

ЦИРКУЛИРУЮЩАЯ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ БИОМАРКЕР ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ.

Мельник А.А., к.б.н.

Циркулирующая внеклеточная ДНК (вкДНК) представляет собой внеклеточные фрагменты ДНК, присутствующие практически во всех жидкостях организма, которые образуются как из нормальных, так и из патологических клеток (1). Молекулы вкДНК различаются по источникам и механизмам образования, длине фрагментов, формам циркуляции и модификациям. Они представляют собой деградированные фрагменты ДНК (50-200 пар нуклеотидов, п.н.). В плазме здоровых доноров их концентрация колеблется в пределах от 10 до 100 нг/мл (в среднем 50 нг/мл). Повышение уровня вкДНК в плазме и сыворотке крови определяется при многих заболеваниях, таких как рак, аутоиммунные заболевания, острый инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, инсульт, диабет, гепатит, рентгеновском облучении, при патологии плода и др. Уровень вкДНК может быть предиктором появления того или иного заболевания, а также индикатором отягощения его течения. Внеклеточная ДНК определяется в различных внеклеточных жидкостях организма - плазме, сыворотке, моче, слюне и спинномозговой жидкости.

Молекулы вкДНК были открыты в системе кровообращения человека Mandel P. и Metais P. в 1948 году (2). Спустя семнадцать лет, в 1965 году Bendich A. et al. (3) предположили, что происходящая от раковых клеток вкДНК была определяющим фактором онкогенеза, способствующая метастатическому распространению рака. В 1966 году Tan E. et al. (4) впервые обнаружили связь между высоким уровнем вкДНК и таким заболеванием как системная красная волчанка (СКВ). Одиннадцать лет спустя Leon S. et al. (5) продемонстрировали с помощью радиоиммунохимического анализа, что у онкологических больных уровень вкДНК выше, чем у нормальных субъектов. Более того, уровни вкДНК снижались при успешной противоопухолевой терапии. Однако из-за технологических ограничений только 12 лет спустя, в 1989 году Stroun M. et al. (6) предоставили первые экспериментальные данные, подтверждающие происхождение вкДНК у онкологических больных. Авторы наблюдали нестабильность, специфичную для опухолевой ДНК и таким образом, ее стали называть циркулирующей опухолевой ДНК. К сожалению, из-за отсутствия знаний о составе, функциях, биологического и эволюционного происхождения, вкДНК не получила значительного внимания в течение последующих 55 лет после ее открытия. И только прогресс методов молекулярной биологии 1990-х годов, связанный с разработкой проекта человеческого генома и его полная расшифровка в 2003 году, позволили продолжить исследовательские работы в данном направлении. Так, Vasioukhin V. et al. (7) и Sorenson G. et al. (8) показали опухолеспецифические (N-RAS) мутации в образцах плазмы больных аденокарциномой поджелудочной железы и острой миелогенной лейкемией. Параллельно с этими работами в клинической практике проводились исследования в других направлениях. В 1997 году Lo Y. et al. (9) идентифицировали вкДНК плода в плазме и сыворотке матери. Эти наблюдения открыли ряд возможностей, позволяющих предположить, что ДНК материнской плазмы/сыворотки является полезным источником для неинвазивной пренатальной диагностики генетических нарушений в акушерстве.

Хотя предыдущие исследования показали, что ДНК опухоли и ДНК плода присутствуют в плазме и сыворотке у больных раком и беременных женщин, первые доказательства митохондриальной вкДНК (мт-вкДНК) в плазме и сыворотке были обнаружены в 2000 г. Zhong S. и др. (10). В этом исследовании мт-вкДНК определяли в плазме и сыворотке крови у здоровых людей и пациентов с сахарным диабетом. Более того, авторы также обнаружили митохондриальную мутацию, обычно характерную для пациентов с материнским унаследованным диабетом в обеих выборках пациентов с диабетом. На

данный момент в номенклатуре вкДНК используются следующие термины - ядерная вкДНК (я-вкДНК) и мт-вкДНК. При этом каждый тип вкДНК обладает различной структурой и функциями.

Источник и механизмы высвобождения вкДНК в организме.

Внеклеточная ДНК не является пассивным биомаркером при патофизиологических состояниях, а играет активную роль во многих процессах, таких как воспаление, иммуномодуляция, опухолевый рост и т. д. В большинстве клинических случаев анализируется непосредственно ядерная вкДНК, она находится в жидкостях организма в различных формах. Различают два основных типа жидкостей человеческого организма:

1. циркулирующие жидкости (кровь и лимфатические жидкости);
2. жидкости, не входящие в состав системы кровообращения (стул, слюна, мокрота, моча, сперма, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость, желчь, бронхиальный лаваж, слезы).

Жизненный цикл внеклеточной циркулирующей ДНК представлен на рисунке 1.



Рис.1. Жизненный цикл внеклеточной циркулирующей ДНК.

Как известно, вкДНК циркулирует в крови в составе апоптотических телец, микровезикул, нуклеосом, экзосом, нуклеопротеиновых комплексов с белками крови и в свободном виде. Считается, что источниками появления вкДНК в крови являются процессы гибели клеток, созревание эритроцитов, секреция ДНК клетками, а также бактерии и вирусы.

Различные механизмы позволяют высвобождать фрагменты ДНК из внутриклеточного и внеклеточного компартментов. Этот процесс выброса вкДНК может происходить у здоровых и больных индивидумов в кровообращение путем:

- 1.) апоптоза;
- 2.) некроза;
- 3) активного высвобождения ДНК;
- 4) из экзогенных источников.

1. Апоптоз.

Апоптоз (от греч. «отделение лепестков от цветов», вариант гибели клетки, при котором клетка распадается на фрагменты, поглощаемые другими клетками) также известный как запрограммированная гибель клеток, является важной частью поддержания физиологического клеточного гомеостаза и предназначен для удаления нежелательных и поврежденных клеток. Существует большое количество разнообразных состояний, как физиологических, так и патологических, которые могут вызвать апоптоз. Механизмы апоптоза являются сложными и включают энергозависимый каскад различных молекулярных событий.

Апоптоз характеризуется упорядоченной «разборкой» клетки изнутри, в результате которой хромосомная ДНК расщепляется на олигонуклеосомальные сегменты, ядро делится на дискретные субъединицы, а сама клетка разбивается на множественные окруженные мембраной фрагменты, чья наружная поверхность маркируется большим числом фосфатидилсериновых молекул, что ведет к их быстрому поглощению фагоцитами. Перемещение фосфатидилсерина на внешнюю мембрану сегодня рассматривается как одно из событий гибели клетки по типу апоптоза. Дополнительно к фрагментации ДНК, апоптоз морфологически характеризуется уплотнением цитоплазмы, ядерным пикнозом, конденсацией хроматина, округлением клетки, сжатием цитоскелета и образованием мембраносвязанных апоптотических телец, которые быстро фагоцитируются и перевариваются макрофагами или соседними клетками без активации иммунного ответа.

В основном, апоптоз осуществляется семейством протеаз, известных как каспазы (цистеинил-аспартат-специфические протеазы). Каспазы находятся в клетке в виде неактивных зимогенов и активизируются путем протеолитического расщепления. Апоптоз инициируется эффекторными каспазами, которые активируются по внешнему и внутреннему пути, запускаемые рецепторами смерти и внутриклеточными стимулами, такими как окислительный стресс. Внутренний митохондриальный путь апоптоза начинается в клетке, когда токсические повреждения, включая окислительный стресс, вызывают снижение митохондриального мембранного потенциала, приводящего к открытию пор митохондриальной мембраны и высвобождению цитохрома С и других субстанций в цитоплазму. Напротив, внешний путь инициируется экстракеллюлярными событиями через связующие рецепторы клеточной поверхности к фактору некроза опухоли суперсемейства лигандов смерти (superfamily death ligands), включая TNF α и Fas лиганды. Многие исследования предполагают, что основная часть вкДНК, обнаруженная у здоровых и больных людей, высвобождается во время апоптоза. Отличительным признаком апоптоза является расщепление хромосомной ДНК, в основном на фрагменты (50–300 п.н.), а затем на кратные нуклеосомные единицы (180–200 п.н.) через активируемую каспазой ДНКазу (11,12). Биохимическим признаком апоптоза считается межнуклеосомная фрагментация ДНК кальций-зависимыми эндонуклеазами на фрагменты двухцепочечной ДНК длиной 180–200 п.н. Из-за высокой эффективности механизмов фагоцитарной очистки наличие апоптотических клеток непродолжительно.

2. Некроз.

Некроз (от греч. «мертвый») – это случайная форма гибели клеток в ответ на физическое или химическое повреждение, которое характеризуется набуханием клеток и быстрой потерей целостности плазматической мембраны, что приводит к выбросу внутриклеточного содержимого. Такие внешние факторы как вредные внешние раздражители к которым относятся инфекции (бактерии, вирусы, грибки, паразиты), токсины, гипоксия и экстремальные условия окружающей среды (тепло, радиация или ультрафиолетовое излучение) приводят к необратимому повреждению ткани и гибели клеток в результате некроза. Jahr et al. (13) предположили, что более длинные фрагменты вкДНК (т.е. > 10 п.н.) часто наблюдаются у онкологических больных, что указывает на некроз. Во многих исследованиях сообщалось, что фрагменты, высвобождаемые из некротических клеток, часто намного больше, чем апоптотический фрагмент ДНК потому что, несмотря на то, что некроз происходит быстрее, чем апоптоз, удаление некротических клеток происходит медленнее. Некроз приводит к неспецифическому расщеплению хроматина, что приводит к высвобождению ДНК. Это может происходить при травме и сепсисе. При этом уровни вкДНК коррелируют с тяжестью травмы и посттравматическими осложнениями (14-16). Хотя роль некроза в повышении уровня вкДНК, наблюдаемая у пациентов с ревматической болезнью, не были тщательно изучены, тем не менее некоторые исследования,

проводимые с участием пациентов с СКВ предполагают, что некротическая гибель клеток может быть основным источником вкДНК. (17-20).

3. NETs (внеклеточные ловушки нейтрофилов), экзосомы и энуклеация эритробластов.

В активном высвобождении ДНК могут выступать NETs (neutrophil extracellular traps, внеклеточные ловушки нейтрофилов), экзосомы и энуклеация эритробластов.

NETs - это сети внеклеточной ДНК, основными компонентами которых являются гистоны, эластаза, миелопероксидаза, катепсин G, лактоферрин, желатиназа, лизоцим и другие антимикробные пептиды и гранулярные белки, которые вовлечены в процесс прямого уничтожения патогенов (21,22). Процесс образования NETs называется НЕТоз и может быть вызван различными индукторами: микроорганизмами, бактериальными компонентами, активированными тромбоцитами, комплементарными пептидами, аутоантителами, IL-8, перекисью водорода, кристаллами урата. NETs являются важным механизмом защиты от бактериальных, вирусных, грибковых и паразитарных инфекций. Тем не менее, недавние данные свидетельствуют о том, что NETs могут играть роль в неинфекционных заболеваниях, включая системную красную волчанку, а также при атеросклерозе, повреждении эндотелиальных клеток, васкулите, травме, тромбозе, раке, сепсисе, воспалительной реакции, при интенсивных физических тренировках (23-32). Механизм образования NETs заключается в деконденсации ядерного хроматина и дезинтеграции ядерной оболочки с одновременным нарушением целостности мембран лизосомальных гранул, за которым следует высвобождение реактивных форм кислорода. Активированный нейтрофил еще сохраняет свою жизнеспособность, когда в нем происходит смешивание ядерного хроматина с содержимым бактерицидных гранул и формируется сетеподобная структура, секретлируемая впоследствии во внеклеточное пространство. Нейтрофилы, после высвобождения NETs, подвергаются клеточной гибели, которая отличается от апоптоза и некроза. Имеется две формы НЕТоза – суицидальный и витальный.

Суицидальный НЕТоз - это программа гибели клеток, которая возникает, когда возбудители активируют нейтрофилы. Этот процесс приводит к деконденсации хроматина, клеточного и ядерного лизиса мембран и, наконец, высвобождению NETs. Суицидальный НЕТоз может потребовать несколько часов, даже при высоком уровне стимуляции антигеном. С другой стороны, **витальный НЕТоз** позволяет высвобождать NETs через пузырьки ядра, в результате чего образуется везикула, заполненная ДНК которая подвергается экзоцитозу, оставляя неповрежденной плазматическую мембрану без гибели нейтрофилов (33). Витальный НЕТоз включает везикулярный перенос ДНК из ядра во внеклеточную среду, способствуя циркуляции вкДНК. Эти безъядерные цитопласты способны отслеживать и поглощать живые бактерии. Хотя НЕТоз впервые был описан у нейтрофилов, аналогичные процессы были отмечены в других иммунных клетках, включая эозинофилы, моноциты, В-клетки, тучные клетки, базофилы и макрофаги, которые вместе именуются «ЭТозом».

Экзосомы - это небольшие везикулы размером 30–100 нм, образуемые путем высвобождения и слияния мультивезикулярных телец эндосомального происхождения с плазматической мембраной. В состав экзосом входят нуклеиновые кислоты, белки, липиды, мРНК, микроРНК, вкДНК и другие метаболиты. Они модулируют различные физиологические и патологические процессы (34). Более 93% амплифицируемой вкДНК плазмы присутствует в экзосомах. Содержание экзосом может варьироваться в зависимости от их клеточного происхождения и стимулов, модулирующих их высвобождение из клеток.

Дополнительным механизмом активного высвобождения ДНК является высвобождение ядер из **эритробластов**. Зрелые эритроциты не содержат ядер. Энуклеация эритробластов является этапом сложного процесса созревания эритроцитов до высокофункциональной специализированной клетки. По окончании дифференциации предшественников

эритроидов, среди происходящих изменений на этой стадии остановки клеточного цикла, отмечается конденсация хроматина и ядерная поляризация, которые важны для энуклеации. Затем эритробласты теряют все свои органеллы и высвобождают свои ядра из-за процесса, зависящего от реорганизации адгезионных белков в плазме. ДНКазы II из лизосом макрофагов отвечают за расщепление ДНК и удаление ядер эритроидных клеток-предшественников. Таким образом, энуклеация эритробластов служит в первую очередь источником вкДНК в кровотоке. Lam W et al. (35) продемонстрировали, что кроветворные клетки могут вносить значительный вклад в происхождение вкДНК. Это продуцирование вкДНК напрямую связано с эритропоэтической активностью костного мозга.

4. Пироптоз.

Пироптоз - это вид программируемой литической формы воспалительной гибели клеток, вызванный активацией каспазы-1 в ответ на различные патогены (36). Активация воспалительных каспаз, которые, в свою очередь, опосредуют последующие процессы, включают процессинг провоспалительных цитокинов, IL-1 β и IL-18, а также литические события, связанные с пироптозом (37–39). На ранних этапах гибели клетки в ней образуются поры на мембране каспазозависимым образом, что в конечном итоге приводит к лизису клеток и высвобождению внутриклеточного воспалительного содержимого, включая IL-1 β и IL-18. При пироптозе, так же как при апоптозе, наблюдается конденсация хроматина и фрагментация ДНК. Если при апоптозе каспаза активирует дезоксирибонуклеазу - фермент, расщепляющий ДНК на фрагменты до 200 пар нуклеотидов, то при пироптозе каспаза-1 активирует специфическую эндонуклеазу. Более того, при пироптозе разрушение ДНК не является необходимым условием для гибели клетки. Показано, что подавление фрагментации ДНК ингибиторами нуклеаз не предотвращает лизис клеток при пироптозе.

5. Клиренс вкДНК.

Важным компонентом в повышении уровня вкДНК является нарушение механизмов клиренса. В исследованиях клиренса вкДНК было показано, что в физиологических условиях вкДНК быстро разрушается эндонуклеазами и выводится из кровотока через несколько систем органов, включая селезенку, печень и почки (40–42). Многие факторы могут влиять на способность ДНКазы чтобы очистить вкДНК, в том числе, входит ли вкДНК в комплекс с белками, нуклеосомами и/или антителами, а также находится ли вкДНК в свободно циркулирующей форме или инкапсулирована в заключенные в мембраны частицы, включая экзосомы и апоптотические тела. Кроме того, имеет значение ее внутриклеточное происхождение. Например, ядерная и митохондриальная вкДНК могут иметь разные структурные характеристики и устойчивость (43–45). Эффективное расщепление свободной и связанной с белком ДНК осуществляется внеклеточными нуклеазами, ДНКазой I и ДНКазой I-подобная III (ДНКазы I и L3).

7. Воспалительный потенциал вкДНК

В физиологических условиях вкДНК обычно не проявляет воспалительных свойств из-за ее быстрой деградации, а также неспособности для доступа к сенсорам внутриклеточной ДНК. В соответствии с этим предположением, вкДНК не индуцировала иммунные ответы на плазмацитоидные дендритные клетки (pDC), которые являются сильнодействующими респондентами на микробные нуклеиновые кислоты (46). Считалось, что толерантность к собственной ДНК обусловлена последовательностью различия в составе собственной и микробной ДНК. Однако многочисленные исследования показали, что собственная ДНК может быть иммуностимулирующим фактором при условии доступа к внутриклеточным сенсорам ДНК (47). Эти белки-носители, часто повышены при воспалительных заболеваниях и могут способствовать провоспалительным реакциям.

Внеклеточная ДНК как маркер при различных патологиях.

В последние годы вкДНК как в плазме, так и в сыворотке изучается как потенциальный биомаркер в качестве неинвазивного прогностического и диагностического биомаркера, а также как инструмент неинвазивного скрининга многих заболеваний. Определение концентрации внеклеточной ДНК позволяет в ряде случаев оценить уровень гибели клеток при патологии или при действии повреждающих факторов.

Внеклеточная ДНК попадает в циркуляцию различными путями (рис.2).

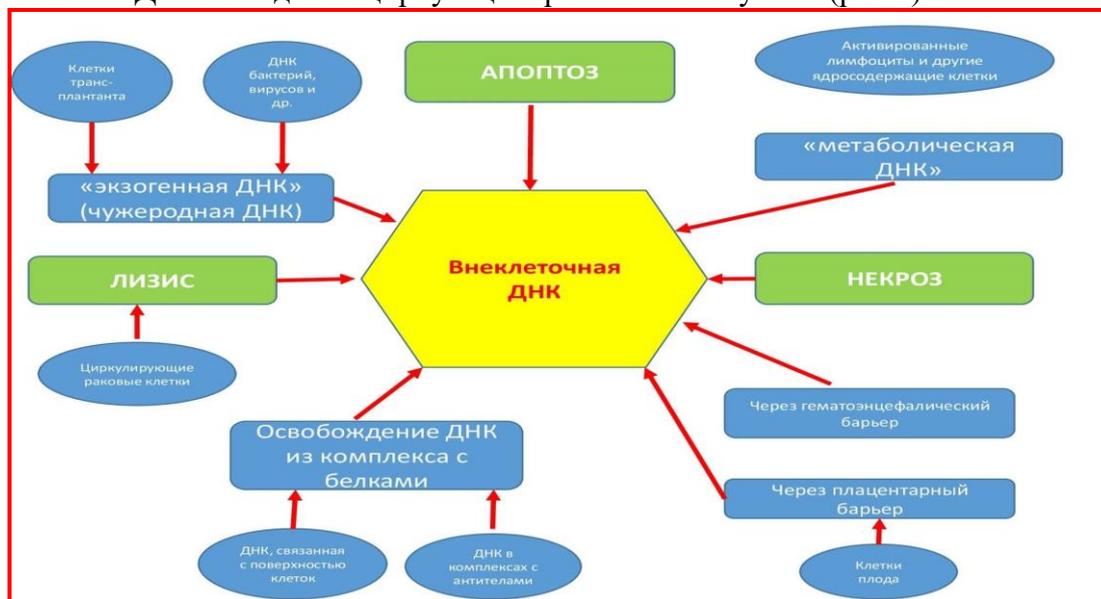


Рис.2. Внеклеточная ДНК попадает в циркуляцию различными путями.

1. Роль вкДНК в клинической онкологии.

В настоящее время в мире отмечается большая распространенность онкологических заболеваний, что инициирует ученых к поиску новых биомаркеров для ранней диагностики, мониторингу течения и прогнозу данной патологии. Было обнаружено, что при многих видах опухолей определяется повышенный уровень вкДНК в периферической крови.

Концентрация внеклеточной ДНК в плазме здоровых доноров в среднем не превышает 50 нг/мл, а при развитии онкологических заболеваний ее концентрация увеличивается и составляет от 10-1200 нг/мл до 2160 нг/мл. В крови онкологических больных ДНК опухолевого происхождения в суммарном пуле циркулирующих ДНК составляет от ~ 1,9% до 93%. Анализ вкДНК как диагностический инструмент в онкологии используют уже более 20 лет, применяя при раках легких, головы и шеи, пищевода, молочной железы, печени, толстой кишки, поджелудочной железы, почек и др. (48-55). Принадлежность вкДНК к опухолевым клеткам можно определять по мутациям в ряде генов (например, в гене p53), наличие мутаций онкогенов, генов-супрессоров опухоли или микросателлитным изменениям. В целом уровни вкДНК значимо связаны с более высокой стадией опухоли, которая коррелировала с худшей выживаемостью.

В онкодиагностике появилось новое направление – «жидкая биопсия», которая позволяет в реальном времени анализировать геном опухоли. При этом, если игла для биопсии берет на исследование только небольшую часть опухоли, то образец крови, содержащий вкДНК представляет каждую раковую клетку в организме (рис.3).



Рис.3. Внеклеточная ДНК плазмы для анализа опухоли.

Ранняя диагностика рака, стадия заболевания и прогноз.

Появление иммунотерапии рака произвело революцию в лечении пациентов с различными опухолями, значительно продлевая выживаемость многих пациентов, особенно на поздних стадиях рака. Однако эффективность этих методов лечения может быть значительно увеличена за счет внедрения клинических методов, позволяющих бессимптомного скрининга населения, ранней диагностики и локального лечения широкого спектра как распространенных видов рака, так и смертельных типов опухолей. Однако, несмотря на многообещающие результаты и годы исследований по этой теме, ранняя диагностика рака остается чрезвычайно сложной задачей. Маленький размер солидных опухолей на ранней стадии затрудняет их дифференциацию, что приводит либо к ложноотрицательным результатам, либо к риску высокого уровня ложноположительных результатов.

Недавние исследования показывают, что технологический прогресс при анализе вкДНК может преодолеть эти проблемы и, возможно, ускорить раннюю диагностику рака (56). Многочисленные исследования продемонстрировали возможность того, что мутации, связанные с раком могут быть обнаружены в вкДНК на ранней стадии заболевания (57-62), перед наличием симптомов (63-66) и до 2-х лет до постановки диагноза (67,68). Хотя эти исследования демонстрируют потенциал вкДНК как маркера для раннего обнаружения и диагностики рака, есть серьезные проблемы, которые необходимо преодолеть, прежде чем это будет возможным применить в клинических условиях.

Реальной целью ранней диагностики рака является обнаружение опухоли диаметром примерно 5 мм ($0,07 \text{ см}^3$), поскольку это бессимптомная стадия, локализованная, с меньшей вероятностью прогрессирования и является излечимой. Однако, кажется маловероятным, что эта цель может быть достигнута с помощью текущей стратегии анализа вкДНК. Действительно, некоторые данные говорят о том, что современные методы позволяют надежно обнаруживать опухоли только диаметром более 1 см ($0,5 \text{ см}^3$) (69). Хотя это тоже считается опухолью на ранней стадии и обычно относится к пациентам, которые уже проявляют клинические признаки и симптомы рака. Более того, опухоли этого размера можно определить с помощью функциональных методов. Необходимо отметить, что расчеты для оценки концентрации вкДНК опухолевого происхождения, часто основаны только на экстраполяции опухоли и размере. Однако количество вкДНК, выделяемое опухолями, не только зависит от размера, но также и от активности оборота, скорости распространения, васкуляризации и перфузии. Следовательно, разные типы опухолей одинакового размера могут высвобождать различное количество вкДНК. Более того, на конечную концентрацию вкДНК в циркуляции влияет скорость ее деградации и клиренс.

Стадия опухоли и прогноз.

За последние три десятилетия многочисленные исследования показали, что уровни вкДНК обычно выше у онкологических больных по сравнению с здоровыми (70). Кроме того, было продемонстрировано, что концентрация циркулирующей вкДНК коррелирует с размером опухоли (71), стадией заболевания (72) и метастатической нагрузкой. Так, в

исследовании 640 пациентов с различными типами рака на различных стадиях заболевания, было показано, что уровни вкДНК примерно в 100 раз выше у пациентов с болезнью IV стадии по сравнению с пациентами I стадии болезни, что дает приблизительную пропорцию для оценки размера опухоли по концентрации вкДНК (73). У пациентов I стадии менее 10 копий мутантной вкДНК присутствовали в 5 мл плазмы, в то время как пациенты с запущенным раком имели более 100 мутантных вкДНК копий в 5 мл плазмы. Помимо этих существенных различий, уровни вкДНК опухолевого происхождения значительно различаются между пациентами с одним и тем же типом рака и стадией заболевания. Это может объясняться плохой васкуляризацией опухоли, гистологическими различиями, перфузией, активностью и пролиферацией. Кроме того, выброс вкДНК из опухоли в кровотоки может ограничиваться биологическими компартментами. Например, концентрация мутантных молекул вкДНК в спинномозговой жидкости пациентов с первичной опухолью мозга значительно выше, чем в плазме. Хотя концентрация вкДНК не может быть использована как эффективное прогностическое и диагностическое средство, этот параметр можно использовать для мониторинга изменений, происходящих с опухолью в процессе лечения, а так же для раннего выявления онкологических патологий.

2. Пренатальная диагностика.

В структуре младенческой смертности на долю врожденных пороков развития приходится около четверти всех случаев. Цель пренатальной диагностики - снизить как частоту, так и распространенность унаследованных состояний, которые оказывают сильное влияние как на психологическое, так и на экономическое аспекты жизни людей. В течение последних двух десятилетий большой интерес вызывает поиск подходов к проведению неинвазивной диагностики генетических заболеваний плода с использованием фетального материала, циркулирующего в материнском кровотоке. Одним из наиболее значительных открытий для применения вкДНК была идентификация фетального вкДНК в материнской крови, что позволило разработать генетические тесты в дородовой помощи. Неинвазивный пренатальный тест (НИПТ) - последнее нововведение в область пренатальной диагностики, направленный на оказание помощи практикующим врачам в ведении беременности, а также будущим родителям в отношении их будущего ребенка.

Еще в 1997 году Lo Y. и др. впервые показали присутствие фетальной внеклеточной ДНК в плазме крови беременных женщин (9). Предполагается, что вследствие апоптоза клеток плаценты, а также деградации клеток плода, проникающих через фетоплацентарный барьер, ДНК плода попадает в кровь матери. Данное открытие послужило стимулом к интенсивному изучению свободной ДНК плода в качестве потенциального субстрата для неинвазивной дородовой диагностики. Количество фетальной ДНК оценивается в среднем от 0,4 до 11,4% от общего количества ДНК плазмы крови. Внеклеточная ДНК может быть обнаружена в материнской плазме уже через 5-7 недель беременности (74). Ее концентрация увеличивается во время беременности от 0,1% в неделю между 10 и 21 неделями беременности до 1% в неделю после 21 недели (75).

Использование плазменной ДНК в диагностических целях тщательно изучено и внедрено в перинатологии, где теперь используют материнскую кровь, содержащую эмбриональную ДНК, для диагностики генетических нарушений плода еще в утробе матери (рис.4.) В крови беременных женщин источниками фетальной ДНК являются апоптоз клеток трофобласта, плаценты и гемопоэтические клетки.

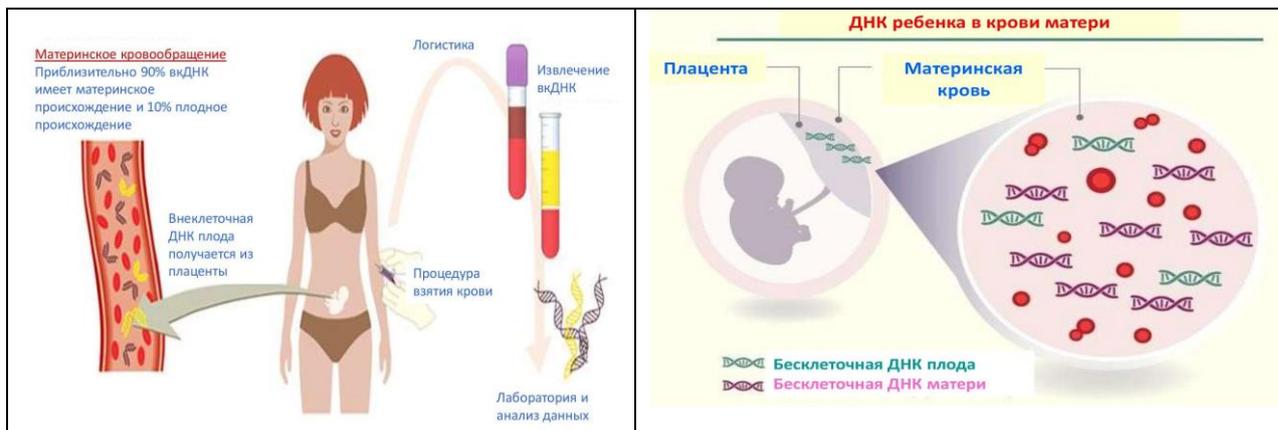


Рис. 4. Использование материнской крови, содержащую эмбриональную ДНК, для диагностики генетических нарушений плода.

С 2011 г. неинвазивные пренатальные тесты вкДНК стали коммерчески доступными для определения отцовства, пола плода и выявления хромосомных отклонений, особенно для выявления наиболее распространенных хромосомных анеуплоидий, таких как синдром Дауна. В настоящее время вкДНК плода уже используется для клинического скрининга генетических аномалий плода при беременностях с высоким риском. Точность метода составляет 99,9%.

Методы НИПТ представлены на рисунке 5.



Рис. 5. Методы неинвазивного пренатального теста.

1. Массивное параллельное геномное секвенирование (*massively parallel shotgun sequencing*):

- Секвенированные последовательности соотносятся с участками определенных хромосом;
- С использованием программного обеспечения производят количественное сравнение полученных результатов по 21, 18, 13 хромосомам с результатом, характерным для эуплоидной беременности и делают вывод о наличии или отсутствии хромосомной патологии у плода;
- Данный метод используется компаниями Sequenom и Verinata и позволяет создать библиотеки фрагментов низкомолекулярной ДНК (материнской и плодной).

2. Таргетный анализ.

1. Таргетное секвенирование:

- Производится секвенирование не всего генома, а только интересующих хромосом, что позволяет повысить точность результата. Требуется применения специально разработанных компьютерных алгоритмов;

- Данный метод используется компанией Ariosa.

2. Микрочипы

- На микрочипе расположены олигонуклеотиды - короткие последовательности нуклеотидов, которые соответствуют искомым участкам ДНК. С ними связываются только полностью комплементарные участки исследуемой ДНК.

3. Секвенирование с последующим сравнением профиля SNPs материнской и плодной ДНК.

NATUS - Next-generation Aneuploidy Testing Using SNPs:

- После секвенирования последовательности исследуемых хромосом анализируются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), позволяющие отличить фетальные и плодные хромосомы;

- Данный метод используется компанией Natera (рис.6).



Рис.6. Секвенирование с последующим сравнением профиля SNPs материнской и плодной ДНК.

3. Аутоиммунные заболевания.

До недавнего времени считалось, что нуклеиновые кислоты являются иммунологически инертными молекулами. Так было показано, что при введении животным геномной ДНК позвоночных специфические аутоантитела к нативной ДНК (нДНК) не индуцируются. Однако такая ситуация имеет место только при условии нормально функционирующей системы фагоцитоза. Когда вДНК апоптотических клеток Jurkat вводили интактным мышам и мышам с «выключенными» (с помощью модифицированных липосом) макрофагами, то оказалось, что у интактных мышей избыточное введение вДНК индуцировало апоптоз самих макрофагов и интенсивное вторичное повышение концентрации вДНК в плазме крови (уже за счет умерших макрофагов), образуя «порочный круг». У мышей с функционально-неактивными макрофагами в ответ на введение ДНК умерших клеток развивалась воспалительная реакция с выработкой антинуклеарных антител (ААТ). В работах Lorenz Н-М и Wiktorowich К. (76,77) отмечена роль вДНК в формировании аутоиммунных реакций у взрослых лиц. Это проявлялось появлением в кровотоке большого количества ДНК, что вызывало аутоиммунный ответ, реализуемый в виде выработки ААТ к ДНК, способных повреждать собственные ткани.

Системная красная волчанка.

Системная красная волчанка СКВ - прототип аутоиммунного заболевания, поражающего некоторые ткани и системы органов, включая кожу, суставы и почки.

В большинстве исследований сообщается о связи между вкДНК и активностью заболевания при СКВ. Исследования путем серийной выборки вкДНК из сыворотки продемонстрировали, что повышение вкДНК у пациентов с СКВ связаны с обострением болезни и не обнаруживаются после клиническое улучшение (78). Уровни вкДНК повышены в начале болезни и значительно снижаются, когда болезнь стабилизируется (79-81).

Ревматоидный артрит.

Как и в случае с СКВ, в большинстве исследований сообщалось о повышенных уровнях циркулирующей вкДНК у пациентов с ревматоидным артритом (РА) по сравнению с контролем (82-86). вкДНК сыворотки может использоваться в качестве маркера прогрессирования заболевания у пациентов при РА.

4. Острый инфаркт миокарда.

В настоящее время в качестве золотого стандарта для диагностики острого инфаркта миокарда (ОИМ) используется определение концентрации в крови кардиоспецифического высокочувствительного тропонина. Однако у некоторых пациентов, в том числе реаниматологического профиля, чувствительность тропонинового теста может быть снижена. Ложноположительный тест возможен при физической нагрузке, сепсисе, почечной недостаточности (в связи с нарушением клиренса) и приеме кардиотоксичных препаратов. Другим недостатком метода является короткий период информативности тропонина после сосудистой катастрофы, в связи с чем необходим поиск дополнительных биомаркеров ОИМ. Jin Xie et al. (87) проследили динамику концентрации вкДНК у пациентов с ОИМ в течение двух периодов: первых 5 дней и далее до 5 месяцев. В качестве контрольной группы были выбраны здоровые доноры, а групп сравнения - пациенты с хроническими сердечно-сосудистыми заболеваниями. По наличию осложнений всех пациентов разделили на 2 группы: с осложнениями - стенокардия, аритмия, повторный инфаркт миокарда (группа 1) и без осложнений (группа 2). В первые 5 суток у всех пациентов с ОИМ наблюдалось 5-10-кратное увеличение концентрации вкДНК относительно таковой у здоровых доноров (группа сравнения), при этом в первой группе значение содержания вкДНК оказалось статистически значимо выше в 1,8 раза. У пациентов, перенесших ОИМ, динамика вкДНК оказалась различна. Так, в группе 1 концентрация вкДНК оставалась повышенной относительно ее значения в группе сравнения и выше относительно группы 2, в которой она за 3 месяца снижалась до уровня, выявляемого у пациентов с хроническими заболеваниями сердца. Таким образом, данные этой работы указывают на возможность использования вкДНК для прогнозирования исходов ОИМ с более широким временным интервалом. Nai Zemmour et al. (88) подтверждают, что ОИМ сопровождается повышением концентрации в крови общей вкДНК, но чувствительность этого теста по сравнению с тропониновым оказалась ниже.

5. Сепсис.

Сепсис является жизнеугрожающим состоянием, возникающим в результате нарушения функции органов вследствие дезадаптации ответа организма на инфекционный процесс. При развитии нарушений циркуляции, клеточной или метаболической дисфункции возникает септический шок, который еще более увеличивает риск смертельного исхода - до 60% и более. Исследования показывают, что у значительной части выписанных пациентов, перенесших сепсис, отмечается снижение качества жизни, они страдают неврологическими расстройствами и обладают иммуносупрессорным статусом. вкДНК в отношении сепсиса рассматривается как биомаркер и как элемент патогенеза. Rannikko et al. (89) была определена прогностическая значимость циркулирующей в плазме ДНК при сепсисе.

Другое патогенетическое звено сепсиса связано с действием активированных продуктами бактерий лейкоцитов, их адгезией на эндотелии сосудов. Для поиска места вкДНК в путях патогенеза сепсиса Schneck et al. (90) рассмотрели ее влияние на систему гемостаза.

Оказалось, что при повышении концентрации вкДНК сокращается время свертывания и нарушается процесс фибринолиза. Под действием ДНКазы 1 нейтрофильные внеклеточные ловушки, образованные благодаря протрузии ДНК сквозь мембрану лейкоцитов, разрушаются и фрагменты вкДНК и гистонов высвобождаются, попадая в циркулирующую кровь. Последние, в свою очередь, активируют синтез тромбина тромбоцитами.

6. Трансплантация.

Трансплантация органов от живых доноров - реальный способ сохранить жизнь пациентам с тяжелой органной недостаточностью. Однако распознавание аллотрансплантата иммунной системой реципиента и, следовательно, последующее отторжение - главное препятствие в терапии трансплантации органов. Для долгосрочного выживания трансплантологам важна точная и ранняя оценка аллотрансплантата. Характеристика донорской вкДНК, полученной из трансплантированного органа, становится потенциально полезным инструментом для контроля посттрансплантационного отторжения аллотрансплантата (91).

В последнее время появилось несколько перспективных исследований, в которых доказано повышенное количество вкДНК полученный из трансплантатов, которые были связаны с отторжением при трансплантации печени и почек (92,93). Сообщается, что высокий коэффициент коротких (105-145 п.н.) к длинным фрагментам вкДНК (160-170 п.н.) при трансплантации печени указывает на раннюю тенденцию повреждения аллотрансплантата. Оценка повреждение аллотрансплантата при использовании соотношения коротких и длинных фрагменты вкДНК полностью соответствовали этому на основе вкДНК, количественно определяемой по хромосоме Y. Следовательно, анализ размера вкДНК полученный из трансплантата, может быть потенциальным подходом к оценке повреждения аллотрансплантата. При трансплантации сердца процент вкДНК меньше 1% наблюдался у стабильных пациентов и увеличивался до 5% во время эпизода отторжения. Это относится и к трансплантации легких и почек. Метод под названием «динамика геномного трансплантата» (GTD) - один из первых разработанных подходов для различия молекул вкДНК донора и реципиента, основанный на количественной оценке уникальных однонуклеотидных полиморфизмов (94). Еще одним применением вкДНК является мониторинг дозы лекарственного иммуносупрессора, эффективного для предотвращения токсичности и корректировки дозы.

7. вкДНК как биомаркер эндотелиальной дисфункции.

Эндотелий играет фундаментальную роль в гомеостазе организма как важный аутокринный, паракринный и эндокринный орган (95). При этом повреждение эндотелия считается своеобразным «мостом» между факторами риска и их последствиями, такими как инфаркт и инсульт. Биомаркеры эндотелиального повреждения - ценный инструмент в клинической практике. Наиболее изученными биомаркерами являются молекулы адгезии, такие как E-селектин, молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), молекула адгезии сосудистых клеток 1 (VCAM-1), а также другие молекулы - фактор фон Виллебранда (vWF) и растворимый тромбомодулин (sCD141) (96).

Первое исследование, связывающее вкДНК и сосудистую дисфункцию было выполнено McCarthy, S. et al. (97), которые предположили, что mt-вкДНК повышается при гипертонии, активируя Toll-подобный рецептор-9 (TLR9) и приводит к эндотелиальной дисфункции. Coscas, R. et al. (98) изучали роль вкДНК в инициации кальцификации сосудов, а Paunel-Görgülü, A. et al. (99) исследовали роль вкДНК как эндотелиального маркера повреждения у пациентов после кардиохирургических вмешательств с искусственным кровообращением. Авторы пришли к выводу, что вкДНК представляет собой ранний биомаркер индуцированного воспаления и потенциальный медиатор повреждения эндотелия после кардиохирургических операций с длительным шунтированием. Исследование также подтвердило, что вкДНК может потенциально вызывать воспаление, усиле-

ние НЕТоза с помощью независимого механизма эндосомных TLR9 и ROS. Недавно Yang et al. (100) предложили анализ крови на основе вкДНК, который может предсказать вероятность развития микрососудистого осложнения у больного диабетом.

8. Острый инсульт.

У больных, перенесших острый инсульт, концентрация вкДНК в плазме крови, измеренная в течение 24 часов, коррелирует с тяжестью инсульта и может служить предиктором смертности и тяжести исхода даже у тех пациентов, у которых нет видимых изменений, обнаруживаемых методами нейровизуализации (101, 102).

9. Ожирение

Японские исследователи (103) описали активное участие вкДНК, появившейся в крови в результате гибели адипоцитов у людей с ожирением, в развитии воспаления и резистентности к инсулину. Ключевым фактором, взаимодействующим в этих процессах с вкДНК, была молекула врожденного иммунитета Toll-подобный рецептор 9 (TLR9) (103).

10. вкДНК и старение.

Первые работы, которые показали взаимосвязь между вкДНК и старением, были опубликованы в 2011 - 2013 годах. Финские микробиологи и иммунологи из университета Тампере изучили показатели вкДНК у долгожителей старше 90 лет, участников исследования Vitality 90+, и у молодых людей (в возрасте 22–37 лет) в качестве контрольной группы. Результаты их работ продемонстрировали, что концентрация вкДНК у долгожителей была значительно выше, чем у молодых. Также были характерные различия вкДНК: у старых людей она была представлена больше низкомолекулярными фрагментами, а у молодых - больше высокомолекулярными, то есть более длинными.

В следующих работах эта же группа показала, что уровни вкДНК имели четкую взаимосвязь с маркерами воспаления (положительно коррелировали с уровнем С-реактивного белка, сывороточного амилоида А (SAA) и др.) и смертностью у людей старше 90 лет. А также то, что более высокие уровни общей и гипометилированной вкДНК были связаны с системным воспалением и развитием старческой астении (104-106).

11. Глиобластома.

Глиобластома - это наиболее часто встречающаяся первичная опухоль головного мозга. Получение биопсии опухолевой ткани мозга - это инвазивная процедура, отягощенная риском диссеминации опухолевых клеток в другие ткани и органы. Ученые из Университета Пенсильвании провели исследование на группе из 42 пациентов с глиобластомой, используя в качестве контроля группу из 42 здоровых доноров (107). Исследователи измеряли уровень вкДНК в плазме периферической крови на нескольких этапах: на стадии диагностики, после удаления опухоли, в начале лучевой терапии (или лучевой терапии в сочетании с химиотерапией) и после месяца получения терапии. Общее количество вкДНК определяли с помощью количественной ПЦР с праймерами к Alu-повтору. Кроме того, ученые провели таргетное секвенирование на платформе Illumina HiSeq ДНК из ткани опухоли и вкДНК из плазмы крови до проведения операции, чтобы сравнить мутации в опухоли и в вкДНК. Все генные варианты, найденные секвенированием вкДНК в плазме, присутствовали также и в ткани опухоли. Исследователи обнаружили, что концентрация вкДНК в плазме у недавно диагностированных пациентов увеличена по сравнению со здоровыми донорами. При этом высокий уровень концентрации вкДНК, независимо от других клинических факторов, ассоциирован с плохим прогнозом заболевания. Также они определили, как меняется уровень вкДНК в плазме в ходе длительной терапии. Оказалось, что у пациентов с прогрессирующим заболеванием возрастал уровень вкДНК. Авторы считают, что вкДНК

из плазмы крови может служить биомаркером опухолевой нагрузки и прогрессии заболевания для пациентов с глиобластомой.

Заключение.

Медицина в значительной степени зависит от клинической лаборатории, которая предоставляет точные и надежные лабораторные результаты для постановки диагноза, прогноза или принятия решения о соответствующем плане лечения.

В настоящее время практическая значимость вкДНК плазмы крови как прогностического и диагностического критерия является доказанной для онкологических, неврологических, аутоиммунных заболеваний, для выявления генетически детерминированных патологий плода и для мониторинга беременности у женщин группы риска. Возможность использования вкДНК в медицине обусловлена тем, что указанные выше патологии в большинстве случаев сопровождаются изменением концентрации вкДНК в плазме и сыворотке крови, изменением размеров ДНК-фрагментов или наличием различных мутаций. Благодаря своей способности накапливаться в кровотоке при повреждении клеток организма и инициировать рецептор-опосредованные сигнальные процессы, вкДНК может выступать в качестве патогенетически значимого биомаркера критических и неотложных состояний в медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aucamp, J.; Bronkhorst, A.J.; Badenhorst, C.P.S.; Pretorius, P.J. The Diverse Origins of Circulating Cell-Free DNA in the Human Body: A Critical Re-Evaluation of the Literature. *Biol. Rev.* 2018, 93, 1649–1683.
2. Mandel, P.; Metais, P. Les Acides Nucléiques Du Plasma Sanguin Chez l'homme. *C R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1948, 142, 241–243.
3. Bendich, A.; Wilczok, T.; Borenfreund, E. Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science* 1965, 148, 374–376.
4. Tan, E.M.; Schur, P.H.; Carr, R.I.; Kunkel, H.G. Deoxybonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Investig.* 1966, 45, 1732–1740.
5. 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.* 1977, 37, 646–650.
6. Stroun, M.; Anker, P.; Maurice, P.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Beljanski, M. Neoplastic Characteristics of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology* 1989, 46, 318–322.
7. Vasioukhin, V.; Anker, P.; Maurice, P.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Stroun, M. Point Mutations of the N-Ras Gene in the Blood Plasma DNA of Patients with Myelodysplastic Syndrome or Acute Myelogenous Leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1994, 86, 774–779.
8. Sorenson, G.D.; Pribish, D.M.; Valone, F.H.; Memoli, V.A.; Bzik, D.J.; Yao, S.L. Soluble Normal and Mutated DNA Sequences from Single-Copy Genes in Human Blood. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 1994, 3, 67–71.
9. Lo, Y.M.; Corbetta, N.; Chamberlain, P.F.; Rai, V.; Sargent, I.L.; Redman, C.W.G.; Wainscoat, J.S.; Dennis Lo, Y.M.; Corbetta, N.; Chamberlain, P.F.; et al. Presence of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum. *Lancet* 1997, 350, 485–487.
10. Zhong, S.; Ng, M.C.Y.; Lo, Y.M.D.; Chan, J.C.N.; Johnson, P.J. Presence of Mitochondrial TRNA(Leu(UUR)) A to G 3243 Mutation in DNA Extracted from Serum and Plasma of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Clin. Pathol.* 2000, 53, 466–469.
11. Proskuryakov, S.Y.; Konoplyannikov, A.G.; Gabai, V.L. Necrosis: A Specific Form of Programmed Cell Death? *Exp. Cell Res.* 2003, 283, 1–16.

12. Kroemer, G.; El-Deiry, W.S.; Golstein, P.; Peter, M.E.; Vaux, D.; Vandenabeele, P.; Zhivotovsky, B.; Blagosklonny, M.V.; Malorni, W.; Knight, R.A.; et al. Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005, 12 (Suppl. S2), 1463–1467.
13. Jahr, S.; Hentze, H.; Englisch, S.; Hardt, D.; Fackelmayer, F.O.; Hesch, R.D.; Knippers, R. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res.* 2001, 61, 1659–1665.
14. McCarthy, C.G.; Wenceslau, C.F.; Gouloupoulou, S.; Ogbi, S.; Baban, B.; Sullivan, J.C.; Matsumoto, T.; Webb, R.C. Circulating Mitochondrial DNA and Toll-like Receptor 9 Are Associated with Vascular Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats. *Cardiovasc. Res.* 2015, 107, 119–130.
15. MARTINS, G.A.; KAWAMURA, M.T.; CARVALHO, M.D.G.D.C. Detection of DNA in the Plasma of Septic Patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, 906, 134–140.
16. Lo, Y.M.D.; Rainer, T.H.; Chan, L.Y.S.; Hjelm, N.M.; Cocks, R.A. Plasma DNA as a Prognostic Marker in Trauma Patients. *Clin. Chem.* 2000, 46, 319–323.
17. Viorritto, I.C.B.; Nikolov, N.P.; Siegel, R.M. Autoimmunity versus Tolerance: Can Dying Cells Tip the Balance? *Clin. Immunol.* 2007, 122, 125–134.
18. Suzuki, N.; Kamataki, A.; Yamaki, J.; Homma, Y. Characterization of Circulating DNA in Healthy Human Plasma. *Clin. Chim. Acta* 2008, 387, 55–58.
19. Van Der Vaart, M.; Pretorius, P.J. The Origin of Circulating Free DNA. *Clin. Chem.* 2007, 53, 2215.
20. Jiang, P.; Chan, C.W.M.; Chan, K.C.A.; Cheng, S.H.; Wong, J.; Wong, V.W.S.; Wong, G.L.H.; Chan, S.L.; Mok, T.S.K.; Chan, H.L.Y.; et al. Lengthening and Shortening of Plasma DNA in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2015, 112, E1317–E1325.
21. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004, 303, 1532–1535.
22. Papayannopoulos, V.; Metzler, K.D.; Hakkim, A.; Zychlinsky, A. Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase Regulate the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J. Cell Biol.* 2010, 191, 677–691.
23. Villanueva, E.; Yalavarthi, S.; Berthier, C.C.; Hodgins, J.B.; Khandpur, R.; Lin, A.M.; Rubin, C.J.; Zhao, W.; Olsen, S.H.; Klinker, M.; et al. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 2011, 187, 538–552.
24. Rangé, H.; Labreuche, J.; Louedec, L.; Rondeau, P.; Planesse, C.; Sebbag, U.; Bourdon, E.; Michel, J.B.; Bouchard, P.; Meilhac, O. Periodontal Bacteria in Human Carotid Atherothrombosis as a Potential Trigger for Neutrophil Activation. *Atherosclerosis* 2014, 236, 448–455.
25. Warnatsch, A.; Ioannou, M.; Wang, Q.; Papayannopoulos, V. Inflammation. Neutrophil Extracellular Traps License Macrophages for Cytokine Production in Atherosclerosis. *Science* 2015, 349, 316–320.
26. Saffarzadeh, M.; Juenemann, C.; Queisser, M.A.; Lochnit, G.; Barreto, G.; Galuska, S.P.; Lohmeyer, J.; Preissner, K.T. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS ONE* 2012, 7, e32366.
27. Kessenbrock, K.; Krumbholz, M.; Schönemmarck, U.; Back, W.; Gross, W.L.; Werb, Z.; Gröne, H.J.; Brinkmann, V.; Jenne, D.E. Netting Neutrophils in Autoimmune Small-Vessel Vasculitis. *Nat. Med.* 2009, 15, 623–625.
28. Relja, B.; Land, W.G. Damage-Associated Molecular Patterns in Trauma. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* 2019.

29. Fuchs, T.A.; Brill, A.; Duerschmied, D.; Schatzberg, D.; Monestier, M.; Myers, D.D.; Wroblewski, S.K.; Wakefield, T.W.; Hartwig, J.H.; Wagner, D.D. Extracellular DNA Traps Promote Thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 15880–15885.
30. Cools-Lartigue, J.; Spicer, J.; McDonald, B.; Gowing, S.; Chow, S.; Giannias, B.; Bourdeau, F.; Kubes, P.; Ferri, L. Neutrophil Extracellular Traps Sequester Circulating Tumor Cells and Promote Metastasis. *J. Clin. Investig.* 2013, 123, 3446–3458.
31. Xu, J.; Zhang, X.; Pelayo, R.; Monestier, M.; Ammollo, C.T.; Semeraro, F.; Taylor, F.B.; Esmon, N.L.; Lupu, F.; Esmon, C.T. Extracellular Histones Are Major Mediators of Death in Sepsis. *Nat. Med.* 2009, 15, 1318–1321.
32. Luo, L.; Zhang, S.; Wang, Y.; Rahman, M.; Syk, I.; Zhang, E.; Thorlacius, H. Proinflammatory Role of Neutrophil Extracellular Traps in Abdominal Sepsis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2014, 307, L586–L596.
33. Pinegin, B.; Vorobjeva, N.; Pinegin, V. Neutrophil Extracellular Traps and Their Role in the Development of Chronic Inflammation and Autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2015, 14, 633–640.
34. Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends. *J. Cell Biol.* 2013, 200, 373–383.
35. Lam, W.K.J.; Gai, W.; Sun, K.; Wong, R.S.M.; Chan, R.W.Y.; Jiang, P.; Chan, N.P.H.; Hui, W.W.I.; Chan, A.W.H.; Szeto, C.C.; et al. DNA of Erythroid Origin Is Present in Human Plasma and Informs the Types of Anemia. *Clin. Chem.* 2017, 63, 1614–1623.
36. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* (2009) 7:99–109.
37. van dV, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* (2011) 32:110–6.
38. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* (2010) 140:821–32.
39. Jorgensen I, Zhang Y, Krantz BA, Miao EA. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *J Exp Med.* (2016) 213:2113–28.
40. Emlen W, Mannik M. Kinetics and mechanisms for removal of circulating single-stranded DNA in mice. *J Exp Med.* (1978) 147:684–99.
41. Chused TM, Steinberg AD, Talal N. The clearance and localization of nucleic acids by New Zealand and normal mice. *Clin Exp Immunol.* (1972) 12:465–76.
42. Gosse C, Le Pecq JB, Defrance P, Paoletti C. Initial degradation of deoxyribonucleic acid after injection in mammals. *Cancer Res.* (1965) 25:877–83.
43. Ljungman M, Hanawalt PC. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin. *Mol Carcinog.* (1992) 5:264–9.
44. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1997) 94:514–9.
45. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1988) 85:6465–7.
46. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* (2002) 20:709–60.
47. Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, et al. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol.* (2005) 174:6129–36. doi: 10.4049/jimmunol.174.10.6129
48. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 3902–8.
49. Egyud M, Sridhar P, Devaiah A, Yamada E, Saunders S, Ståhlberg A, et al. Plasma circulating tumor DNA as a potential tool for disease monitoring in head and neck cancer. *Head Neck.* 2019; 41 (5): 1351–8. DOI: 10.1002/hed.25563.
50. Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal

- adenocarcinoma. *JNCI*. 2000; 92 (22): 1805–11. Available from: <https://doi.org/10.1093/jnci/92.22.1805>.
51. Shaw JA, Smith BA, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 1119–24.
 52. Kirk GD, Camus-Randon AM, Mendy M, Goedert JJ, Merle P, Trepo C, et al. Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from the Gambia. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)*. 2000; 92 (2): 148–53. DOI: 10.1093/jnci/92.2.148.
 53. Koprenski MS, Benko FA, Borys DJ, Khan A, McGarrity TJ, Gocke C. D. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)*. 2000; 92: 918–23.
 54. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res*. 1998; 4: 1527–32.
 55. Goessl C, Heicappell R, Muncher R, Anker P, Stroun M, Krause H, et al. Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma. *Cancer Res*. 1998; 58: 4728–32.
 56. A.M. Aravanis, M. Lee, R.D. Klausner, Next-generation sequencing of circulating tumor DNA for early Cancer detection, *Cell*. (2017)/
 57. J.D. Cohen, L. Li, Y. Wang, et.al. CDetection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test, *Science* (80-) (2018).
 58. G. Tian, X. Li, Y. Xie, F. Xu, D. Yu, F. Cao, X. Wang, F. Yu, W. Zhong, S. Lu, The early diagnosis in lung cancer by the detection of circulating tumor DNA, *BioRxiv* (2017) 189340.
 59. P.A. Cohen, N. Flowers, S. Tong, N. Hannan, M.D. Pertile, L. Hui, Abnormal plasma DNA profiles in early ovarian cancer using a non-invasive prenatal testing platform: implications for cancer screening, *BMC Med*. (2016).
 60. C. Bettgowda, M. Sausen, R.J. Leary, I. Kinde, Y. Wang, N. Agrawal, B.R. Bartlett, H. Wang, B. Lubner, R.M. Alani, Detection of circulating tumor DNA in early-and late-stage human malignancies, *Sci. Transl. Med*. 6 (2014) 224ra24-224ra24.
 61. A.M. Newman, S.V. Bratman, J. To, J.F. Wynne, N.C.W. Eclov, L.A. Modlin, C.L. Liu, J.W. Neal, H.A. Wakelee, R.E. Merritt, J.B. Shrager, B.W. Loo, A.A. Alizadeh, M. Diehn, An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage, *Nat. Med*. (2014), <https://doi.org/10.1038/nm.3519>.
 62. I. Kinde, C. Bettgowda, Y. Wang, J. Wu, N. Agrawal, I.M. Shih, R. Kurman, F. Dao, D.A. Levine, R. Giuntoli, R. Roden, J.R. Eshleman, J.P. Carvalho, S.K.N. Marie, N. Papadopoulos, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, L.A. Diaz, Evaluation of DNA from the papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers, *Sci. Transl. Med*. (2013).
 63. K.C.A. Chan, J.K.S. Woo, A. King, B.C.Y. Zee, W.K.J. Lam, S.L. Chan, S.W.I. Chu, C. Mak, I.O.L. Tse, S.Y.M. Leung, G. Chan, E.P. Hui, B.B.Y. Ma, R.W.K. Chiu, S.- F. Leung, A.C. van Hasselt, A.T.C. Chan, Y.M.D. Lo, Analysis of plasma Epstein–Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal Cancer, *N. Engl. J. Med*. (2017).
 64. D.W. Bianchi, D. Chudova, A.J. Sehnert, S. Bhatt, K. Murray, T.L. Prosen, J.E. Garber, L. Wilkins-Haug, N.L. Vora, S. Warsof, J. Goldberg, T. Ziainia, M. Halks-Miller, Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies, *JAMA J. Am. Med. Assoc*. (2015).
 65. F. Amant, M. Verhecke, I. Wlodarska, L. Dehaspe, P. Brady, N. Brison, K. Van Den Bogaert, D. Dierickx, V. Vandecaveye, T. Tousseyn, P. Moerman, A. Vanderstichele, I. Vergote, P. Neven, P. Berteloot, K. Putseys, L. Danneels, P. Vandenberghe, E. Legius, J.R. Vermeesch, Presymptomatic identification of cancers in pregnant women during noninvasive prenatal testing, *JAMA Oncol*. (2015)/
 66. K. Sun, P. Jiang, K.C.A. Chan, J. et.al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments, *Proc. Natl. Acad. Sci*. (2015).

67. E. Gormally, P. Vineis, G. Matullo, F. et al. TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study, *Cancer Res.* (2006),
68. L. Mao, R.H. Hruban, J.O. Boyle, M. Tockman, D. Sidransky, Detection of onco gene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer, *Cancer Res.* (1994).
69. C. Fiala, E.P. Diamandis, Utility of Circulating Tumor DNA in Cancer Diagnostics With Emphasis on Early Detection, (2018).
70. M. Fleischhacker, B. Schmidt, Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Rev. Cancer* 1775 (2007) 181–232.
71. T.M. Gorges, J. Schiller, A. Schmitz, D. Schuetzmann, C. Schatz, T.M. Zollner, T. Krahn, O. Von Ahsen, Cancer therapy monitoring in xenografts by quantitative analysis of circulating tumor DNA, *Biomarkers* (2012).
72. A.M. Newman, S.V. Bratman, J. To, J.F. Wynne, N.C.W. Eclow, L.A. Modlin, C.L. Liu, J.W. Neal, H.A. Wakelee, R.E. Merritt, J.B. Shrager, B.W. Loo, A.A. Alizadeh, M. Diehn, An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage, *Nat. Med.* (2014).
73. C. Bettgowda, M. Sausen, R.J. Leary, I. Kinde, Y. Wang, N. Agrawal, B.R. Bartlett, H. Wang, B. Lubber, R.M. Alani, Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014).
74. Wright, C.F.; Burton, H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum. Reprod. Update* 2009, 15, 139–151.
75. Wang, E.; Batey, A.; Struble, C.; Musci, T.; Song, K.; Oliphant, A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 2013, 33, 662–666.
76. Lorenz H-M., Herrmann M., Winkler T. Role of apoptosis in autoimmunity // *Apoptosis.* – 2000. – V. 5, No 5. – P. 443–449.
77. Wiktorowich K., Szyfter K., Furmaniuk M., Gorny M., Morkowski J., Samborski W., Tabaczewski P., Mackiewicz S.S. Extracellular DNA and its Immunomodulatory Function in RA and SLE // *Immunologia Polska.* – 1987. – V. 12, No 1. – P. 33–43.
78. Morimoto C, Sano H, Abe T, Homma M, Steinberg AD. Correlation between clinical activity of systemic lupus erythematosus and the amounts of DNA in DNA/anti-DNA antibody immune complexes. *J Immunol.* (1982) 129:1960–5.
79. Tug S, Helmig S, Menke J, Zahn D, Kubiak T, Schwarting A, et al. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cell Immunol.* (2014).
80. Zhang S, Lu X, Shu X, Tian X, Yang H, Yang W, et al. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern Med.* (2014) 53:2763–71.
81. Xu Y, Song Y, Chang J, Zhou X, Qi Q, Tian X, et al. High levels of circulating cell-free DNA are a biomarker of active SLE. *Eur J Clin Invest.* (2018)
82. Abdelal TI, Zakaria AM, Sharaf MD, Elakadc MG. Levels of plasma cell-free DNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Egypt Rheumatol.* (2016) 38:295–300. doi: 10.1016/j.ejr.2016.06.005
83. Rykova E, Sizikov A, Roggenbuck D, Antonenko O, Bryzgalov L, Morozkin E, et al. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Res Ther.* (2017) 19:85. doi: 10.1186/s13075-017-1295-z
84. Hashimoto T, Yoshida K, Hashimoto N, Nakai A, Kaneshiro K, Suzuki K, et al. Circulating cell free DNA: a marker to predict the therapeutic response for biological DMARDs in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* (2017) 20:722–30. doi: 10.1111/1756-185X.12959
85. Laukova L, Konecna B, Vlkova B, Mlynarikova V, Celec P, Stenova E. Anti-cytokine therapy and plasma DNA in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* (2018) 38:1449–54. doi: 10.1007/s00296-018-4 055-8

86. Eldosoky MAER, Hammad RHM, Kotb HG, Eldesoky NA-R, Elabd HA. Cell free DNA and CD38 expression on T helper cells as biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ame J Biochem.* (2018) 8:60–8. doi: 10.5923/j.ajb.20180803.03
87. Xie J, Yang J, Hu P. Correlations of Circulating Cell-Free DNA With Clinical Manifestations in Acute Myocardial Infarction. *Am J Med Sci.* 2018;356(2):121–129.
88. Zemmour H, Planer D, Magenheimer J, Moss J, Neiman D, Gilon D, et al. Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA. *Nat Commun.* 2018;9(1):1443.
89. Rannikko J, Seiskari T, Huttunen R, Tarkiainen I, Jylhävä J, Hurme M, et al. Plasma cell-free DNA and qSOFA score predict 7-day mortality in 481 emergency department bacteraemia patients. *J Intern Med.* 2018;284(4):418–426.
90. Schneck E, Samara O, Koch C, Hecker A, Padberg W, Lichtenstern C, et al. Plasma DNA and RNA differentially impact coagulation during abdominal sepsis-an explorative study. *J Surg Res.* 2017;210:231–243.
91. Sigdel TK, Archila FA, Constantin T, Prins SA, Liberto J, Damm I, Towfghi P, Navarro S, Kirkizlar E, Demko ZP (2019) Optimizing detection of kidney transplant injury by assessment of donor-derived cell-free DNA via massively multiplex PCR. *J Clin Med* 8:19.
92. Schutz E, Fischer A, Beck J, Harden M, Koch M, Wuensch T, et al. Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study. *PLoS Med.* 2017; 14: e1002286.
93. Oellerich M, Shipkova M, Asendorf T, Walson PD, Schauerte V, Mettenmeyer N, et al. Absolute quantification of donor-derived cell-free DNA as a marker of rejection and graft injury in kidney transplantation: Results from a prospective observational study. *Am J Transplant.* 2019; 19: 3087-99.
94. Snyder TM, Khush KK, Valentine HA, Quake SR (2011) Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci* 108:6229–6234.
95. Verma, S.; Buchanan, M.R.; Anderson, T.J. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation* 2003, 108, 2054–2059.
96. Constans, J.; Conri, C. Circulating Markers of Endothelial Function in Cardiovascular Disease. *Clin. Chim. Acta* 2006, 368, 33–47.
97. McCarthy, C.G.; Wenceslau, C.F.; Goulopoulou, S.; Ogbi, S.; Baban, B.; Sullivan, J.C.; Matsumoto, T.; Webb, R.C. Circulating Mitochondrial DNA and Toll-like Receptor 9 Are Associated with Vascular Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats. *Cardiovasc. Res.* 2015, 107, 119–130
98. Coscas, R.; Bensussan, M.; Jacob, M.P.; Louedec, L.; Massy, Z.; Sadoine, J.; Daudon, M.; Chaussain, C.; Bazin, D.; Michel, J.B. Free DNA Precipitates Calcium Phosphate Apatite Crystals in the Arterial Wall in Vivo. *Atherosclerosis* 2017, 259, 60–67.
99. Paunel-Görgülü, A.; Wacker, M.; El Aita, M.; Hassan, S.; Schlachtenberger, G.; Deppe, A.; Choi, Y.H.; Kuhn, E.; Mehler, T.O.; Wahlers, T. CfDNA Correlates with Endothelial Damage after Cardiac Surgery with Prolonged Cardiopulmonary Bypass and Amplifies NETosis in an Intracellular TLR9-Independent Manner. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1–13.
100. Yang, Y.; Zeng, C.; Lu, X.; Song, Y.; Nie, J.; Ran, R.; Zhang, Z.; He, C.; Zhang, W.; Liu, S.-M. 5-Hydroxymethylcytosines in Circulating Cell-Free DNA Reveal Vascular Complications of Type 2 Diabetes. *Clin. Chem.* 2019, 65, 1414–1425.
101. Rainer TH, Wong LKS, Lam W, Yuen E, Lam NYL, Metreweli C, Lo YMD. Prognostic Use of Circulating Plasma Nucleic Acid Concentrations in Patients with Acute Stroke. *Clin Chem* 2003; 49:562-9.
102. Lam NY, Rainer TH, Wong LK, Lam W, Lo YM. Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset. *Resuscitation* 2006; 68:71-8.

103. Sachiko Nishimoto, Daiju Fukuda et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv.* 2016 Mar; 2(3): e1501332.
104. Jylhävä J1, Kotipelto T, Raitala A, Jylhä M, Hervonen A, Hurme M. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90+ study. *Mech Ageing Dev.* 2011 Jan-Feb;132(1-2):20-6.
105. Jylhävä J1, Jylhä M, Lehtimäki T, Hervonen A, Hurme M. Circulating cell-free DNA is associated with mortality and inflammatory markers in nonagenarians: the Vitality 90+ Study. *Exp Gerontol.* 2012 May;47(5):372-8.
106. Jylhävä J1, Nevalainen T, Marttila S, Jylhä M, Hervonen A, Hurme M. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell.* 2013 Jun;12(3):388-97.
107. Bagley S., et al // Clinical utility of plasma cell-free DNA in adult patients with newly diagnosed glioblastoma - a pilot prospective study // *Clinical Cancer Research*, 2019;