

СВОБОДНАЯ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Козлов В.А.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В работе представлены литературные данные о существовании в организме свободной ДНК (свДНК), не связанной с клетками, которая определяется практически во всех жидкостях организма. Данные свидетельствуют о том, что свДНК определяется в нормальном, здоровом организме. При этом повышение уровня свДНК в плазме и сыворотке крови определяется при многих заболеваниях, включая аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования, инфаркт миокарда и др. Во многих случаях уровень свДНК становится предиктором появления того или иного заболевания, а также утяжеления течения болезни. До сих пор не ясна физиологическая роль свДНК, а так же ее значение в развитии того или иного заболевания. Показано, что свДНК может стимулировать и подавлять функции иммунокомпетентных клеток, может выполнять роль индуктора аутоиммунных состояний. Кроме того, предполагается, что свДНК может служить переносчиком генетической информации в организме между опухолевыми и нормальными клетками, так же как между последними из различных органов и тканей.

Ключевые слова: свободная внеклеточная ДНК, метилирование, злокачественные клетки

Адрес для переписки:

Козлов Владимир Александрович
д.м.н., профессор, академик РАМН, директор
ФГБУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН
630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-66-27.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: vako40@yandex.ru

Авторы:

Козлов В.А. – д.м.н., профессор, академик
РАМН, директор ФГБУ «НИИ клинической
иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск

Поступила 07.05.2013

Отправлена на доработку 11.05.2013

Принята к печати 22.05.2013

FREE EXTRACELLULAR DNA IN NORMAL STATE AND UNDER PATHOLOGICAL CONDITIONS

Kozlov V.A.

Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The paper represents a synopsis of current publications concerning existence of free extracellular DNA. Such DNAs are not associated with cells of the organism, being revealed in nearly all body fluids. Recent data show that the cell-free DNA is determined in normal, healthy organism as well. Increased level of free DNA plasma and serum are detectable in many diseases, including autoimmune disorders, malignant neoplasias, myocardial infarction, etc. In many cases, free DNA may be suggested as predictive markers for various distinct diseases, as well as worsening of their clinical course. Physiological role of free DNA is not yet clear, like as its importance in development of certain diseases. It was shown that free DNA may exert stimulatory or suppressive effects upon functions of immunocompetent cells. Free extracellular DNA may also perform an inducing role for autoimmune conditions. In addition, one may assume that free DNA may be a carrier of genetic information in the body between tumor and normal cells in the body, like as between normal cells in various organs and tissues. (*Med. Immunol., 2013, vol. 15, N 5, pp 399-412*)

Keywords: free extracellular DNA, methylation, malignant cells

Address for correspondence:

Kozlov Vladimir A.
PhD, MD, Professor, Full Member of Russian Academy of Medical Sciences, Director, Research Institute of Clinical Immunology
630090, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-66-27.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: vakoz40@yandex.ru

Authors:

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member of Russian Academy of Medical Sciences, Director, Research Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation

Received 07.05.2013
Revision received 11.05.2013
Accepted 22.05.2013

Долгие годы в клинической медицине *de facto* было принято считать невозможным существование в сыворотке крови в свободном виде нуклеиновых кислот якобы из-за наличия РНК-аз и ДНК-аз. Последние действительно присутствуют в сыворотке, но... Но думается, данный постулат на годы задержал развитие, прежде всего, клинической медицины, т.к. последняя была лишена важной дополнительной информации диагностического, патогенетического и терапевтического плана. И что интересно к тому же, так это то, что впервые ДНК в сыворотке крови была обнаружена еще в 1947 г. [42], задолго до описания спиральной структуры ДНК Уотсоном и Криком. К сожалению, только так можно объяснить, что это не было оценено по достоинству, и данные были просто забыты до 1960 г., когда повышенный уровень свободной ДНК (свДНК, используется также термин внеклеточная ДНК-вкДНК) был зарегистрирован у больных СКВ [65], позднее в 1970 г. – у раковых больных. И только в 1980 г. было определено клеточное происхождение свДНК. В частности, было показано, что свДНК происходит из опухолевых клеток [62].

Общие положения

СвДНК определяется в самых различных внеклеточных жидкостях организма, включая: плазму, сыворотку, мочу, слюну и даже жидкость спинного мозга. Установлено, что свДНК находится во внеклеточных жидкостях в виде таких структур, как микропузырьки, микрочастицы, апоптотические тельца, экзосомы, гистоновые комплексы и виртосомы [50]. Определены значения свДНК у здоровых доноров, которые колеблются в пределах 10-100 ng/ml 10^3 - 10^4 GEq/ml.

По-видимому, к семейству свДНК в организме следует относить: клеточную и митохондриальную ДНК из соматических и из опухолевых клеток, подвергающихся процессам апоптоза и некроза; ДНК из эритроцитов, ядра которых энуклеируются в процессе дифференцировки в эритроциты, ДНК из лимфоцитов в процессе их апоптотической гибели после стимуляции, ДНК эмбрионов в крови матери, бактериальную и вирусную ДНК [58]. Предполагается, что в норме основным источником свДНК являются гемопоэтические клетки, клетки иммунной системы. Во многих исследованиях показано, что уровень свДНК в сыворотке у доноров превышает значения в плазме, возможно, за счет высвобождения ДНК с клеток при образовании сгустка.

Несомненна диагностическая значимость оценки уровня свДНК, ибо более высокие показатели по сравнению с контрольными значениями практически однозначно будут свидетельствовать о наличии в организме того или иного патологического процесса. Помимо оценки уровня свДНК имеет значение определение размеров нуклеотидного состава, оценка изменений в метилировании и появления мутаций. Например, при наличии

первичной опухоли в организме, гиперметилирование генов, специфически связанных с опухолью или другой патологией, будет нести необходимую информацию о заболевании [50].

Апоптоз и свДНК

По всей вероятности, в нормальном, здоровом организме за появление свДНК во внеклеточных жидкостях несет ответственность процесс апоптотической гибели клеток, который начинает регистрироваться с раннего эмбриогенеза. Некроз клеток, как источник свДНК, по-видимому, имеет здесь минимальное значение [63]. Во взрослом организме в течение суток 10^{11} - 10^{12} клеток делаются. Следовательно, такое же количество клеток должно отмирать за это же время, чтобы не был нарушен клеточный гомеостаз в различных органах и тканях, а значит, продукты их гибели должны быть удалены. Кроме того, следует привлечь внимание, что во взрослом человеческом организме ежедневно продуцируется 10^{11} эритроцитов, и энуклеированные ядра становятся потенциальным источником свДНК в случае нарушения механизмов ее деградации в макрофагах, непосредственно участвующих в фагоцитозе этих ядер. Нельзя исключить влияние на уровень свДНК ферментов нуклеаз, изменение активности которых и связанное с этим изменение уровня свДНК выявлено при разных патологиях [19].

Что касается механизмов апоптоза, то молекулярные пути, ведущие к индукции апоптоза, разделяют на два: на внешний и внутренний пути. Внешний путь апоптоза указывает на форму гибели, индуцированную внеклеточными сигналами, обусловленными связыванием лиганд со специфическими трансмембранными рецепторами, имеющими коллективное обозначение как рецепторы смерти, которые относятся к семье TNF/NGF. Внутренний апоптоз связан с ответом клеток на ряд стрессующих условий, включающих повреждение ДНК, оксидативный стресс и многие другие факторы. Так или иначе, но оба эти пути апоптоза связаны с индукцией ферментного каскада каспас, активация которых обуславливает процессы конечных стадий апоптоза [18]. Деградация клеточной (хромосомной) ДНК в процессе апоптоза клеток проходит две стадии: сначала ДНК расщепляется в нуклеосомных единицах апоптотических клеток, автономных от клеток, ферментом ДНКазой, активированной каспасой; после поглощения макрофагами апоптотических клеток ДНК деградирует до нуклеотидов под влиянием фермента ДНКазы II в лизосомах. Последний отвечает также за деградацию ДНК из эритроидных предшественников в костном мозге и фетальной печени [45], что в случае фетальной печени свидетельствует о наличии апоптоза в эмбриогенезе, когда печень является ярко выраженным гемопоэтическим органом.

Весомая по значению патогенетическая роль апоптоза. По-видимому, все основные заболевания человека (рак, атеросклероз, нейродегенеративные и аутоиммунные заболевания и др.) в большей или меньшей степени связаны с нарушениями в механизмах апоптоза клеток, либо с увеличением, либо с уменьшением его интенсивности. Несомненно, что нарушения эти напрямую будут связаны с нарушениями в механизмах удаления продуктов клеточной гибели, т.е. с фагоцитарной активностью разных клеточных элементов.

Роль макрофагов в появлении свДНК

Имеющиеся данные свидетельствуют об активном участии макрофагов в процессах фагоцитирования клеток, погибающих в результате апоптоза или некроза. При этом оказалось, что погибающие клетки не пассивно высвобождают ДНК в циркуляцию, а для этого необходимо активное взаимодействие клеток с макрофагами. Показано, что в условиях *in vitro* без макрофагов некротические клетки вообще не высвобождают ДНК в свободном виде. Можно предположить, что в отсутствие макрофагов или при их нарушенной функции клеточные материалы перевариваются не полностью, и та же ДНК может находиться в составе нуклеосом. С другой стороны, при определенных количественных взаимоотношениях между макрофагами и некротическими (или апоптотическими) клетками макрофаги сами подвергаются апоптозу, что и может стать причиной отсутствия механизмов расщепления ДНК и появления ее в свободном виде [12]. Причиной гибели макрофагов может стать фагоцитоз макрофагами бактерий с последующим подъемом уровня свДНК [52]. По крайней мере, следует признать за устоявшийся факт, что появление свДНК является результатом не просто апоптоза или некроза клеток, а результатом активного взаимодействия этих клеточных элементов с макрофагами и уже последующего появления во внеклеточном пространстве свДНК. Возможно, с активностью макрофагов связаны различные размеры свДНК, которые значительно меньше у свДНК из апоптотических клеток, чем из некротических [27]. По-видимому, гибель макрофагов в организме может быть активным процессом, который индуцируется Т-клетками. В экспериментах на мышах показано, что введение сингенным животным как Th1-клеток АЕ7 клона, так и Th2 клона D10, обработанных ингибитором метилирования ДНК 5-azaC, индуцировало появления анти-ДНК антител на фоне гибели макрофагов [76]. Авторы не обсуждают в статье возможную роль свДНК в индукции аутоантител, но здесь главное все же то, что интактные Т-клетки без ингибиции метилирования ДНК не обладали таким индуцирующим эффектом. Можно думать, что здесь мы имеем дело с двумя взаимодополняющими процессами: с од-

ной стороны, активированные Т-клетки убивают сингенные макрофаги, подвергаясь при этом апоптозу, с другой стороны, высвободившаяся при этом свДНК участвует в процессах индукции образования аутоантител к ДНК. Следует здесь упомянуть данные о способности Т-клеток больных СКВ спонтанно лизировать аутологичные макрофаги и о повышенном апоптозе моноцитов у больных СКВ в активной фазе заболевания [54].

Рецепция свДНК на клетках

По-видимому, в организме, что называется, «просто так» ничего не происходит. Вряд ли не играет никакой позитивной, негативной, регуляторной роли такая молекула, как ДНК, находясь в свободном «плавании» по жидкостным средам организма. В пользу такого положения говорит наличие на ряде клеток специфических для свДНК рецепторов из семейства TLR, имеющих самое прямое отношение к формированию врожденного и приобретенного иммунитета. Описано 13 членов данного семейства, TLR12 и TLR13 из которых отсутствуют у человека, но имеются у мышей. Классифицируются данные рецепторы как связанные с поверхностью клетки или как внутриклеточные. К первой группе относятся TLR1, 2, 4, 5, 6, 10, ко второй – TLR3, 7, 8, 9. Последние находятся внутри клетки в эндосомальных и лизосомальных отделах. Рецепторы первой группы узнают, главным образом, молекулы микробных клеточных мембран (липиды, липопептиды, протеины), а второй – нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) или родственные молекулы. Наконец, из последних только TLR9 участвует в распознавании молекул ДНК, и экспрессируются эти рецепторы в основном на плазматитоидных дендритных клетках (пДК) и В-лимфоцитах, через которые в клетках запускаются механизмы синтеза хемокинов, интерферонов 1-го типа, IL-10 и которые используют фактор-88 миелоидной дифференцировки в качестве адаптера для восприятия индуцирующего сигнала и для которых фактором негативной регуляции является SIGIRR, блокирующий развитие сигнального пути через фактор-88. Последним, как и другим факторам негативной регуляции, отводится роль поддержания баланса между процессами формирования иммунного ответа в ответ на стимул и толерантностью, что является важнейшим моментом для индукции или не индукции аутоиммунной реакции [29, 34, 36, 48]. Помимо TLR9 в клетках имеются и другие механизмы узнавания внеклеточной свДНК.

Несмотря на то, что об иммуностимулирующем эффекте бактериальной ДНК известно уже в течение последних несколько десятков лет, только в 1995 г. было доказано, что стимулирующим компонентом ДНК являются неметилированные CpG островки [32, 48]. Таким образом, передача сигнала через TLR9 обуславливается лигацией с ДНК, содержащей неметилирован-

ные CpG-мотивы, коими являются ДНК, в первую очередь, бактерий и вирусов. В отличие от пДК, миелиодные ДК экспрессируют TLR1, TLR2, TLR3, TLR8 и они не реагируют продукцией интерферона I типа в ответ на CpG-ДНК. Метилированное состояние CpG-ДНК, характерное для млекопитающих, по-видимому, поддерживает состояние толерантности к аутоантигенам. Если статус метилирования ДНК изменяется в сторону гипометилирования, что регистрируется при целом ряде патологий, тогда ДНК переходит в ранг индукторов аутоиммунных реакций и других патологических процессов [48]. Считается, что гипометилированное состояние CpG динуклеотидов является абсолютным требованием для активации TLR9 [73]

с последующим формированием иммунитета против разнообразных внутриклеточных (но не внеклеточных) бактерий, вирусов и паразитов. По-видимому, в процессе формирования сигнального пути от действия CpG решающую роль играют внутриклеточные молекулы реактивного кислорода, которые определяются уже в течение 5 мин после связывания лиганды с рецептором. Антиоксиданты, блокирующие продукцию данных молекул, отменяли стимулирующий эффект CpG ОДН. Убедительно показано, что стимулирующий эффект CpG ОДН на экспрессию генов в клетках целого ряда цитокинов, в большинстве своем провоспалительного характера, реализуется через стимуляцию нескольких митоген-активированных протеинкиназ с последующей активацией ряда факторов транскрипции, таких как ATF-2, AP-1, NF-κB [33].

Следует сказать об эволюционно неслучайной внутриклеточной локализации TLR9 в эндосомальном-лизосомальном отделе пДК. Именно такое их расположение позволяет ДК включаться в процесс формирования иммунного ответа к бактериальной ДНК, т.к. патогены проникают в клетку с помощью эндоцитоза, что не может осуществляться собственной ДНК. Т.е. здесь мы видим механизм ограничения формирования реакции иммунной системы на аутоантигены с возможной последующей индукцией аутоиммунного заболевания. Следовательно, процесс компарментализации TLR9 вовнутрь клетки отвечает за неспособность этих рецепторов быть активированными внеклеточными молекулами ДНК, т.к. было показано, что TLR4/TLR9 фузи-он белок на мембране клетки активируется ДНК позвоночных [6]. В то же время показано, что собственная ДНК все же может проникать внутрь клетки, но только в виде комплексов или с анти-телами к ДНК, или с LL37 – эндогенным анти-микробным пептидом, который продуцируется кератиноцитами и нейтрофилами. Кроме того, было показано, что комплекс из свДНК позвоночных и катионных липидов может стимулировать синтез того же IFNα в макрофагах мышей

и культуральных ДК. Такой же комплекс из бактериальной ДНК и катионных липидов обладал большей стимулирующей активностью в отношении продукции ДК интерферонов, по сравнению с чистой ДНК [74]. ДНК-антиДНК иммунный комплекс проникает в пДК через CD32 рецептор (рецептор мономерного IgG), где CpG-ДНК связывается с TLR9, что приводит к стимуляции продукции ряда цитокинов, включая IFNα, который, по-видимому, является одним из главных индукторов поломы толерантности при той же СКВ и индукции аутоиммунных реакций за счет, например, сдвига созревания моноцитов в ДК.

Иммуномодулирующая роль свДНК

Необходимо еще раз подчеркнуть тот факт, что повышенный, по сравнению с нормой, уровень свДНК указывает, с одной стороны, на наличие в организме того или иного патологического процесса как такового, а с другой стороны, на него необходимо обращать внимание как на возможный этиологический фактор развития заболевания.

При сравнительных исследованиях только ДНК, экстрагированная из апоптотических спленоцитов индуцировала образование антител при введении сингенным мышам, обуславливая формирование гломерулонефрита и протеинурии, но не ДНК из некротических или интактных лимфоцитов. Подчеркивается, что именно гипометилированное состояние апоптотической ДНК отвечает за способность индуцировать продукцию антител, и прежде всего антител IgG2a субкласса. Было показано, что повышение уровня метилирования ДНК значительно подавляет способность индуцировать продукцию антител, в то время как гипометилирование некротической или интактной ДНК обуславливало появление иммуногенности у последних [70]. В настоящее время нет ясности в механизмах де-метилирования ДНК в клетках.

Показано, что именно гипометилированное состояние CpG динуклеотидов в составе олигонуклеотидов (CpG ODN) обуславливает иммуностимулирующий эффект последних, проявляющийся в стимуляции экспрессии молекул МНС класса II и костимулирующих молекул, в стимуляции продукции TNFα, IL-18, IL-12, IL-6 и иммуноглобулинов В-клетками. По существу ODN с неметилированными CpG являются стимуляторами иммунного ответа Th1-направленности. Более того, данные нуклеотиды перенаправляют в сторону Th1-ответа уже сформировавшийся Th2-ответ в результате иммунизации мышей Hbc антигеном в аллюминиевом адьюванте [69]. Можно предполагать, что этот эффект CpG-ODN обусловлен его выраженным стимулирующим влиянием на продукцию IFNα/β пДК [34]. Скорее всего, цитокин IFNα является одним из главных инициаторов формирования Th1-ответа, ингиби-

руя при этом еще и апоптоз Т-клеток. Аналогичным стимулирующим эффектом на синтез TNF α обладал олигодеоксинуклеотид, выделенный из сыворотки больных СКВ и содержащий неметилированные CpG островки. Продуцентами в этих экспериментах также были предшественники пДК. Метилирование островков отменяло эффект этого нуклеотида [41]. Авторы высказывают вероятностное мнение, что гипометилированное состояние ДНК при СКВ и является фактором увеличения апоптоза и снижения клиренса апоптотических клеток. Именно гипометилированная CpG-ДНК индуцировала у мышей MRL^{lpr/lpr} формирование волчаночного нефрита, действуя, по-видимому, через TLR9. Вполне вероятно, что эффект CpG-ДНК в отношении индукции СКВ, волчаночного нефрита является комплексным, состоящим из влияния на пролиферацию В-клеток, на дендритные клетки, на макрофаги и на CD4⁺CD25⁺Treg, функциональная активность которых снижается под влиянием IL-6, синтез которого в дендритных клетках возрастает под влиянием гипометилированной ДНК [47, 49].

Помимо иммуномодулирующего эффекта, который регистрируется по поликлональной активации В-клеток, по увеличению продукции антиген-презентирующими клетками (дендритные клетки, макрофаги) таких цитокинов, как IL-1, IL-6, IL-12 TNF α , CpG-ODN в экспериментах на мышах стимулировал гемопоэз, повышал миграцию КОЕ-С из костного мозга в селезенку, способствовал более выраженной регенерации гемопоэза после миелосупрессии, индуцированного сублетальным облучением, что, по мнению авторов, дает возможность рекомендовать нуклеотид для применения в клинической практике [61].

Опухолевый рост и свДНК

Говоря о злокачественных опухолях, прежде всего, следует подчеркнуть, что рак является полигенным заболеванием. При многих видах опухолей определяется повышенный уровень свободной свДНК в периферической крови. При этом прогресс заболевания часто связан с постепенным повышением уровня свДНК. Более того, довольно часто уровень свДНК возрастает при метастазировании опухоли, по сравнению со значениями в отсутствие последних. Предполагается, что свДНК у этих больных происходит из опухолевых клеток непосредственно. Принадлежность свДНК к опухолевым клеткам можно определять по мутациям в ряде генов, связанных с опухолевой прогрессией клеток, например, в гене p53 [9]. В ряде случаев наличие вирусной ДНК в периферической крови может свидетельствовать об опухолевом росте в организме, как это показано в отношении Эпштейна–Барр вируса при назофарингеальной карциноме [9]. Диагностическим подспорьем могут быть методы

определения уровня метилирования свДНК. Показано, что на фоне глобального гипометилирования ДНК раковой клетки, при ряде опухолей, отмечается региональное гиперметилирование генов опухолевой супрессии, генов восстановления ДНК, генов ингибиторов метастазирования.

Помимо диагностического значения эти данные имеют отношение к патогенезу опухолевого роста, указывая на возможную их значимость в росте раковой клетки. Например, при многих опухолях регистрируется гиперметилирование, например, генов p15 и p16, имеющих прямое отношение к ингибции клеточного деления и обуславливающих нечувствительность клеток карциномы печени к таким факторам индукции апоптоза, как IFN α и TGF- β [71]. Было обнаружено, что частота гиперметилирования целого ряда генов (APC, GSTP1, PTGS2, p14, p16, RAFFS 1A), была значительно выше у больных тестикулярным раком, чем в контроле, особенно в сочетанных случаях гиперметилирования нескольких генов. Особое значение это имеет при выявлении ранних стадий развития опухоли и при рецидивах последней [15]. Достаточно часто оценка состояния метилирования отдельных генов при конкретной злокачественной опухоли имеет диагностические преимущества перед другими опухолевыми маркерами. Показано, что при саркоме печени отмечается 100% совпадение гиперметилирования гена p16 свДНК и наличие в сыворотке альфа-фетопротейна при уровне последнего более 45 нг/мл. Однако, при его уровне менее 45 нг/мл только в 57% случаев регистрировалось гиперметилирование гена p16 [71]. Гиперметилирование генов супрессоров опухолевого роста может стать диагностическим критерием наличия опухолевого процесса, а не просто увеличение уровня свДНК в плазме. По крайней мере, гиперметилирование одного из 4-х кандидатных генов в свДНК опухолевого происхождения определялось у 62% женщин больных раком груди, по сравнению с 13% у здоровых [26]. Наличие метилированного гена CST6 в свДНК в значительном проценте у женщин с раком груди может стать дополнительным диагностическим признаком на фоне полного отсутствия данного признака у здоровых [11]. Метилирование промотора SOX17 в свДНК больных раком груди может свидетельствовать о наличии опухолевых клеток в циркуляции как до, так и после хирургического вмешательства [11]. Ненормальное гиперметилирование свДНК определяется у пациентов при раке легкого, при меланоме [64]. Было обнаружено, что гиперметилирование генов HMTF (helicase-liketranscriptionfactor) и HPP1/TPEF (hyperplasticpolyposis transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domains) в свДНК при раке прямой кишки может охарактеризовать степень агрессивности опухолевого роста, возможное появление метастазов

и уменьшение сроков выживания при определенных стадиях развития опухоли [51]. Выраженную значимость для более точной диагностики имеет определение целостности молекулы свДНК, которая измеряется как пропорция длинных фрагментов ДНК к коротким. Было обнаружено, что при раке груди уровень свДНК в сыворотке, хоть и был пропорционален стадиям 3 и 4 опухолевого роста, но более выраженная корреляция со стадиями – увеличение целостности свДНК, уровень которой возрастал в зависимости от стадии развития опухоли и был всегда выше, чем у здоровых доноров. Более того, уровень целостности свДНК был увеличен при микрометастазах и был предиктором определения предоперационных метастазов в лимфатических узлах при раке грудной железы [9, 67].

Наличие опухолевой свДНК может играть роль суррогатного предиктора одновременно и развития опухолевого процесса, когда уровень свДНК напрямую связан с размером опухоли, и эффективности проводимой химиотерапии, когда уровень свДНК снижался пропорционально достигнутому положительному результату лечения на размер опухоли.

Интересно, что уровень свДНК в сыворотке крови у больных раком груди был выше, чем в плазме, и в обоих источниках был выше, чем у доноров и у пациентов с доброкачественными процессами. Однако, если в обеих группах пациентов отмечалась позитивная корреляция уровней свДНК в плазме и сыворотке, этого не наблюдалось в группе доноров. В то же время уровень свДНК у больных раком груди в обоих случаях был выше, чем в случаях с доброкачественными поражениями. Последнее различие авторы объясняют возможностью более высокого уровня некроза и апоптоза опухолевых клеток, чем в случае доброкачественного процесса, а разницу между плазмой и сывороткой – дополнительным происхождением свДНК из клеток крови. Оценка уровня свДНК и в сыворотке и в плазме может стать дифференциальным признаком между злокачественной и доброкачественной опухолью, т.к. оказалось, что повышенный уровень в первом случае определялся в обеих исследуемых средах, а во втором случае только в сыворотке. Повышенный уровень свДНК при раке грудной железы был достаточно четко связан с размером опухоли, с наличием метастазов в лимфатических узлах, с клинической стадией заболевания, а также с экспрессией таких генов, как Her2/neu (human epithelial receptor type 2)

и topoisomerase II. И если первый из них связан с плохим прогнозом заболевания, с укорочением периода ремиссии и увеличенным риском метастазирования на фоне резистентности ко многим видам терапии, то второй будет свидетельствовать о необходимости применения ингибитора Торо II, наиболее удачного цитостатического

агента для лечения инвазивных форм рака груди [25].

Имеются данные, свидетельствующие о том, что в отдельных случаях, по крайней мере, наиболее точно наличие или отсутствие опухоли в организме отображает отношение между длинными и короткими фрагментами свДНК, когда вероятность присутствия опухоли прямой кишки возрастает с увеличением значений этих пропорций. Более того, оказалось, что при проведении предоперационной химиотерапии эти пропорции уменьшались только у больных, у которых отмечался позитивный ответ на лечение химиотерапевтическими препаратами. Предполагается, что у больных без изменений значений пропорции между длинными и короткими фрагментами свДНК следует прекращать проведение химиотерапии ввиду ее неэффективности – это с одной стороны. С другой стороны, в таких случаях необходимо в самое ближайшее время проведение масштабных оперативных вмешательств

[3]. Следует отметить, что уровень свДНК был выше у больных с наличием метастазов, чем без, и что после проведения радиотерапии уровень снижался практически на 90% [39].

Проблема генометастазирования и свДНК

Весьма интересной в свете проблемы возможных функций свДНК представляется гипотеза «генометастазирования, или генометастазов». Сущность этой гипотезы заключается в предположении авторов о наличии у молекул свДНК неких функциональных нагрузок. В частности, по мнению авторов, свДНК из опухолевых клеток могут служить в качестве неких «трансформаторов» нормальных клеток организма в опухолевые в результате переноса опухолевого клеточного генома. И, следовательно, делается вывод о том, что метастазы основной опухоли являются не ее клеточными элементами, а нормальными клетками различных тканей, которые трансформировались в опухолевые под влиянием опухолевой свДНК. Эта гипотеза основана на ряде данных о способности ДНК из опухолевых клеток в условиях *in vitro* индуцировать трансформацию нормальных фибробластов в опухолевые клетки, а также на основе специально проведенных экспериментов. В качестве одного из доказательств авторами представлены данные, что в течение длительного времени после удаления опухоли и в отсутствие опухолевых клеток циркуляция плазмы остается потенциальным онкогенным источником при наличии в ней свДНК [21, 23]. Показано, что инкубация мышиноного происхождения клеток р16-дефицитных NIH-3T3 с плазмой от больных раком прямой кишки обуславливала появление ДНК человека в клетках-реципиентах. Плазма доноров не оказывала подобного эффекта, но его оказывала ДНК, экстрагированная из самой опухоли. Более того, такие клетки с опухолевой ДНК приобретали потенциал онкогенной ак-

тивности, образуя опухоли при трансплантации NOD-SCID мышам. По мнению авторов, частицы, содержащие ДНК, могут проникать в клетки через имеющиеся в мембране поры и отвечать за опухолевую трансфекцию, подтверждая саму возможность горизонтального генометастазирования [22]. Важно подчеркнуть, что все те изменения в нуклеотидной последовательности, в интенсивности гипо- и гиперметилования генов в свДНК полностью отражают состояние этих процессов во внутриклеточной ДНК [50].

В принципе, данная точка зрения, которая, несомненно, имеет право на существование, поднимает вопрос вообще о функциональной значимости свДНК и вне опухолевых процессов, т.е. в норме и/или при других патологических состояниях организма. Почему бы тогда не предположить о подобного рода функциональной активности у свДНК из клеток любых других тканей, уровень которых в периферической крови возрастает в результате повышенного апоптоза, и встает вопрос о механизмах восполнения клеточной массы, о механизмах регенерации ткани. Что если подумать об участии в процессах регенерации, например, печени, клеток других тканей за счет их трансформации в клетки печени под влиянием молекул свДНК из тех же клеток печени? Если это возможно, то, скорее всего, на роль «вспомогателей» регенерации подходят стволовые клетки кроветворной и лимфоидной тканей, их коммитированные предшественники в силу их уникальной способности к миграции по организму. Кстати, об этом же думают и авторы гипотезы «генометастазирования».

Сказанное выше находит подтверждение в исследованиях, где была показана возможность пентрации свДНК и ее фрагментов в нормальные и трансформированные клетки, причем в первые более эффективно, чем во вторые. Более того, оказалось, что метилированные свДНК в районе определенных генов более эффективно проникают в клетки, чем не метилированные, первые более стабильны во внеклеточном пространстве, чем вторые. Авторами было показано, что после проникновения ДНК из облученных лимфоцитов в нормальные, последние показывали аналогичные цитологические изменения, характерные для облученных клеток [60]. Предполагается также возможность участия свДНК в комплексе с ДНК-зависимой РНК полимеразой в процессе синтеза РНК вне клеток [19].

Роль свДНК в аутоиммунной патологии

При СКВ отмечается увеличенное деметилирование ДНК в Т-клетках и их повышенный апоптоз. Алу нуклеотиды ДНК у больных СКВ составляют 55% свДНК, по сравнению с 13% у здоровых доноров. Показано, что Алу фрагменты свДНК гипометилированы, чем вносят свой вклад в активацию иммунной системы через TLR9.

Возросший уровень свДНК обуславливает стимуляцию в пДК TLR9 с последующим повышением продукции IFN группы I и переориентации иммунного ответа в направлении Th2.

В то же время, при определенных условиях, свДНК может принимать участие в индукции дифференцировки наивных Т-клеток в клетки CD4⁺CD25⁺Treg с помощью пДК. В пользу этого могут говорить данные о подобном эффекте CpG олигодеоксинуклеотидов (ОДН) после добавления в культуру ДК. Установлено, что как свДНК, так и CpG ОДН оказывают свой эффект на клетки через TLR9, которые экспрессируются на пДК, но не миелоидных ДК. Интересно, что пДК принимают участие как в процессах переключения Th1-ответа на Th2-ответ, так и в индукции Treg. Предполагается, что здесь могут участвовать разные субпопуляции пДК, это с одной стороны. Возможно также, что в определенной степени этот разнонаправленный эффект может быть связан с органным расположением пДК. Показано, что способностью инициировать образование Treg и индуцировать толерантность к пересаженному трансплантату обладают только пДК, мигрирующие в лимфатические узлы, но не пДК из селезенки или из периферической крови. Вполне вероятно, что оба эти предположения связаны между собой [44, 66].

У больных СКВ в периферической крови в 50-100 раз снижено содержание пДК. Предполагается, что эти изменения связаны с их активацией той же свДНК и последующей миграцией их в лимфоидную ткань, в участки воспаления, как это было показано, например, в случае с кожной формой волчанки. Активированные пДК были найдены также в синовиальной жидкости больных РА [5]. При этом отмечается снижение интенсивности клиренса продуктов апоптоза на фоне увеличения уровня свДНК. Ситуация усугубляется еще и тем, что активированные Т-клетки убивают собственные макрофаги в отсутствие антигена и цитотоксической активностью обладают Th2-клетки с гипометилированной ДНК и с повышенной экспрессией β-интегрина LFA-1. Кстати, Th1-клетки также могут обладать аутоцитотоксичностью в отношении макрофагов при тех же показателях активности [76].

Выше было сказано, что одним из механизмов повышения уровня свДНК при СКВ может быть нарушение клиренса клеток, находящихся в процессе апоптоза, за который в первую очередь отвечают макрофаги. Какова причина нарушения данной функции у макрофагов, по-видимому, пока не очень понятно. Но апоптотические клетки с длительной незавершенностью процесса на фоне отсутствия эффективного клиренса подвергаются некрозу с последующей интенсификацией процесса образования свДНК, который уже проявлялся в процессе апоптоза клеток. Данные

показывают, что в условиях *in vitro*, по крайней мере, при контакте макрофагов с некротизирующими клетками появление свДНК в растворе является результатом активного участия в этом процессе именно макрофагов, а не пассивного выделения свДНК из клеток в некрозе. Одни не-кротизирующие клетки в культуре без макрофагов не выделяли в среду свДНК. У мышей, обработанных клондронатом (или силикой), которые убивают макрофаги, введение апоптотических клеток не приводило к появлению свДНК в циркуляции, в отличие от интактных животных, что еще раз свидетельствует об активном участии макрофагов в данном процессе.

По всей вероятности, накопление в циркуляции свДНК, выступающей в роли аутоантигена, в конце концов обуславливает индукцию образования аутоантител со всеми вытекающими отсюда последствиями для патогенеза СКВ [20].

Показано, что синтезированная ДНК, аналог фрагментов свДНК у больных СКВ, стимулировала экспрессию молекул адгезии ICAM-1 и генов провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF α , IFN γ). Предполагается, что именно эти механизмы лежат в основе патогенеза васкулита при СКВ с учетом уменьшенного уровня метилирования CpG-участков. Кроме того, повышенная экспрессия генов IL-6 и IFN α обуславливает увеличение дифференцировки и созревания ДК из гемопоэтических предшественников, внося тем самым вклад в патогенез СКВ [77].

У больных РА уровень свДНК был выше, чем в контроле, и в сыворотке, и в плазме. При этом увеличение уровня свДНК в сыворотке было непропорционально более выраженным, чем в плазме. В целом повышенные уровни свДНК у больных РА достигали значений, полученных при наличии опухоли и при преэклампсии.

Делается вывод, что уровень свДНК может стать биомаркером РА и что одним из механизмов повышения уровня свДНК вообще и при РА в частности может быть снижение способности макрофагов участвовать в деградации ДНК [78]. В пользу этого предположения говорят экспериментальные данные, указывающие на снижение способности макрофагов у мышей с нокаутированным геном DNКазы 11 деградировать ДНК из эритроидных предшественников и из апоптотических клеток [30]. Следует обратить внимание на факт увеличения свДНК при РА параллельно с возрастанием в сыворотке уровня γ -glutamyltranspeptidase (GGT), полифункционального фермента, локализованного на лейкоцитах, эндотелиальных клетках сосудов, печени, эпителиальных клетках (luminal). Фермент отвечает за процесс превращения глутатиона, глутамина и лейкотриенов и за индукцию образования остеокластов. Предполагается, что как и свДНК, фермент GGT является продуктом апоптоза клеток и принимает активное участие в процессах

резорбции костей, а параллельное увеличение уровней обоих факторов является показателем более тяжелого течения заболеваний РА [37], так же как и у детей с диабетом I-го и II-го типов. По всей вероятности, помимо свДНК клеточно-го происхождения организма больного РА в патогенезе последнего может играть роль свДНК микробного происхождения, которая обнаруживается в сыворотке крови и суставной жидкости пациентов. Предполагается, что последняя происходит из микроорганизмов в полости рта при наличии у больных признаков периодонтита, которому приписывают роль фактора, ухудшающего течение основного заболевания. При этом подчеркивается роль метилированных CpG островков в возможной индукции аутоиммунных процессов [43].

При вирусных инфекциях также отмечается изменение уровня свДНК. Так, у больных, инфицированных вирусом Dengue (костоломная лихорадка), регистрируется повышение уровня свДНК, которое может коррелировать с выраженностью основного заболевания и с такими его характеристиками, как гематокрит, вторичные инфекции и, что очень важно, с выраженностью апоптоза в мононуклеарных клетках периферической крови, в клетках печени, мозга и легких, который, кстати, и является основным источником свДНК в жидкостях организма. Авторы делают вывод, что уровень свДНК при данной инфекции может иметь прогностическое значение [24].

свДНК как предикторы основного заболевания

В определенных ситуациях уровень свДНК может выполнять роль предиктора исхода заболевания. Так, показано, что концентрация свДНК в плазме является строгим независимым предиктором смертности в первые 24 часа в *post-resuscitation period after cardiac arrest*. При этом уровень свДНК коррелирует с начальной концентрацией лактата и ее максимумом, что может являться отражением влияния гипоксии на уровень апоптоза и некроза клеток [2]. У пациентов

с острым коронарным синдромом повышение концентрации свДНК четко было связано с тяжестью заболевания, и наивысшие значения свДНК были найдены у пациентов, умерших в течение 2 лет [35]. Аналогичная ситуация определяется и при выраженном сепсисе или септическом шоке. И при данной патологии уровень свДНК является независимым предиктором негативного исхода данного патологического процесса.

Повышение уровня свДНК при сепсисе может стать хорошим информационным предиктором и смертности при данной патологии, и тяжести течения процесса. Отмечается, что уровень свДНК в этих случаях несет больше информации о состоянии больного, чем выраженность заболевания или состояние дисфункции органов, чем такие маркеры как IL-6, уровни тромбина и протейна С [53].

Показано, что при острых физических на-грузках уровень свДНК значительно возрастает вскоре после нагрузок и быстро возвращается к норме в ближайшее время. Механизм этих изменений пока не известен и, по-видимому, здесь ни при чем ни апоптоз, и ни некроз. Возможно, здесь участвуют активированные иммунокомпетентные клетки с помощью механизма NETosis (pathogen-induced cell death), включая высвобождение нейтрофильных экстраклеточных ловушек. В то же время при длительных тяжелых физических нагрузках появление свДНК в сыворотке можно объяснить механизмами апоптоза и некроза.

свДНК митохондриального происхождения при онкопатологии

В свободном виде в сыворотке и плазме определяется не только клеточная ДНК, но и митохондриальная ДНК (митДНК). Предполагается, что митДНК происходит в эволюции из внутриклеточных бактерий – эндосимбионтов. Гены, которые кодируются митДНК, относятся к группе плазмогенов, т.е. генов, расположенных вне ядра (вне хромосом). Совокупность этих плазмогенов составляет плазмон данного вида организмов, в отличие от генома. Установлено, что митДНК наследуется по материнской линии, т.е. если гены ядерной ДНК передаются потомству поровну от обоих родителей, то митохондриальные гены наследуются потомством только от матери. МитДНК характеризуется рядом отличий от клеточной ДНК: митДНК – кольцевые, а ядерные ДНК упакованы в хромосомы, которые можно, с некоторой степенью условности, рассматривать как линейные последовательности нуклеотидов; они накапливают мутаций более чем в десять раз больше по сравнению с ядерным геномом, возможно, это связано с отсутствием гистонов в митохондриальном геноме и с высоким уровнем реактивных видов кислорода во-круг митДНК; наконец, митДНК характеризуется более высоким уровнем гипометилирования в норме, по сравнению с ядерной ДНК. Оказалось, что уровень митДНК в сыворотке больных раком простаты был выше, чем в контроле, и он не отличался от уровня у пациентов с (benign) гиперплазией простаты и не коррелировал ни с клиническими признаками, ни с лабораторными показателями. Однако, было обнаружено, что пациенты с высоким уровнем коротких фрагментов митДНК имели высокий риск возврата индивидуальных показателей ПСА после радикальной простатэктомии, что определяет его как важный предиктор высоких показателей ПСА [17]. Таким же важным и ранним предиктором уровень митДНК в сыворотке может стать у больных с саркомой Ewing [75], с тестикулярным раком [16]. Причем в последних случаях более высокий уровень коротких фрагментов митДНК у больных раком, чем в контроле, регистрировался даже при нормальных значениях, что очень важно, других опухолевых маркеров, таких как аль-

фа-фетопротеин, хорионический гонадотропин, лактатдегидрогеназа и др. Возможно, все-таки, при сравнительной оценке диагностической значимости сывороточных уровней ядерной и митохондриальной ДНК, уровень свДНК имеет более весомое значение, чем уровень митДНК. Было показано, что уровень свДНК был выше, чем у пациентов с доброкачественной опухолью груди, и выше, чем в контроле, в то время как уровень митДНК у больных со злокачественной опухолью был одинаковый в первых двух случаях, хотя и выше чем в контроле. Более того, при ряде опухолей уровень митДНК был ниже, чем в контроле [31]. Возможно, в последних случаях следует подумать об отношениях между степенью повышения уровня свДНК и степенью снижения уровня митДНК, что может дать более точную информацию о наличии или отсутствии злокачественного роста в организме.

свДНК и активность иммунокомпетентных клеток

В литературе имеются указания на то, что кроме TLR2, через который ДК направляют дифференцировку Т-клеток по пути Th2, лиганды для всех остальных рецепторов этого семейства направляют дифференцировку по пути Th1. Однако оказалось, что обработка пДК CpG-ODN (TLR9 лиганда) стимулировала продукцию IL-10 и IL-12, что способствует дифференцировке Т-клеток не только в направлении Th1 и CTL, но и накоплению Tr1. Ингибиторы MAPK p38, через который индуцируется синтез IL-10 в ДК TLR9 лигандой, значительно повышали иммунизирующую активность ДК (в противоопухолевом и вакцинальном иммунитете) на фоне ослабления способности индуцировать накопление Tr1 за счет снижения продукции IL-10 и повышения продукции IL-12. Интересно, что ингибиторы ЦОГ-2 также повышали способность CpG-ODN стимулировать активность ДК. Оказывается, что продукция ЦОГ-2 в ДК также опосредуется ферментом p38 MAPK [28].

Полученные данные свидетельствуют о том, что TLR9 лиганда CpG-ODN вместе с анти-CD3 антителами индуцирует у крыс пролиферацию как CD4⁺CD25⁻, так и CD4⁺CD25⁺Treg. Но оказалось, что данная лиганда частично отменяет супрессивный эффект Treg, по-видимому, за счет наличия TLR9 на Т-клетках эффекторах, делая последние более резистентными к влиянию Treg. Стимулирующий эффект TLR9 лиганды на адаптивный иммунитет может складываться из расширения популяции эффекторных Т-клеток и из ослабления супрессивного эффекта Treg. В дальнейшем, по мере созревания, пДК будет усиливать индуцирующий эффект TLR9 лиганд в отношении накопления Treg с целью подавления иммунного ответа по мере снижения уровня патогена в организме [40].

Помимо Th1-клеток, пДК, обработанные CpG-ODN, оказывали стимулирующий эффект на цитотоксическую активность NK-клеток

и на селективную пролиферацию CD56bright CD16-NK-клеток. Показано, что сами NK клетки экспрессируют TLR9, но могут ли они отвечать непосредственно на лиганды к этому рецепту, не известно. Предполагается, что Treg экспрессируют TLR9 и соответствующие лиганды микробного и вирусного происхождения могут активировать эти клетки. Оказалось, что CD4+ Th-клетки повышают стимулирующий эффект пДК на активность NK-клеток за счет продукции IL-2. Интересно, что добавление CD4+CD25+ Treg подавляло полностью повышающий эффект Т-клеток, но не влияло на стимулирующий эффект самих пДК [56]. Вполне очевидно, что здесь можно проследить связь между врожденным и адаптивным иммунитетом: ДК после контакта с лигандом для TLR9 стимулируют активность NK-клеток, но и начинают индуцировать накопление Treg, которые не действуют на этой стадии врожденного иммунитета, но начинают оказывать супрессивный эффект на активность NK-клеток на стадии адаптивного иммунитета, когда к стимулирующему действию пДК присоединяются Т-клетки, вовлекаемые в процесс иммуногенеза антигеном.

Обработка CD3+CD4+Т-клеток человека 1 α 25VitD3 (calcitriol) обуславливает увеличение экспрессии IL-10 и TLR9 в Treg и усиление супрессорной активности последних. CpG-ODN (связывается с TLR9) обуславливает снижение экспрессии IL-10 и TLR9 у этих Treg и уменьшение их супрессорной активности (Vit-D усиливает экспрессию IL-10 не только в Т-клетках, но и в пДК) [68]. Данный подход, по-видимому, может быть использован для усиления противоопухолевого и вакцинального иммунитета.

Четко показано, что степень активации TLR9 бактериальной ДНК напрямую зависит от вида микроорганизма, из которого выделена ДНК, и от связанной с видом бактерий частотой содержания в ДНК гипометилированных островков. Стимулирующий потенциал бактериальных ДНК также возрастает при внутриклеточном высвобождении молекулы нуклеиновой кислоты [13].

Заключение

И все-таки, какие функции выполняет в организме ДНК вне клетки, находясь практически во всех его жидких средах? Если ДНК определяется и в здоровом организме, то тогда следует

думать об ее участии в нормальных физиологических процессах, но каких? Она является источником нуклеиновых кислот? Возможно, почему нет. Соблазнительным является предположение о возможном ее участии в процессах клеточной трансформации. И особенно это касается клеток иммунной системы, где и уровень апоптоза в норме выше, чем в клетках других тканей и органов, и среди которых регистрируются превращения одних субпопуляций лимфоцитов в другие, как это показано, например, в отношении Treg и Th17. Нельзя исключить иммуномодулирующую роль свДНК, которая через TLR9 на плазматитоидных дендритных клетках может как стимулировать активность клеток эффекторов иммунной системы, так и подавлять иммунный ответ за счет их способности индуцировать накопление клеток Treg с их иммуносупрессорной функцией. Вполне вероятно, что свДНК, источником которой в норме могут быть прежде всего лимфоциты, гибнущие постоянно в организме от самых различных воздействий экзогенного и эндогенного характера, включая «микро и макро» иммунные ответы, является первоначальным механизмом запуска процесса гомеостатической пролиферации, в ходе которой восстанавливается клеточная численность иммунной системы. В последних процессах, скорее всего, могут принимать участие митохондриальная ДНК и ДНК из апоптотических клеток, ибо они характеризуются гипометилированным состоянием, которое является условием стимуляции TLR9 рецепторов. Безусловно, необходимо считать повышением уровня свДНК в организме выше нормы «диагностическим» сигналом о развитии, о наличии того или иного заболевания. К модулированию функций иммунной системы имеют, по-видимому, отношение свДНК бактериального и вирусного происхождения, ДНК из опухолевых клеток, даже если думать об ее негативной роли, которая будет базироваться на способности подавлять иммунный ответ к этиопатогенетическим антигенам.

Совершенно ясно одно, главное одно, необходимо подробнейшим образом изучать эту проблему, ибо она касается молекулы, от которой во многом, если не во всем, зависит здоровье человеческого организма и продолжительность его жизни и с изменением характеристик которой связано его нездоровье.

Список литературы (References)

1. Arnalich F., Codoceo R., López-Collazo E., Montiel C. Circulating cell-free mitochondrial DNA: a better early prognostic marker in patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*, 2012, vol. 83, no. 7, pp. 162-173.
2. Arnalich F., Menéndez M., Lagos V., Ciria E., Quesada A., Codoceo R., Vazquez J.J., López-Collazo E. and Montiel C. Prognostic value of cell-free plasma DNA in patients with cardiac arrest outside the hospital: an observational cohort study. *Critical Care*, 2010, vol. 14, R47, pp. 1-11.
3. Agostini M., Pucciarelli S., Enzo M.V., Del Bianco P., Briarava M., Bedin C., Maretto I., Friso M.L., Lonardi S., Mescoli C., Toppan P., Urso E., Nitti D. Circulating cell-free DNA: a promising marker of pathologic

tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Ann. Surg. Oncol.*, 2011, vol. 18, no. 9, pp. 2461-2468.

4. Anker P., Stroun M. Immunological aspects of circulating DNA. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 2006, vol. 1075, pp. 34-39.
5. Barrat F.J., Coffman R.L. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunology Reviews*, 2008, vol. 223, pp. 271-283.
6. Barton G.M., Kagan J.C., Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.*, 2006, vol. 7, no. 1, pp. 49-56.
7. Breitbach S., Tug S., Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med.*, 2012, vol. 42, no. 7, pp. 565-586.
8. Chan J.Y., Chow V.L., Mok V.W., Ho A.C., Wei W.I. Prediction of surgical outcome using plasma Epstein-Barr virus dna and (18)F-FDG PET-CT scan in recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*, 2012, vol. 34, no. 4, pp. 541-545.
9. Chan K.C., Lo Y.M. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. *Br. J. Cancer*, 2007, vol. 12, no. 96, pp. 681-685.
10. Chang K.P., Tsang N.M., Liao C.T., Hsu C.L., Chung M.J., Lo C.W., Chan S.C., Ng S.H., Wang H.M., Yen T.C. Prognostic significance of 18F-FDG PET parameters and plasma Epstein-Barr virus DNA load in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J. Nucl. Med.*, 2012, vol. 53, no. 1, pp. 21-28.
11. Chimonidou M., Tzitzira A., Strati A., Sotiropoulou G., Sfikas C., Malamos N., Georgoulas V., Lianidou E. CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. *Clin. Biochem.*, 2013, vol. 46, no. 3, pp. 235-240.
12. Choi J.J., Reich C.F. 3rd, Pisetsky D.S. The role of macrophages in the *in vitro* generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*, 2005, vol. 115, no. 1, pp. 55-62.
13. Dalpke A., Frank J., Peter M., Heeg K. Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 2, pp. 940-946.
14. Duramad O., Fearon K.L., Chan J.H., Kanzler H., Marshall J.D., Coffman R.L., Barrat F.J. IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood*, 2003, vol. 15, no. 102, pp. 4487-4492.
15. Ellinger J., Albers P., Müller S.C., von Ruecker A., Bastian P.J. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU International*, 2009, vol. 104, no. 1, pp. 48-52.
16. Ellinger J., Albers P., Perabo F.G., Müller S.C., von Ruecker A., Bastian P.J. CpG island hypermethylation of cell-free circulating serum DNA in patients with testicular cancer. *J. Urol.*, 2009, vol. 182, no. 1, pp. 324-329.
17. Ellinger J., Müller S.C., Wernert N., von Ruecker A., Bastian P.J. Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence after prostatectomy. *BJU International*, 2008, vol. 5, no. 102, pp. 628-632.
18. Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di Ilio C., De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 2012, vol. 4, no. 5, pp. 330-349.
19. Gahan P.B., Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 2008, vol. 1137, pp. 1-6.
20. Gaipal U.S., Munoz L.E., Grossmayer G., Lauber K., Franz S., Sarter K., Voll R.E., Winkler T., Kuhn A., Kalden J., Kern P., Herrmann M. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Autoimmun.*, 2007, vol. 28, no. 2-3, pp. 114-121.
21. García-Olmo D., García-Olmo D.C. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomastasis. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 2001, vol. 945, pp. 265-275.
22. García-Olmo D.C., Domínguez C., García-Arranz M., Anker P., Stroun M., García-Verdugo J.M., García-Olmo D. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.*, 2010, vol. 70, no. 2, pp. 560-567.
23. García-Olmo D., García-Olmo D.C., Domínguez-Berzosa C., Guadalajara H., Vega L., García-Arranz M. Oncogenic transformation induced by cell-free nucleic acids circulating in plasma (genomastasis) remains after the surgical resection of the primary tumor: a pilot study. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2012, vol. 12, suppl 1, pp. 61-68.
24. Ha T.T., Huy N.T., Murao L.A., Lan N.T., Thuy T.T., Tuan H.M., Nga C.T., Tuong V.V., Dat T.V., Kikuchi M., Yasunami M., Morita K., Huong V.T., Hirayama K. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 10, p. 25969.
25. Hashad D., Sorour A., Ghazal A., Talaat I. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2012, vol. 26, no. 6, pp. 467-472.
26. Hoque M.O., Feng Q., Toure P., Dem A., Critchlow C.W., Hawes S.E., Wood T., Jeronimo C., Rosenbaum E., Stern J., Yu M., Trink B., Kiviati N.B., Sidransky D. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2006, vol. 10, no. 24, pp. 4262-4269.
27. 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, vol. 15, no. 61, pp. 1659-1665.
28. Jarnicki A.G., Conroy H., Brereton C., Donnelly G., Toomey D., Walsh K., Sweeney C., Leavy O., Fletcher J., Lavelle E.C., Dunne P., Mills K.H. Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through

inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J. Immunol.*, 2008, vol. 15, no. 180, pp. 3797-3806.

29. Jin B., Sun T., Yu X.H., Yang Y.X., Yeo A.E. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012. 32 p.

30. Kawane K., Ohtani M., Miwa K., Kizawa T., Kanbara Y., Yoshioka Y., Yoshikawa H., Nagata S. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*, 2006, vol. 443, no. 7114, pp. 998-1002.

31. Kohler C., Radpour R., Barekati Z., Asadollahi R., Bitzer J., Wight E., Bürki N., Diesch C., Holzgreve W., Zhong X.Y. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol. Cancer*, 2009, vol. 17, no. 8, p. 105.

32. Krieg A.M., Yi A.-K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995, vol. 374, no. 6522, pp. 546-549.

33. Krieg A.M. Signal transduction induced by immunostimulatory CpG DNA. *Springer Semin Immunopathol.*, 2000, vol. 22, pp. 97-105.

34. Krug A. Nucleic acid recognition receptors in autoimmunity. *Handb Exp. Pharmacol.*, 2008, vol. 183, pp. 129-151.

35. Lam N.Y., Rainer T.H., Wong L.K., Lam W., Lo Y.M. Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset. *Resuscitation*, 2006, vol. 68, no. 1, pp. 71-78.

36. Lamphier M.S., Sirois C.M., Verma A., Golenbock D.T., Latz E. TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 2006, vol. 1082, pp. 31-43.

37. Langford M.P., Redens T.B., Harris N.R., Lee S., Jain S.K., Reddy S., McVie R. Plasma levels of cell-free apoptotic DNA ladders and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in diabetic children. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2007, vol. 232, no. 9, pp. 1160-1169.

38. Lechner M.G., Epstein A.L. A new mechanism for blocking myeloid-derived suppressor cells by CpG. *Clin. Cancer Res.*, 2011, vol. 1, no. 17, pp. 1645-1648.

39. 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, vol. 37, no. 3, pp. 646-650.

40. Liu G., Zhao Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunology*, 2007, vol. 122, no. 2, pp. 149-156.

41. Magnusson M., Magnusson S., Vallin H., Rönblom L., Alm G.V. Importance of CpG dinucleotides in activation of natural IFN-alpha-producing cells by a lupus-related oligodeoxynucleotide. *Scand. J. Immunol.*, 2001, vol. 54, no. 6, pp. 543-550.

42. Mandel P., Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1948, vol. 142, pp. 241-243.

43. Martinez-Martinez R.E., Abud-Mendoza C., Patiño-Marin N., Rizo-Rodríguez J.C., Little J.W., Loyola-Rodríguez J.P. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Periodontol.*, 2009, vol. 36, no. 12, pp. 1004-1010.

44. Moseman E.A., Liang X., Dawson A.J., Panoskaltis-Mortari A., Krieg A.M., Liu Y.J., Blazar B.R., Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2004, vol. 1, no. 173, pp. 4433-4442.

45. Nagata S. Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. *Immunol. Rev.*, 2007, vol. 220, pp. 237-250.

46. Pan W., Zhu S., Yuan M., Cui H., Wang L., Luo X., Li J., Zhou H., Tang Y., Shen N. MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4⁺ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J. Immunol.*, 2010, vol. 15, no. 184, pp. 6773-6781.

47. Pasare C., Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003, vol. 14, no. 299, pp. 1033-1036.

48. Patole P.S., Anders H.J. Nucleic acids modulate autoimmunity through nucleic-acid-specific toll-like receptors. *Curr. Med. Chem.*, 2006, vol. 13, no. 25, pp. 3061-3067.

49. Pawar R.D., Patole P.S., Wörnle M., Anders H.J. Microbial nucleic acids pay a Toll in kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2006, vol. 291, no. 3, pp. 509-516.

50. Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA – a new paradigm in genetic behavior. *Clin. Chim. Acta*, 2011, vol. 12, no. 412, pp. 806-811.

51. Philipp A.B., Stieber P., Nagel D., Neumann J., Spelsberg F., Jung A., Lamerz R., Herbst A., Kolligs F.T. Prognostic role of methylated free circulating DNA in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 2012, vol. 15, no. 131, pp. 2308-2319.

52. Pisetsky D.S., Fairhurst A.M. The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity*, 2007, vol. 40, no. 4, pp. 281-284.

53. Rhodes A., Cecconi M. Cell-free DNA and outcome in sepsis. *Crit. Care*, 2012, vol. 8, no. 16, p. 170.

54. Richardson B.C., Strahler J.R., Pivrotto T.S., Quddus J., Bayliss G.E., Gross L.A., O'Rourke K.S., Powers D., Hanash S.M., Johnson M.A. Phenotypic and functional similarities between 5-azacytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 1992, vol. 35, no. 6, pp. 647-662.

55. Richardson B.C., Yung R.L., Johnson K.J., Rowse P.E., Lalwani N.D. Monocyte apoptosis in patients with active lupus. *Arthritis Rheum.*, 1996, vol. 39, no. 8, pp. 1432-1434.
56. Romagnani C., Chiesa D.M., Kohler S., Moewes B., Radbruch A., Moretta L., Moretta A., Thiel A. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4⁺ T helper cells and CD4⁺ CD25^{hi} T regulatory cells. *Eur. J. Immunol.*, 2005, vol. 35, no. 8, pp. 2452-2458.
57. Rothenfusser S., Hornung V., Krug A., Towarowski A., Krieg A.M., Endres S., Hartmann G. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.*, 2001, vol. 31, no. 12, pp. 3525-3534.
58. Rudin C.M., Thompson C.B. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev. Med.*, 1997, vol. 48, pp. 267-281.
59. Saukkonen K., Lakkisto P., Pettilä V., Varpula M., Karlsson S., Ruokonen E., Pulkki K.; Finnsepsis Study Group. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clinical Chemistry*, 2008, vol. 54, no. 6, pp. 1000-1007.
60. Skvortsova T.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Binding and penetration of methylated DNA into primary and transformed human cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, vol. 1137, pp. 36-40.
61. Sparwasser T., Hültner L., Koch E.S., Luz A., Lipford G.B., Wagner H. Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J. Immunology*, 1999, vol. 162, no. 4, pp. 2368-2374.
62. 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, vol. 46, no. 5, pp. 318-322.
63. Suzuki N., Kamataki A., Yamaki J., Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta*, 2008, vol. 387, no. 1-2, pp. 55-58.
64. Swaminathan R., Butt A.N. Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, vol. 1075, pp. 1-9.
65. Tan E.M., Schur P.H., Carr R.I., Kunkel H.G. Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, 1966, vol. 45, no. 11, pp. 1732-1740.
66. Tang Q., Bluestone J.A. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2006, vol. 212, pp. 217-237.
67. Umetani N., Giuliano A.E., Hiramatsu S.H., Amersi F., Nakagawa T., Martino S., Hoon D.S. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J. of Clinical Oncology*, 2006, vol. 24, no. 26, pp. 4270-4276.
68. Urry Z., Xystrakis E., Richards D.F., McDonald J., Sattar Z., Cousins D.J., Corrigan C.J., Hickman E., Brown Z., Hawrylowicz C.M. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J. Clin. Invest.*, 2009, vol. 119, no. 2, pp. 387-398.
69. Weeratna R.D., Brazolot Millan C.L., McCluskie M.J., Davis H.L. CpG ODN can redirect the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 2001, vol. 32, no. 1, pp. 65-71.
70. Wen Z.K., Xu W., Xu L., Cao Q.H., Wang Y., Chu Y.W., Xiong S.D. DNA hypomethylation is crucial for apoptotic DNA to induce systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in SLE-non-susceptible mice. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, vol. 46, no. 12, pp. 1796-1803.
71. Wong Ivy H.N., Dennis Lo Y.M., Lai Paul B.S. and Johnson Philip J. Relationship of p16 Methylation Status and Serum α -Fetoprotein Concentration in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Clinical Chemistry*, 2000, vol. 46, no. 9, pp. 1420-1422.
72. Wong I.H., Lo Y.M., Johnson P.J. Epigenetic tumor markers in plasma and serum: biology and applications to molecular diagnosis and disease monitoring. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2001, vol. 945, pp. 36-50.
73. Yasuda K., Richez C., Uccellini M.B., Richards R.J., Bonegio R.G., Akira S., Monestier M., Corley R.B., Viglianti G.A., Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R. Requirement for DNA CpG content in TLR9-dependent dendritic cell activation induced by DNA-containing immune complexes. *J. Immunol.*, 2009, vol. 1, no. 183, pp. 3109-3117.
74. Yoshinaga T., Yasuda K., Ogawa Y., Nishikawa M., Takakura Y. DNA and its cationic lipid complexes induce CpG motif-dependent activation of murine dendritic cells. *Immunology*, 2006, vol. 120, no. 3, pp. 295-302.
75. Yu M., Wan Y.F., Zou Q.H. Cell-free circulating mitochondrial DNA in the serum: a potential non-invasive biomarker for Ewing's sarcoma. *Arch. Med. Res.*, 2012, vol. 43, no. 5, pp. 389-394.
76. Yung R.L., Quddus J., Chrisp C.E., Johnson K.J., Richardson B.C. Mechanism of drug-induced lupus. I. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors *in vitro* cause autoimmunity *in vivo*. *J. Immunology*, 1995, vol. 154, no. 6, pp. 3025-3035.
77. Zhang R., Xing M., Ji X., Gu L., Yang X., Wang H., Jiang P. Interferon-alpha and interleukin-6 in SLE serum induce the differentiation and maturation of dendritic cells derived from CD34⁺ hematopoietic precursor cells. *Cytokine*, 2010, vol. 50, no. 2, pp. 195-203.
78. Zhong X.Y., von Mühlhelen I., Li Y., Kang A., Gupta A.K., Tyndall A., Holzgreve W., Hahn S., Hasler P. Increased concentrations of antibody-bound circulatory cell-free DNA in rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry*, 2007, vol. 53, no. 9, pp. 1609-1614.