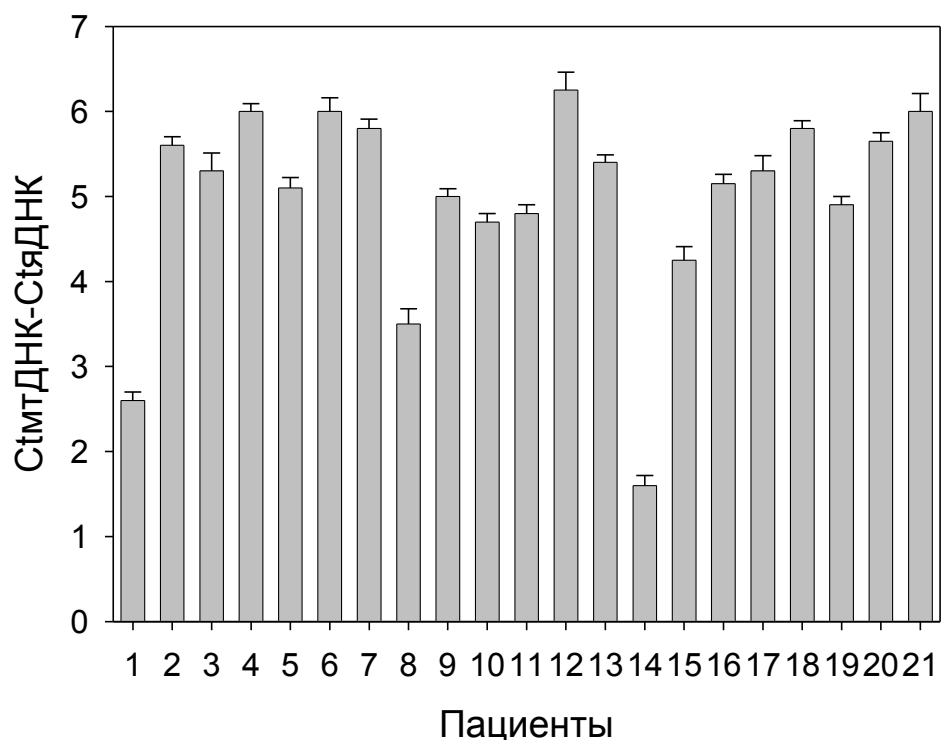
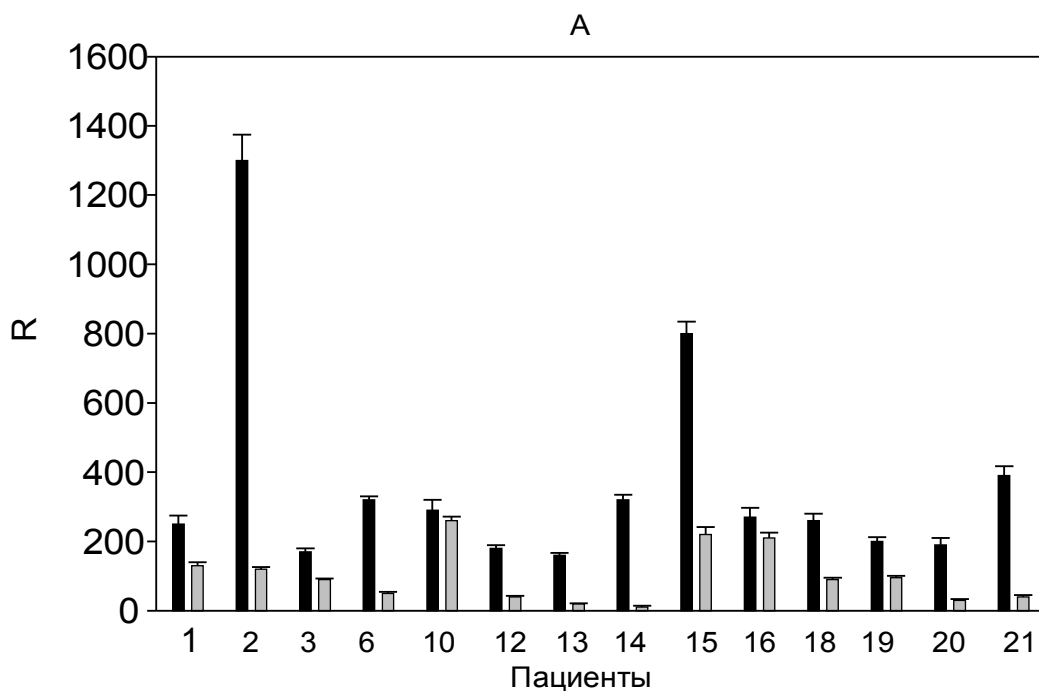


Рис.2 Индивидуальный уровень мтДНК в периферической крови пациентов с диагнозом рак груди 2 стадии, до проведения радиохимиотерапии. Показана разница Сt при амплификации фрагмента мтДНК и фрагмента гена. *gapdh*

Сразу после окончания курса РХТ у 14 пациентов из 21 обнаружено резкое увеличение числа копий мтДНК. Особенно необходимо отметить пациента №2, у которого изменение количества копий мтДНК достигает порядковых величин (в 13 раз). У 11 пациентов также регистрируется увеличение копий мтДНК, однако эти изменения выражены в меньшей степени, хотя и выражаются в кратных увеличениях (в 2-4 раза). И, наконец, существует группа пациентов, у которых изменение в уровне мтДНК в крови не обнаружено или даже снижено сразу после проведения курса РХТ (Рис.3).



1

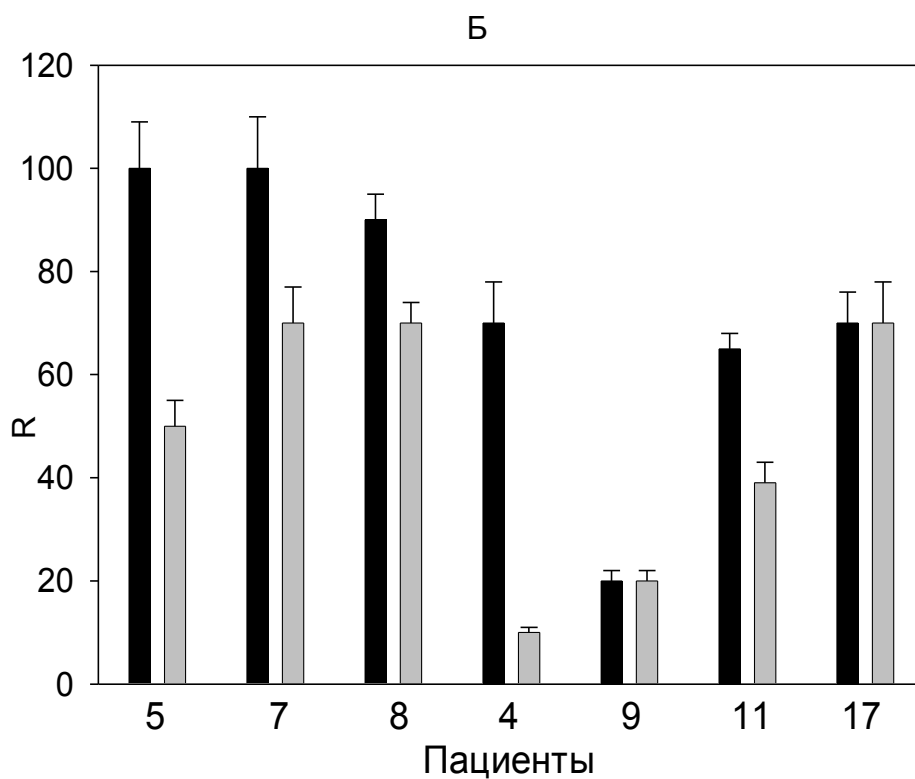


Рис.3 Изменение количества копий мтДНК в периферической крови после проведения курса радиохимиотерапии. А- Пациенты с увеличением количества копий более чем на 100%. В – Пациенты у которых не происходят изменения, а также пациенты у которых уменьшается количество копий мтДНК в периферической крови.

В независимости от того, насколько выраженными были изменения в количестве мтДНК сразу после проведения РХТ, через неделю после ее завершения количество мтДНК у всех пациентов приближается к уровню, предшествующему терапии.

При определении нестабильности хромосомальной ДНК клеток периферической крови пациентов с опухолью молочной железы исследовались аллельные композиции ДНК по восьми STR –локусам: D3S1358, D7S820, D8S1179, D18S51, D21S11, VWA, THOI, FGA. На Рис.3 представлено электрофоретическое разделение аллельных вариантов ДНК в локусах VWA, THOI, FGA, D3S1358, D21S11 пяти из 21 пациента. Пациенты №№ 1,2,15 относятся к группе пациентов с большими изменениями количества копий мтДНК, соответственно; 248, 1300, 800% (Рис.3А). Пациенты №4 и №5 относятся к группе с небольшими изменениями количества копий мтДНК, соответственно; 64,6 и 103,5% (Рис.3Б). При анализе ДНК ни у одного из 21 пациента не было обнаружено каких либо изменений в распределении аллелей по локусам VWA, D3S1358, D7S820, D8S1179, D18S51. В локусах THOI, D21S11, FGA у шести пациентов были выявлены изменения в аллельных композициях ДНК. Наиболее заметные проявления микросателлитной нестабильности зарегистрированы у пациента №2. Еще до проведения РХТ аллельное распределение в локусе D21S11 у данного пациента представлено тремя аллелями, что не соответствует нормальному генотипу. Курс радиохимической терапии не изменил аллельного распределения по данному локусу. Через 1 неделю после окончания курса РХТ у этого пациента обнаружена дестабилизация гетерозиготного генотипа в локусах FGA (происходит элиминация одной аллели) и THOI (обнаружены многочисленные инсерции) (Рис.4).

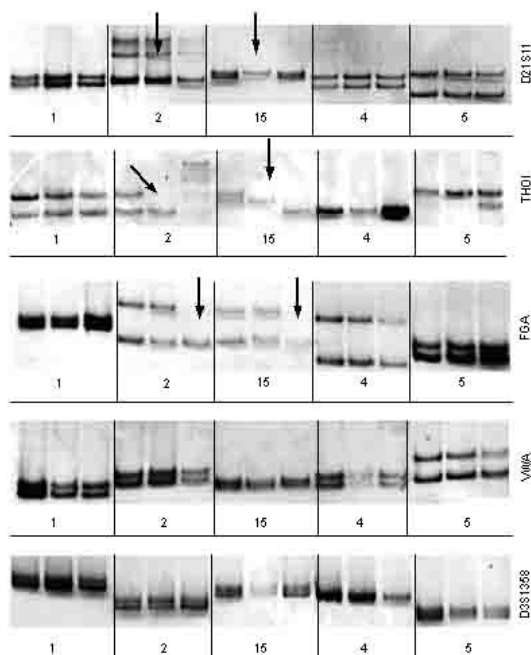


Рис. 4. Индивидуальные генотипические комбинации STR – локусов хромосомальной ДНК. Каждый блок соответствует одному пациенту. Первая дорожка в блоке – до проведения курса радиохимиотерапии, вторая дорожка в блоке – через 1 час после проведения радиохимиотерапии, третья дорожка в блоке – через 1 неделю после проведения РХТ.

У пациента №15 делеция одной аллели в локусе TPO1 обнаружена через 1 час после проведения РХТ, а спустя 1 неделю размер данной аллели уменьшается на несколько нуклеотидов (Рис.4). Микросателлитная нестабильность была обнаружена также у пациентов №№ 4,5,10,14,15,18, 19, 20 и 21 в локусах TPO1, FGA и выражалась в нарушении распределения аллельных вариантов ДНК (См. Таблицу 2).

Таблица 2. Микросателлитная нестабильность и изменения копий мтДНК пациентов до и после проведения РХТ

Пациент – год рождения	Потеря гетерозиготы	Появление артефактных аллелей		Делеции внутри аллели
		После РХТ		
	До РХТ	После РХТ	После РХТ	
1-1944	-	-	-	-
2-1944	+	+	+	+
3-1966	+	-	-	+
4-1947	-	-	-	+
5-1952	-	-	+	-
6-1949	-	-	-	-

7-1973	-	-	-	-
8-1957	-	-	-	-
9-1963	-	-	-	Не опр
10-1943	+	-	-	
11-1950	-	-	-	Не опр
12-1950	-	-	-	Не опр.
13-1952	-	-	-	-
14-1925	+	-	-	+
15-1939	+	-	+	+
16-1947	-	-	-	Не опр.
17-1930	-	-	-	-
18-1925	-	-	+	-
19-1949	-	-		+
20-1926	+	-	+	+
21-1953	-	-	+	-

Обозначения: (+) – обнаружена, (-) – не обнаружена, не.опр – не определялось.

Обсуждение

В настоящее время курс РХТ широко применяется при лечении различных форм раковых патологий. Как правило, он включает в себя многократное облучение и применение различных химических цитостатиков. Известно, что действие облучения и цитостатиков в первую очередь направлено на поражение пролиферирующих клеток опухолей, но очевидно также, что действие таких сильных физических и химических факторов сопровождается блокировкой клеточного цикла, апоптозом пролиферирующих клеток, изменением репликации ДНК и транскрипции РНК в здоровых тканях(38-41).

Ранее было показано, что при онкогенезе количество свободно циркулирующей ДНК в плазме увеличивается, и составляет в среднем 100 нг/мл (42, 43-45), в то время как у здоровых индивидуумов, это количество обычно не превышает 1нг/мл (46). Данные же о том, как, при проведении РХТ меняется исходное количество ДНК вообще, и мтДНК в частности в литературе представлены недостаточно.

Несомненно, что немалый вклад в суммарный пул ДНК, содержащийся в сыворотке периферической крови, вносит мтДНК. В нашей работе мы показали, что РХТ способствует дополнительному увеличению количества мтДНК в периферической крови которая, вероятно, представляет собой обрывки митохондриальной ДНК опухолевых клеток, деструкция которых индуцировалась радиацией и цитостатиками. В связи с этим, мы предполагаем, что количество мтДНК в периферической крови может являться маркером эффективности РХТ, так как фрагменты мтДНК деградирующих опухолевых

клеток поступают именно в кровяное русло. С другой стороны вклад в общее содержание мтДНК в периферической крови могут вносить и клетки крови, в которых содержатся митохондрии. Подтверждением этого факта являются наши исследования, в которых было показано, что даже незначительные дозы ионизирующей радиации могут индуцировать репликацию мтДНК с последующей транслокацией ее в цитозоль клеток (ссылка в цитологии).

Изучение микросателлитной нестабильности у онкологических больных, как было сказано выше, имеет большое практическое значение. Целью таких работ является, как правило, диагностика онкогенеза. В настоящей работе мы показали, что микросателлитная нестабильность может индуцироваться и курсом радио-химиотерапии. Как видно из таблицы 2 большинство наблюдаемых нами генетических нарушений, происходят после проведения РХТ. Известно, что ионизирующая радиация, как и многие цитостатические антибиотики, вызывают повреждение структуры ДНК. При нормальном функционировании клетки эти дефекты устраняются системами репарации. Недавно было показано, что микросателлитная нестабильность может иметь место и в клетках с поврежденной системой репарации неспаренных оснований (47), а дисфункцию последней могут вызывать ДНК-повреждающие агенты (48), к которым, несомненно, относятся как радиация, так и цитостатические антибиотики. Таким образом, исходя из наших результатов, можно полагать, что комбинированное действие радиации и химических генотоксикантов приводит к нарушениям в системе репарации ДНК, результатом которой является регистрируемая нами микросателлитная нестабильность.

Однако в свете последних данных о том, мтДНК может транслоцироваться в ядро и встраиваться в ядерную ДНК *de novo* (49) можно предположить и другой вариант развития событий. При анализе данных представленных в таблице 2 и рис.1, 2 обращает на себя внимание тот факт, что микросателлитная нестабильность, в большинстве случаев наблюдается у пациентов, динамика изменения количества мтДНК которых наиболее выражена, т.е. наблюдается наибольшее увеличение количества фрагментов мтДНК, свободно циркулирующих в крови. Можно предположить, что при большом пуле фрагментов мтДНК, часть этих фрагментов может встраиваться в ядерную ДНК. Процессы встраивания фрагментов мтДНК, как было показано ранее (49), наиболее вероятны во время репарационных процессов, которые, несомненно, в большей степени имеют место при воздействии облучения и цитостатических антибиотиков.

Выстроившиеся в ядерную ДНК фрагменты мтДНК вызывают изменение генотипа, характеризующиеся появлением артефактных аллелей.

Таким образом, можно утверждать, что радио-химиотерапия у некоторых пациентов приводит к значительным изменениям количества копий мтДНК в крови. У этих пациентов также наблюдается изменение генотипа, которое выражается инсерциями и делециями в микросателлитной ДНК.

Благодарности:

Работа была поддержана грантом РФФИ – р-04-97278 и программой президиума РАН «ФНМ».

Авторы выражают благодарность заведующему отделом радиологии онкологического диспансера (г. Балашиха, Московская область) Фрадкину В.Г. за предоставление образцов крови пациентов.

Литература

1. Donnelly J.G. Pharmacogenetics in cancer chemotherapy: balancing toxicity and response. *Ther. Drug Monit.*, 2004, 26, 231-235
2. Danesi, R. De Braud, F Fogli S., Martino De Pas T., Di Paolo A., Curigliano G. and Del Tacca M. Pharmacogenetics of Anticancer Drug Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmacological Reviews*. 2003, 55, 57-103.
3. Wardell TM, Ferguson E, Chinnery PF, Borthwick GM, Taylor RW, Jackson G, Craft A, Lightowers RN, Howell N, Turnbull DM. Changes in the human mitochondrial genome after treatment of malignant disease. *Mutat Res.*, 2003, 525, 19-27.
4. Loeb L.A. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*. 1994, 54: 5059-5063.
5. Sherbet G.W. and Lakshmi M.S. *The genetics of cancer*. 1997, Academic press, San Diego.
6. T. Grundei, H. Vogelsang, K. Ott, J. Mueller, M. Scholz, K. Becker, U. Fink, J. R. Siewert, H. Höfler and G. Keller. Loss of heterozygosity and microsatellite instability as predictive markers for neoadjuvant treatment in gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6, 4782-4788.

7. Prasanna PG, Hamel CJ, Escalada ND, Duffy KL, Blakely WF. Biological dosimetry using human interphase peripheral blood lymphocytes. *Mil. Med.*, 2002, 167(2 Suppl).
8. Carew J.S., Zhou Y., Albitar M., Carew J.D., Keating M.J., Huang P. Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. *Leukemia*. 2003, 17, 1437-1447.
9. Litt, M. and Luty, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. hum. Genet.*, 44, 397-401.
10. Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res.*, 17, 6463-6471.
11. Weber, J.L. and May, P.E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. hum. Genet.*, 44, 388-396.
12. Weber, J.L. and Wong, C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum.Mol.Genet.* , 2, 388-396.
13. Eshleman, J.R. and Markowitz, S.D. (1996) Mismatch repair defects in carcinogenesis. *Hum.Mol.Genet.* , 5, 1489-1494.
14. Arnheim, N. and Shibata, D. (1997) DNA mismatch repair in mammals: role in disease and meiosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 364-370.
15. Lothe, R.A. (1997) Microsatellite instability in human solid tumors. *Mol. Med. Today*, 2, 61-68.
16. Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R., Peterson, G.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., de la Chapelle, A. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260, 812-816.
17. Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Wei, Y.F., Ruben, S.M., Carter, K.C., Rosen, S.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., Fraser, C.M., Adams, M.D., Venter, J.C., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., Watson, P., Lynch, H.T., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1994) Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263, 1625-1629.
18. Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., Fields, P., Marshall, G., Narod, S., Lenoir, G.M., Lynch, H., Feunteun, J., Odeville, P., Cornelisse, C.J., Menko, F.H., Daly, P.A., Ormiston, W., McManus, R., Pye, C., Lewis, C.M., Cannon-Albright, L.A., Petro, J.,

- Ponder, B.A.J., Skolnik, M.H., Easton, D.F., Goldgar, D.E., Stratton, M.R. (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, TRCA26 to chromosome 13q12-13. *Science*, 265, 2088-2090.
19. Yee, C.J., Roodi, N., Verrier, C.S., Parl, F.F. (1994) Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *CancerRes.*, 54, 1641-1644.
20. Knudson, A.G., (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90, 10914-10920.
21. Jass, J.R., Cottier, D.S., Jeevaratnam, P., Pokos, V., Holdaway, K.M., Bowden, M.L., Van de Water, N.S., Browett P.J., (1995) Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet.*, 346, 1200-1201.
22. Aaltonen, L.A., Aslovaara, M.D., Kristo, P., Canzian, F., Hemminki, A., Peltomaki, P., Chadwick, R.B., Kaariainen, H., Eskelinen, M.D., Jarvinen, H., Mecklin, J.P., Chapelle, A. (1998) Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N. Engl. J. Med.*, 338, 1481-1487.
23. Beckman, K.B., Ames, B.N., (1999) Endogenous damage of mtDNA. *Mutat. Res.*, 424, 51-58.
24. Sawyer, D.E., Van Houten, B. (1999) Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat. Res.*, 434, 161-176.
25. Marcelino, L.A., Thilly, W.G. (1999) Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues. *Mutat. Res.*, 434, 177-203.
26. May, A., Bohr, V.A. (2000) Gene-specific repair of a gamma-ray-induced DNA strand breaks in colon cancer cells: no coupling to transcription and no removal from the mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 433-437.
27. LeDoux, S.P., Wilson, G.L. (2001) Base excision repair of mitochondrial DNA damage in mammalian cells. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, 68, 273-284.
28. Dianov, G.L., Souza-Pinto, N., Nyaga, S.G., Thybo, T., Stevnsner, T., Bohr, V.A. (2001) Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. . *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, 68, 285-297.
29. Gaziev, A.I., Podlutskii, A.J. (2003) Low efficiency of DNA repair system in mitochondria. *Tsitologija*, 45(4), 403-417.
30. Khrapko, K., Coller, H., Andre, P., Li, X.-C., Hanekamp, J.S., Thilly, W.G. (1997) Mitochondrial mutation spectra in human cells and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13798-13803.

31. Ozawa, T. (1997) Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol.Rev*, 77, 425-464.
32. Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial disease in mouse and man. *Science.*, 283, 1482-1488.
33. Kubota, N., Hayashi, J.-I., Inada, T., Iwamura, Y. (1997) Induction of particular deletion in mtDNA by X rays depends on the inherent radiosensitivity of the cells. *Radiation Res.*, 148, 395-398.
34. Prithivirajasingh, S., Story, M.D., Bergh, S.A., Geara, F.B., Ang, K.K., Ismail, S.M., Stevens, C.W., Buchholz, T.A., Brock W.A. (2004) Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett.*, 571 (1-3), 227-232.
35. Patrushev, M.V., Patrusheva, V.E., Kasymov V.A., Evdokimovsky E.V., Ushakova T.E., and Gaziev A.I. (2005) The mtDNA Release and Activation of its Replication in Tissues of Irradiated Mice. *Tsitologiya*, in press.
36. Patrushev, M., Kasumov, V., Patrusheva, V., Ushakova, E., Gogvadze, V., and Gaziev, A. (2004) Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 24, 3100-3103.
37. www.cstl.nist.gov/biotech/strbase
38. Anand, S., Verma, H., Kumar, L., Singh, N., (1995) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia lymphocytes by hydroxyurea and adriamycin. *Cancer Lett.* 88, 101-105
39. Ciocca, D.R., Rozados, V.R., Cuello Carrion, F.D., Gervasoni, S.I., Matar, P., Scharovsky, O.G., (2003) Hsp25 and Hsp70 in rodent tumors treatment with doxorubicin and lovastatin. *Cell Stress Chaperones.* 8, 26-36.
40. Skladanowski, A. and Konopa, J. (1994) Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biological activity. (1994) *Biochem. Pharmacol.* 47, 2279-2287.
41. Larson, E.D., Drummond, J.T., (2001) Human mismatch repair and G.T mismatch binding by hMutS α in vitro is inhibited by adriamycin, actinomycin D and nogalamycin. *J. Biol. Chem.* 276, 9775-9783.
42. Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E. M., Leon S. A. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer (Phila.)*, 51: 2116-2120, 1983.

43. Leon S. A., Shapiro B., Sklaroff D. M., Yaros M. J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.*, 37: 646-650, 1977.
44. Stroun M., Anker P., Lyautey J., Lederrey C., Maurice P. A. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 28: 707-712, 1987.
45. Maebo A. Plasma DNA level as a tumour marker in primary lung cancer. *Jpn. J. Thorac. Dis.*, 28: 1085-1091, 1990.
46. Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E. M., Leon S. A. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer (Phila.)*, 51: 2116-2120, 1983.
47. Bacon AL, Farrington SM, Dunlop MG. Mutation frequency in coding and non-coding repeat sequences in mismatch repair deficient cells derived from normal human tissue. *Oncogene*. 2001, 20, 7464-7471.
48. S. Lee, D. Chang, A. Goel, C. R. Boland, W. Bugbee, D. L. Boyle and G. S. Firestein Microsatellite Instability and Suppressed DNA Repair Enzyme Expression in Rheumatoid Arthritis *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 2214-2220
49. M. Ricchetti., F. Tekaiia, B. Dujon Continued colonization of the Human genome by mitochondrial DNA. *PLOS Biology*, 2004, 2, 1313-1325.
50. Patrushev M, Kasymov V, Patrusheva V, Ushakova T, Gogvadze V, Gaziev AI. Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice. // *Mitochondrion*. 2006 V.6 P. 43-47