

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

Алексеева Людмила Александровна

Механизм подавления опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., Миронова Надежда Львовна

Новосибирск-2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ДНК КАК СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОПУХОЛЕВЫЙ АГЕНТ: ХАРАКТЕРИСТИКА И ФУНКЦИИ	16
1.1. Введение	16
1.2. Характеристика циркулирующих внДНК крови.....	17
1.3. Концентрация внДНК	18
1.4. Состав внДНК	19
1.4.1. GC-состав внДНК	19
1.4.2. Последовательности онкогенов и онкосупрессоров среди внДНК	20
1.4.3. Хромосомные перестройки, обнаруживаемые во фрагментах внДНК	23
1.4.4.Тандемные и сателлитные повторы	23
1.4.5. Мобильные генетические элементы в составе внДНК	25
1.4.6. Вирусная и митохондриальная ДНК в составе внДНК	28
1.4.7. Статус метилирования внДНК.....	29
1.5. Биогенез внДНК.....	30
1.5.1. Источники внДНК.....	30
1.5.2. Апоптоз как источник внДНК	31
1.5.3. Некроз как источник внДНК.....	33
1.5.4. Секреция как источник внДНК.....	34
1.5.5. Нетоз и образование NET.....	36

1.5.6. Распознавание ДНК	41
1.6. Патогенез вДНК в крови онкологических больных.....	42
1.6.1. Участие вДНК опухолевого происхождения в злокачественной трансформации здоровых клеток ..	42
1.6.2. Взаимоотношения NET и опухолей	45
1.7. Применение ДНКазы I в качестве антиметастатического и противоопухолевого агента	48
Заключение	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	52
2.1 Материалы.....	52
2.1.1 Реактивы и препараты	52
2.1.2 Оборудование	53
2.1.3. Плазмиды	53
2.1.4. Буферы и растворы	53
2.1.5. Олигонуклеотиды.....	54
2.1.6. Клеточные культуры.....	55
2.1.7. Лабораторные животные и опухолевые модели	55
2.2. Методы	56
2.2.1. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот	56
2.2.2. Приготовление первичной культуры опухолевых клеток LLC и RLS ₄₀	56
2.2.3 Опухолевые модели мыши.....	57
2.2.4. Получение сыворотки крови	59
2.2.5. Выделение ДНК	59
2.2.6. Исследование влияния бычьей панкреатической ДНКазы I и Пульмозима™ на опухолевые клетки <i>in vitro</i>	61
2.2.7. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической ДНКазы I и Пульмозима™.....	63
2.2.8. Приготовление ДНК-библиотек и секвенирование	65

2.2.9. Трансфекция клеток KB-3-1 человека вДНК, полученной из сыворотки крови мышей с LLC	70
2.2.10. Определение уровня SINE и LINE элементов с помощью qPCR	71
2.2.11. Статистический анализ.....	72

ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМ ПОДАВЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДНКАЗЫ I73

3.1. Изменение параметров опухолевых культур под действием бычьей панкреатической ДНКазы I *in vitro*73

3.1.1. Линии опухолевых клеток, использованные в работе.....	73
3.1.2. Определение чувствительности клеток меланомы B16 к ДНКазе I.....	73
3.1.3. Влияние ДНКазы I на концентрацию вДНК на поверхности клеток LLC, B16 и RLS ₄₀ и в культуральной среде.....	74
3.1.4. Влияние ДНКазы I на миграционную активность опухолевых клеток B16.....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	77

3.2. Исследование антиметастатического, противоопухолевого и иммуномодулирующего действия ДНКазы I *in vivo*79

3.2.1. Опухолевые модели, использованные в работе	79
3.2.2. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I при различных типах введения на модели LLC.....	79
3.2.3. Противоопухолевое и антиметастатическое действие ДНКазы I на моделях опухолей B16 и RLS ₄₀ . .81	
3.2.4. Влияние дозы ДНКазы I на интенсивность противоопухолевого эффекта на моделях B16 мышей C57B1 и RLS ₄₀ мышей CBA.....	84
3.2.5. Влияние ДНКазы I на ДНКазную активность и концентрацию вДНК в сыворотке крови мышей с B16, LLC и RLS ₄₀	86
3.2.6. Влияние ДНКазы I на морфофункциональное состояние органов иммунной системы мышей с меланомой B16.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91

3.3. Поиск молекулярных мишеней ДНКазы I среди вДНК сыворотки крови на модели карциномы легких Льюис93

3.3.1. Дизайн эксперимента и приготовление ДНК-библиотек	93
--	----

3.3.3 Получение микрочастиц с иммобилизованными амплифицированными фрагментами ДНК-библиотек с помощью эмульсионной ПЦР.	97
3.3.3. Анализ данных секвенирования	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
3.4. Исследование роли SINE и LINE элементов как возможных маркеров опухолевой прогрессии и их связи с метастазированием.....	106
3.4.1. Анализ представленности повторов SINE и LINE элементов в крови мышей с различными типами опухолей	106
3.4.2. Исследование способности вДНК крови мышей с LLC проникать в клетки KB-3-1 человека.....	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
3.5. Исследование антиметастатического, противоопухолевого и иммуномодулирующего действия препарата Пульмозим™ <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>.....	116
3.5.1. Определение ДНКазной активности и цитотоксичности препарата Пульмозим™ <i>in vitro</i>	116
3.5.2. Влияние Пульмозима™ на миграционную активность опухолевых клеток B16	118
3.5.3. Антиметастатическое действие Пульмозима™ на модели меланомы B16.	119
3.5.4. Действие Пульмозима™ на уровни SINE и LINE элементов в пуле вДНК.	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
ВЫВОДЫ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

в/б – внутрибрюшинный способ введения

в/м – внутримышечный способ введения

в/в – внутривенный способ введения

внДНК – внеклеточные ДНК

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

ИФА – иммуно-ферментный анализ

МРЛ – мелкоклеточный рак легкого

мт-внДНК – митохондриальные внДНК

НК – нуклеиновые кислоты

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

РНКаза – рибонуклеаза

ТРО – торможение роста опухоли

Физ. раствор – физиологический раствор

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

Abs – аутоантитела

АРС– аденоматозный полипоз толстой кишки

AR – рецептор андрогенов

AT1R – рецептор ангиотензина типа 1

а.у. – условные единицы активности

BL-WGA – полногеномная амплификация, опосредованная лигированием

BM-hMSC – мезенхимальные стромальные клетки человеческого костного мозга

C5a – фактор комплемента-5a

CML – хроническая миелогенная лейкемия

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат

EBV – вирус Эпштейна-Барра

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

ERK – киназа, регулирующая внеклеточные сигналы

ET – внеклеточные ловушки

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

HA-1 – гепатоцеллюлярная карцинома A-1

HIV – вирус иммунодефицита человека

hASC – стволовые клетки жировой ткани человека

HIF-1 α – индуцируемый гипоксией фактор 1 α

HK – высокомолекулярный кининоген

HS3 – последовательность сателлита 3 человека

HUVEC – эндотелиальные клетки пуповины человека

GAPDH – Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GM-CSF – гранулоцитарный/макрофагальный колониестимулирующий фактор

IL-8 – интерлейкин-8

LINE – длинные повторяющиеся последовательности

LLC – карцинома легких Льюис

LPS – липополисахариды

MAPK – митоген-активирующая протеинкиназа

MHC – главный комплекс гистосовместимости

MGE – мобильные генетические элементы

MII – индекс ингибирования метастазов

MMP2 – матриксная металлопротеиназа 2

MPO – миелопероксидаза

MVB – мультивезикулярные тельца

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NE – нейтрофильная эластаза

NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки

NGS – массовое параллельное секвенирование

NOX-2 – NADPH-оксидаза-2

ORF – открытая рамка считывания

OZ – опсонизируемый зимозан

PAD-4 – пептидил-аргинин-деминаза

PAF – фактор активации тромбоцитов

PCR – полимеразная цепная реакция

PCR-SSCP – полимеразная цепная реакция с однонитевым конформационным полиморфизмом

PGM – персональная машина секвенирования генома

PMA – форбол 12-миристан 13-ацетат

PNA-PCR – полимеразная цепная реакция, опосредованная пептидной нуклеиновой кислотой

RMEK – Raf митоген-активируемая протеинкиназа

ROS – активные формы кислорода

RPM – количество последовательностей на один миллион последовательностей библиотеки

SINE – короткие перекрестные повторяющиеся последовательности

SNP – точечные мутации

SRP – сигнал-распознающая частица

SVT – SINE-VNTR-Alu ретротранспозон

TFPI – ингибитор липопротеин-ассоциированной коагуляции

TFRC – рецептор трансферрина

TLR – toll-подобный рецептор

TNF- α – фактор некроза опухолей- α

tPA – тканевый активатор плазминогена

VSMC – клетки гладкой мускулатуры сосудистых стенок

WGS – полногеномное секвенирование

WES – полноэкзомное секвенирование

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Наличие внеклеточных ДНК (внДНК) в плазме крови было впервые описано в работе Mandel и Métais в 1948 году [1]. Однако данная работа не привлекла особого внимания исследователей вплоть до 1977 года, когда Stroun и Anker достаточно подробно описали циркулирующие внДНК плазмы крови некоторых высших организмов [2]. Исследователями было выделено некое вещество, которое было устойчиво к действию РНКаз и протеаз, но гидролизовалось ДНКазой I на фрагменты с низкой молекулярной массой. При применении теста на выявление ДНК с пониженной стабильностью структуры, характерных для ДНК опухолевых клеток, оказалось, что часть внДНК в плазме крови онкологических больных была сходна по свойствам с ДНК опухолевого происхождения [3].

В настоящий момент накоплено большое количество данных о составе циркулирующих внДНК в крови высших организмов, но биологические функции внДНК до сих пор активно изучаются. В клинике предпринимаются попытки использовать характеристики внДНК для ранней диагностики различных заболеваний или для пренатальной диагностики [4,5]. Для диагностики онкологических заболеваний используют методы выявления SNP-мутаций некоторых генов, в том числе протоонкогенов и онкосупрессоров, изменений в статусе метилирования ДНК, определение представленности фрагментов различных последовательностей и микросателлитов ДНК опухолевого происхождения, tandemных повторов и мобильных генетических элементов [4,6 – 8]. Несмотря на успехи в поиске новых онкомаркеров на основе анализа SNP внДНК, низкая чувствительность методов и неудачи в применении разработанных маркеров для детекции онкологических заболеваний на ранних стадиях до сих пор значительно ограничивают клиническое применение такого анализа внДНК [9]. Тем не менее, SNP-анализы фетальной внДНК используются в пренатальной диагностике [10]. С другой стороны, повышенное содержание фрагментов микросателлитов, tandemных повторов и мобильных генетических элементов обычно выявляется в пуле внДНК уже на ранних стадиях развития как экспериментальных опухолей, так и различных опухолей у пациентов, в результате чего исследователи все чаще рассматривают эти последовательности как перспективные прогностические и диагностические инструменты в онкологии [11 – 14].

Тщательное исследование характеристик внДНК позволило поставить вопрос о возможной роли внДНК в канцерогенезе, что подтверждается некоторыми

экспериментальными данными. В 1999 группой исследователей, возглавляемой Garcia-Olmo, была выдвинута генометастатическая гипотеза [15]. Согласно этой гипотезе, “метастазы могут возникнуть путем трансфекции уязвимых клеток, расположенных в органах-мишенях, опухолеспецифическими ДНК из клеток первичной опухоли, циркулирующими в плазме крови”. Эта гипотеза была принята другими авторами как модель, которая может объяснить противоречия в экспериментальных данных, касающихся метастазирования [16]. В нескольких работах было сделано предположение, что внДНК опухолевого происхождения, в состав которой в том числе входят и фрагменты онкогенов, может вести себя подобно онковирусам, что открывает альтернативный путь метастазирования [17 – 19]. Открытие ДНК-содержащих микровезикул и полученные доказательства горизонтального переноса ДНК для многих клеточных линий и организмов позволили укрепить эту гипотезу [20].

Открытие феномена нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) как особой сети, состоящей из внДНК с интегрированным в нее содержимым гранул нейтрофилов, изменило существующие концепции иммунологии [21]. В 2003 году было обнаружено, что нейтрофилы и другие гранулоциты способны вместе с содержимым гранул выбрасывать собственный генетический материал во внеклеточное пространство с образованием особых ловушек, способных задерживать патогены [22]. Неоднократно было замечено, что во многих случаях развитие опухоли и метастазирование сопровождается избыточным образованием NET, что не только усиливает адгезию и инвазию, но и в некоторых случаях позволяет опухоли избежать иммунного надзора.

Принимая во внимание возможную патологическую роль внДНК в канцерогенезе, в настоящий момент ведутся разработки новых противоопухолевых и антиметастатических препаратов на основе дезоксирибонуклеаз. За последние 50 лет антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I был неоднократно продемонстрирован различными группами исследователей как *in vitro*, так и *in vivo* [23 – 25]. Кроме того, предпринимались попытки использовать ДНКазу I в качестве препарата для лечения больных с различными метастазирующими формами онкологических заболеваний, а с недавнего времени ведутся исследования человеческой рекомбинантной ДНКазы I (дорназы альфа) [26,27].

Несмотря на то, что эти исследования носили фрагментарный характер, перспективность дальнейшего исследования ДНКазы I в качестве противоопухолевого агента и поиск ее мишеней как возможных участников опухолевой прогрессии, не вызывает сомнений.

Цели и задачи исследования.

Целью нашего исследования являлось изучение антиметастатического потенциала ДНКазы I на примере бычьей панкреатической ДНКазы I на экспериментальных опухолевых моделях и поиск ее молекулярных мишеней среди циркулирующих внеклеточных ДНК.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

1. Исследование влияния ДНКазы I на жизнеспособность и миграцию опухолевых клеток *in vitro*.
2. Исследование антиметастатического и противоопухолевого потенциала ДНКазы I на моделях метастазирующих опухолей мыши и поиск корреляций между уровнем циркулирующих внДНК и дезоксирибонуклеазной активностью сыворотки крови.
3. Поиск и валидация молекулярных мишеней ДНКазы I среди циркулирующих внДНК крови мышей с различными типами метастазирующих опухолей.
4. Изучение возможности межвидового переноса внДНК опухолевого происхождения мыши в клетки человека.
5. Сравнение противоопухолевой эффективности бычьей панкреатической ДНКазы I и рекомбинантного аналога ДНКазы I человека (Пульмозим™) *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна полученных результатов.

В данной работе впервые показано антиметастатическое действие бычьей панкреатической ДНКазы I на двух опухолевых моделях – меланоме B16 и лимфосаркоме RLS₄₀ мыши. Впервые продемонстрирована способность ДНКазы I подавлять рост первичного опухолевого узла на моделях карциномы легких Льюис LLC и лимфосаркомы RLS₄₀. Впервые продемонстрирован антиметастатический потенциал рекомбинантной ДНКазы I человека (Пульмозим™) на модели меланомы B16.

Впервые показано, что при прогрессировании опухолей различного гистогенеза (карциномы легких Льюис, меланомы B16 и лимфосаркомы RLS₄₀) происходит значительное повышение представленности фрагментов онкогенов, tandemных повторов и мобильных генетических элементов среди циркулирующих внДНК крови. Впервые показано, что антиметастатическое и противоопухолевое действие ДНКазы I коррелирует с деградацией некоторых фрагментов внДНК в крови животных-опухоленосителей: фрагментов онкогенов *Hmga2*, *Myc*, *Jun* и фрагментов tandemных повторов, в частности SINE и LINE элементов.

Впервые показано, что антиметастатическое действие рекомбинантной ДНКазы I человека (Пульмозим™) коррелирует с деградацией в кровотоке фрагментов SINE и LINE элементов.

Впервые показано, что фрагменты SINE и LINE элементов из крови мышей с карциномой легких Льюис LLC могут проникать в клетки человеческого происхождения, что свидетельствует о способности tandemных повторов участвовать в межвидовом переносе ДНК.

Практическая значимость.

Автором выявлен ряд значимых tandemных повторов SINE и LINE и онкогенов *Hmga2*, *Mus* и *Jup* среди циркулирующих внДНК мышей с различными типами экспериментальных опухолей, которые могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров для диагностики опухолевых заболеваний, ответа на лечение и мишеней для ген-направленной терапии при экстраполяции на человека. Полученные результаты продемонстрировали, что ДНКазы I является хорошим инструментом для поиска новых потенциальных онкомаркеров среди циркулирующих внДНК. Выявлен высокий противоопухолевый и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I и рекомбинантной ДНКазы I человека на широком спектре экспериментальных опухолей мыши, что позволяет рассматривать эти дезоксирибонуклеазы как перспективные препараты противоопухолевой терапии человека.

Методология и методы исследования

В работе применялись стандартные методы выделения ДНК, методы фракционирования биополимеров, ПЦР в реальном времени и массовое параллельное секвенирование (NGS). В работе использовали стандартные методы работы с культурами клеток *in vitro* и с опухолевыми моделями на мышах *in vivo* в соответствии с этическими протоколами.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 158 страницах, включает 32 рисунка и 15 таблиц. Список литературы содержит 365 источников.

Положения, выносимые на защиту

1. Панкреатическая бычья ДНКазы I снижает жизнеспособность и миграционную активность опухолевых клеток *in vitro*, и уровень метастазирования и размер первичного опухолевого узла *in vivo*.

2. При развитии метастазирующих опухолей карциномы легких Льюис LLC, меланомы B16 и лимфосаркомы RLS₄₀ происходит повышение представленности tandemных повторов подсемейства B1 (SINE) и семейств L1 и Lx (LINE) в крови животных-опухоленосителей, а развитие карциномы легких Льюис также сопровождается увеличением представленности фрагментов онкогенов *Hmga2*, *Myc*, *Fos* и *Jun*.
3. Снижение инвазивного потенциала экспериментальных опухолей под действием панкреатической бычьей ДНКазы I сопровождается восстановлением дезоксирибонуклеазной активности крови до уровня здоровых животных.
4. Молекулярными мишенями панкреатической бычьей ДНКазы I среди циркулирующих вДНК являются фрагменты онкогенов *Hmga2*, *Myc* и *Jun* и около 200 типов tandemных повторов.
5. Снижение инвазивного потенциала экспериментальных опухолей различного гистогенеза под действием панкреатической бычьей ДНКазы I коррелирует со снижением представленности фрагментов SINE и LINE элементов в крови животных-опухоленосителей.
6. Возможен межвидовой перенос вДНК опухолевого происхождения мыши в клетки человека.
7. Рекомбинантная ДНКазы I человека (Пульмозим™) снижает инвазивный потенциал меланомы B16 как *in vitro*, так и *in vivo*. *In vivo* сокращение количества метастазов сопровождается снижением представленности фрагментов SINE и LINE элементов в крови животных-опухоленосителей.

Апробация работы и публикации.

По материалам диссертации опубликовано 3 научные статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базе данных Web of Science и Scopus.

1. Алексеева Л.А., Патутина О.А., Сенькова А.В., Зенкова М.А., Миронова Н.Л. Подавление инвазивных свойств меланомы мыши под действием бычьей панкреатической ДНКазы I *in vitro* и *in vivo*. Молекулярная биология. 2017. 51(4): 637-646.

2. Alekseeva L.A., Mironova N.L., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Patutina O.A., Zenkova M.A. Alteration of the exDNA profile in blood serum of LLC-bearing mice under the decrease of

tumour invasion potential by bovine pancreatic DNase I treatment // PLoS One. –2017. – V. 12. – P. e0171988

3. Alekseeva L.A., Sen'kova A.V., Zenkova M.A., Mironova N.L. Targeting circulating SINEs and LINEs with DNase I provides metastases inhibition in experimental tumor models // Mol Ther Nucleic Acids. – 2020. – V. 20. – P. 50–61. doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.035.

Работа была представлена на российских и международных конференциях в виде устных и постерных докладов на The Forth meeting of the CNRS LIAN «Biogenesis, structure and reactivity of nucleic acids protein assemblies important for health and disease» (Новосибирск, 23 – 25 июня, 2015), International Research Conference «Expanding Frontiers of RNA Chemistry and Biology» (Новосибирск, 9 – 11 ноября, 2015), Международная конференция “Chemical Biology”, посвященная 90-летию академика Д.Г.Кнорре. (Новосибирск, 24 – 28 июля, 2016), International Workshop «Targeting RNA world» (Saint-Petersburg, 2 – 7 сентября, 2018), Международная конференция «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 29 июня – 2 июля, 2019), 19th FEBS Young Scientists’ Forum and 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 3 – 11 июля, 2019).

Личный вклад автора

Основная часть экспериментальной работы и анализ полученных данных выполнены лично автором. Работы с мышинными опухолевыми моделями выполнены совместно с к.б.н. Калединым В.И., к.м.н. Николиным В.П. (ИЦиГ СО РАН) и к.м.н. Сеньковой А.В. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

Работы по конструированию ДНК библиотек были выполнены совместно к.б.н. Е.В. Бреннером. Секвенирование было проведено к.б.н. Бреннером Е.В. и Тупикиным А.Е на базе ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН). Первичная обработка данных секвенирования была проведена к.б.н. Курильщиковым А. М. (ЛММ, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Последующая обработка данных секвенирования была проведена автором работы совместно с к.б.н. Курильщиковым А.М.

ГЛАВА 1. Внеклеточные ДНК как специфический опухолевый

агент: характеристика и функции

1.1. Введение

На протяжении долгого времени считалось, что у высших эукариот нуклеиновые кислоты (НК) присутствуют исключительно в ядрах, митохондриях и хлоропластах, где выполняют функцию носителя наследственной информации. Однако, к настоящему времени установлено, что фрагменты ДНК присутствуют и вне клеток. Внеклеточными ДНК (внДНК) называют фрагменты ДНК, не находящиеся в составе хромосом, и обнаруживаемые за пределами клеток в межклеточном пространстве и биологических жидкостях. Эти молекулы свободно циркулируют в различных жидкостях организма (так называемые циркулирующие ДНК), или находятся в связанном состоянии на наружной мембране клеток (иммобилизованные на мембране внДНК).

В 2009 году Век с соавторами при анализе сыворотки крови 50-ти здоровых доноров обнаружили, что состав внДНК является во многом отражением состава геномной ДНК, как по последовательности, так и по структуре [28]. При этом представленность фрагментов генов среди внДНК хорошо коррелировала с длиной гена и гораздо меньше с его экспрессией. В плазме крови больных онкологическими заболеваниями были обнаружены внДНК, последовательность которых содержала мутантные формы онкогенов, микросателлитные ДНК, тандемные повторы [29].

На сегодняшний день присутствие внДНК обнаружено не только в плазме и сыворотке крови, но также и в большинстве жидкостей организма, таких, как лимфа, ликвор, асцит, молоко, бронхиальная и перитонеальная жидкость, моча, секрет простаты, спинномозговая жидкость, желудочный и желчный сок и околоплодная жидкость [4].

В обзоре рассмотрены характеристики внДНК, особенности ее циркуляции, возможные функции в организме, а также возможность ее использования в качестве источника онкомаркеров и терапевтических мишеней.

1.2. Характеристика циркулирующих внДНК крови

ВнДНК представляют собой гетерогенную фракцию фрагментов ДНК, циркулирующих в различных жидкостях организма, различающиеся по структуре, длине, строению, способам возникновения, и представляющие собой не только свободные ДНК, но и комплексы ДНК с белками и другими молекулами [30]. Как правило, в крови свободные внДНК практически не встречаются, а циркулируют в комплексе с гистонами и нередко встречаются в составе нуклеосом, апоптотических телец, микровезикул, экзосом, а также агрегатов с белками крови [31 – 35]. Состав и структура внДНК, ее концентрация, а также время циркуляции сильно зависят не только от активности нуклеаз крови, но и от состава комплексов, в которых находятся ДНК, так как входящие в комплексы белки и другие компоненты защищают ДНК от деградации нуклеазами [36 – 39].

В крови здоровых людей в большинстве своем содержатся короткие фрагменты внДНК длиной 100 – 500 п.н., но также присутствуют и высокомолекулярные фрагменты длиной от 21 до 80 тысяч п.н., причем содержание коротких фрагментов в 10-20 раз больше, чем длинных [40]. У больных различными заболеваниями наблюдаются изменения в этом соотношении: некоторые исследователи показывают увеличение размера фрагментов внДНК, коррелирующее с возрастанием количества нуклеосом и снижением активности ДНКаз в крови [31,41]. Кроме того, в крови пациентов с онкологическими заболеваниями обнаружено кратное возрастание длины фрагментов (т.е., присутствуют фрагменты длиной 200, 400, 600, 800 п.н. и т.д.), что связано с фрагментацией хроматина по участкам между олигонуклеосомами [31]. Однако, согласно данным других исследователей, у пациентов с различными заболеваниями более выражена фрагментация внДНК по сравнению с внДНК здоровых доноров, и в большей степени представлена фракция низкомолекулярных ДНК [42,43]. В частности, фрагменты внДНК в крови пациентов с солидными нематастатическими опухолями в среднем короче, чем фрагменты внДНК здоровых доноров [44]. На данный момент оценку длины фрагментов внДНК крови нельзя использовать в качестве онкомаркера, так как данные, полученные разными исследователями, противоречивы и неоднозначны [45,46].

Основными ферментами, разрушающими внДНК в крови, являются циркулирующие ДНКазы крови: ДНКазы I, ДНКазы II3, и, в меньшей степени, эндонуклеаза G, индуцирующий апоптоз фактор (AIF), топоизомераза II и циклофилины, а также ДНКазы III [47].

Время циркуляции внДНК невелико: в частности, время полувыведения экзогенной ДНК в крови в среднем составляет от 4 до 30 минут [36,48 – 50]. Время циркуляции не зависит ни от

структуры внДНК (двухцепочечная или одноцепочечная), ни от размера фрагментов [49,51,52], однако непосредственно зависит от состава комплексов, в которых находится внДНК. Так, при введении свободной внДНК уже через 5 минут ее количество в плазме крови снижается в 4 раза [49,51]. При нахождении внДНК в составе комплексов, защищающих ДНК от действия нуклеаз, время полужизни внДНК увеличивается до 30 мин и более [49,50].

Помимо гистонов, комплексы с геномной ДНК образует огромное количество белков: энхансеры, факторы транскрипции и репликации и другие. В сыворотке крови здоровых доноров обнаружены фрагменты центромерного гетерохроматина, входящие в состав комплексов с центромерными белками CEN-A, CEN-B и CEN-C [53]. ВнДНК также обнаруживают в составе комплексов с белками системы комплемента (C1q), лизоцимом, сывороточным альбумином, иммуноглобулинами, фибронектином и другими белками системы свертывания крови, транспортными белками крови (лактоферрином) [30].

1.3. Концентрация внДНК

Впервые факт, что средняя концентрация внДНК в сыворотке крови больных онкологическими заболеваниями, выше, чем у здоровых доноров, был изучен и опубликован Леоном и соавторами [54], а позднее подкреплен данными других исследований [55 – 58]. Концентрация внДНК у онкологических больных может возрасти до 1000 нг/мл крови и выше, и в среднем колеблется в пределах 200 – 300 нг/мл [59 – 61]. Для сравнения у здоровых доноров концентрация внДНК составляет 0 – 100 нг/мл, при средней концентрации 30 нг/мл [30]. Однако малые размеры выборок пациентов в таких исследованиях затрудняют определение более точных диапазонов концентраций.

Неоднократно было показано, что при многих патологических процессах уровень внДНК сильно повышается и сравним с уровнем внДНК в плазме крови онкологических больных: у пациентов с предраковыми состояниями, с воспалениями, травмами, после тяжелой физической нагрузки и у пожилых пациентов, страдающих острыми или хроническими заболеваниями [62].

В начале 2000-х годов в Европе было проведено многоцентровое исследование, где была проанализирована сыворотка крови 1184-х пациентов с различными заболеваниями, в том числе онкологическими [63]. Значения концентрации внДНК пациентов варьировали, и в немалой степени зависели от расовой и этнической принадлежности, региона проживания, профессии, а также типа лечения. Кроме того, были отмечены дневные колебания внДНК, которые могли быть связаны с утомляемостью, стрессом, физической нагрузкой и т.д. Была обнаружена корреляция между повышенным уровнем внДНК в плазме крови пациентов с

хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), и повышенной частотой смертельного исхода. При этом у больных раком легких повышенная концентрация вДНК в плазме крови была отмечена только у 71% пациентов, тогда как у 37% не было отличий от концентрации вДНК здоровых доноров.

В 2003 году Sozzi с соавторами выявил значительную разницу в уровне вДНК в плазме крови пациентов раком легких и здоровых доноров, основываясь на выборке в 200 пациентов [64]. Однако, в других исследованиях никаких различий между уровнем вДНК в плазме крови здоровых доноров и пациентов с тем же типом рака обнаружено не было [65 – 67].

Во многих исследованиях было показано, что при лечении опухоли терапевтический ответ на лечение часто сопровождается снижением патологически повышенного уровня вДНК в плазме крови. При этом у пациентов без терапевтического ответа снижение концентрации вДНК не отмечалось, а наоборот, могло наблюдаться ее повышение [68]. Для пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) была показана корреляция между снижением концентрации вДНК в плазме крови и торможением роста опухоли после химиотерапии [67]. Тем не менее, для пациентов с колоректальным раком было показано, что уровень вДНК в сыворотке и плазме крови никак не коррелирует с количеством метастазов [69].

При анализе концентрации вДНК следует принимать во внимание особенности кинетики вДНК, так как ее уровень может меняться до 10 раз в течение дня. Поэтому исследователи в качестве характеризующего параметра используют максимальные концентрации вДНК [4]. Было показано, что после проведения хирургических операций по удалению опухоли уровень вДНК у онкологических больных снижался до уровня здоровых доноров [70]. В случаях, когда уровень вДНК оставался высоким, это свидетельствовало о неполной ремиссии [56]. Несмотря на достаточно противоречивые результаты исследований, оценка концентрации вДНК крови может оказаться полезным диагностическим инструментом в сочетании с анализом других биомаркеров крови.

1.4. Состав вДНК

1.4.1. GC-состав вДНК

GC-состав циркулирующей вДНК отличается от геномной ДНК присутствием большего числа GC-богатых районов [71,72]. У человека содержание GC- богатых фрагментов в пуле вДНК варьирует от 30.5% до 74.8% (среднее значение 53.7%), в то время как содержание GC-богатых фрагментов в геномной ДНК составляет 38% [73]. У крысы

содержание GC-богатых участков среди внДНК составляет 48 – 50% по отношению к 43% в геномной ДНК [74]. Увеличение этого соотношения, так же как и появление AT-богатых последовательностей, может быть следствием изменения транскрипционной активности генома и наличия в организме патологических процессов [75]. Увеличение количества GC-богатых участков может быть связано с накоплением GC-богатых фрагментов рибосомных генов, устойчивых к нуклеазному гидролизу, а увеличение количества AT-богатых фрагментов связывают с присутствием сателлита 3, некоторых tandemных повторов и общим снижением активности ДНКаз крови [76].

1.4.2. Последовательности онкогенов и онкосупрессоров среди внДНК

В 1994 году в составе внДНК крови онкологических больных были обнаружены последовательности мутантных фрагментов гена *RAS* [77,78], и к настоящему времени мутации гена *K-RAS* проанализированы наиболее тщательно. По этому гену, наряду с *P53*, насчитывается наибольшее количество случаев возникновения мутаций при появлении опухолевых процессов в организме. Мутации этого гена были обнаружены у 50% больных раком поджелудочной железы, 25% больных раком кишечника, 23% с НМРЛ, 11% больных раком мочевого пузыря, а также у 27% пациентов с солидными опухолями поджелудочной и молочной желез, желудка и кишечника [79 – 82]. В последовательности гена *K-RAS* имеются три «горячие точки» возникновения мутаций – в 12, 13 и 61 кодонах [83]. Однако существует не так много работ, в которых описана корреляция между наличием точечных мутаций во фрагментах гена *K-RAS*, обнаруживаемых в плазме крови онкологических больных, и течением онкологических заболеваний. В работе Dianxi с соавторами была показана возможность использования мутаций во фрагментах гена *K-RAS*, обнаруживаемых в пуле внДНК крови больных, в качестве онкомаркеров, однако, только в сочетании с другими маркерами, такими как *CA19-9* [84]. В других работах была обнаружена корреляция между снижением уровня мутантных ДНК и терапевтическим ответом на лечение у пациентов с колоректальным раком, и высказано предположение, что данный маркер имеет большую прогностическую значимость [85].

Другим часто анализируемым геном является ген *P53*. Мутантные последовательности этого гена были обнаружены среди внДНК у 30% больных НМРЛ и 37% больных мелкоклеточным раком легкого (МРЛ), 15% больных раком яичника, 5 – 12% больных раком желудка, 19% больных раком поджелудочной железы, 6 – 21% больных раком кишечника, 18 – 40% больных раком печени [86 – 94]. Для некоторых типов опухолей была показана корреляция между течением онкологического заболевания и наличием мутаций в последовательностях *P53*

во внДНК в плазме крови: в частности, подобная корреляция была отмечена у больных раком кишечника, яичников, а у больных раком молочной железы также наблюдалась корреляция между представленностью мутантных фрагментов гена *P53*, размером опухоли и количеством метастазов в лимфатических узлах [91,95]. В 1997 году было обнаружено, что мутация в 249-м кодоне гена *P53* встречается в 55% случаев гепатоцеллюлярной карциномы, и было предложено использовать эту мутацию в качестве потенциального онкомаркера [96]. У некоторых пациентов, у которых был позже обнаружен рак печени, такая мутация во внДНК была детектирована за несколько лет до появления клинических признаков заболевания [93,97].

Следует отметить, что мутантные фрагменты генов *P53* и *K-RAS* встречаются также в сыворотке крови здоровых доноров в 3 – 7% случаев [94,98], и доля фрагментов этих генов возрастает в сыворотке крови пациентов с заболеваниями, не связанными с онкологией [99,100].

Наличие мутаций, в частности, делеций, было отмечено также для циркулирующих фрагментов гена рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*). Подобная мутация зафиксирована у 100% больных раком легкого, и выявляется с чувствительностью 92%. Для больных раком легкого была обнаружена достоверная корреляция между количеством мутаций в гене *EGFR* и ответом на лечение [101 – 103]. В 2016 году Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило тесты для выявления уровня мутантных фрагментов *EGFR* в (Cobas, Roche) в плазме пациентов с раком легких [104]. На сегодняшний день это пока единственный одобренный FDA тест для генотипирования плазмы в клинике [12].

В качестве потенциальных онкомаркеров исследуют и другие гены, в которых часто обнаруживаются мутации при возникновении опухолей. Мутации были обнаружены в таких генах как *PIK3CA*, *ESR1*, *PTEN*, *AKT1*, *IDH2*, *SMAD4*, *FGFR1*, *HER2*, *BRAF*, *EGFR*, *N-RAS*, *CKIT*, *APC-1* и других [105]. При этом каждый тип онкологического заболевания обладает своим набором мутантных генов, в результате чего среди внДНК обнаруживаются разные мутантные последовательности. В таблице 1 приведены некоторые типы онкологических заболеваний, для которых обнаружены определенные мутантные последовательности среди внДНК.

Помимо степени мутантности аллелей онкогенов среди внДНК важным фактором является общее количество последовательностей онкогенов. Так, в пуле внДНК, выделенной из плазмы или сыворотки крови больных с нейробластомой, была обнаружена повышенная представленность фрагментов *N-MYC*, количество которых было в 25 – 600 раз больше по сравнению со здоровыми донорами [106]. Полученные авторами данные позволяют сделать

вывод, что определение уровня *N-MYC* в сыворотке крови может служить в качестве диагностического и прогностического маркера нейробластомы [107].

Таблица 1. Онкогены, использующиеся в качестве онкомаркеров

Тип онкологического заболевания	Ген	Метод определения последовательности	Ссылка
Рак простаты	Ген рецептора андрогенов AR (экзон 8)	Roche 454 NGS	[108] [109]
Рак легкого	<i>EGFR, ERBB2, K-RAS, BRAF, PIK3CA, TP53, N-RAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, MET, RIT1, STK11, KEAP1, NF1, RB1, CDKN2A, SETD2, ARID1A, SMARCA4, RBM10, U2AF1, MGA</i>	Droplet Digital PCR, IonTorrentNGS, Ion PGM, Illumina HiSeq	[110] [111] [112] [113]
Гепатоцеллюлярная карцинома	<i>TERT, CTNNB1, TP53, hTERT</i>	Illumina MiSeq, real-time PCR	[114] [115]
Рак желудка	<i>TP53, HER2</i>	droplet digital PCR, Ion-AmpliSeq	[116] [117]
Рак молочной железы	<i>TP53, PIK3CA, ESRI, PTEN, AKT1, IDH2, FGFR1, FGFR2, SMAD4, HER2, ESRI</i>	Ion-AmpliSeq, Droplet digital PCR	[118]
Колоректальный рак	<i>K-RAS, TP53, BRAF, EGFR, N-RAS, cKIT, PDGFRa, APC 1</i>	Ion PGM, Droplet Digital PCR, PNA-PCR, PCR-SSCP	[119] [120] [121] [90] [122]
Рак пищевода	<i>TP53, FAT3, MLL3, AJUBA, CREBBP</i>	Illumina HiSeq2000	[123]
Рак головы и шеи	<i>TP53, PIK3CA, NOTCH1, CDKN2A, FAT1, CDK2NA</i>	Illumina HiSeq	[124]
Меланома	<i>BRAF</i>	PCR-SSCP	[125]
Глиобластома	<i>ERBB2, PIK3R1, TP53, NF1</i>	Illumina HiSeq	[126]
Рак яичников	<i>TP53, NF1, BRCA1, BRCA2, RB1, GABRA6, CSMD3, FAT3, CDK12</i>	Illumina HiSeq	[127]
Рак эндометрия	<i>TP53, PTEN, CTNNB1, PIK3CA, ARID1A, K-RAS, ARID5B, POLE</i>	Illumina HiSeq	[128]

В плазме крови 50% пациенток с раком молочной железы было обнаружено повышенное содержание фрагментов гена *HER-2* [129]. При этом ответ на лечение и повышение выживаемости пациенток коррелировали со снижением содержания фрагментов этого гена. В спинномозговой жидкости пациентов с внутримозговыми опухолями также была отмечена повышенная концентрация циркулирующих фрагментов *HER-2* [130].

В некоторых случаях было обнаружено увеличение длины фрагментов генов вДНК. Так, в крови пациентов с колоректальным раком были найдены удлиненные фрагменты гена аденоматозного полипоза толстой кишки (*APC-1*), и длина фрагментов коррелировала со стадией развития заболевания [131]. Мутации гена *APC-1* обнаруживаются в 43 – 60% случаев колоректального рака наряду с мутациями в генах *P53* и *K-RAS* [122,132].

1.4.3. Хромосомные перестройки, обнаруживаемые во фрагментах вДНК

В ряде работ в пуле вДНК были обнаружены также фрагменты, несущие хромосомные перестройки, такие как глобальные геномные перестройки и переамплификации. В циркулирующей вДНК пациентов с В-клеточной лимфомой в 86% случаев обнаруживаются перестановки тяжелых цепей иммуноглобулинов [133]. Также у пациентов с фолликулярной лимфомой среди вДНК обнаруживаются транслокации фрагментов 14 и 18 хромосом [132]. Однако из-за скудного объема данных не до конца понятно, являются ли источниками этих фрагментов опухолевые клетки или же это артефакты методов определения состава циркулирующих ДНК.

1.4.4. Тандемные и сателлитные повторы

Тандемные повторы представляют собой последовательности тандемно расположенных повторяющихся мотивов ДНК, и, в зависимости от размера, подразделяются на несколько классов [134]. Самые протяженные сателлитные повторы представляют собой последовательности от 100 тысяч до 1 миллиона п.о., а длина повторяющегося мотива составляет около 100 п.о. Большая часть сателлитных повторов расположена в центромерных и теломерных гетерохроматиновых участках хромосом [134]. Второй класс, минисателлиты, представляют собой GC-богатые последовательности длиной 10 – 1000 п.о., с длиной мотива 7 – 10 п.о. [134]. Как правило, минисателлиты локализованы в субтеломерных и перицентромерных участках [134,135]. Третий класс, микросателлиты, представляет собой максимально простые короткие тандемные повторы длиной до 1000 п.н. с мотивами в 1 – 6 п.о. [134]. Микросателлиты характеризуются высокой скоростью изменения последовательностей, обусловленной «проскальзыванием» при репликации ДНК и точечными мутациями [136]. Мини- и микросателлиты часто используются в качестве маркеров в молекулярно-генетических исследованиях [136]. Тандемные повторы встречаются не только в гетерохроматиновых участках, они также включаются в регуляторные последовательности и всегда присутствуют в составе мобильных генетических элементов (MGE) [134].

В связи с высокой устойчивостью гетерохроматиновых центромерных и теломерных участков к расщеплению эти последовательности часто встречаются в составе вДНК [137]. Наиболее хорошо охарактеризованными повторами в составе вДНК являются микросателлиты, для которых характерны множественные микросателлитные перестройки. Микросателлитные перестройки характерны как для вДНК ядерного происхождения, так вДНК из митохондрий [134].

Такие микросателлитные перестройки как микросателлитная нестабильность (MSI) и потеря гетерозиготности (LOH) можно обнаружить уже на ранних стадиях развития некоторых заболеваний [138,139]. Как следствие мутаций в генах репарации ДНК, для некоторых микросателлитных участков обнаруживается увеличение длины последовательностей (MSI). LOH возникают, когда из-за мутаций нормальная функция одного аллеля теряется. При раке LOH часто встречается в генах-супрессорах опухолей, что, скорее всего, способствует злокачественной трансформации клеток [140]. Еще в 1999 Sozzi с соавторами показали, что у пациентов с НМРЛ в 40% случаев детектируется MSI локуса D21S1245 и LOH локуса FHIT, причем у 43% пациентов – на I стадии развития заболевания [141]. Поскольку MSI и LOH играют фундаментальную роль в канцерогенезе, в многочисленных исследованиях предпринимались попытки найти такие изменения в пуле вДНК.

В 2006 был предложен высокочувствительный метод анализа микросателлитных повторов опухолевого происхождения во вДНК [138,142]. Авторы предложили использовать полногеномную амплификацию, опосредованную лигированием (BL-WGA), что позволило увеличить чувствительность поиска мутаций и аллельных вариантов в 100 раз и создать хороший диагностический маркер для детекции заболевания на ранних стадиях. В 2011 Carpano с соавторами обнаружили, что микросателлитные изменения четырех локусов (D3S1300, D3S1289, D3S1266 и D3S2338), расположенных на хромосоме 3p, в пуле вДНК из цельной крови пациентов с НМРЛ в абсолютном большинстве соответствовали профилям MSI и LOH локуса 3p опухолевых тканей пациентов с НМРЛ [143]. Подобные перестройки среди вДНК были обнаружены у больных со многими видами опухолей: при раке легких, головы, шеи, почки, мочевого пузыря, предстательной железы, печени [140].

К сожалению, последние данные показывают, что микросателлитные перестройки сложно использовать в качестве маркера канцерогенеза, тем более на ранних стадиях развития опухоли, так как высок шанс получения ложноположительных результатов. Для достоверного детектирования изменений микросателлитной ДНК необходимо, чтобы контаминация опухолевой ДНК нормальными последовательностями не превышала 0.5% (т.е. соотношение

опухолевой и здоровой ДНК должно быть не менее 200:1), в то время как для анализов другого типа достаточно наличия 20% опухолевой ДНК в образце [144 – 147]. Тем не менее, при комбинировании анализа микросателлитных перестроек с другими онкомаркерами были получены более достоверные прогностические панели. Так, при анализе образцов плазмы крови пациентов с раком молочной железы, комбинированный анализ потери гетерозиготности по шести различным локусам вместе с анализом мутаций гена *P53* и изменениями метилирования первого экзона гена *P16* выявил достоверную корреляцию этих параметров с различными патологическими параметрами опухоли [148].

1.4.5. Мобильные генетические элементы в составе вДНК

Мобильные генетические элементы относятся к повторяющимся элементам генома, имеющим несколько копий в последовательности ДНК клетки (рисунок 1). Эти элементы генома могут располагаться в тандеме (сателлитный гетерохроматин, теломеры и т. д.) и могут быть рассеяны по геному (MGE, псевдогены и т. д.) [149]. В пуле вДНК многими авторами было обнаружено повышенное количество мобильных генетических элементов, а именно, SINE-элементов, и низкая представленность LINE-элементов, в частности L1 и L2, [28,150,151].

Диспергированные SINE-ретротранспозоны являются короткими последовательностями ДНК (менее 500 п.о.), появившимися в результате обратной транскрипции коротких молекул РНК, транскрибируемых РНК-полимеразой III: 5S рРНК, тРНК и различные мяРНК [152]. SINE не кодируют белки, и их транспозиция в геноме зависит от других мобильных элементов [134]. Самые известные SINE-элементы человека, Alu-повторы или Alu-элементы, представляют собой короткие последовательности ДНК, которые были открыты при обработке ДНК человека рестриктазой Alu. Alu-повторы различных типов в большом количестве представлены в геномах приматов. В геноме человека они являются одними из самых распространенных элементов и представлены более чем миллионом копий, что составляет около 10.7 % от всего генома [134]. Alu-повторы берут свое происхождение от гена, кодирующего 7SL РНК, которая является компонентом сигнал распознающей частицы (SRP), участника системы остановки трансляции [153]. У мыши присутствуют элементы, гомологичные Alu-повторами человека, которые выделяют в особое В-семейство, включающее подсемейства В1 – В4, причем наибольшую гомологию с повторами человека имеют семейство В1 [154].

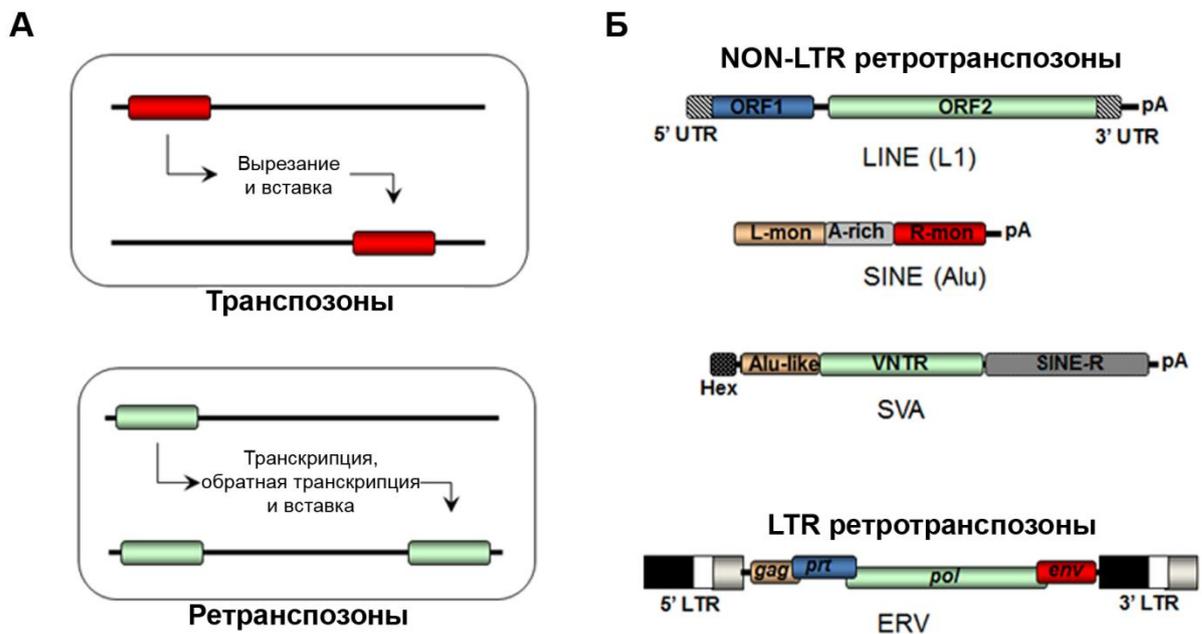


Рисунок 1. Способы транспозиции и типы мобильных генетических элементов (MGE) млекопитающих. (А) Механизмы перемещения мобильных генетических элементов. (Б) Типы MGE и их строение. LINE – длинный диспергированный ядерный элемент; SINE – короткий диспергированный ядерный элемент; ERV – эндогенный ретровирус; SVA – SINE-R_VNTR_Alu; UTR – нетранслируемый регион; ORF – открытая рамка для чтения; pA – поли(А) хвост; L-mon – левый мономер; R-mon – правый мономер; Hex – гексамерный домен; Alu-like – Alu-подобный домен; VNTR – переменное число tandemных повторов; SINE-R – домен SINE-R; LTR – длинный терминальный повтор; gag– групповой антиген; prt– протеаза; pol– полимераз; env – чехол. Рисунок адаптирован из Noutsopoulos, 2016 [155].

Наличие Alu-повторов в составе вДНК человека было показано еще в 1977 году Anker и Stroun [2]. Было обнаружено, что среди вДНК онкологических больных присутствует больше Alu-фрагментов по сравнению со здоровыми донорами. При сравнении с эталонным геномом, среди вДНК здоровых доноров было обнаружено больше коротких Alu-повторов и меньше LINE [156]. Неоднократно было отмечено возрастание количества Alu-элементов среди вДНК при развитии многих онкологических заболеваний, коррелирующее со стадией развития заболевания и с его тяжестью, в связи с чем был разработан PCR-тест для обнаружения Alu-элементов опухолевого происхождения во вДНК [157].

LINE-элементы представляют собой более длинные ретротранспозоны (несколько тысяч п.о.), как правило, без длинных концевых повторов, однако на 3'-конце LINE содержат поли(А)-хвост, аденин-богатую последовательность, либо tandemно-повторяющиеся

последовательности (рисунок 1) [158]. Так же как и SINE-элементы, они относятся к диспергированным повторам, однако могут располагаться тандемно [159]. LINE содержат одну или две открытые рамки считывания (ORF), кодирующие обратную транскриптазу и эндонуклеазу [152]. Наиболее изученным семейством у млекопитающих является L1 семейство с двумя ORF [152]. ORF1 кодирует белок, по свойствам похожий на продукт гена *GAG* ретровирусов. ORF2 кодирует апуриновую-апиримидиновую эндонуклеазу и обратную транскриптазу.

Alu-повторы чаще располагаются в открытых эухроматиновых участках генома, тогда как LINE чаще обнаруживают в гетерохроматине. Повышенное содержание Alu-последовательностей и сниженная представленность LINE элементов может говорить о присутствии в составе вДНК, в большинстве своем, транскрибируемой части генома [76]. Вероятно, активно экспрессируемая ДНК быстрее подвергается деградации при апоптозе и некрозе и пополняет пул вДНК. Однако остается вопрос, почему эти участки не подвергаются дальнейшему гидролизу в кровотоке: возможно, повышенная представленность Alu при многих патологических процессах свидетельствует о наличии особых механизмов упаковки вДНК, либо о снижении активности циркулирующих нуклеаз.

При секвенировании вДНК, полученной из крови крыс, получивших высокодозную радиацию, индуцирующую апоптоз и некроз, было замечено двукратное снижение количества SINE-элементов относительно здорового контроля, однако было выявлено повышенное содержание LINE-элементов [74]. Ранее было показано многократное увеличение содержания LINE-элементов в клетках хлоролейкемии крыс при воздействии на них ультрафиолета и ионизирующей радиации [160]. По-видимому, данные явления обусловлены тем, что высокодозная радиация вызывает глубокое разрушение хроматина, что приводит к выбросу большого количества гетерохроматина с высоким содержанием LINE-элементов в кровь либо в межклеточное пространство [76].

Инсерция ретротранспозонов может иметь регуляторное значение. Есть данные, что инсерция Alu-повторов меняет распределение метилирования и влияет на транскрипцию генов, вызывая такие заболевания как неврофиброматоз, гемофилию, семейную гиперхолестеринемию, рак молочной железы, инсулиннезависимый диабет II типа и саркому Ивенга [161]. Инсерции и делеции LINE-элементов также могут изменять функционирование генов и приводить к неравной рекомбинации и нестабильности генома [161]. Например, было показано, что в результате ретротранспозиции LINE1-элементов могут возникать инсерционные мутации в зародышевых линиях и в соматических клетках человека, мышей и собак, что

приводит к изменению их фенотипа и приобретению черт злокачественно-трансформированных клеток [162 – 164]. Показано, что мутации протоонкогенов и онкосупрессоров, обусловленные вставкой ретротранспозонов, могут являться причиной возникновения опухолей [165 – 167]. Так, встройка полноразмерных SINE-VNTR-Alu ретротранспозонов (SVT) в интрон 8 гена каспазы 8 (*CASP8*) приводит к возникновению кожной базально-клеточной карциномы и рака молочной железы [168].

Изменение соотношения SINE- и LINE-элементов среди вДНК является признаком наличия патологических процессов, в том числе признаком развития опухолевых заболеваний, и может быть использовано для ранней PCR-диагностики онкологических заболеваний [169 – 171].

1.4.6. Вирусная и митохондриальная ДНК в составе вДНК

Среди фрагментов вДНК было обнаружено немало вирусных последовательностей. Фрагменты ДНК вируса Эпштейна-Барра (EBV) и папилломавируса, нередко обнаруживаемые в клетках многих злокачественных опухолей, были также обнаружены в сыворотке крови, как здоровых пациентов, так и онкологических больных [79,172,173]. Последовательности этих вирусов в крови были детектированы при раке головы, шеи, носоглотки, молочной железы и шейки матки [172 – 175]. Исследователи также обнаружили, что содержание вирусных последовательностей коррелирует со стадией заболевания и ответом на лечение, а также с возможностью рецидива, вследствие чего идентификацию вирусных последовательностей было предложено использовать в качестве потенциального онкомаркера [176].

Фрагменты митохондриальной ДНК (мтДНК) также присутствуют в составе вДНК крови [177,178]. Повышенное содержание фрагментов мтДНК было отмечено при раке яичников и простаты, причем количество фрагментов могло возрасти в 1000 раз [177,178]. Для пациентов с раком простаты повышенные уровни внеклеточной мтДНК коррелировали с низкой выживаемостью пациентов в течение 2 лет.

Кроме того, во фрагментах циркулирующих мтДНК были обнаружены точечные мутации. Так, в плазме крови пациентов с раком головы и шеи, легкого, пищевода, прямой кишки, мочевого пузыря и предстательной железы, а также с гепатоцеллюлярной карциномой и злокачественной меланомой были обнаружены мутации в районе D-петли мтДНК, 16S рРНК и NADH-субъединиц (*ND3*, *ND4* и *ND5*) комплекса I дыхательной цепи переноса электронов, а также относительно небольшое количество мутаций в генах цитохромов и тРНК [179 – 183]. D-петля является критически важным элементом генома митохондрии, т.к. она содержит начало

репликативной вилки и основные промоторы транскрипции, а белки рРНК и дыхательной цепи являются необходимыми для нормального функционирования митохондрии и клетки в целом. Наличие мутаций в циркулирующей мтДНК, так же как и общая копияность фрагментов, коррелировали с низкой выживаемостью пациентов, а также с тяжестью протекания заболевания и, в некоторых случаях, с его стадией. Так как количество копий мтДНК в сотни раз превышает количество копий геномной ДНК, анализ количества фрагментов циркулирующих мтДНК и детекция мутантных последовательностей рассматривается в качестве особо эффективного маркера для ранней диагностики заболеваний [184,185].

Не так давно были получены данные, что мтДНК часто обнаруживается в NET наряду с геномной ДНК [186 – 189]. МтДНК, интегрированные в NET, могут представлять серьезную опасность для организма-хозяина. Так, было обнаружено, что избыточное образование мтДНК-содержащих NET, либо проблемы с их деградацией детектируются у пациентов с HIV и различными онкологическими и аутоиммунными заболеваниями [190 – 193].

1.4.7. Статус метилирования внДНК

При развитии различных заболеваний, в том числе возникновении опухолей, многими исследователями были отмечены изменения статуса метилирования ДНК, влияющие на экспрессию онкогенов и онкосупрессоров [79,176]. Повышение количества гиперметилированных фрагментов среди внДНК было показано для гена *P16* у 25% больных раком поджелудочной железы и у 81% больных гепатоцеллюлярной карциномой [99,157,160,194 – 196]. У больных раком предстательной железы в 24% случаев среди внДНК обнаруживались гиперметилированные фрагменты *RASSF1*, в 12% случаев *RARB2* и в 13% случаев – *GSTP1* [109,146]. У 25% пациентов с раком молочной железы среди внДНК присутствовали гиперметилированные фрагменты *APC* и *GSTP1* [158,197]. У больных раком яичников в 100% случаев среди внДНК обнаруживались гиперметилированные фрагменты одного из шести генов *BRCA1*, *RASSF1A*, *APC*, *P14ARF*, *P16INK4A* или *DAPK* [161,198]. Так как эпигенетические изменения ДНК опухолевых клеток возникают уже на ранних стадиях опухолевого процесса, анализ изменения статуса метилирования внДНК пригоден для ранней диагностики опухолей [162,163,199,200]. У пациентов с раком молочной железы среди внДНК крови в 32% случаев обнаруживались гиперметилированные фрагменты *RASSF1A* и в 26% случаев – *RARB2*, тогда как в крови здоровых доноров их доля составила 5% и 8%, соответственно [158,197].

Метилирование ДНК способствует стабилизации структуры, и, кроме того, дает дополнительную защиту от действия нуклеаз, чем и объясняется большая продолжительность

жизни метилированных фрагментов в кровотоке. На культурах клеток HeLa и HUVEC было показано, что метилированные фрагменты гена *RARB2* более стабильны и дольше циркулируют в культуральной среде, чем неметилированные фрагменты [50,201].

1.5. Биогенез внДНК

1.5.1. Источники внДНК

У здоровых людей в норме основными источниками внДНК являются форменные элементы крови и клетки эндотелия сосудов, а также, в меньшей степени, клетки печени, селезенки и легких [31]. Основным путем попадания внДНК в кровь является апоптоз (рисунок 2). Кроме того, в некоторых случаях некроз также является вариантом нормального источника внДНК. Остатки некротизированных клеток и апоптотические тельца поглощаются макрофагами и другими фагоцитирующими клетками, однако часть апоптотических телец может участвовать в циркуляции, избежав фагоцитоза. Впоследствии макрофаги могут выделять «переработанные» ДНК в окружающие ткани [32,202] (рисунок 2). В качестве одного из путей образования внДНК может рассматриваться и активная секреция [203].

Онкоз, как специфический способ клеточной гибели, также может рассматриваться в качестве механизма выброса внДНК. Онкоз, как и некроз, может являться причиной появления высокомолекулярных фрагментов внДНК с участками неспецифического расщепления в крови больных с различными типами опухолей [204,205] (рисунок 2).

Не так давно был обнаружен еще один способ появления внДНК в результате клеточной гибели нейтрофилов и других гранулоцитов, называемый нетозом или этозом [206]. В результате нетоза наблюдается выброс структурированного хроматина в комплексе с содержимым гранул с формированием сетеподобных структур NET [207]. Таким образом, NET также могут служить источником внДНК.

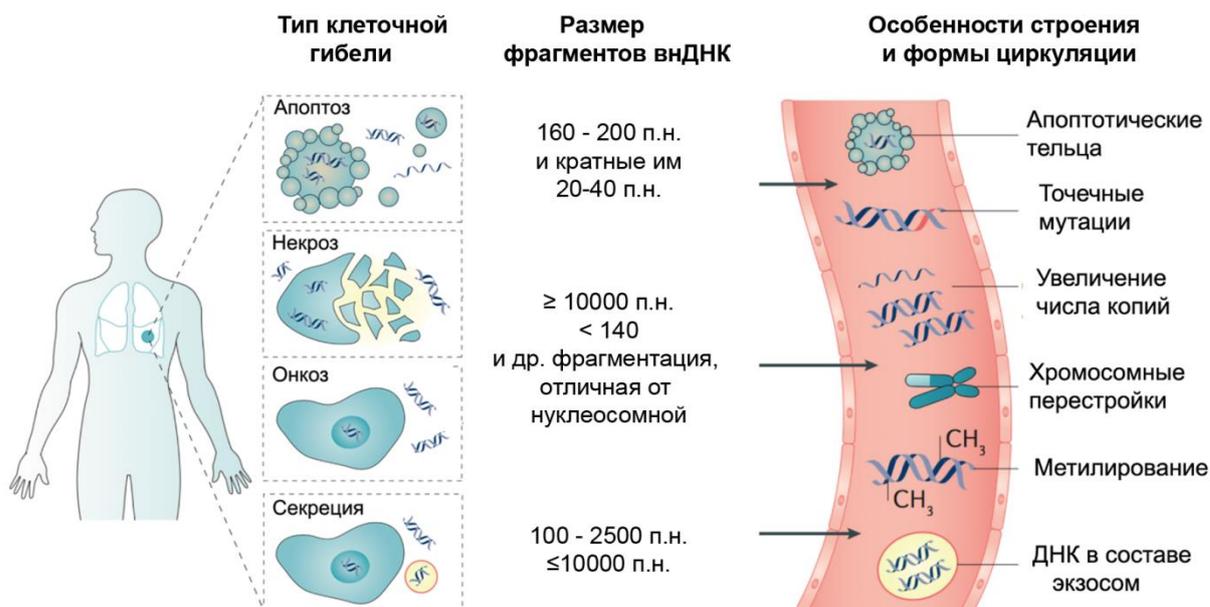


Рисунок 2. Источники и состав внДНК опухолевого происхождения. Рисунок адаптирован из Wan et al., 2017 [208].

1.5.2. Апоптоз как источник внДНК

В процессе апоптоза происходит расщепление ДНК под действием магний-чувствительных ДНКаз на фрагменты, длина которых кратна 160 – 180 п.о., с последующей фрагментацией вплоть до отдельных нуклеотидов [209]. Поэтому обнаружение в крови здоровых доноров и онкологических больных фрагментов, кратных 160 – 200 п.о., а также более мелких фрагментов (10 – 20 п.о.), служат доказательством того, что, по крайней мере, часть внДНК имеет апоптотическое происхождение [32,43].

В большинстве случаев короткие фрагменты внДНК присутствуют в кровотоке в виде нуклеосом или олигонуклеосом [42]. Увеличение количества клеток, вступивших в апоптоз или некроз, приводит к повышению количества циркулирующих нуклеосом [210]. Повышение концентрации нуклеосом может быть хорошим маркером наличия апоптотических и некротических процессов в организме, которые могут являться признаками серьезных заболеваний.

Моно- и олигонуклеосомы содержат гистон H1 и по этой причине нерастворимы в плазме крови, содержащей двухвалентные катионы [33]. Однако, сывороточный амилоидный компонент Р способен замещать гистон H1 в нуклеосомах, что приводит к повышению растворимости нуклеосом в плазме и добавляет устойчивости к действию нуклеаз крови [211,212]. Возрастание количества циркулирующих нуклеосом было отмечено в плазме крови

пациентов с широким спектром заболеваний: при различных онкологических заболеваниях, при травмах, сепсисе [63,213]. Концентрация циркулирующих нуклеосом может возрасти также при нормальном функционировании тканей, например, при интенсивном делении клеток, при дифференцировке клеток в костном мозге и при созревании форменных элементов крови.

Существует предположение, что нуклеосомная упаковка может способствовать секреции внДНК. В частности, в большинстве внДНК присутствует локус, связывающийся с модифицированным гистон H3K27me2. Предполагается, что этот гистон необходим для экспорта внДНК, стабилизации и ее секреции [214]. Нуклеосомная упаковка препятствует эффективному гидролизу внДНК ДНКазой крови. Кроме того, циркулирующие нуклеосомы могут включаться в нейтрофильные сети (NET) [215].

Повышенная концентрация нуклеосом является маркером апоптоза у пациентов с онкологическими заболеваниями. Увеличение их количества было обнаружено у пациентов с различными видами рака: первичным и рецидивирующим раком молочной железы, раком прямой кишки и желудка, колоректальным раком, гепатоцеллюлярной карциномой и раком щитовидной железы [216,217]. Было показано, что у пациентов с панкреатитом и различными доброкачественными заболеваниями молочной железы наблюдается снижение концентрации нуклеосом после лечения радио- и химиотерапией, что коррелирует с уменьшением размера опухоли [218]. Анализ концентрации нуклеосом у больных прогрессирующим НМРЛ после химиотерапии показал, что снижение уровня циркулирующих нуклеосом коррелирует с ответом на лечение [67]. И, таким образом, определение уровня нуклеосом в плазме крови может быть важным прогностическим маркером [218].

В 2000 было обнаружено присутствие в плазме крови апоптотических телец, содержащих внДНК [73,219]. Позднее было показано, что внДНК в апоптотических тельцах, полученных из клеток HUVES, обогащена перичентромерными тандемными повторами, большую часть которых составляли фрагменты человеческого сателлита 3 (HS3), но обеднена по представленности центромерных α -сателлитов. Кроме того, среди внДНК апоптотических телец наблюдалась высокая представленность SINE-элементов (преимущественно, Alu-повторов) и низкая представленность LINE-элементов. Сходные результаты были показаны в работе Векс с соавторами при анализе апоптотических телец, выделенных из сыворотки крови здоровых доноров [28]. Кроме того, Морозкиным с соавторами было показано обогащение внДНК из апоптотических телец нормальных клеток более специфическими последовательностями, например ДНК района 9q12 [220].

Апоптотические тельца представляют собой мембранные частицы размером от 50 нм до 5000 нм [221], образуются на поздних стадиях апоптоза и содержат остатки разрушенной ДНК клетки, чаще всего в варианте конденсированного хроматина [222]. Как и нуклеосомы, они защищают внДНК от разрушения нуклеазами, о чем свидетельствуют, в том числе, данные Морозкина с соавторами [220]. Циркулирующие апоптотические тельца появляются в кровотоке вследствие избегания ими фагоцитоза соседними клетками и профессиональными фагоцитами, такими как макрофаги и незрелые дендритные клетки [223,224]. На ранних стадиях апоптоза вследствие клеточного сжатия от поверхности клеток могут отделяться микровезикулы размером 200 – 1000 нм, которые содержат ДНК не только внутри, но и на поверхности [20,225]. Нарушение функции фагоцитоза является одним из путей избегания опухолевой клеткой иммунного надзора, вследствие чего в кровотоке повышается концентрация апоптотических телец [223].

1.5.3. Некроз как источник внДНК

В норме некроз встречается значительно реже апоптоза и характеризуется отличной от апоптоза фрагментацией ДНК. В частности, присутствие в крови пациентов с различными заболеваниями высокомолекулярных фрагментов ДНК (~10000 п.н.) и комплексов, отличных по составу от апоптотических телец, свидетельствуют об альтернативных путях высвобождения внДНК в кровь, и в том числе путем некроза [31,43].

Некроз часто наблюдается при росте опухолей вследствие недостаточного питания трансформированных тканей. Повышение концентрации внДНК у онкологических больных может объясняться наличием некротических процессов в организме [226]. Однако высокие концентрации внДНК наблюдаются, в том числе, уже на ранних этапах развития опухоли, не сопровождающихся обширным метастазированием и возникновением некротизированных участков, поэтому некроз не может рассматриваться как основной источник внДНК у онкологических больных [227].

Процесс некроза может быть вызван жёстким и необратимым вмешательством, например, травмой, высокодозной радиацией, высокой температурой и/или обработкой веществами, приводящими к разрушению клеточной мембраны или блокирующими энергетические процессы, что сопровождается повышением уровня внДНК [207]. В частности, значительное увеличение концентрации внДНК уже через 20 минут после получения травмы может объясняться как некрозом, так и ускоренным апоптозом [228]. Кроме того, была обнаружена достоверная корреляция увеличения концентрации циркулирующей в крови ДНК в зависимости от тяжести травмы у пациентов.

Недавние данные показывают, что в крови онкологических больных с заболеваниями поздней стадии преобладают более короткие фрагменты (145 ± 5 п.н.), по сравнению с фрагментами после межнуклеосомной деградации [229]. Подобное фрагментирование может быть следствием того, что деградация внДНК происходит в кровотоке ферментативным путем, после высвобождения ДНК в результате некроза [230].

1.5.4. Секреция как источник внДНК

Еще в 1972 году была показана способность лимфоцитов человека синтезировать новую ДНК при культивировании в присутствии фитомиогенов и выделять до 90% этой ДНК в культуральную жидкость. Выделяемая ДНК имела высокую молекулярную массу ($3 - 12 \times 10^6$) и находилась в комплексе с белками и липидами [231]. В 1976 году Anker с коллегами в пионерской работе предположили, что активная секреция может рассматриваться в качестве одного из путей образования внДНК [203]. Однако, есть и исследования, опровергающие гипотезу об активной секреции [232].

Таким образом, вопрос о наличии путей высвобождения внДНК, не связанных с лизисом клеток, остается открытым. В частности, для культур опухолевых клеток было показано более активное высвобождение внДНК по сравнению с нормальными клетками, по-видимому, не связанное с процессами апоптоза и некроза [233]. Также эксперименты *in vivo* и наблюдения за онкологическими пациентами показали, что опухолью в кровь также выделяется значительное количество внДНК уже на ранних стадиях развития опухоли, не сопровождающихся некротическими и апоптотическими процессами [45,60]. Для некоторых типов опухолей была замечена статистически значимая корреляция между диаметром опухоли и увеличением уровня внДНК, что может служить косвенным подтверждением наличия секреторного пути образования внДНК [234].

В настоящий момент остаются неизученными пути возможной секреции внДНК. При использовании ингибиторов основных транспортных путей в культуре как нормальных, так и раковых клеток, не было замечено изменение концентрации внДНК, однако было показано изменение количества ДНК, связанных с поверхностью клеток [235]. Только при обработке первичных клеток HUVES хлорхиноном, который увеличивает рН в эндосомах, лизосомах и пузырьках Гольджи, было показано увеличение поверхностно связанных и свободных внДНК в 2 раза.

Наличие внДНК в составе микровезикул может являться доказательством существования секреторных путей для внДНК. Микровезикулы представляют собой гетерогенную фракцию,

различающуюся по размеру и содержанию, но, как правило, они содержат трансмембранные и цитозольные пептиды, липиды и их метаболиты, миРНК и мРНК, а по последним данным геномную и митохондриальную ДНК [236 – 239]. Длина фрагментов ДНК в микровезикулах колеблется в пределах 6-17 тысяч п.н. и, в среднем, составляет 15-17 тысяч п.н..

Также внДНК секретируются клетками в составе экзосом, особых везикул размером 30 – 100 нм. ВнДНК в экзосомах, по-видимому, существует в двух типах: первый тип двуцепочечной внДНК находится на внешней поверхности мембраны и имеет относительно большой размер ($> 2,5$ п.н.). Второй тип двуцепочечной внДНК находится внутри экзосомы и имеет размеры от 100 до 2500 п.н. [240]. Учитывая то, что экзосомы секретируются практически всеми клетками организма, внДНК в составе экзосом могут составлять весьма существенную долю во фракции циркулирующих внДНК [241].

Экзосомы могут содержать ДНК опухолевого происхождения. Yoshida с соавторами обнаружили, что статус метилирования фрагментов LINE1 элемента и гена *SOX17* в экзосомальной внДНК, полученных из желудочного сока, отражает статус метилирования геномной ДНК клеток рака желудка. Метилирование гена *SOX17* было обнаружено как на ранней, так и на поздней стадии рака желудка, независимо от типа дифференцировки, поэтому данный факт может быть полезным биомаркером при диагностике рака желудка [242]. Однако, авторы показали, что внДНК, выделенная из экзосомальной фракции имела длину >10000 п.н., что ставит под сомнение некоторые детали протокола выделения экзосом. Другими авторами были обнаружены короткие фрагменты внДНК в экзосомальной фракции, содержащие мутантные фрагменты *K-RAS* и *P53* [243].

Содержимое микровезикул сохраняет свою биологическую функцию и может участвовать в регуляции жизнедеятельности клетки-реципиента [244 – 247]. Было обнаружено, что некоторые фрагменты ДНК содержали последовательности целых генов, включая 5'-промоторную область, кодирующую область и 3'-нетранслируемую область, что говорит об их потенциальной способности транскрибироваться. После попадания в клетку-реципиент внДНК экспрессируются, что приводит к увеличению уровня мРНК и белков, закодированных в доставленных внДНК [243]. Внутри клеток-реципиентов ДНК из экзосом попадают преимущественно путем эндоцитоза либо перфузией. При этом ДНК могут быть транспортированы как в цитозоль, так и прямо в ядро [248].

Подобный перенос внДНК играет крайне важную роль в возникновении опухолей и распространении метастазов [249,250]. В состав микровезикул опухолевого происхождения входят ДНК, несущие черты материнской опухолевой клетки: мутантные фрагменты генов,

переамплифицированные последовательности, и т.д. [239,248,250 – 253]. Неоднократно была показана возможность горизонтального переноса ДНК в составе микровезикул в здоровые клетки, приводящего к трансформации клетки. Подробно это явление будет описано в разделе 1.7.4.

1.5.5. Нетоз и образование NET

Особым способом выброса внДНК в кровь или межклеточное пространство, называемым нетозом, обладают нейтрофильные лейкоциты [254]. Основы этого процесса были изучены еще в 1996 году группой Takei [21]. Было показано, что в клетках первичной культуры человеческих нейтрофилов при активации форбол 12-мирикат 13-ацетатом (РМА) происходили изменения, не характерные для процессов апоптоза и некроза. После разрушения ядра хроматин компактизовался и специфически упаковывался, при этом фрагментация ДНК, характерная для апоптоза, не происходила, и дегенеративных изменений в других органеллах не наблюдалось. Через 3 часа после активации РМА возрастала проницаемость мембраны и концентрация внДНК в культуральной среде. Аналогичные изменения наблюдались в популяции нейтрофилов, фагоцитирующих опсонизированный зимозан, что свидетельствовало о том, что данный тип клеточной смерти не является уникальным явлением, а может выступать в качестве особого механизма клеточной деградации при активации различными патогенами и иметь определенную биологическую функцию.

Обнаруженный механизм сильно отличался как от апоптоза, так и от некроза. В процессе, названном в дальнейшем нетозом, происходило не только выбрасывание специфически упакованного материала в межклеточное пространство, но и контролируемое высвобождение остальных компонентов нейтрофила [255,256]. В отличие от апоптоза, нетоз не зависел от действия каспаз и активировался активными формами кислорода (ROS) [21]. При нетозе фрагментация хроматина существенно отличалась от таковой при апоптозе, хотя и происходил распад ядерной мембраны [257]. В процессе апоптоза выделение ДНК в межклеточную среду происходит в составе апоптотических телец, в то время как в процессе нетоза происходила частичная конденсация хроматина с последующим упаковыванием в остатки ядерной мембраны и выделением фрагментов нуклеома в межклеточное пространство. В процессе нетоза выброс хроматина из клетки является контролируемым явлением [258]. Для нетоза, как правило, требуется специфическая активация с участием NADPH оксидазы [257].

Процесс нетоза также отличается и от некроза: главным отличием являются морфологические изменения ядерной оболочки. Во время некроза ядро подвергается кариопикнозу: ядерная оболочка разрушается только после последовательного разрушения

генетического материала путем образования ядерных глыбок (кариорексис) и только потом лизируется [257]. В процессе нетоза происходит увеличение пространства между внутренней и внешней ядерной мембраной, в результате чего она распадается на множество пузырьков, и далее ДНК-белковые комплексы смешиваются с содержимым гранул нейтрофила [235].

Такие специфические ДНК-белковые комплексы формируют сетеподобные структуры, в которые помимо ДНК с гистонами входят другие ядерные белки, а также различные ферменты нейтрофильных гранул, такие как нейтрофильная эластаза (NE), миелопероксидаза (MPO) и другие продуценты ROS, интерлейкины и другие белки (рисунок 3) [206]. Эти структуры были названы нейтрофильными внеклеточными ловушками (NET). NET являются основой механизма антимикробного действия нейтрофилов и обладают способностью захватывать и убивать патогенные организмы и индуцировать воспалительные изменения [259]. По аналогии, новый описанный механизм клеточной гибели был назван нетозом. Позднее подобное явление было замечено у других гранулоцитов и фагоцитов [249]. Основные компоненты NET перечислены в таблице 2.

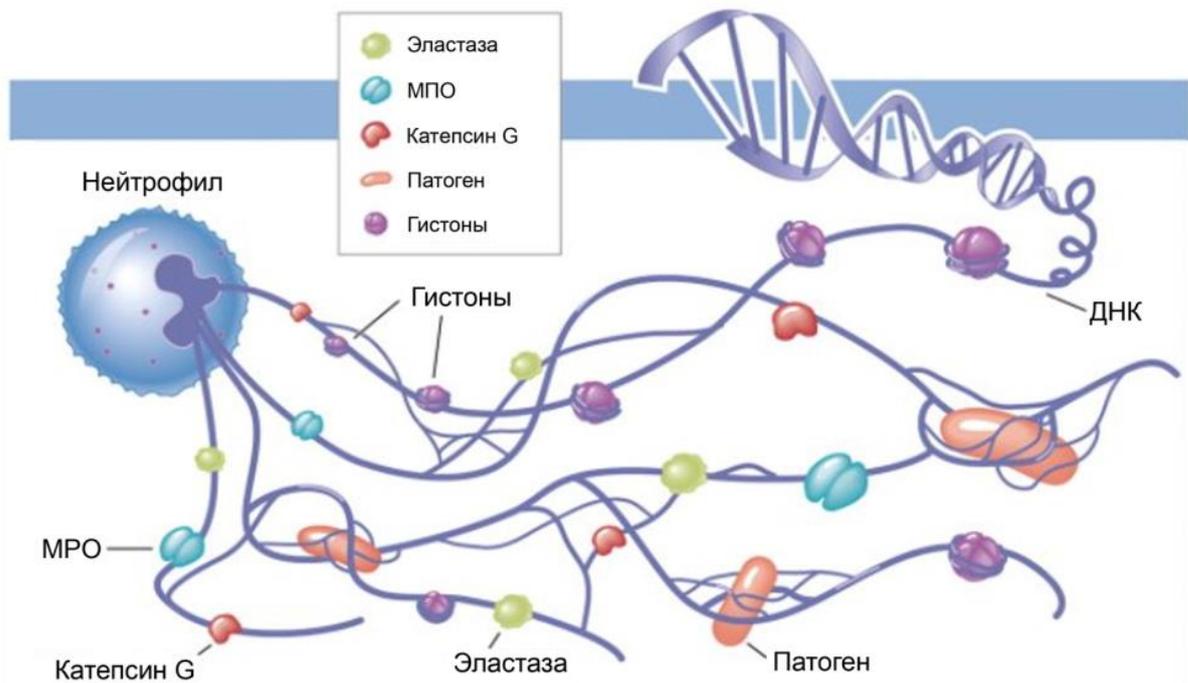


Рисунок 3. Механизм формирования NET. Нейтрофилы высвобождают нуклеосомы и содержимое гранул, формирующие сетеподобные структуры, в ответ на инфекцию или воспалительные стимулы. ДНК в комплексе с гистонами и компонентами гранул (NE, MPO, катепсин G) способствуют захвату и разрушению патогенов. Рисунок адаптирован из Miyata & Fan, 2012 [260].

Таблица 2. Основные компоненты NET и их функции

Компонент NET	Источник	Функция в NET	Ссылка
ДНК	Хроматин	Кóровая функция	[206]
Гистоны H1, H2, H3, H4	Хроматин	Увеличение проницаемости клеточной стенки бактерий и ее разрушение; защита ДНК от действия нуклеаз	[261]
Нейтрофильная эластаза NE	Первичные гранулы нейтрофилов	Разрушение ряда факторов вирулентности энтеробактерий; предотвращение выхода бактерий из фаголизосом	[206,262]
Сериновые протеазы	Первичные азурофильные гранулы	Проникновение и разрушение бактериальных мембран	[262]
Лактоферрин и липокалин 2	Вторичные гранулы	Поглощение ионов железа и ограничение поступления питательных веществ в бактериальные клетки	[206,264]
Миелопероксидаза (MPO)	Первичные азурофильные гранулы	Образование гипохлорита из анионов хлора	[206]
Лизоцим	Первичные и вторичные гранулы	Гидролиз компонентов клеточной стенки бактерий	[206]
Дефензины	Вторичные гранулы	Микропорация клеточных стенок бактерий	[206]
Желатиназа А (матриксная металлопротеиназа 2, MMP2)	Третичные гранулы	Разрушение белковых компонентов клеточных стенок; Специфическое разрушение коллагена IV базальных мембран	[206]
Активные формы кислорода (ROS)	Митохондрии	Перфорация клеточных стенок бактерий; Активация прочих компонентов NET	[206]

Активация нейтрофилов с последующим нетозом и генерацией NET может происходить под воздействием самых разных молекул: интерлейкина-8 (IL-8), фактора некроза опухолей- α (TNF- α), фактора комплемента-5a (C5a), фактора активации тромбоцитов (PAF), липосахарида (LPS), гранулоцитарно/макрофагально колониестимулирующих фактора (GM-CSF), анти-нейтрофильных антител [265 – 269].

Стандартный механизм образования NET включает два пути: литический или NOX-зависимый путь (рисунок 4, А) и везикулярный путь (рисунок 4, Б) [270]. На первом этапе

литического пути происходит активация нейтрофила: активация NADPH-оксидазы-2 (NOX-2) и протеинкиназы C и генерирование ROS, способных связываться с ядерной мембраной с помощью toll-подобных рецепторов 4 (TLR4). Далее происходит активация нейтрофильной эластазы (NE), пептидил-аргинин-деиминазы-4 (PAD4) и модификация гистоновых белков за счет превращения аргинина и метиларгинина в цитруллин. На следующем этапе происходит деконденсация хроматина и высвобождение ДНК, выделение содержимого гранул в цитоплазму, проникновение NE и миелопероксидазы (MPO) из азурофильных гранул в ядро и дальнейшая деконденсация хроматина. Утрата ядерной оболочкой сегментообразного строения приводит к ее распаду на множество пузырьков с деконденсированным хроматином, затем происходит полное исчезновение гранул и равномерное распределение их содержимого, частичная конденсация хроматина либо вторичная фрагментация ДНК в постъядерных везикулах. На завершающих этапах происходит активация сигнальной фосфатидил-инозитол-3-киназы (PIK-3) и серин-треонин-киназы (STK, СТК), активация цитоскелета и сжатие клетки, далее разрыв клеточной мембраны, который приводит к гибели нейтрофила и выбрасыванию его содержимого с образованием NET.

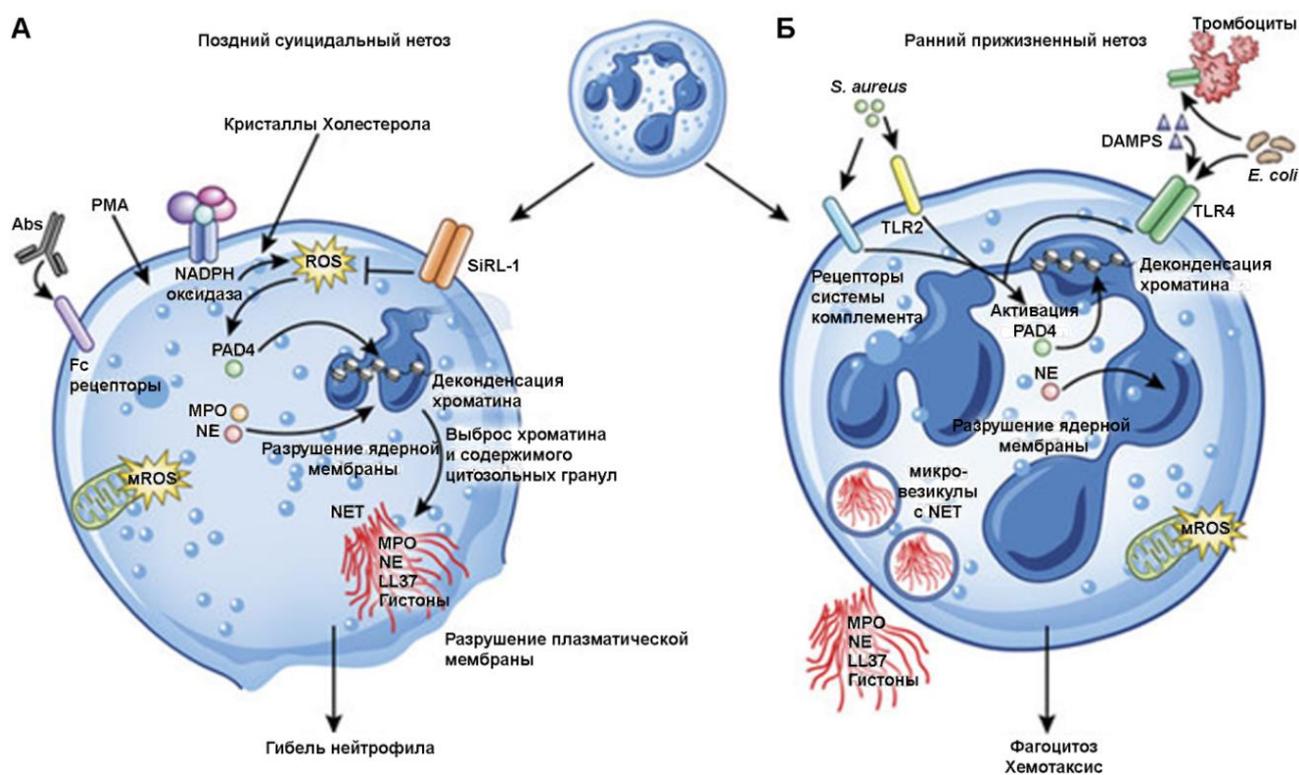


Рисунок 4. Нетоз и образование NET: литический (А) и везикулярный пути (Б). Рисунок адаптирован из Jorch and Kubes, 2017 [270].

При везикулярном пути образования NET (рисунок 4, Б) [218] активатором выступают *S. aureus* как через рецепторы комплемента, так и через TLR2, или *E. coli* непосредственно через TLR4 или опосредованно через TLR4-активированные тромбоциты. Уже через несколько минут после стимуляции нейтрофила активируется PAD4, по всей вероятности, вне зависимости от образования ROS, и индуцирует деконденсацию хроматина. Как и в литическом пути, NE мигрирует в ядро, чтобы способствовать дальнейшей деконденсации хроматина и распаду ядерной мембраны. Хроматин в комплексе с белками нейтрофила высвобождается в везикулах.

Важным отличием этого пути является то, что высвобождение NET происходит уже через несколько минут после стимуляции нейтрофила, и не сопровождается гибелью клетки-продуцента, в результате чего у нейтрофила остается как способность к фагоцитозу, так и к новому образованию NET. Было высказано предположение, что данный везикулярный тип высвобождения предшествует нетозу, и активируется при небольшой концентрации и низкой опасности патогена.

Образование NET было обнаружено в крови, в мукозальных секретах при различных неинфекционных, инфекционных или аутоиммунных заболеваниях. Кроме того, особенно активно NET образуются на поверхности слизистых оболочек, куда и мигрируют в конечном итоге большинство гранулоцитов [271]. В тканях, куда также нередко мигрируют гранулоциты, также замечено формирование NET [271].

В норме у животных, в отличие от растений, при отсутствии инфекции и воспаления NET не образуются, либо их образование ингибируется гуморальными факторами сыворотки, либо они разрушаются макрофагами и свободными протеазами и нуклеазами крови [272,273]. Однако при аутоиммунных, инфекционных либо иных патологиях, а также при образовании опухолей, может происходить избыточное формирование NET [274]. В первую очередь, образование NET может приводить к нарушению кровообращения как в сосудах, так и в тканях и органах, которое может осложняться возникновением различных аутоиммунных патологий [274 – 276]. В процессе нетоза происходит выход внутриклеточных белков и ДНК во внеклеточную среду, которые могут превратиться в мощные аутоантигенные факторы для организма хозяина и спровоцировать множественные аутоиммунные ответы [267]. Избыточное образование NET показано при многих патологических состояниях: при аппендиците, преэклампсии, микрососудистом васкулите, тяжелом сепсисе, малярии, периодонтите, мастите, отите, астме и многих других. Кроме того, существует предположение, что опухолевые клетки

могут использовать NET в качестве своеобразных «рельсов», способствующих распространению метастазов по организму [277].

Таким образом, образование NET является «обоюдоострым мечом» врожденного иммунитета, угрожающим как различным патогенам, так и самому хозяину. Нарушения образования NET могут приводить как к уязвимости к бактериальным инфекциям, так и к гиперфункционированию замещающих путей, приводящих к тромбозу, ишемии и повреждениям сосудов и усилению канцерогенеза.

1.5.6. Распознавание ДНК

Принцип распознавания ДНК является относительно консервативным и присутствует у всех животных. У млекопитающих присутствует группа toll-подобных рецепторов (TLR), способных к распознаванию различных компонентов клетки, однако только внутриклеточный эндосомальный белок TLR9 способен к распознаванию и связыванию ДНК [278]. Экспрессируются эти рецепторы, в основном, в плазмацитоидных и дендритных клетках. Через эти рецепторы запускаются механизмы синтеза интерлейкинов, различных хемокинов, TNF- α и интерферонов 1-го типа. Главным стимулом для TLR9 являются метилированные CpG-островки, характерные для бактериальной и вирусной ДНК, а также для митохондриальной ДНК и, в некоторых случаях, для геномной ДНК при некоторых патологических процессах [279 – 281]. Также было показано, что TLR9 способны распознавать гетеродуплексы ДНК:РНК, но не одноцепочечную ДНК [282].

В норме геномная ДНК содержит метилированные CpG динуклеотиды, что защищает организм от возникновения аутоиммунных реакций [283]. Однако некоторые заболевания характеризуются изменением статуса метилирования и возникновением гипометилированной внДНК, что приводит к возникновению аутоиммунных и иных патологий [280]. Тем не менее, в организме присутствует второй уровень защиты в виде системы генерации активных форм кислорода (ROS) и антиоксидантов, которые позволяют блокировать волну аутоиммунных ответов. При ошибочном связывании TLR9 с метилированной ДНК либо при связывании с геномной гипометилированной ДНК уже через 5 минут происходит активная генерация ROS, за которой следует активация систем антиоксидантов, «отключающих» стимулирующий эффект TLR9 [284].

Так как внДНК находятся в комплексе с белками, липопротеинами или в составе микровезикул, эти структуры так же могут обеспечивать взаимодействие с различными рецепторами и способствует проникновению внДНК в другие клетки [285,286].

1.6. Патогенез внДНК в крови онкологических больных

1.6.1. Участие внДНК опухолевого происхождения в злокачественной трансформации здоровых клеток

Первое упоминание о существовании внДНК можно найти в работах Griffith, который продемонстрировал передачу патогенных свойств от убитых вирулентных бактерий живым клеткам невирулентного штамма [287]. Несколькими годами позже Avery с соавторами продолжили опыт Griffith и не только продемонстрировали передачу генетического материала путем горизонтального переноса между различными штаммами *Pneumococcus*, но и доказали, что именно внДНК участвуют в переносе [288]. Более поздние исследования с использованием *Bacillus subtilis* показали, что высвобождение ДНК в окружающие ткани и жидкости может быть результатом активной секреции [2].

Классическая теория метастазирования предполагает, что метастазирование происходит путем распространения по организму клеток первичной опухоли через кровоток с формированием очагов метастазов в наиболее “чувствительных” к этому органам-мишенях [16]. В 1999 году группа исследователей, возглавляемая Garcia-Olmo, выдвинула гипотезу об альтернативном пути возникновения метастазов [15]. Согласно этой «генометастатической» гипотезе, предполагается, что “метастазы могут возникать путем трансфекции уязвимых клеток, расположенных в органах-мишенях, опухолеспецифическими ДНК из клеток первичной опухоли, циркулирующими в крови”. Эта гипотеза была принята другими авторами как одна из главных моделей, которая может объяснить противоречия в экспериментальных данных, касающихся метастазирования.

Впоследствии группа Bergsmedh представила доказательства, что фрагменты ДНК опухолевого происхождения могут попадать в другие клетки при поглощении ими апоптотических телец путем горизонтального переноса, что приводило к анеуплоидии и накоплению генетических изменений, ведущих к образованию опухолей [18].

В 2010 году Garcia-Olmo с соавторами было показано участие внДНК из опухолевых клеток в злокачественной трансформации здоровых клеток [16]. Для этого использовали плазму крови пациентов, больных раком толстого кишечника, в которой были выявлены внДНК, содержащие фрагменты мутантных генов *K-RAS*, *P53* и β -глобина. Линию NIH-3T3 опухолевых клеток мыши, не имеющих такого паттерна экспрессии мутантных генов, культивировали в присутствии плазмы крови пациентов, больных раком толстого кишечника, или плазмы здоровых доноров (в качестве контроля) в течение 20 суток. После культивирования

опухолевые клетки вводили подкожно мышам линии NOD-SCID. Для клеток линии NIH-3T3, которые культивировали в плазме крови онкологических больных, был показан высокий онкогенный потенциал, при этом не было замечено образования опухоли после инъекции клеток, культивировавшихся в плазме крови здоровых доноров. В опухолевой ткани, развившейся из клеток NIH-3T3 после культивирования в плазме онкологических больных, были обнаружены мутантные последовательности гена *K-RAS*, на основании чего авторы сделали заключение о злокачественной трансформации клеток мыши вДНК из опухоли человека. То есть фактически они доказали приобретение клетками мыши злокачественного фенотипа опухоли.

Однако при проведении аналогичного опыта на культуре стволовых клеток жировой ткани человека (hASC) после культивирования этих клеток в присутствии плазмы крови онкологических больных в клетках не было обнаружено мутантных форм ни одного из исследуемых генов, а также не было выявлено образование опухоли после инъекции мышам, что может быть связано с использованием в качестве реципиентов клеток жировой ткани.

Интересно, что после культивирования линии NIH-3T3 в плазме крови онкологических больных было отмечено приобретение клетками фенотипа, схожего с фенотипом опухолевых клеток человека. Эти результаты коррелируют с исследованиями других авторов, в которых было показано, что в клетках культуры мышинных фибробластов после трансфекции вДНК из опухолей человека обнаруживали не только трансформированные опухолевые гены, но и огромное количество других фрагментов ДНК человека [289].

В 2012 году группой Dueñas-González было показано, что циркулирующие вДНК способны вызывать возникновение опухоли толстой кишки у крыс линии Hsd:Wistar и мышей BALB. В качестве источника вДНК была выбрана линия клеток рака прямой кишки с точечными мутациями в 12-м кодоне гена *K-RAS*. Результаты исследования показали, что вДНК опухолевого происхождения не только вызывает трансформацию клеток-реципиентов, а также способствует росту опухоли в живом организме [17].

Аналогичные результаты были получены другими исследователями с использованием апоптозированных клеток и органов в качестве источника экзогенной ДНК. Bergsmedh с соавторами использовали крысиные клетки, трансфицированные генами *H-RAS* человека или *CMYC* крысы, в качестве доноров экзогенной ДНК, и мышинные эмбриональные фибробласты в качестве реципиентов [18]. Gaiffe с соавторами использовали HIV-положительные клетки рака шейки матки и человеческие мезенхимальные клетки в качестве донора и реципиента,

соответственно [19]. В обоих случаях было показано злокачественное перерождение клеток-реципиентов.

Открытие экзосом дало новый толчок к развитию теории горизонтального переноса вДНК. При исследовании миграции экзосом из кардиомиоцитов в трофобласты было замечено изменение экспрессии 333-х генов, из которых для 175-ти наблюдалось повышение экспрессии, а для 158 – снижение [248]. В другой работе при исследовании клеток простаты были обнаружены экзосомоподобные частицы, названные простасомами, выделяющиеся непосредственно в сперму и регулирующие процесс оплодотворения [290]. Простасомы содержали рандомные фрагменты практически всех участков генома размером 1-14 тысяч п.н., в среднем, около 12 т. п.н. с отдельным паттерном фрагментов длиной около 1000 п.н. При исследовании красных кровяных телец, зараженных *Plasmodium falciparum*, было обнаружено прямое сообщение между паразитами разных клеток с помощью микровезикулярных частиц, способных к доставке целых генов [291]. Итогом такого межклеточного взаимодействия была не только передача отдельных генов, но и целых каскадов тандемно организованных, тесно сцепленных, функционально связанных локусов нескольких генов. Инкубирование нетрансформированных эпителиальных клеток с экзосомами, содержащими последовательности *H-RAS*, приводило к переносу полноразмерного гена в клетки-реципиенты, что стимулировало возникновение фенотипических изменений и активную пролиферацию клеток [292].

В 2013 году группе Cai с соавторами удалось провести перенос с помощью внеклеточных микровезикул, содержащих BCR/ABL гибридную ДНК из клеток хронической миелогенной лейкемии (CML) в клетки эмбриональных почек человека HEK293 и нейтрофилы [293]. В результате эксперимента было получено увеличение синтеза мРНК и усиление экспрессии белка рецептора АТ1. Аналогичный результат был получен теми же авторами в 2014 и в 2015 году, при переносе с помощью экзосом ДНК гена рецептора ангиотензина типа 1 (*AT1R*) из клеток гладкой мускулатуры сосудистых стенок (VSMC) в HEK293 и гена *SRY* с помощью микровезикул плазмы между лейкоцитами и эндотелиальными клетками [237,250].

Однако по-настоящему убедительное доказательство осуществления горизонтального переноса ДНК было получено Fischer с соавторами в 2016 году [294]. Для этого авторы использовали микровезикулы из мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека (BM-hMSC). В этих частицах обнаружили высокомолекулярную ДНК, связанную, в основном, с внешней мембраной микровезикул и в меньшей степени локализованную внутри. ДНК была мечена включением последовательности *Arabidopsis thaliana*, введенной с помощью

лентивируса. После инкубации меченых микровезикул в течение 2-х недель с клетками-реципиентами, мезенхимальными стромальными клетками, в клетках-реципиентах было зафиксировано присутствие ДНК из *Arabidopsis thaliana* [294].

Явление горизонтального переноса генов открывает широкие возможности как для верификации злокачественных трансформаций, так и для терапии. Неоднократно были получены данные о присутствии в крови пациентов с различными формами рака микровезикул, содержащих мутантные или переамплифицированные фрагменты ДНК, характерные для данных типов рака [292]. Так у пациентов с медуллобластомой в микровезикулах крови были обнаружены фрагменты мутантного *СМУС*, у пациентов с раком простаты *MLH1*, *PTEN* и *TP53*, у пациентов с раком поджелудочной железы *K-RAS* и *P53* [295,296]. Более того, в 2013 – 2015 гг. были получены данные о злокачественной трансформации нормальных клеток с помощью микровезикулярных внДНК. После переноса гена *SRY* с помощью микровезикул плазмы крови между лейкоцитами и эндотелиальными клетками было показано развитие атеросклероза, а при переносе гибридных генов *BCR/ABL* в нейтрофилы – развитие *CML* как *in vitro*, так и *in vivo* [243,248].

1.6.2. Взаимоотношения NET и опухолей

За последнее десятилетие собрано немало данных о взаимоотношениях NET и опухолей, и эти взаимоотношения весьма противоречивы и неоднозначны. Самые ранние данные говорили о наличии избыточного количества новообразованных NET непосредственно вблизи опухоли, как у пациентов, так и у мышей-опухоленосителей с различными типами опухолей [297]. Есть данные, указывающие на то, что образование NET может способствовать как росту опухоли и распространению метастазов, так и клиренсу опухоли [298].

Избыточное количество нейтрофилов и повышение концентрации нейтрофильной ДНК было найдено во многих экспериментальных опухолях у мышей, а также в биопсии опухолевой ткани у пациентов [299]. Наличие больших скоплений погибших нейтрофилов и наличие NET-подобных структур было зафиксировано в микроокружении геморрагической карциномы легких Льюис (LLC) мыши [300]. Аналогичная картина наблюдалась в гистологических срезах опухолей пациентов с саркомой Юинга [301]. Кроме того, наличие NET в биоптатах опухолей коррелировало с частотой рецидивов у пациентов с саркомой Юинга [301]. Подобная корреляция была показана также для пациентов с метастатическим колоректальным раком [302]. У пациентов с раком тонкого кишечника течение заболевания также сопровождалось общей нейтрофилией и гиперкоагулопатией [303]. Однако долгое время оставалось неясным,

вызывает ли развитие опухоли привлечение избыточного количества нейтрофилов, или сами нейтрофилы и NET каким-то образом способствуют развитию опухоли и метастазированию.

На модели хронической миелогенной лейкемии был предложен следующий механизм взаимоотношений NET и опухоли (рисунок 5). Гипоксия внутри опухоли может активировать индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α), который, в свою очередь, может стимулировать нетоз (рисунок 5) [304]. На модели рака тонкого кишечника было обнаружено, что повышенные концентрации циркулирующих липополисахаридов (LPS) вызывают возрастание экспрессии компонента C3a комплемента, что приводит к нетозу и индукции коагуляции, что, в свою очередь, стимулирует онкогенез [303]. Индуцированные коагуляцией сгустки создают attractive среду, вызывая петлю положительной обратной связи и способствуя продукции нейтрофилов, которые стимулируют коагуляцию, что затем дополнительно стимулирует развитие опухоли (рисунок 5) [303].

Помимо прямого воздействия на злокачественное прогрессирование опухоли, NET также способствуют возникновению системных патологических эффектов при онкологических заболеваниях. Например, было предположено, что NET способствуют развитию тромбоза глубоких вен [305]. Рак-ассоциированный тромбоз является одной из самых распространенных причин смерти онкологических больных. В 2012 году на моделях хронического миелогенного лейкоза и карциномы молочной железы мыши впервые было показано, что поздние стадии заболевания сопровождаются избыточным нетозом одновременно с развитием венозных тромбов в легких [305]. Как было сказано ранее, NET способствуют агрегации тромбоцитов преимущественно благодаря отрицательно заряженной ДНК, а также гистонам, стимулирующих образование тромбина [306]. Более того, как тканевые факторы, так и фактор XII являются индукторами внешних и внутренних путей коагуляции, и часто присутствуют в NET (рисунок 5) [307 – 309].

Избыточный нетоз также может приводить к осложнениям, напрямую не связанным с прогрессией опухоли, но часто встречающимся у онкологических больных. Недавно на моделях карциномы молочной железы и инсулиномы мыши было продемонстрировано, что NET способствуют нарушению сосудистой функции и системному воспалению в органах, не являющихся участками роста опухоли и областями метастазирования, таких как сердце и почки [310]. Гипоперфузия сосудистой системы почек и связанное с ней воспаление являются показателями почечной недостаточности – частой проблемы у онкологических больных с летальными исходами [311 – 313]. В 2016 г. было показано, что нетоз и вызванная им

сосудистая дисфункция часто встречается у пациентов с ишемическим инсультом, осложненным явным или скрытым онкологическим заболеванием [314].

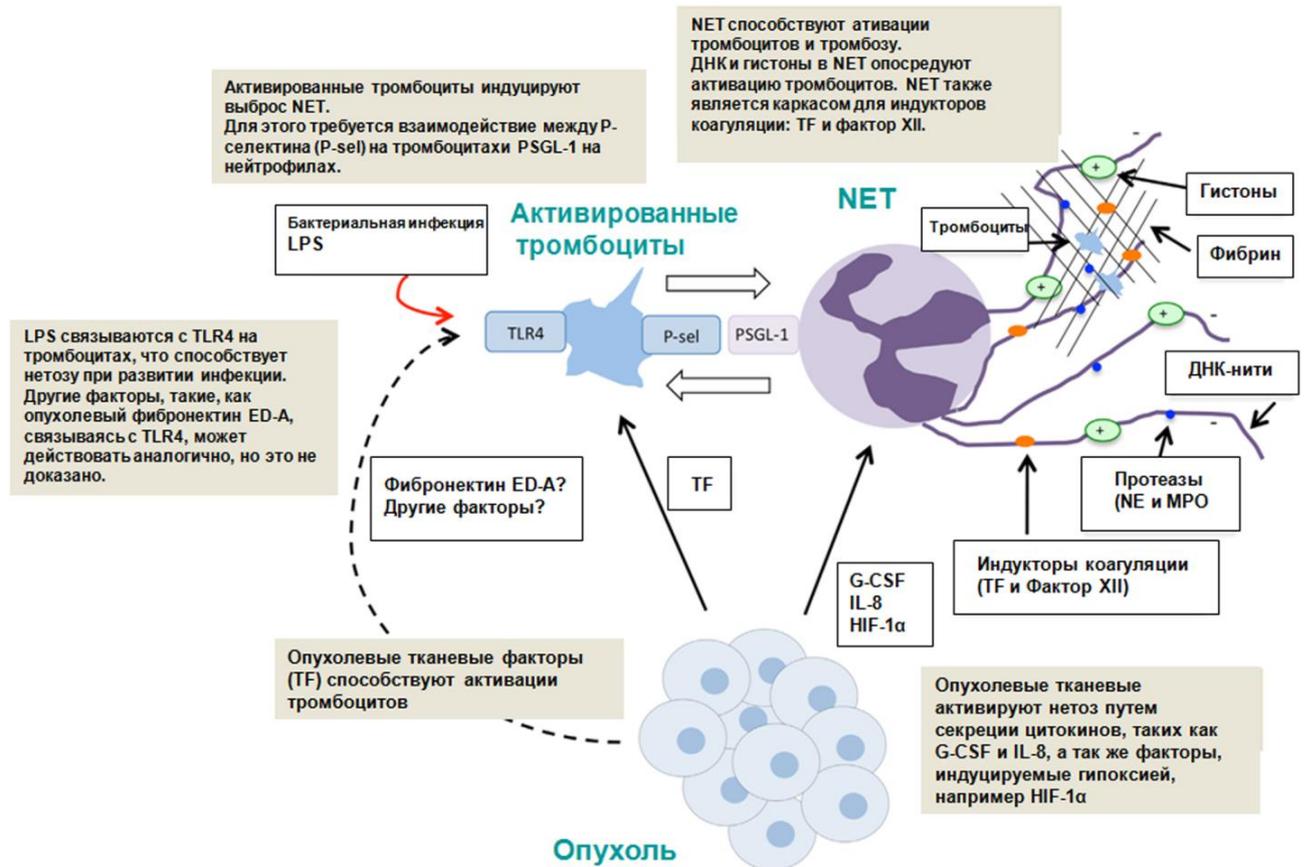


Рисунок 6. Взаимодействия нейтрофилов, тромбоцитов и опухолевых клеток при опухолеассоциированном нетозе. Опухолевые клетки могут напрямую индуцировать нетоз путем секреции таких факторов как GM-CSF, IL-8 или HIF-1α. Далее опухоль способствует активации тромбоцитов путем продукции тканевых факторов (TF). Активированные тромбоциты запускают нетоз с помощью прямого связывания P-селектина на их поверхности и PSGL-1 на поверхности нейтрофилов. Стимуляция нейтрофилов через связывание LPS при инфекционных заболеваниях или опухолевых факторов с TLR4 также может вносить вклад в индукцию нетоза тромбоцитами. Далее NET стимулируют активацию тромбоцитов и тромбоз с помощью хроматина и локализации TF и фактора XII. Рисунок адаптирован из Olsson and Cedervall, 2016 [315]

Тем не менее, существуют данные, что нетоз и образование NET на ранних стадиях канцерогенеза могут препятствовать развитию опухоли и способствовать ее элиминации. На модели кишечной аденокарциномы CT-26 мыши было показано, что онколитический вирус везикулярного стоматита запускал воспалительную реакцию, которая включала нейтрофил-зависимое инициирование коагуляции в кровеносных сосудах опухоли, возможно, опосредованное NET, тогда как остальная сосудистая сеть оставалась свободной от сгустков

[316]. При этом ингибиторы тромбина предотвращали опухолевый сосудистый коллапс и, следовательно, останавливали действие вируса на опухоль. Однако остается вопрос, были ли реально NET в сочетании с вирусом вовлечены в потенциальное разрушение опухоли?

Другие же авторы высказывали предположение о том, что накопление нейтрофилов внутри опухолевого узла способствует развитию первичной опухоли [304]. Недавно было продемонстрировано, что NET могут способствовать метастазированию путем секвестрации опухолевых клеток в кровообращении у мышей с легочными опухолями (карциномой легких A549 человека, карциномой легких Льюис) [317]. В модели системной инфекции (состояния, способствующего метастазированию) авторы документировали выброс NET в микроциркуляторное русло и последующей захват циркулирующих раковых клеток ДНК-сетями. Авторы предположили, что, подобно захвату бактерий происходит иммобилизация опухолевых клеток. Действительно, было показано, что захваченные NET опухолевые клетки выживают и пролиферируют, образуя псевдометастатические сгустки. Возможно, NET или продукты их деградации ингибируют иммунные клетки, обеспечивая выживание захваченных опухолевых клеток. Наблюдаемое усиление метастазирования также указывает на возможную роль NET в прогрессировании опухоли, а наличие внутрисосудистых NET после сепсиса способствует метастазированию у мышей [317].

1.7. Применение ДНКазы I в качестве антиметастатического и противоопухолевого агента

Данные исследований участия вДНК опухолевого происхождения в канцерогенезе показали, что вДНК могут выступать в качестве нового класса терапевтических мишеней, что дало стимул к изучению дезоксирибонуклеаз в качестве противоопухолевых и антиметастатических агентов.

Приведенные в обзоре данные указывают, что уровень вДНК плазмы крови следует рассматривать вместе с таким важным параметром, как дезоксирибонуклеазная активность плазмы крови. Есть данные, что увеличение уровня вДНК в крови онкологических больных часто коррелирует со снижением ДНКазной активности ферментов плазмы крови [318]. При этом отмечалась клиническая значимость этого параметра: уровень активности ДНКаз крови коррелировал с эффективностью лечения [81,319,320]. Для пациентов с раком печени была обнаружена корреляция между повышенным уровнем ДНКазной активности крови при низкой концентрации вДНК в преклинике и риском развития рака [321]. Тем не менее, при развитии

рака у пациентов отмечали снижение активности ДНКазы крови, сопровождающееся повышением уровня вДНК [321].

ДНКазы I используется для лечения специфических вирусных и аутоиммунных заболеваний [322]. Однако недавно ДНКазы I начала привлекать внимание исследователей как «восстановитель баланса» между концентрацией вДНК и ДНКазной активностью плазмы крови. Антиметастатический потенциал ДНКазы I был показан еще в 60-х годах XX-века, когда впервые на модели спонтанного лимфолейкоза мышей линии АКР была продемонстрирована способность ДНКазы в дозе 250 мг/кг вызывать уменьшение размеров перерожденных лимфатических узлов больных животных [23]. Немного позднее на модели мышинной опухоли L5178Y-ML было показано, что ДНКазы I обладает выраженным антиметастатическим эффектом [24].

В 2009 году группой Alvarado-Vásquez было проведено исследование влияния ДНКазы I на пролиферацию культур опухолевых клеток Calu-1, SK-MES-1, HeLa, HEp-2 и L-929 в сравнении с нормальными клетками PBMN и эмбриональными фибробластами человека. Было показано снижение количества опухолевых клеток в 5-9 раз, в то время как для нормальных клеток влияния на пролиферацию отмечено не было. Кроме того, было отмечено существенное уменьшение вДНК в культуральной жидкости [323].

В 2010 году в ЛБНК ИХБФМ СО РАН на двух мышинных моделях – карциноме легких Льюис и гепатоме А1 был продемонстрирован антиметастатический потенциал ДНКазы I при ежедневном введении в дозах 0.02-2.3 мг/кг внутримышечно [25]. Была найдена корреляция между антиметастатическим действием ДНКазы I и падением уровня вДНК плазмы крови животных-опухоленосителей [97].

В 2013 году Wen с соавторами показали наличие высокого антиметастатического потенциала ДНКазы I на модели рака поджелудочной железы *in vivo* [277]. Кроме того, *in vitro* было показано, что ДНКазы I уменьшает миграционную активность клеток рака поджелудочной железы, но не влияет на миграцию нормальных клеток панкреатического протокового эпителия, причем эффективное снижение миграции достигалось уже при концентрациях 0.03 ед.акт./мл. Было высказано предположение, что ДНКазы I разрушает опухолеспецифические NET, что приводит к снижению миграционной активности опухолевых клеток и падению уровня метастазирования.

Открытие NET дало новый толчок к изучению ДНКазы I как терапевтического препарата. Было показано, что ДНКазы I разрушает избыточные NET, снижая их вклад в

патогенные процессы [324,325]. Интраперитонеальные инъекции ДНКазы I мышам с опухолью поджелудочной железы человека приводили не только к сокращению NET, но и снижению степени патологического тромбоза [326]. Инъекции микрочастиц с иммобилизованной ДНКазой I так же приводили к сокращению общей площади NET у мышей с раком легких человека, что коррелировало со снижением уровня метастазирования [327].

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что ДНКазы I является новым эффективным средством лечения заболеваний, связанных с избыточным образованием ДНК, в том числе избыточного выброса патологической внДНК, NET, а так же вирусной и бактериальной ДНК, и перспективным антиметастатическим препаратом для широкого спектра опухолей.

Заключение

Прогрессирование опухоли и метастазирование – сложные процессы, которые связаны с большим количеством генетических и эпигенетических изменений. В связи с постоянным обменом генетическим материалом между организмом и опухолью фрагменты опухолеспецифических ДНК, несущих эти изменения, могут быть обнаружены в плазме крови. По этой причине вДНК могут быть хорошим биомаркером опухолевых процессов; возможно, даже более информативным, корректными и точными, чем другие биомаркеры. Средняя концентрация вДНК в сыворотке крови онкологических больных существенно выше, чем у здоровых людей, что указывает на возможность использования значений концентрации вДНК в плазме в качестве показателя динамики развития опухолевого процесса и согласно данным некоторых исследователей в качестве прогностического маркера.

Согласно современным теориям, вДНК способна участвовать в злокачественной трансформации здоровых клеток. Это дает возможность рассматривать именно вДНК в качестве индуктора образования метастазов согласно теории метастазирования, основывающейся на горизонтальном переносе.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы и препараты

В работе использовали агарозу, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, TEMED, Трис, ЭДТА, диэтилпиракарбонат (DEPC), бромфеноловый синий, ксиленцианол, глицерин, фосфатно-солевой буфер (PBS), бутанол, 10% формалин, параформальдегид, ксилол, гематоксилин, эозин, FBS производства ICN Biomedicals Inc. (США); фенол, хлороформ, изоамиловый спирт, этанол, изопропанол, ацетон производства Реактив (РФ); физиологический раствор (физ. раствор, натрия хлорид 0.9%) производства Красфарма (РФ); мочевины, персульфат аммония, агарозу, МТТ, Stains-A1, бычью панкреатическую ДНКазу I IV степени очистки (2400 Kunitz/мг), 0.25% раствор трипсина в ЭДТА, культуральные среды DMEM и IMDM, универсальную среду для отделения Histopaque производства Sigma-Aldrich (США); среду для отделения лимфоцитов LSM, раствор антибиотиков и антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина) производства MP Biomedicals (США); бромистый этидий производства Fluka (Швейцария); QI Aquick Gel Extraction kit производства Qiagen (США); среда Opti-MEM, Lipofectamine 2000, набор для определения концентрации ДНК Quant-iT™ dsDNA HS Assa kit производства Invitrogen (США); Agilent DNA 1000 Kit производства Agilent Technologies (США); SOLiD™ Fragment Library Oligos Kit, SOLiD™ Fragment Library Construction Kit, SOLiD™ Library Column Purification Kit, Low TE Buffer, SOLiD™ ePCR Kit V2, SOLiD™ Buffer Kit, SOLiD™ Bead Enrichment Kit, SOLiD™ Bead Deposition Kit, SOLiD™ ePCR Tubes and Caps, MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates, MicroAmp Optical Adhesive Film, производства Applied Biosystems (США); ингибитор трипсина, ДНК-маркеры FastRuler™ Ultra Low Range (ready-to-use), Fast Ruler™ Low Range (ready-to-use) производства Thermo Scientific (США), 10 × ПЦР мастер-микс производства Вектор-Бест, (Россия); трипановый синий производства BioRad (США); Пульмозим™ производства Genentech Inc. (США). Прочие реактивы были отечественного производства марки “О.С.Ч.” и “Х.Ч.”.

Также в работе использовали пластик Covaris microTUBEs производства Covaris (США), и LoBind производства Eppendorf (США).

2.1.2 Оборудование

В работе использовали рН-метр Orion 410A (США); центрифуги Mini Spin Plus Eppendorf, Eppendorf 5415 (Eppendorf, Германия) и Contron T42K (Centricon Instruments, Италия); флуориметр ДНК Qubit™ fluorimeter (Invitrogen, США), трансиллюминатор DigiGEL-Advanced (Zenith Engineers, США), соникатор Covaris™ S2 System (Applied Biosystems, США), амплификатор GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, США), спектрофотометр NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific), миксеры Vortex-Genie 2 (Scientific Industries) и ULTRA-TURRAX® Tube Drive (Applied Biosystems), Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), автоматическую пипетку Repeater® Xstream (Eppendorf), магнитный концентратор Magnetic Stand (Applied Biosystems), секвенатор SOLiD™ 5500 System (Applied Biosystems), амплификатор PCR Express (Hybaid, США), микроскопы Axioimager Z (ZEISS, Германия), AxioStar plus, оснащенный камерой MRc5 (ZEISS, Германия) и Zeiss Primo Vert (Zeiss, Германия), оснащенный камерой AxioCam ERc5s CCD, сканер Epson Perfection 2400 (Epson, Япония), вакуумную сушилку для акриламидных гелей (LAB CONCO, США), систему гель-документации Infinity-1500/36M (Vilber Lourmat, Франция), прибор для автоматического подсчета клеток Automated Cell Counter TC20 (Bio-Rad, Сингапур).

Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: Microsoft Excel 2010, Adobe Photoshop CS3, Adobe Photoshop CS52, Gel-Pro Analyzer 4.0, Viesscan Professional V8.2.13, Origin 8.0, Axiovisionv. 3.1, ImageJ 1.50f, FastQC V.0.6.0, Bioscope 1.3, Viesscan ProfessionalV8.2.13, Statistica 10.0.

Для анализа данных использовали интернет-ресурсы NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), Genes and Genomes, (<http://www.genome.jp/kegg/kaas/>) и Gene Card (<http://www.genecards.org>), OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>),

2.1.3. Плазмиды

В работе была использована плазида рMDR670, содержащая фрагмент гена Р-гликопротеина человека 678 н., полученная в Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот (ИХБФМ СО РАН).

2.1.4. Буферы и растворы

Для приготовления всех буферных растворов и реакционных проб использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США). Все растворы и среды фильтровали через

нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Состав буферов и растворов приведен в Таблице 3.

Таблица 3. Буферы и растворы

Буфер	Состав
PBS	1.47 мМ KH_2PO_4 , 4.29 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 137 мМ NaCl
TBE	2 мМ ЭДТА, 0.089 М Трис-борат, pH 8.3
ТАЕ	0.05 М ЭДТА, 0.1М Трис, ~1.56М уксусная кислота, pH 7.6
Раствор бромистого этидия	0.002%-ный бромистый этидий в воде
Раствор А	50%-ный глицерин, 0.05%-ный бромфеноловый синий, 0.05%-ный ксиленцианол
Раствор В	8 М мочевины, 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.025%-ный ксиленцианол
Буфер D	10 мМ Трис- HCl , pH 7.5, 2.5 мМ MgCl_2 , 0.1 мМ CaCl_2
Лизирующий буфер	(100 мМ Tris-HCl , pH 8.0; 5 мМ EDTA , pH 8.0; 200 мМ NaCl ; 0.2% SDS , 10 нг/мл протеиназы К)

2.1.5. Олигонуклеотиды

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН с помощью стандартного фосфитамидного метода и выделены с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе, приведены в таблице 4.

Таблица 4. Последовательность праймеров, использованных в работе.

Наименование	Последовательность прямого праймера, 5' → 3'	Последовательность обратного праймера, 5' → 3'	Длина ампликона
β -актин	AGCCATGTACGTAGCCATCCA	TCTCCGGAGTCCATCACAATG	81
GAPDH	AATGGTGAAGGTCGGTGTG	ACAAGCTTCCCATTCTCGG	198
MYC	CGACTACGACTCCGTACAGC	CCAGATATCCTCACTGGGCG	71
B1_Mm	TGGCGCACGCCTTTAAT	TCCTGGACCTCACTTTGTAGA	92
B1_mur4	AGGCGGATTTCTGAGTTCAA	GAGACAGGGTTTCTCTGTGTAG	91
B1_mus1	AGGCGGATTTCTGAGTTCAA	GAGACAGGGTTTCTCTGTGTAG	91
B1_mus2	GAGACAGGCGGATTTCTGAGT	TGTAGCCCTGGCTGTCCT	71
L1_mus 1	GCCAGGTATCTGTGCATCTT	ACTCTAGCTCTCTCCTGAGTTT	87
L1Md_F	GCTACTATACCGAGCCAAACTC	GCTGGATTCGTGGAGAGATAAT	99
L1Md_Gf	GCTACTATACCCAGCCAAACTC	CGTGGAGAGATAATGCGTGAA	91
Lx_mus1	ACATGGTATGTGCTCACTGATAA	CTCTTCCTTCTTGGGCTTCAT	96

2.1.6. Клеточные культуры

C57Bl/6J-производная меланома B16-F10 и клеточная линия эпидермоидной карциномы человека KB-3-1 были приобретены в Институте цитологии (Российская академия наук, Санкт-Петербург, Россия). Модифицированные клетки RLS₄₀ были получены из коллекции ИХБФМ СО РАН.

Клетки LLC, RLS₄₀ и KB-3-1 инкубировали в среде DMEM или IMDM с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), раствором антибиотика-антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, и 0.25 мкг/мл амфотерицина) в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C (стандартные условия, с.у.), и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

2.1.7. Лабораторные животные и опухолевые модели

В работе использовали 10-14-недельных мышей линии CBA/LacSto (далее CBA) и C57Bl/6J (далее C57Bl) развода вивария ИЦиГ СО РАН и ИХБФМ СО РАН. Животных содержали по 10 особей в клетке в хорошо освещенном помещении. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Эксперименты с животными проводили согласно директиве EEC Directive 2010/63/EU.

Для работы использовали опухолевый модели меланомы мыши B16, лимфосаркомы RLS₄₀ [328] и карциномы легких Льюис (LLC). Штамм LLC был любезно предоставлен профессором Поповой Н.А (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Клетки поддерживались пассированием на мышях C57Bl (LLC) и CBA (RLS₄₀) в вивариях ИЦиГ СО РАН и ИХБФМ СО РАН.

2.2. Методы

2.2.1. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот

2.2.1.1. Электрофорез в агарозном геле

Разделение фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в 1%-ном или 1.5%-ном агарозном геле в буфере TBE или TAE при напряженности электрического поля 20 В/см. Перед нанесением на гель к пробам добавляли 2 мкл раствора А. Гель окрашивали бромистым этидием, фотографировали при визуализации в УФ свете с использованием прибора Infinity-1500/36M.

2.2.1.2. Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях

Разделение продуктов ПЦР проводили в 12%-ном ПААГ при соотношении акриламид:N,N'-метиленабисакриламид = 20:1 в буфере TBE в присутствии 8 М мочевины при напряженности электрического поля 30 – 45 В/см. Перед нанесением на гель к пробам добавляли одну пятую от объема пробы раствора В. Положение продуктов в геле определяли путем окрашивания раствором Stains-all.

2.2.2. Подготовка первичной культуры опухолевых клеток LLC и RLS₄₀

Для формирования солидной опухоли клетки LLC вводили в/м в правую бедренную мышцу мышей линии C57Bl (10⁷ кл./мл, 0.1 мл). На 14 – 16 дни развития опухоли животных подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков, отделяли пласт опухолевой ткани и помещали в 5 мл PBS во льду. Опухолевую ткань гомогенизировали и фильтровали до состояния однородной суспензии.

Для формирования асцита клетки RLS₄₀ вводили в брюшную полость мышей линии СВА в/б (10⁷ кл./мл, 0.1 мл). На 10 – 12 день развития асцитной опухоли 0.5 мл физиологического раствора вводили животным в брюшную полость. Мышь умерщвляли методом дислокации шейных позвонков, далее асцитную жидкость собирали с помощью шприца и разводили в 5 мл PBS.

Суспензию клеток доводили до объема 10 мл с помощью PBS, наносили на 5 мл среды LSM или Histopaque и центрифугировали при 450 g в течение 15 мин. Клеточную фракцию собирали, промывали PBS и центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, клеточный осадок суспендировали в PBS и повторяли процедуру центрифугирования

на LSM или Histopaque, после чего клетки LLC и RLS₄₀ суспендировали в среде IMDM, содержащей 10% FBS, 100 ед. акт./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина. Количество клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева при окрашивании трипановым синим. Клетки LLC и RLS₄₀ (10⁶ кл./мл) культивировали в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C в течение 1 – 2-х недель или использовали для имплантации непосредственно после выделения.

2.2.3 Опухолевые модели мыши

2.2.3.1. Имплантация опухолей

Карцинома легких Льюис (LLC) с первичным опухолевым узлом. Клетки LLC (10⁶ кл. в 0.2 мл PBS/животное) имплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии C57Bl (самцам) для формирования солидной опухоли. Мышей выводили из эксперимента на 15 – 18-ый день развития опухолей.

Лимфосаркома RLS₄₀. Клетки RLS₄₀ (10⁶ кл./мл в 0.2 мл в физиологическом растворе) имплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии CBA (самцам) для формирования солидной опухоли или в/б для формирования опухоли в асцитной форме. Мышей выводили из эксперимента на 19-ый день развития опухолей.

Метастатическая меланома B16. Клетки B16 (10⁵ кл. в 0.1 мл PBS) имплантировали внутривенно (в/в) в хвостовую вену мышам линии C57Bl (самцам). Мышей выводили из эксперимента на 22-ой день после имплантации.

2.2.3.2. Определение параметров опухолевого роста

В ходе эксперимента, как только опухоли начинали пальпироваться, каждые 2 – 3 дня отслеживали динамику роста штангенциркулем в трех взаимно перпендикулярных направлениях. Объем опухоли подсчитывали по формуле

$$(\pi/6 \times \text{длина} \times \text{высота} \times \text{ширина}) [329].$$

По окончании эксперимента мыши были препарированы, опухоли изъяты и взвешены. Вес опухоли определяли как разницу между весом лапы с опухолью и лапы без опухоли.

Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = (V \text{ контроль} - V \text{ опыт}) / V \text{ контроль} \times 100\%,$$

где V контроль – средний объем опухолей в группе контроля, см^3 , V опыт – средний объем опухолей в группе ДНКазы, см^3 .

2.2.3.3. Терминация эксперимента и забор биологического материала

На 15-ый день (для модели LLC), 19-ый (для модели RLS₄₀) и 22-ой день (для модели B16) развития опухолей у мышей собирали кровь из ретроорбитального синуса и животных подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. Далее проводили забор материала для последующего патоморфологического и морфометрического исследований: селезенку и тимус, а также лёгкие в случае меланомы B16 и LLC и печень в случае RLS₄₀. Исследуемые органы и опухолевые узлы отделяли и фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формалине в течение семи дней. Количество поверхностных легочных метастазов подсчитывали с помощью бинокулярного микроскопа.

2.2.3.4. Гистологическое исследование и морфометрирование

Образцы легких и печени мышей после фиксации обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и заключали в парафин. Для исследования брали большую долю правого легкого и большую долю печени и изготавливали фронтальный срез, соответствующий гистотопограмме. Срезы толщиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Патоморфологическое и морфометрическое исследование препаратов проводили с помощью микроскопа AxioStar plus, оснащенного камерой MRc5. Для проведения морфометрического анализа гистотопограмм препараты сканировали на сканере Epson Perfection 2400 с разрешением 1200 dpi и обрабатывали с помощью программы Viesscan Professional V8.2.13. Измерение площади среза доли легкого и площади метастазов на данном срезе проводили с использованием программы Adobe Photoshop C52. Рассчитывали процент площади метастазов по отношению к площади измеряемой доли легкого.

Торможение развития метастазов оценивали путем вычисления индекса ингибирования метастазов (МИ):

$$\text{МИ} = \left(\frac{\text{средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}} - \text{средняя площадь метастазов}_{\text{эксперимент}}}{\text{средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}}} \right) \times 100\%.$$

МИ контрольной группы отражал отсутствие ингибирования метастазов и соответствовал 0 %.

Селезенку и тимус, зафиксированные в 10%-ном растворе нейтрального формалина, подвергали стандартной обработке: обезвоживанию в растворах этилового спирта

возрастающей концентрации, осветлению ксилолом и парафинированию. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином и анализировали на микроскопе Axiostar plus, оснащенном камерой AxioCam MRc5 («Zeiss», Германия).

Для оценки степени активации иммунной системы проводили микроскопическое и морфометрическое исследование селезенки и тимуса с использованием закрытой тест-системы из 100 точек площадью 3.2×10^6 мкм². При морфометрическом исследовании селезенки подсчитывали объемные плотности (V_v , %) белой и красной пульпы, а также определяли диаметр лимфоидных фолликулов (в мкм). При морфометрическом исследовании тимуса оценивали объемные плотности (V_v , %) коркового и мозгового вещества, подсчитывали корково-мозговой индекс (КМИ) по формуле:

$$\text{КМИ} = N/n,$$

где N и n – число точек, приходящихся, соответственно, на корковое и мозговое вещество тимуса. Объемную плотность структуры (объемную долю ткани, занимаемую данной структурой) подсчитывали как число узловых точек, приходящихся на данную структуру.

2.2.4. Получение сыворотки крови

Кровь, собранную из ретроорбитального синуса, использовали для получения сыворотки. Кровь животных-опухоленосителей собирали, как описано в п. 2.2.3.3. Кровь здоровых животных собирали в 4 приема с интервалом в 7 дней.

Сыворотку крови получали методом формирования тромба инкубацией при 37°C в течение 30 мин с последующей инкубацией при 4 °C в течение ночи. Тромб извлекали и сыворотку центрифугировали (1500 g, 4 C, 20 мин). Образцы сывороток хранили при –70 C.

2.2.5. Выделение ДНК

2.2.5.1. Выделение внДНК с поверхности клеток

Клетки суспензионных культур RLS₄₀ и LLC осаждали центрифугированием при 300 g об/мин в течение 5 мин, супернатант (культуральную жидкость) сохраняли для дальнейшего использования. Клетки промывали PBS и собирали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. С клеток монослойной культуры B16 собирали культуральную жидкость и сохраняли для дальнейшего использования, клетки открепляли 0.25% раствором трипсина с ЭДТА, промывали PBS, осаждали центрифугированием с последующим промыванием PBS и повторным осаждением.

Для снятия вДНК, связанной с поверхностью культивируемых клеток, к клеточной суспензии объемом 50 мкл добавляли 20 – 30 мкл 0.25%-ного трипсина в ЭДТА и инкубировали в течение 4-х минут, покачивая пробирку. Далее добавляли ингибитор трипсина из расчета 1 мг ингибитора на 1.0 – 3.0 мг трипсина, и центрифугировали в течение 20 мин при 350 g и 4°C. Супернатант переносили в новую пробирку и центрифугировали при 500 g в течение 20 мин при 4°C, после чего переносили супернатант в чистую пробирку.

ВДНК из суспензии, полученной при снятии вДНК с поверхности клеток, выделяли смесью фенол/хлороформ (v/v; 1/1) К 200 мкл суспензии или культуральной жидкости добавляли равный объем фенола, рН = 8.0, перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин и центрифугировали при 10000 g в течение 8 мин. Водную фазу переносили в новые пробирки, добавляли равный объем хлороформа, перемешивали в течение 30 сек и центрифугировали при 10000 g в течение 8 мин.

ВДНК выделяли и концентрировали методом обратимой сорбции на силикатном сорбенте. К 100 мкл водной фазы добавляли три объема буфера QG из QI Aquick Gel Extraction kit (США), инкубировали при 50°C в течение 5 мин, добавляли один объем изопропанола и перемешивали. Раствор наносили на колонки QI Aquick Spin (Qiagen, USA) и центрифугировали при 10000 g в течение 1 мин, затем промывали 700 мкл буфера PE путем центрифугирования при 10000 g в течение 1 мин. ВДНК с поверхности фильтра элюировали с помощью 30 мкл воды центрифугированием при 10000 g в течение 1 мин, фильтрат собирали и хранили при -20°C в пробирках с низкой сорбционной способностью.

Концентрацию вДНК измеряли с помощью прибора Qubit™ согласно протоколу фирмы производителя с помощью Quant-iT™ dsDNA HS Assay kit с использованием красителя-интеркалятора Quant-iT™.

2.2.5.2. Выделение вДНК из культуральной жидкости

Клетки суспензионных культур RLS₄₀ и LLC осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин, супернатант переносили в отдельную пробирку. С клеток монослойной культуры В16 собирали культуральную жидкость и осаждали оставшиеся клетки центрифугированием при 300 g в течение 5 мин, супернатант переносили в отдельную пробирку. ВДНК выделяли из культуральной жидкости как описано в п. 2.2.5.1. Концентрацию ДНК определяли, как описано в п. 2.2.5.1.

2.2.5.3. Выделение *внДНК* из сыворотки крови

Сыворотку крови здоровых животных и опухоленосителей получали и хранили, как описано в п. 2.2.4. *ВнДНК* выделяли из сыворотки крови как описано в п. 2.2.5.1. Концентрацию *ДНК* определяли, как описано в п.2.2.5.1.

2.2.5.4. Выделение суммарной клеточной *ДНК*

С клеток KB-3-1 собирали культуральную жидкость, клетки открепляли 0.25% раствором трипсина в ЭДТА, промывали PBS, осаждали центрифугированием с последующим промыванием PBS и повторным осаждением, как описано в п. 2.2.5.1. Клеточный осадок обрабатывали 0.25% раствором трипсина в ЭДТА и центрифугировали при 350 g в течение 20 мин при 4°C, после чего супернатант удаляли. К клеткам добавляли 600 мкл лизирующего буфера и инкубировали в течение 4 ч при 65°C, периодически перемешивая без взбалтывания. Далее *ДНК* выделяли и хранили, как описано в п. 2.2.5.1. Концентрацию *ДНК* определяли, как описано в п.2.2.5.1.

2.2.6. Исследование влияния бычьей панкреатической *ДНКазы I* и Пульмозима™ на опухолевые клетки *in vitro*

2.2.6.1. Определение активности *ДНКазы I* и Пульмозима™ *in vitro*

Реакционную смесь объёмом 10 мкл, содержащую 0.5 мкг плазмиды pMDR670, буфер D, интактную *ДНКазу I* в количестве 0.001 – 0.1 ед.акт. или Пульмозим™ в количестве 0.001 – 0.1 ед.акт. инкубировали при 37 С в течение 5 – 30 мин. По окончании реакции к смеси добавляли ЭДТА до концентрации 2.5 мМ и инкубировали при 65°C в течение 10 мин, с последующей экстракцией фенолом, смесью фенол/хлороформ (v/v; 1/1) и хлороформом. Продукты расщепления анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием геля бромистым этидием.

Эффективные константы скорости расщепления *ДНКазой I* (k_{eff}) получали с использованием уравнения

$$P_t = P_\infty \times (1 - \exp^{-k_{\text{eff}} t}),$$

где P_t и P_∞ соответствуют фракции субстрата, расщепленного в момент времени t и в конечной точке, соответственно[330].

2.2.6.2. Влияние ДНКазы I и Пульмозима™ на жизнеспособность клеток меланомы B16

Жизнеспособность клеток линии меланомы B16 к ДНКазе I и Пульмозиму™ определяли с помощью МТТ теста [331]. Для этого клетки высаживали в 96-луночный планшет по 4×10^3 клеток на лунку в среде IMDM, содержащей 10%-ную FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. Через 24 ч среду заменяли на среду без FBS, добавляли ДНКазу I в диапазоне концентраций $1 - 20 \times 10^3$ ед. акт./мл или Пульмозим™ в диапазоне концентраций $0.1 - 0.75 \times 10^3$ ед. акт./мл и инкубировали при 37°C и 5%-ном CO₂ в течение 24 ч. Далее к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали в течение 3 – 4 ч в тех же условиях. Среду удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO и измеряли оптическую плотность по разности поглощения на длинах волн $\Delta(\lambda 570 - \lambda 630)$ нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan RC (Labsystems, Финляндия). Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля.

2.2.6.3. Определение миграционной активности клеток меланомы B16 под действием ДНКазы I и Пульмозима™ методом зарастания царапины (Scratch assay)

Клетки меланомы B16 высаживали в 6-луночный планшет таким образом, чтобы через 12 ч клеточная культура достигла состояния 95%-ного конфлюэнтного монослоя (1.5×10^6 клеток на лунку). В клеточном монослое наносили царапины носиком пипетки на 200 мкл шириной 0.5 мм, монослой трижды промывали PBS для удаления открепленных клеток и инкубировали в среде DMEM, содержащей ДНКазу I в диапазоне концентраций $1 - 20 \times 10^3$ ед. акт./мл или Пульмозим™ в диапазоне концентраций $0.1 - 0.5 \times 10^3$ ед. акт./мл, при 37°C и 5%-ном насыщении CO₂ в течение 48 ч. Границы царапины маркировали и фотографировали зоны повреждения каждые 2 ч в течение двух суток с помощью микроскопа Zeiss Primo Vert (Zeiss, Германия). Длину зоны миграции оценивали, как разницу между границами царапин через 0 и 48 ч после нанесения повреждения. Площадь миграции оценивали, как отношение площади, заполненной клетками через 48 ч, к начальной площади царапины, относительно контроля. Скорость миграции клеток оценивали путем расчета степени зарастания царапины по формуле:

$$v = (1 - X) \times 100\%,$$

где X – отношение свободной площади царапины через 2, 8, 24, 36 и 48 ч к первоначальной площади царапины. Для обсчёта использовали программу ImageJ [332].

Для оценки статистической достоверности данных, полученных для контроля и каждой дозы ДНКазы I или Пульмозима™, получали фотографии в трех независимых экспериментах, данные усредняли, и приводили в виде MEAN ± SE.

2.2.7. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической ДНКазы I и Пульмозима™

2.2.7.1. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I при различных типах введения на модели LLC

Имплантацию клеток LLC самцам линии C57Bl проводили, как описано в п. 2.2.3.1. Животных делили на 6 групп (n = 20), и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали в/м: группы 1, 2 и 3 (контроль) – физ./раствор в/м (0.1 мл), в/б (0.2 мл) в/в (0.2 мл), соответственно; 4, 5 и 6 – ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг, в/м, в/б и в/в, соответственно. В/м и в/б введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв), в/м введение проводили на 4, 7, 11, 14 и 18 дни. На 18-ый день развития опухолей, через 1 час после последней инъекции мышей выводили из эксперимента. Лёгкие изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.3.4. Измерение объема и веса опухолей проводили, как описано в п. 2.2.3.2.

2.2.7.2. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I на различных моделях метастазирующих опухолей

Имплантацию LLC и B16 самцам линии C57Bl и RLS₄₀ самкам линии CBA проводили, как описано в п. 2.2.3.1. Животных линии C57Bl с LLC делили на 2 группы (n = 20), и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ./раствор (0.1 мл); 2 – ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг (0.1 мл в физ./растворе). Животных линии C57Bl с B16 делили на 4 группы (n = 20), и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали в/м: группа 3 (контроль) – физ./раствор (0.1 мл); 4, 5 и 6 – ДНКазу I в дозах 0.12, 0.6 и 1.2 мг/кг (0.1 мл в физ./растворе), соответственно. Животных линии CBA с RLS₄₀ делили на 3 группы (n = 20), и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали в/м: группа 7 (контроль) – физ./раствор (0.1 мл); 8 и 9 – ДНКазу I в дозах 0.12 и 0.24 мг/кг (0.1 мл в физ./растворе), соответственно. Введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На 15, 22 и 19 день развития опухолей LLC, B16 и RLS₄₀, соответственно, через 1 час после последней инъекции мышей выводили из эксперимента. Лёгкие (LLC, B16) и RLS₄₀ (печень) изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в DMEM и анализировали, как описано в п. 2.2.3.4. Для исследования иммуномодулирующего

действия ДНКазы I на модели В16 у мышей с В16 извлекали селезенку и тимус и фиксировали в 10%-ном формалине для последующего патоморфологического исследования органов.

Количество поверхностных метастазов в легких у мышей с В16 подсчитывали с помощью бинокля. Кровь собирали и готовили сыворотку, как описано в п. 2.2.4. Измерение объема и веса опухолей проводили, как описано в п. 2.2.3.2.

2.2.7.3. Исследование антиметастатического действия Пульмозима™ на модели меланомы В16.

Клетки меланомы В16 имплантировали, как описано в п. 2.2.6.1. Животных делили на 4 группы (n = 20), и, начиная с четвертого дня после имплантации, животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ./раствор (0.1 мл); 2 – ДНКазу I в дозе 1.2 мг/кг (0.1 мл), 3, 4 и 5 – Пульмозим™ в дозах 1 мг/кг, 5 мг/кг или 10 мг/кг (0.1 мл), соответственно. Инъекции проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв) в течение двух недель. На 21-ый день после имплантации, через 1 час после последней инъекции мышей выводили из эксперимента. Легкие собирали и фиксировали в 10%-ном формалине для последующего патоморфологического исследования органов. Количество поверхностных метастазов в легких подсчитывали с помощью бинокля.

2.2.7.4. Определение концентрации вДНК в сыворотке крови

Для забора крови использовали мышей линии С57В1 с LLC или В16 и мышей линии СВА с RLS₄₀ из п. 2.2.7.2 и 2.2.7.3. Сыворотку крови получали, как описано в п. 2.2.4. вДНК выделяли из плазмы крови и определяли их концентрацию, как описано в п. 2.2.5.1.

2.2.7.6. Определение суммарной ДНКазной активности сыворотки крови

Определение суммарной ДНКазной активности сыворотки крови проводили в образцах сыворотки крови мышей линии С57В1 с LLC и В16 и мышей линии СВА с RLS₄₀ из п. 2.2.7.2. Реакционную смесь объемом 30 мкл, содержащую 1 мкл сыворотки, и 0.5 мкг плазмиды рМDR670, инкубировали при 37 С в течение 5 – 30 мин. По окончании реакции к 5 мкл смеси добавляли ЭДТА до концентрации 2.5 мМ и инкубировали при 65°С в течение 10 мин, с последующей экстракцией фенолом, смесью фенол/хлороформ (v/v; 1/1) и хлороформом. Продукты расщепления анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле при окрашивании бромистым этидием.

Эффективные константы скорости расщепления модельной ДНК сывороткой, которые характеризуют суммарную ДНКазную активность сыворотки крови, рассчитывали, как описано в п. 2.2.6.1.

2.2.8. Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование

2.2.8.1. Дизайн эксперимента

Имплантиацию LLC самкам линии C57Bl/6J возрастом 10 – 14 недель проводили, как описано в п. 2.2.3.1. Мышей делили на две группы (n = 10), и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали в/м: группа 1 (контроль) – физ./раствор (0.1 мл); группа 2 – ДНКазу I в дозе 0.12 мкг/кг (0.1 мл в физ./растворе), соответственно. Введение проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На 15-ый день после имплантации опухоли собирали кровь из ретроорбитального синуса у всех животных через 60 мин после последней инъекции ДНКазы I.

Из крови 6 мышей каждой группы готовили сыворотку, как описано в п. 2.2.4. Также использовали сыворотку крови 6 здоровых животных, которую собирали, как описано в п. 2.2.4. ВнДНК выделяли из шести образцов каждой группы, как описано в п. 2.2.5.3, и объединяли согласно группам. Концентрацию ДНК измеряли, как описано в п. 2.2.5.1.

2.2.8.2. Подготовка ДНК-библиотек из внДНК

Библиотеки внДНК готовили с помощью модифицированного протокола ABS SOLiD™ Fragment Library Construction Kit. Реактивы без указания концентрации или объема добавляли согласно протоколу фирмы-производителя.

Озвучивание ДНК. Выделенную из сыворотки крови внДНК (п. 2.2.8.1) в объеме 50 мкл (250 нг/мл) переносили в пробирки Covaris™ microTube и фрагментировали ультразвуком с помощью соникатора Covaris S2 System в течение 155 сек при коэффициенте мощности 20% или в течение 330 сек при коэффициенте мощности 10% при 4°C. Длину фрагментов обработанной ультразвуком ДНК оценивали с помощью электрофореза в микрогеле на приборе Agilent.

Достройка концов молекул ДНК. К фрагментированной ультразвуком ДНК добавляли 20 мкл 5-кратного буфера, 4 мкл 10 мМ dNTP, 2 мкл End Polishing Enzyme 1 (10 ед.акт./мкл), 8 мкл End Polishing Enzyme 2 (5 ед.акт./мкл) и 32 мкл H₂O milliQ. Смесь инкубировали в течение 30 – 60 мин при комнатной температуре. ДНК выделяли с помощью SOLiD™ Library Column Purification Kit. К образцу объемом 25 мкл добавляли 100 мкл буфера B2-Sc 55%-ным

изопропанолом, смесь наносили на колонку, инкубировали в течение 2 мин, центрифугировали при 10000 g в течение 1 мин и отбрасывали фильтрат. Колонку промывали 500 мкл буфера W1, центрифугировали при 10000 g в течение 2 мин, переворачивали пробирку на 180 градусов и повторно центрифугировали для удаления остатков жидкости. Колонку сушили на воздухе в течение 2 мин. Для элюции вДНК с поверхности фильтра на колонку наносили 25– 50 мкл воды, инкубировали в течение 2– 4 мин и центрифугировали при 10000 g в течение 1 мин, фильтрат собирали в пробирки LoBind с низкой сорбционной способностью.

Лигирование с адапторами P1 и P2. Реакционную смесь объемом 100 мкл, содержащую 100 нг озвученной вДНК с затупленными концами, по 1 мкл адапторов P1 и P2 (50 пМ/мкл), 40 мкл 5-кратного T4-лигазного буфера и 10 мкл T4-лигазы (5 ед.акт./мкл), инкубировали при комнатной температуре в течение 15-30 мин. ДНК выделяли с помощью ДНК с помощью QIAquick Gel Extraction kit, как описано в п. 2.2.4.1. Образцы хранили при -20°C в пробирках LoBind Tubes.

Очистка ДНК-библиотек в агарозном геле. Разделение фрагментов ДНК проводили электрофорезом в 1.5% геле из LE агарозы в буфере TAE, как описано в п. 2.2.1. Гель фотографировали при визуализации в УФ свете. Скальпелем вырезали зону, соответствующую по маркерам фрагментам вДНК с лигированными адапторами (150 – 250 п.н.). Фрагмент геля переносили в чистую пробирку и выделяли ДНК с помощью QI Aquick Gel Extraction kit, как описано в п. 2.2.5.1. Концентрацию выделенной ДНК измеряли на приборе Qubit™.

Ник-трансляция и амплификация. К выделенной ДНК добавляли 150 мкл Platinum® PCR Amplification Mix и по 10 мкл ПЦР-праймеров 1 и 2 (5 мкМ/мл). Для получения продуктов проводили ник-трансляцию (72°C, 20 мин; 95°C, 5 мин) и 6 циклов ПЦР (95°C, 15 сек, 62°C, 15 сек, 70°C, 4 мин). ДНК выделяли с помощью SOLiD™ Library Column Purification Kit. Концентрацию выделенной ДНК измеряли на приборе Qubit™.

2.2.8.3. Проведение эмульсионной ПЦР с использованием магнитных микрочастиц

Масляную фазу готовили смешиванием 1.8 мл эмульсионного стабилизатора 1, 400 мкл эмульсионного стабилизатора 2 и 37.8 мл масла, после чего дегазировали в течение 12 часов при 4°C. Для приготовления водной фазы смешивали реагенты ПЦР и 2 мкл ДНК-библиотеки (500 пМ). Объемы компонентов реакционной смеси приведены в таблице 5.

Магнитные микрочастицы концентрировали из раствора с помощью магнитного штатива и ресуспендировали в 200 мкл 1 × Bead Block Solution, после чего озвучивали с помощью соникатора Covaris S2 System в течение 35 сек при коэффициенте мощности 5%. Пробирку

помещали в магнитный штатив на 1 мин, супернатант убирали и магнитные микрочастицы ресуспендировали в 200 мкл ТЕХ-буфера.

Таблица 5. Объемы и концентрации компонентов ПЦР-смеси.

Компонент	Конечная концентрация	Объем (мкл)
10-кратный ПЦР буфер	1-кратный	280
Смесь dNTP (100мМ смесь, содержащая по 25 мМ dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	14 мМ (по 3.5мМ каждого dNTP)	392
MgCl ₂ (1 М)	25 мМ	70
праймер 1 для эПЦР (10 мкМ)	40 нМ	11.2
праймер 2 для эПЦР (500 мкМ)	3 мкМ	16.8
ДНК-библиотека	0.5 нМ	2.8
H ₂ O milliQ	-	1647.2
ДНК-полимераза AmpliTaq Gold [®] (5 ед.акт./мкл)	0.54 ед.акт./мкл	300
Общий объем	-	2720

Пробирку помещали в ULTRA-TURRAX[®] Tube Drive вносили в нее 9 мл масляной фазы. К водной фазе добавляли 80 мкл магнитных микрочастиц, предварительно озвученных в течение 105 сек при коэффициенте мощности 5%, после чего немедленно объединяли водную фазу с масляной и перемешивали течение 5 мин.

Эмульсию вносили в 96-луночный планшет по 100 мкл в лунку. ПЦР проводили в амплификаторе GeneAmp[®] PCR System 9700 в течение 40 циклов: 93°C, 15 сек; 62°C, 30 сек; 72°C, 75 сек (40 циклов); 72°C в течение 7 мин. Далее эмульсию хранили при 4°C.

Эмульсию разрушали добавлением в лунки по 200 мкл 2-бутанола, после чего смесь объединяли в 50-мл флаконе и центрифугировали при 2000 g в течение 5 мин. Масляно-бутанольную фазу убрали. Микрочастицы промывали 600 мкл 1 × Bead Wash Buffer с помощью магнитного штатива, переносили в 1.5 мл пробирку LoBind и снова промывали 1 мл 1 × Bead Wash Buffer. Для промывки магнитных микрочастиц от масляно-бутанольной фазы пробирку центрифугировали при 14000 g, супернатант убирали и ресуспендировали в 200 мкл 1 × TEX Buffer. Микрочастицы собирали из суспензии на магнитном штативе в течение 1 мин, и снова ресуспендировали в 1 × TEX Buffer, после чего процедуру промывки повторяли. Суспензию микрочастиц в 1 × TEX Buffer хранили при 4 °C.

2.2.8.4. Обогащение микрочастиц с амплифицированными ДНК-библиотеками.

Для подготовки к обогащению 300 мкл обогащающих микрочастиц (на 1 эПЦР-реакцию) вносили в 1.5 мл пробирку LoBind. Микрочастицы центрифугировали при 14000 g в течение 2 мин, супернатант убирали, после чего ресуспендировали в 900 мкл 1 × Bind & Wash Buffer.

Процедуру центрифугирования повторяли дважды и ресуспендировали в 150 мкл 1 × Bind & Wash Buffer. К суспензии микрочастиц добавляли 1.5 мкл 1 мМ Enrichment Oligo, перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, далее центрифугировали при 14000 g в течение 2 мин, супернатант убирали и ресуспендировали в 900 мкл 1 × TEX Buffer, после чего процедуру центрифугирования повторяли. Подготовленные обогащающие микрочастицы хранили при 4°C.

Для каждой эПЦР готовили денатурирующий раствор, для чего к 1.8 мл денатурирующего буфера добавляли 200 мкл образца с магнитными микрочастицами и тщательно перемешивали.

Магнитные микрочастицы собирали из раствора 1 × TEX Buffer на магнитном штативе в течение 1 мин, супернатант убирали. Микрочастицы ресуспендировали в 300 мкл денатурирующего раствора и инкубировали в течение 1 мин. Пробирку перемещали в магнитный штатив на 1 мин, супернатант удаляли и процедуру инкубации в денатурирующем растворе повторяли. Далее микрочастицы дважды промывали 300 мкл 1 × TEX Buffer и ресуспендировали в 75 мкл of 1 × TEX Buffer, перемещали в пробирку LoBind Tube и озвучивали с помощью соникатора Covaris S2 System в течение 35 сек при коэффициенте мощности 5%. После этого подготовленные обогащающие микрочастицы объемом 75 мкл помещали в пробирку с магнитными микрочастицами и озвучивали с помощью соникатора Covaris S2 System в течение 105 сек при коэффициенте мощности 5%.

Смесь объемом 150 мкл инкубировали при 61°C в течение 15 мин, каждые 5 мин перемешивая помощью миксера, после чего помещали в лед на 2 мин. На 400 мкл свежеприготовленного 60%-го раствора глицерина наслаивали 150 мкл смеси магнитных и обогащающих микрочастиц и центрифугировали при 16000 g. в течение 3 мин. Верхний слой, содержащий обогащенные микрочастицы, переносили в новую пробирку LoBind с 1 мл 1 × TEX Buffer, после чего доводили объем до 2 мл с помощью 1 × TEX Buffer и центрифугировали при 16000 g в течение 1 мин. Супернатант убирали, ресуспендировали в 400 мкл 1 × TEX Buffer и центрифугировали при 16000 g в течение 1 мин. Супернатант убирали, ресуспендировали в 400 мкл денатурирующего раствора и инкубировали в течение 1 мин. Магнитные частицы выделяли из денатурирующего раствора на магнитном штативе в течение 1 мин, супернатант убирали, после чего процедуру повторяли дважды. Микрочастицы дважды промывали 400 мкл 1 × TEX Buffer, ресуспендировали в 200 мкл 1 × TEX Buffer и переносили в новую пробирку LoBind.

Микрочастицы озвучивали с помощью соникатора Covaris S2 System в течение 35 сек при коэффициенте мощности 5%, промывали дважды 400 мкл 1 × TEX Buffer, ресуспендировали в 200 мкл 1 × TEX Buffer и хранили при 4°C.

Количество обогащенных микрочастиц оценивали визуально с помощью SOLiD™ Bead Concentration Chart (рисунок 6). Оптимальный диапазон концентраций составляет от 750000 микрочастиц в микролитре (мкч/мкл) до 1250000 мкч/мкл.

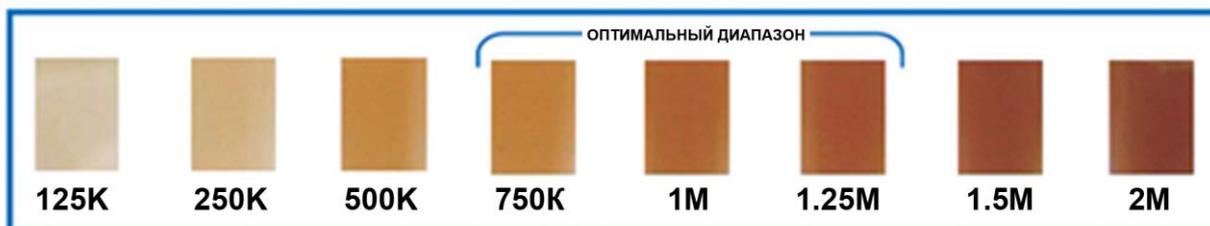


Рисунок 6. Шкала концентраций магнитных микрочастиц (SOLiD™ Bead Concentration Chart).

2.2.8.5. Модификация 3'-концов амплифицированных ДНК-библиотек, иммобилизованных на магнитных микрочастицах.

Обогащенные микрочастицы озвучивали с помощью соникатора Covaris S2 System в течение 105 сек при коэффициенте мощности 5%, пробирку с микрочастицами помещали в магнитный штатив на 1 мин, супернатант удаляли, микрочастицы ресуспендировали в 100 мкл терминально-трансферазного раствора (55 мкл 10 × Terminal Transferase Buffer, 55 мкл 10 × CoCl₂, 390 мкл H₂O milliQ). Процедуру повторяли дважды. Микрочастицы ресуспендировали в 178 мкл терминально-трансферазного буфера и добавляли 20 мкл 1 мМ буфера Bead Linker. Микрочастицы озвучивали с помощью соникатора Covaris S2 System в течение 35 сек при коэффициенте мощности 5% и добавляли 2 мкл терминальной трансферазы (20 ед. акт./мкл). Смесь инкубировали при 30°C в течение 2 час. Микрочастицы из буфера собирали с помощью магнитного штатива в течение 1 мин, дважды промывали 400 мкл 1 × TEX Buffer и ресуспендировали в 200 мкл 1 × TEX Buffer.

2.2.8.6. Секвенирование ДНК-библиотек методом на платформе Solid 5.500.

Микрочастицы озвучивали с помощью соникатора Covaris S2 System в течение 105 сек при коэффициенте мощности 5%, пробирку с микрочастицами помещали в магнитный штатив на 1 мин, супернатант удаляли, микрочастицы ресуспендировали в 400 мкл Deposition Buffer. Процедуру повторяли дважды.

Микрочастицы иммобилизовали на слайд и анализировали на платформе Solid 5.500 (длина прочтения 75 нк) согласно протоколу фирмы-производителя в ЦКП «Геномика» СО РАН. Секвенирование было проведено к.б.н. Бреннером Е.В. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) и Тупикиным А.Е. (ЦКП «Геномика», ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Общий объем данных секвенирования составил не менее 50 млн последовательностей. Данные секвенирования были выложены в базе NCBI BioProject (accession number PRJNA313482).

2.2.8.7. Анализ данных секвенирования

Данные секвенирования были обработаны с помощью ПО Trimmomatic 0.32 [333]. Затем качество данных оценивали с помощью ПО FastQC. Данные картировали на референс, состоящий из 980 tandemных повторов генома *Mus musculus*, с использованием ПО Bioscope v.1.3. Для оценки покрытия опухоль-ассоциированных генов данные секвенирования картировали на геном *Mus musculus* (MM9) с помощью ПО Bioscope v.1.3. Количество последовательностей, картированных на экзоны генов *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *N-ras* и *Jun*, было нормировано на один миллион последовательностей в каждой библиотеке (RPM, reads per million).

*2.2.8.8. Валидация уровня гена *Myc* методом qPCR*

Аmplификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0.1 – 0.5 нг вДНК, SYBR-Green-containing Bio Master Coq HS-qPCR и по 0.4 мкМ прямого и обратного специфических праймеров к *Myc* и β -актину (Таблица 4). Условия реакции были следующие: (1) 95°C, 6 мин; (2) 95°C, 15 сек; 59°C, 15 сек; 65°C, 45 сек, 40 циклов. Уровень экспрессии гена *Myc* нормализовали на уровень экспрессии β -актина.

2.2.9. Трансфекция клеток KB-3-1 человека вДНК, полученной из сыворотки крови мышей с LLC

Мышам линии C57BL прививали опухоль LLC как описано в п. 2.2.3.1. Начиная с 4-го дня после имплантации опухоли, мыши получали инъекции ДНКазы I (0.12 мг/кг) или физ./раствора как описано в п. 2.2.7.4. На 15-й день кровь собирали, готовили сыворотку как описано в п. 2.2.4. и выделяли вДНК как описано в п. 2.2.5.3.

Клетки KB-3-1 высевали в 24-луночный планшет (30×10^3 кл./лунку) и культивировали в среде DMEM в присутствии 10% FBS и 1% раствора антибиотика и антимикотика, при 5%-ном насыщении CO₂ и 37°C в течение 12 часов. Далее среду меняли на среду DMEM без сыворотки, и клетки культивировали в следующих условиях: (1) – в отсутствии вДНК, (2) – в присутствии

внДНК (100 нг), выделенной из сыворотки крови здоровых мышей C57Bl; (3) – в присутствии внДНК (100 нг), выделенной из сыворотки крови мышей с LLC; (4) – в присутствии внДНК (100 нг), выделенной из сыворотки крови мышей с LLC, получавших ДНКазу I в/м в дозе 0.12 мг/кг, (5) – в отсутствии внДНК, но с добавлением Lipofectamine 2000 согласно стандартному протоколу, (6) – в присутствии внДНК (100 нг), выделенной из сыворотки крови здоровых мышей C57Bl после прекомплексообразования с Lipofectamine 2000; (7) – в присутствии внДНК (100 нг), выделенной из сыворотки крови мышей с LLC, после прекомплексообразования с Lipofectamine 2000; (8) – в присутствии внДНК (100 нг), выделенной из сыворотки крови мышей с LLC, получавших ДНКазу I в/м в дозе 0.12 мг/кг, после прекомплексообразования с Lipofectamine 2000.

После 3 дней инкубации клетки собирали 0.25% раствором трипсин-ЭДТА (Sigma-Aldrich), промывали PBS. Количество и жизнеспособность собранных клеток измеряли с использованием камеры Горяева и Automated Cell Counter TC20™ (Bio-Rad, Сингапур). ВнДНК с поверхности клеток удаляли, как описано в п. 2.2.5.1. Суммарную клеточную ДНК выделяли, как описано в п. 2.2.5.4.

2.2.10. Определение уровня SINE и LINE элементов с помощью qPCR

Уровень SINE и LINE определяли среди внДНК, полученных из крови здоровых мышей CBA и C57Bl и мышей CBA с RLS₄₀ и C57Bl с меланомой B16 или LLC, получавших инъекции физ./раствора, ДНКазу I в дозах 0.12 – 1.2 мг/кг (п. 2.2.7.2.) или Пульмозим™ в дозах 1 – 10 мг/кг (п. 2.2.7.3), или суммарной ДНК, выделенной из клеток KB-3-1 (п. 2.2.9).

Аmplификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0.1 – 0.5 нг ДНК, SYBR-Green-containing Bio Master CoqHS-qPCR и по 0.6 мкМ прямого и обратного специфических праймеров к (B1_Mm, B1_mur4, B1_mus1, B1_mus2,) и LINE элементам (L1_mus1, L1Md_F, L1Md_Gf, Lx2_mus1) (таблица 4). Условия реакции были следующие: (1) 95°C, 6 мин; (2) 95°C, 15 сек; 59°C, 20 сек; 65°C, 60 сек, 30 циклов.

Для оценки эффективности qPCR использовали серию из четырех разведений для подбора оптимальных условий амплификации SINE и LINE элементов: эффективность праймеров проверяли с помощью построения стандартной кривой с наклоном около -3,30.

Количество ДНК рассчитывали из числа циклов с использованием стандартных кривых методом ΔСТ и автоматически нормировали относительно значения одного из образцов здоровых мышей. Значения внДНК приведены в условных единицах (а.у.).

2.2.11. Статистический анализ

Все эксперименты *in vitro* проводили не менее, чем в трех повторах. Все эксперименты *in vivo* проводили не менее, чем в двух повторах.

Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки (Tukey). Значение $p \leq 0.05$ отражало статистически достоверные отличия. Для статистического анализа использовали программу STATISTICA 10.0.

ГЛАВА 3. Механизм подавления опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I

3.1. Изменение параметров опухолевых культур под действием бычьей панкреатической ДНКазы I *in vitro*

3.1.1. Линии опухолевых клеток, использованные в работе

В работе использовали три культуры опухолевых клеток мыши: суспензионную первичную культуру карциномы легких Льюис (LLC), суспензионную культуру лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS₄₀ и культуру меланомы B16, растущую в виде монослоя. Клетки LLC, RLS₄₀ и B16 использовали в экспериментах *in vitro*, поскольку именно на этих опухолевых моделях предполагалось исследование антиметастатической активности бычьей панкреатической ДНКазы I *in vivo*.

3.1.2. Определение чувствительности клеток меланомы B16 к ДНКазе I

Клетки инкубировали в присутствии ДНКазы I в диапазоне концентраций $(1 - 20) \times 10^3$ ед.акт./мл без добавления FBS в стандартных условиях в течение 24 ч. Восприимчивость клеток к ДНКазе I определяли с помощью МТТ теста [331]. За 100% принимали количество живых клеток в контроле. На рисунке 7 представлена зависимость количества живых клеток от концентрации ДНКазы I. Из представленных данных видно, что уже при концентрации ДНКазы I 5×10^3 ед.акт./мл жизнеспособность клеток B16 снижалась до 80%, а при наибольшей используемой концентрации, 20×10^3 ед.акт./мл, выживаемость клеток составляла лишь 25%. На основании данных МТТ теста определяли значение IC₅₀ – дозу фермента, при которой выживает 50% клеток. Значение IC₅₀ для ДНКазы I составило $(10.1 \pm 1.2) \times 10^3$ ед.акт./мл.

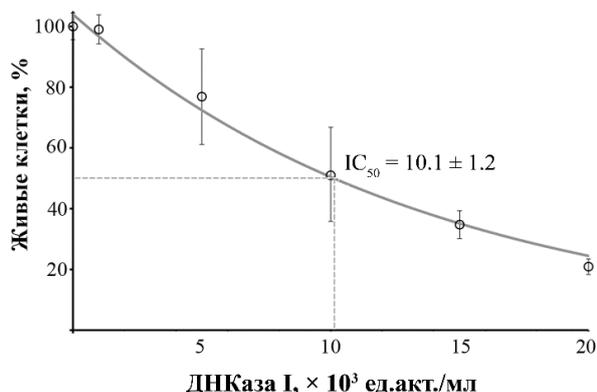


Рисунок 7. Влияние ДНКазы I на жизнеспособность клеток меланомы B16. За 100% принято число живых клеток в контроле (клетки инкубировали в отсутствие фермента). Данные были статистически проанализированы с использованием Т-теста Стьюдента. Данные представлены в виде MEAN ± SE.

3.1.3. Влияние ДНКазы I на концентрацию внДНК на поверхности клеток LLC, B16 и RLS₄₀ и в культуральной среде

Первичную культуру клеток LLC получали из солидной опухоли LLC, как описано в разделе 2.2.2.

Клетки B16 (10^6 кл./мл), RLS₄₀ (5×10^5 кл./мл) и LLC (5×10^5 кл./мл) инкубировали в среде IMDM или DMEM с добавлением антибиотика и антимикотика без добавления FBS в течение 48 ч в присутствии ДНКазы I в концентрации 0.05×10^3 ед.акт./мл, после чего собирали клетки и кондиционную среду после культивирования, и выделяли внДНК из культуральной среды (5 мл) и с поверхности опухолевых клеток, как описано в разделе 2.2.5. Количество клеток оценивали после отделения кондиционной среды методом автоматического подсчета на Automated Cell Counter TC20. Концентрацию внДНК оценивали с помощью Qubit. Концентрация внДНК в образцах представлена в таблице 6.

Как видно из представленных данных, концентрация внДНК на поверхности клеток линий RLS₄₀ и LLC была примерно одинакова и составила 9 – 13 нг на 1 млн. клеток, в то время как для меланомы B16 она оказалась в два раза выше. Следует, однако, учитывать, что реальная концентрация внДНК на поверхности клеток B16 может быть существенно выше, т.к. культура растет в виде монослоя и для открепления клеток требуется использование трипсина, что может снизить количество внДНК, связанной с поверхностью клеток.

Таблица 6. Влияние ДНКазы I на концентрацию внДНК на поверхности опухолевых клеток и в культуральной среде.

Тип опухоли	Концентрация ДНК, нг/млн.кл.			
	в культуральной жидкости,		на поверхности клеток,	
	ДНКазы I			
	-	+	-	+
B16	64 ± 10	35 ± 5*	22 ± 2	2 ± 1*
LLC	92 ± 13	11 ± 2**	13 ± 2	2 ± 1*
RLS ₄₀	200 ± 11	166 ± 10	9 ± 1	<1 ± 0.5*

Данные были статистически проанализированы с использованием Т-теста Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде MEAN ± SE. * – достоверные отличия, $p < 0.05$; ** – достоверные отличия, $p < 0.001$.

Самая высокая концентрация внДНК в культуральной жидкости была обнаружена для клеток RLS₄₀ и составила 200 ± 10 нг/млн. кл. У меланомы B16 и LLC концентрация внДНК в культуральной среде составила 64 ± 10 и 92 ± 13 нг/млн. кл., соответственно. Возможно, более высокое содержание внДНК в культуральной среде RLS₄₀ связано с тем, что клетки RLS₄₀

способны самопроизвольно впадать в апоптоз, что приводит к повышению уровня вДНК в культуральной среде.

Инкубация клеток в присутствии ДНКазы I в концентрации 0.05×10^3 ед. акт./мл приводила к существенному снижению концентрации вДНК и на поверхности клеток, и в культуральной жидкости только для клеток LLC и B16. Инкубация этих клеток с ДНКазой I приводила к 2-кратному и 10-кратному снижению вДНК в культуральной жидкости для B16 (с 64 ± 10 до 35 ± 5 нг/млн. кл.) и LLC (с 92 ± 13 до $11 \pm 292 \pm 3$ нг/млн. кл.), соответственно, и практически полному исчезновению вДНК, связанной с поверхностью этих клеток (таблица 6). В отличие от клеток LLC и B16, инкубация клеток RLS₄₀ в присутствии ДНКазы I приводила к полному исчезновению вДНК на клеточной поверхности ($<1 \pm 0.5$ нг/млн. кл.), но при этом количество вДНК в культуральной среде снижалось лишь на 25% (таблица 6).

3.1.4. Влияние ДНКазы I на миграционную активность опухолевых клеток B16

Влияние ДНКазы I на миграционную активность опухолевых клеток исследовали на примере клеток меланомы B16 *in vitro* с помощью метода зарастания царапины (“Scratch assay”). Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и измеряли скорость ее заполнения клетками в отсутствие (контроль) или в присутствии ДНКазы I в концентрации $(0.1 - 3.0) \times 10^3$ ед. акт./мл (рисунок 8).

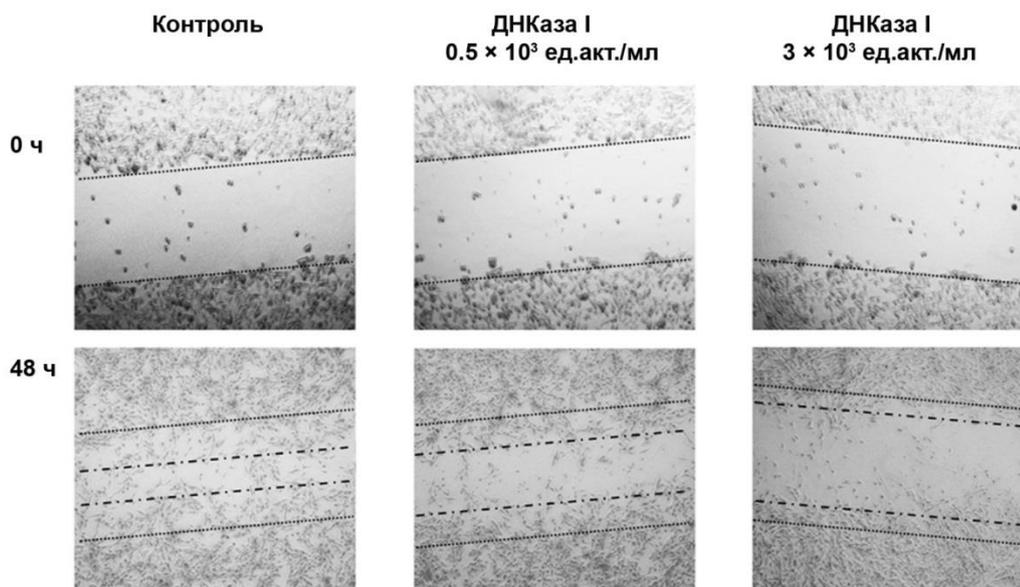


Рисунок 8. Фотографические изображения заполнения царапины опухолевыми клетками через 48 ч инкубации в присутствии ДНКазы I в концентрации 0.5 и 3.0×10^3 ед. акт./мл (4-х кратное увеличение). Прерывистой линией отмечены первоначальные границы царапины, пунктирной линией обозначены границы клеточного монослоя через 48 ч после нанесения повреждения.

При анализе миграционной активности клеток было обнаружено, что ДНКаза I вызывала замедление миграции клеток пропорционально концентрации фермента (рисунок 9, А – В). Так, через 48 ч ДНКаза I в концентрации 0.25×10^3 ед.акт./мл и выше вызывала двукратное снижение длины зоны миграции клеточного фронта (рисунок 9, А). Кроме того, под действием ДНКазы I наблюдалось дозозависимое уменьшение общей площади миграции: через 8 ч площадь заполнения царапины сокращалась на 20 – 40% при концентрациях ДНКазы I $(0.1 - 0.5) \times 10^3$ ед.акт./мл. и на 50 – 70% при концентрациях ДНКазы I $(1.5 - 3.0) \times 10^3$ ед.акт./мл (рисунок 9, Б). Наибольшее снижение скорости миграции клеток меланомы В16 наблюдалось при концентрациях фермента $(1.5 - 3.0) \times 10^3$ ед.акт./мл: через 2 ч инкубации скорость зарастания царапины снижалась вдвое, а к 48 ч – падала в 5 раз (рисунок 9, В). Следует отметить, что токсический эффект ДНКазы I на клетки меланомы В16 был незначителен, поскольку используемые концентрации были значительно ниже IC_{50} .

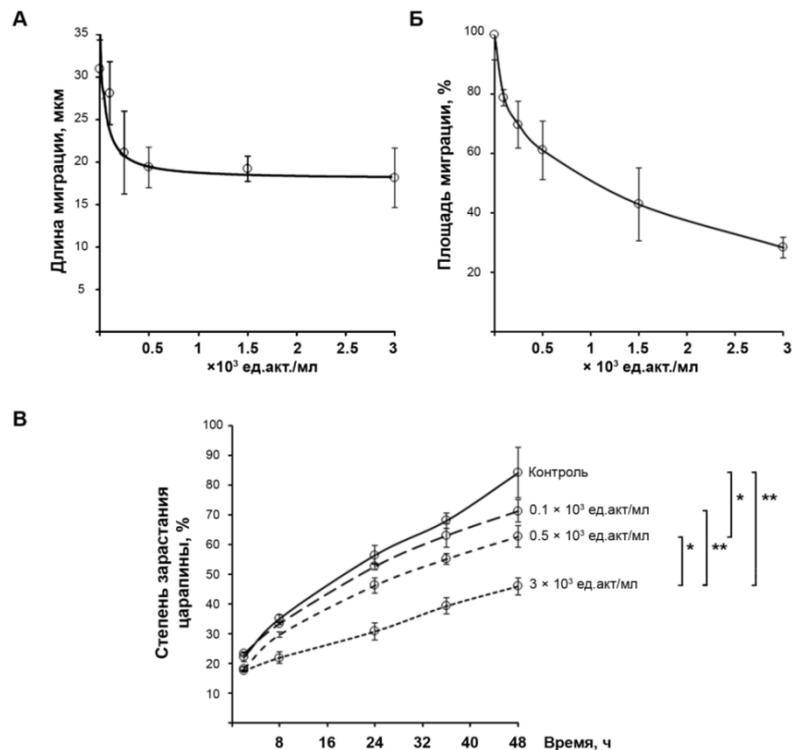


Рисунок 9. Влияние ДНКазы I на миграционную активность клеток меланомы В16. Клетки В16 культивировали в течение двух суток в присутствии ДНКазы I в концентрации $(0.1 - 3.0) \times 10^3$ ед.акт./мл. **(А)** и **(Б)** Длина зоны миграции и площадь зарастания царапины в культуре клеток В16 через 48 ч инкубации с ДНКазой I (относительно контроля), соответственно. **(В)** Кинетика зарастания царапины опухолевыми клетками в присутствии и в отсутствие ДНКазы I. Данные были статистически проанализированы с Т-теста Стьюдента. Данные представлены в виде $MEAN \pm SE$. * - достоверные отличия, $p < 0.05$, ** - достоверные отличия, $p < 0.001$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные показали, что ДНКазы I способствует замедлению пролиферации клеток меланомы и оказывает негативное действие на их жизнеспособность ($IC_{50} = (10.1 \pm 1.2) \times 10^3$ ед. акт./мл), а также уже в дозах $(0.5 - 3) \times 10^3$ (менее $1/5 IC_{50}$), снижает миграционную активность клеток *in vitro*, что проявлялось в сокращении длины миграции клеточного фронта, уменьшении общей площади зарастания царапины и снижении скорости миграции клеток. Кроме того, было показано, что инкубация клеток B16, LLC и RLS₄₀ с ДНКазой I *in vitro* в течение 48 ч приводит к существенному сокращению внДНК как в культуральной жидкости, так и на поверхности клеток.

Ранее группа Alcázar-Leyva с соавторами провела исследование влияния ДНКазы I на пролиферацию и жизнеспособность опухолевых клеток Calu-1, SK-MES-1, HeLa, HEP-2, L-929 – в сравнении с нормальными мононуклеарными клетками периферической крови и эмбриональными фибробластами человека (PBMS) [323]. Авторы показали, что инкубация клеток в присутствии ДНКазы I снижает скорость пролиферации опухолевых клеток в 5 – 9 раз и не оказывает влияния на скорость роста нормальных клеток. Полученные нами результаты хорошо согласуются с этими данными, причем значения IC_{50} , полученные для клеток меланомы B16, близки к таковым для других опухолевых линий [323].

Данные, полученные по влиянию ДНКазы I на концентрацию внДНК в культуральной среде различных опухолевых линий коррелируют с данными Wen с соавторами [277], показавшими, что ДНКазы I приводит к практически полному исчезновению внДНК в межклеточном пространстве линий аденокарциномы поджелудочной железы VxPc3 и эпителиальной карциномы поджелудочной железы MiaPaCa-2. Исследователи окрашивали препараты клеток флуоресцентными красителями DAPI и SYTOX, и после обработки клеток ДНКазой I в межклеточном пространстве было показано исчезновение окрашенных фрагментов ДНК. Однако по результатам Wen с соавторами сложно судить об изменениях связанных с поверхностью внДНК под действием ДНКазы I, т.к. изменения интенсивности окрашивания поверхности клеток не было обнаружено. Таким образом, ДНКазы I *in vitro* способна снижать концентрацию как внДНК в культуральной среде, так и внДНК, связанных с поверхностью клеток.

Продемонстрированные нами результаты по снижению миграционной активности клеток меланомы B16 под действием ДНКазы I хорошо согласуются с данными Wen с соавторами [277], показавшими, что ДНКазы I уменьшает миграционную активность клеток рака поджелудочной железы, но не влияет на миграцию нормальных клеток панкреатического

протокового эпителия, при этом эффективное снижение скорости миграции наблюдается уже при концентрациях фермента 0.03×10^3 ед.акт/мл.

Суммируя полученные *in vitro* данные, можно утверждать, что ДНКза I снижает уровень вДНК в культуральной жидкости различных опухолевых линий, а также способствует замедлению пролиферации и миграции.

3.2. Исследование антиметастатического, противоопухолевого и иммуномодулирующего действия ДНКазы I *in vivo*

3.2.1. Опухолевые модели, использованные в работе

В работе использовали три типа опухолевых моделей: карциному легких Льюис (LLC), лекарственно-устойчивую лимфосаркому RLS₄₀ и меланому B16. LLC и RLS₄₀ при внутримышечном введении формируют первичный опухолевый узел и метастазируют в легкие и печень, соответственно. Меланома при внутривенном введении не формирует первичного опухолевого узла и метастазирует в легкие. Все модели опухолей относятся к различным гистологическим типам и имеют гомологию с опухолями человека. Карцинома легких Льюис LLC имеет эпителиальное происхождение и гомологична плоскоклеточному раку легких человека [334]. Лимфосаркома RLS₄₀ с фенотипом множественной лекарственной устойчивости происходит из гемопоэтической ткани и гомологична диффузной крупной В-клеточной лимфоме человека [335]. Меланома B16 происходит из нервной ткани, представляет собой перерожденные меланоциты и гомологична метастатической меланоме человека [336].

3.2.2. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I при различных типах введения на модели LLC

Ранее высокий антиметастатический потенциал ДНКазы I был продемонстрирован на модели карциномы легких Льюис (LLC) при введении ежедневных внутримышечных инъекций ДНКазы I в дозах 0.02 – 2.3 мг/кг [25]. Для определения наиболее эффективного способа введения ДНКазы I было проанализировано три метода введения фермента – внутримышечное (в/м), внутрибрюшинное (в/б) и внутривенное (в/в). В этом и в последующих *in vivo* экспериментах ДНКазу I вводили в дозе 0.12 мг/кг, что соответствует 1×10^3 ед.акт./кг (5 ед.акт./мышь), так как ранее для этой дозы ферменты было показано достоверное снижение количества метастазов [25].

Мышам C57Bl были в/м имплантированы клетки LLC, и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли животные получали инъекции ДНКазы I в/м по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв); в/в на 4, 7, 11, 14 и 18 дни; в/б по схеме 5+2 (рисунок 10, А). В контрольных группах животные-опухоленосители получали инъекции физ./раствора. На 18 день эксперимента, через 1 час после последней инъекции животных выводили из эксперимента и определяли количество метастазов в легких мышей с LLC, получавших ДНКазу I с использованием различных методов введения (рисунок 10, Б).

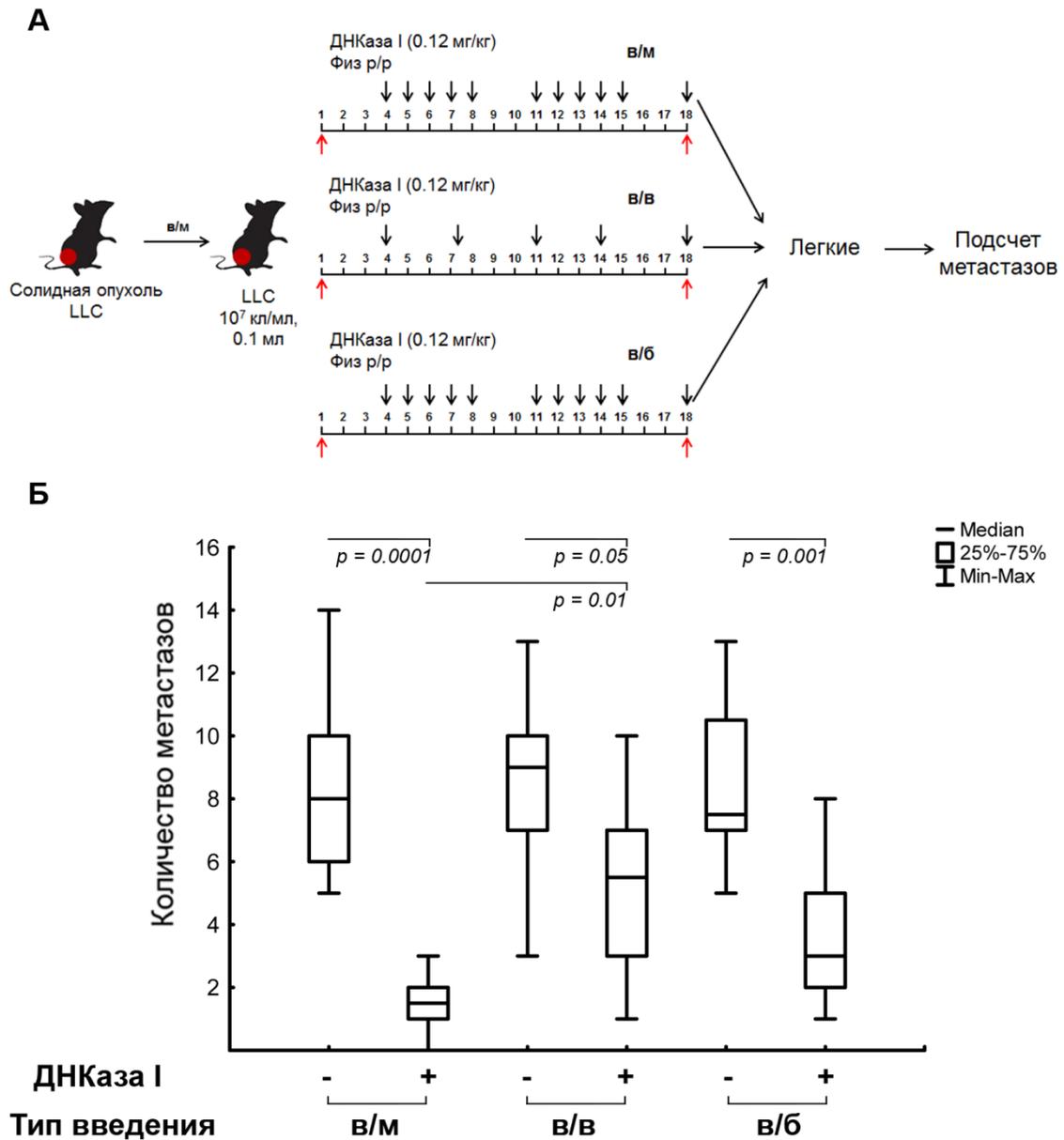


Рисунок 10. Исследование антиметастатической активности ДНКазы I при разных типах введения. (А) Дизайн эксперимента. Клетки LLC имплантировали мышам C57Bl. Начиная с 4 дня после имплантации опухоли, животные получали ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг в/м, в/в или в/б. Режим введения ДНКазы I указан на схеме. (Б) Количество метастазов в легких мышей C57Bl с LLC при разных типах введения ДНКазы I. Данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде медианы. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Наиболее высокое антиметастатическое действие наблюдалось при в/м способе введения ДНКазы I (рисунок 10, Б): количество метастазов при в/м введении снижалось в 4 раза по сравнению с контролем, тогда как при в/б и в/в способе введения наблюдалось снижение в 2 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Таким образом, внутримышечное введение ДНКазы I оказывало более выраженное антиметастатическое действие, даже при использовании относительно низких концентраций ДНКазы I. Внутримышечное введение по схеме 5 + 2 представляется наиболее эффективной схемой терапии, поэтому в дальнейших экспериментах была использована эта схема введения.

3.2.3. Противоопухолевое и антиметастатическое действие ДНКазы I на моделях опухолей B16 и RLS₄₀.

Для оценки влияния ДНКазы I на инвазивный потенциал различных опухолей были выбраны модели меланомы B16 и лимфосаркомы RLS₄₀, а также LLC в качестве контрольной модели, на которой неоднократно был показан противоопухолевый и антиметастатический эффект фермента.

Дизайн эксперимента приведен на рисунке 11. Клетки меланомы B16 имплантировали в/в (метастатическая модель), а клетки RLS₄₀ и LLC – в/м, и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали: инъекции ДНКазы I (0.12 мг/кг) в/м по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На 15, 22 и 19 день развития опухолей LLC, B16 и RLS₄₀, соответственно, через 1 час после последней инъекции у мышей собирали кровь, готовили сыворотку. Сыворотку в дальнейшем использовали для определения ДНКазной активности (раздел 3.2.5), определения концентрации вДНК (раздел 3.2.5) и для проведения qPCR (раздел 3.4).

На рисунке 12 представлено влияние ДНКазы I на рост первичной опухоли и количество метастазов. Введение мышам с RLS₄₀ и LLC ДНКазы I в/м приводило к замедлению роста первичного опухолевого узла (рисунок 12, А): было обнаружено 2-кратное уменьшение объема опухоли для LLC ($3.1 \pm 0.4 \text{ см}^3$ в контроле vs $1.7 \pm 0.3 \text{ см}^3$ в экспериментальной группе) и 1.5-кратное снижение для RLS₄₀ ($2.4 \pm 0.2 \text{ см}^3$ в контроле vs $1.6 \pm 0.2 \text{ см}^3$ в экспериментальной группе) (рисунок 12, А). Индекс торможения роста опухоли (ТРО) составил 45% для мышей с LLC и 33% для мышей с RLS₄₀, соответственно (см. раздел 2.2.3.2).

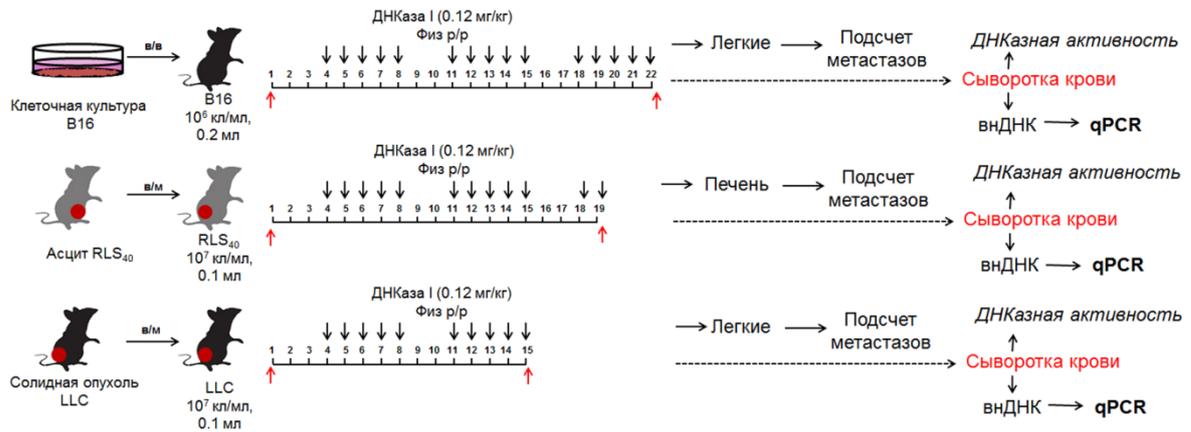


Рисунок 11. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I на моделях B16, LLC и RLS₄₀. Дизайн эксперимента. Клетки B16, LLC или RLS₄₀ имплантировали мышам C57Bl (B16 в/в и LLC в/м) или мышам СВА (RLS₄₀ в/м). Начиная с 4-го дня после имплантации опухоли, животные получали внутримышечно физ./раствор (0.1 мл) или ДНКазу I (0.12 мг/кг, в 0.1 мл). Режим введения указан на схеме. На 15, 22 и 19 день развития опухолей LLC, B16 и RLS₄₀, соответственно, кровь мышей собирали для приготовления сыворотки и последующего измерения ДНКазной активности и выделения вДНК для qPCR; легкие и печень собирали для подсчета МП или количества поверхностных метастазов.

Следует отметить, что впервые на моделях RLS₄₀ и LLC показано, что ДНКаза I индуцирует столь значительное торможение роста первичной опухоли. Ранее на модели LLC не было обнаружено влияние ДНКазы I на размер первичного опухолевого узла [25]. В других исследованиях (рак поджелудочной железы, рака прямой кишки и рак легких человека) также не наблюдалось изменений объема первичного опухолевого узла под действием ДНКазы I ни на мышах [277,327], ни на крысах [337]. Только при использовании смеси бычьей панкреатической ДНКазы I и протеаз (папаин, трипсин и химотрипсин) было продемонстрировано значительное уменьшение размера первичного опухолевого узла [327]. Тем не менее, данные об ингибировании роста первичной опухоли ДНКазой I *in vivo* согласуются с данными о влиянии ДНКазы I на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*.

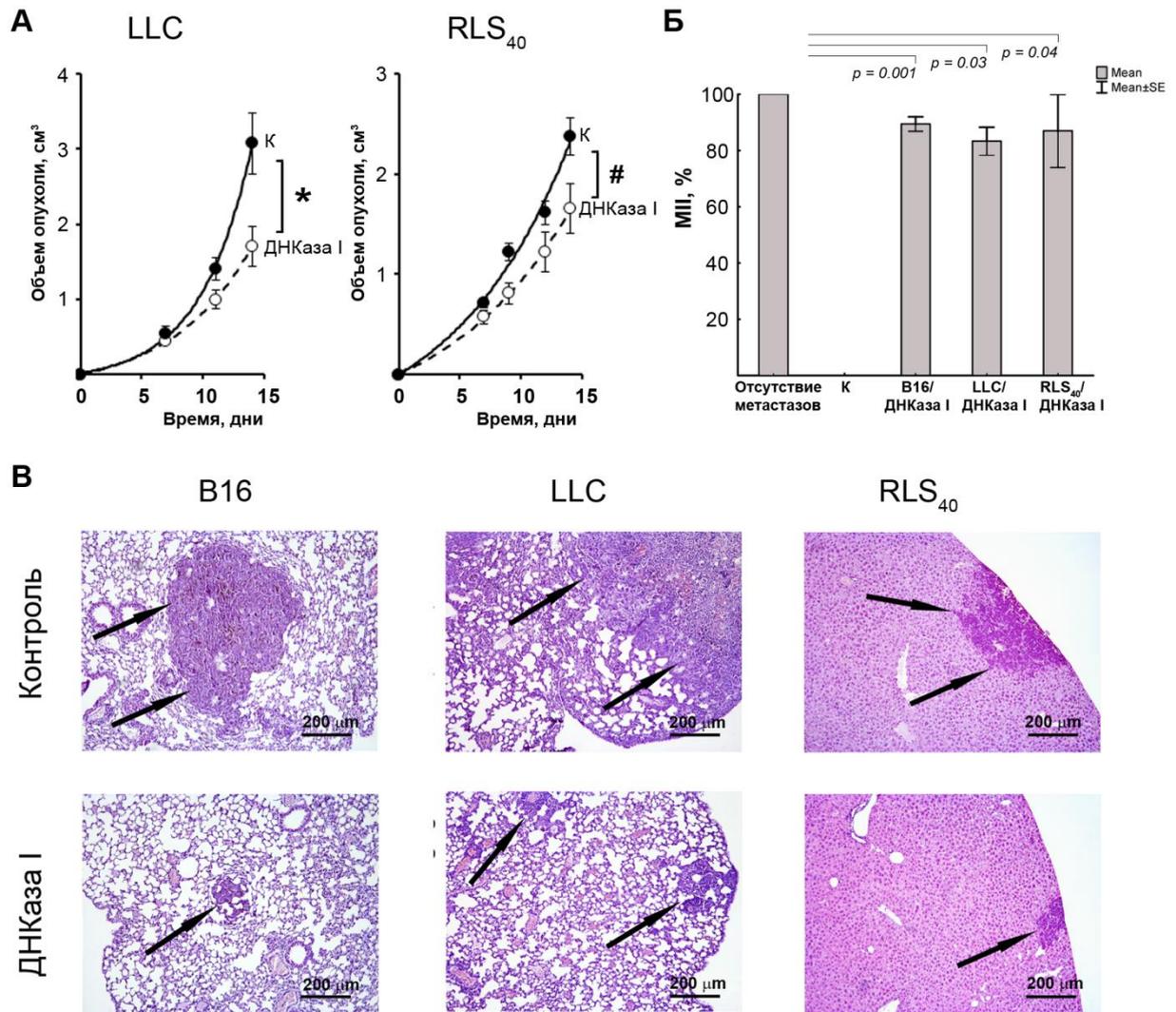


Рисунок 12. Влияние ДНКазы I на рост первичной опухоли и метастазирование у мышей с LLC, RLS₄₀ и B16. (А) Влияние ДНКазы I на рост первичных опухолей LLC и RLS₄₀. К – мыши с опухолями, получавшие инъекции физиологического раствора; ДНКазы I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 мг/кг). (Б) Индекс ингибирования метастазов (МИ) легких и печени групп мышей с B16, LLC и RLS₄₀, получавших инъекции физ./раствора (К) и ДНКазы I. К – мыши с опухолями, получавшие инъекции физиологического раствора; ДНКазы I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 мг/кг). Данные были статистически проанализированы с использованием Т-теста Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде MEAN ± SE. * – достоверные отличия, $p < 0.05$, # – недостоверные отличия. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. (В) Гистотопограммы срезов легких и печени групп мышей с B16, LLC и RLS₄₀, получавших инъекции физ./раствора (Контроль) и ДНКазы I. Окрашивание гематоксилином и эозином. Стрелками указаны крупные метастазы. Шкала соответствует 200 мкм.

Введение ДНКазы I во всех экспериментальных группах приводило к значительному снижению площади метастазов. Наблюдалось снижение количества поверхностных метастазов в легких на модели метастатической меланомы B16, уменьшение площади внутренних метастазов в легких на моделях LLC и B16 и печени на модели RLS₄₀ по сравнению с контрольными животными (рисунок 12, Б). У мышей с меланомой B16 без лечения среднее количество метастазов на поверхности легких составляло 117 ± 21 , в то время как у животных, получавших ДНКазу I, оно составляло 61 ± 11 .

Ингибирование развития метастазов оценивали путем подсчета средней площади метастазирования и индекса ингибирования метастазирования (МИ) с использованием морфометрического анализа. МИ контрольной группы принимали за 0%, а МИ, соответствующий 100%, указывал на отсутствие метастазов. Гистологическое исследование образцов было проведено к.м.н. Сеньковой А.В. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН). После введения ДНКазы I было обнаружено 6-ти кратное уменьшение площади метастазов в легких у мышей с LLC ($p = 0.03$), 7.7-кратное уменьшение площади метастазов в печени у мышей с RLS₄₀ ($p = 0.04$) и 9.4-кратное уменьшение площади метастазов в легких у мышей с метастатической меланомой B16 ($p = 0.0001$) (рисунок 12, Б). Морфометрический анализ показал, что МИ у мышей с LLC, RLS₄₀ и меланомой B16, получавших ДНКазу I, были примерно одинаковыми и составили в среднем 83 – 89% (рисунок 12, Б).

Гистологическое исследование срезов легких мышей с B16 показало, что метастатические очаги в легких были представлены атипичными полиморфными и веретенообразными клетками, содержащими коричневый пигмент меланин (рисунок 12, В, панель B16). Метастатические очаги LLC в легких состояли из полиморфных клеток округлой формы с большим ядром и крупными ядрышками с конденсированными зернами хроматина (рисунок 12, В, панель LLC) так же, как и первичный опухолевый узел. Метастатические очаги RLS₄₀ в печени были представлены мономорфными атипичными лимфоидными клетками с множественными митозами (рисунок 12, В, панель RLS₄₀), и такая же картина наблюдалась в первичном опухолевом узле.

3.2.4. Влияние дозы ДНКазы I на интенсивность противоопухолевого эффекта на моделях B16 мышей C57Bl и RLS₄₀ мышей CBA

Для исследования эффекта дозы ДНКазы I на интенсивность противоопухолевого эффекта мышам C57Bl и CBA были имплантированы клетки B16 (в/в) и RLS₄₀ (в/м), соответственно. Начиная с четвертого дня после имплантации опухолей, животные получали

физ. раствор или ДНКазу I в дозах 0.12 – 1.2 мг/кг, что соответствует $1 - 10 \times 10^3$ ед.акт./кг (5 – 50 ед.акт./мышь) по схеме, представленной на рисунке 14. На 22 и 19 день развития опухолей B16 и RLS₄₀, соответственно, через 1 час после последней инъекции, у мышей собирали кровь для приготовления сыворотки. Сыворотку использовали для определения ДНКазной активности (раздел 3.2.5.), концентрации вДНК (раздел 3.2.5.) и проведения qPCR (раздел 3.4).

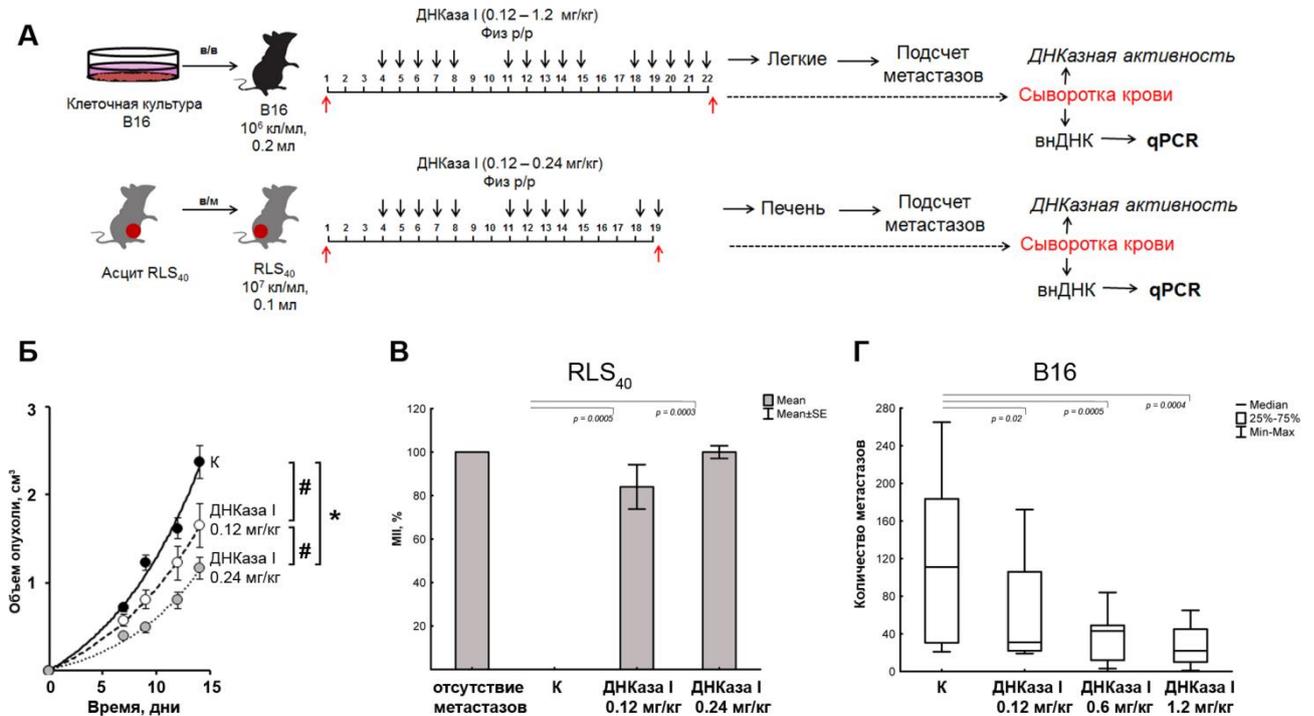


Рисунок 13. Исследование эффекта дозы ДНКазы I на моделях B16 и RLS₄₀. (А) Дизайн эксперимента. Клетки B16 или RLS₄₀ имплантировали мышам C57Bl (B16, в/в) или СВА (RLS₄₀, в/м). Начиная с 4 дня после имплантации опухоли, животные получали в/м физ./раствор или ДНКазу I (дозы и режим введения указаны на схеме). (Б) Влияние ДНКазы I на рост первичной опухоли RLS₄₀; К – мыши с опухолями, получавшие инъекции физиологического раствора; ДНКаза I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 мг/кг). (В) МПИ в печени мышей СВА с RLS₄₀. (Г) Количество поверхностных метастазов в легких мышей C57Bl с B16. Данные были статистически проанализированы с использованием Т-теста Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде медианы или MEAN ± SE. * – достоверные отличия, $p < 0.05$, # – недостоверные отличия, $p > 0.05$. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

На модели RLS₄₀ ДНКаза I в дозе 0.12 мг/кг ингибировала рост первичной опухоли в 1.5 раза по сравнению с контрольной группой (рисунок 13, Б) и увеличение дозы до 0.24 мг/кг привело к ингибированию роста опухоли уже в 2.5 раза. Также было показано, что ДНКаза I в дозе 0.12 мг/кг приводила к ингибированию площади внутренних метастазов до 87%, а

удвоение дозы приводило полному исчезновению у мышей-опухоленосителей метастазов в печени на модели RLS₄₀ (рисунок 13, В).

Анализ поверхностных метастазов в легких у мышей с В16, показал, что ДНКазы I вызывала уменьшение количества метастазов дозозависимым образом. ДНКазы I в дозе 0.12 мг/кг снижала количество метастазов в два раза (61 ± 11 в экспериментальной группе vs 117 ± 21 в контроле, рисунок 13, Г). Увеличение дозы ДНКазы I до 0.6 мг/кг приводило к снижению числа метастазов до 48 ± 10 , однако дальнейшее увеличение дозы до 1.2 мг/кг не приводило к значительному усилению эффекта (35 ± 5 , рисунок 13, Г). Различия между группами, получавшими ДНКазу I в дозах 0.6 и 1.2 мг/кг, были статистически недостоверными.

3.2.5. Влияние ДНКазы I на ДНКазную активность и концентрацию вДНК в сыворотке крови мышей с В16, LLC и RLS₄₀.

ДНКазную активность и концентрацию вДНК определяли в сыворотке крови мышей с метастатической меланомой В16, а также в сыворотке крови мышей с LLC и RLS₄₀ с первичным опухолевым узлом (схема эксперимента приведена на рисунках 11 и 13). ДНКазу I в дозе 0.12 – 1.2 мг/кг вводили в/м по схеме 5+2 (5 дней инъекции, два дня перерыв). Кровь собирали через 1 ч после последней инъекции ДНКазы I и получали сыворотку, как описано разделе 2.2.4.

Уровни вДНК в сыворотке крови здоровых мышей и мышей с опухолями В16, LLC и RLS₄₀ после лечения ДНКазой I и без него приведены в таблице 8. Концентрация вДНК в крови здоровых мышей C57Bl/6J и CBA составила 65 ± 10 нг/мл и 168 ± 32 нг/мл, соответственно. Прогрессирование опухоли у мышей, получавших инъекции физ. раствора (контроль), приводило к двукратному увеличению концентрации вДНК в сыворотке крови животных с LLC (до 138 ± 20 нг/мл) и RLS₄₀ (до 300 ± 91 нг/мл). Наиболее выраженное увеличение концентрации вДНК было обнаружено у мышей с В16; в этом случае уровень вДНК достиг 456 ± 82 нг/мл, что было в 5 – 6 раз выше по сравнению со здоровыми животными (таблица 7).

Введение ДНКазы I (0.12 мг/кг) приводило к значительному снижению уровней вДНК в крови мышей с LLC (в 1.5 раза) и В16 (в 2 раза), но не в крови мышей с RLS₄₀ (таблица 7). Ранее на модели LLC было показано, что снижение метастазирования под действием ДНКазы I коррелировало со снижением патологически повышенного уровня вДНК в сыворотке крови мышей и повышением ДНКазной активности плазмы крови [25].

Анализ уровней вДНК в сыворотке крови мышей с меланомой В16 (схема эксперимента представлена на рисунке 13) показал, что в группах мышей, получавших ДНКазу I в дозах 0.12, 0.6 и 1.2 мг/кг концентрации вДНК составили 246 ± 22 , 92 ± 10 и 83 ± 6 нг/мл, соответственно, что для доз 0.6 и 1.2 мг/кг было близко к значениям концентрации вДНК у здоровых животных. В отличие от модели меланомы В16 (мыши С57В1), в сыворотке крови мышей СВА с RLS₄₀ не наблюдалось дозозависимого снижения концентрации вДНК: концентрация вДНК в контрольной группе составляла 300 ± 91 нг/мл, тогда как при лечении ДНКазой I в обеих исследованных дозах (0.12 и 0.24 мг/кг) статистически значимых изменений в концентрации вДНК обнаружено не было, и концентрация вДНК в среднем составила 286 ± 93 нг/мл.

Таблица 7. Влияние ДНКазы I на концентрацию вДНК в сыворотке крови мышей с опухолями (В16, LLC, RLS₄₀) при снижении инвазивного потенциала опухолей

Линия мышей	Концентрация вДНК, нг/мл	Тип опухоли	Концентрация вДНК, нг/мл	
	Здоровые мыши, нг/мл		Контроль	ДНКазы I
С57В1	65 ± 10	В16	$456 \pm 82^{\alpha\alpha}$	$246 \pm 22^{**}$
		LLC	$138 \pm 20^{\alpha}$	$97 \pm 16^*$
СВА	168 ± 32	RLS ₄₀	$300 \pm 91^{\alpha}$	292 ± 89

Контроль – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ. раствора; ДНКазы I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 мг/кг). Данные были статистически проанализированы с использованием Т-теста Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде MEAN \pm SE. ^α – достоверные отличия между группами здоровых мышей и мышей-опухоленосителей без лечения, $p < 0.05$, ^{αα} – достоверные отличия, $p < 0.001$; * – достоверные отличия между группами мышей-опухоленосителей без лечения и получавших лечение ДНКазой I (0.12 мг/кг), $p < 0.05$, ** – достоверные отличия, $p < 0.001$.

Суммарную ДНКазную активность сыворотки крови здоровых мышей и мышей-опухоленосителей после лечения ДНКазой I и без него определяли в реакции расщепления модельной плазмидной ДНК при 37°C и выражали в виде эффективных констант скорости расщепления ДНК (k_{eff}). ДНКазная активность сыворотки крови здоровых мышей линий С57В1 и СВА была примерно одинакова: $k_{\text{eff}} = (6.3 \pm 0.5) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, и $(6.2 \pm 1.2) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, соответственно. При прогрессировании меланомы В16 и LLC было отмечено двукратное снижение ДНКазной активности: $k_{\text{eff}} = (2.9 \pm 0.6) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $(2.8 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, соответственно (таблица 8), тогда как при прогрессировании RLS₄₀ было отмечено снижение ДНКазной активности в пять раз: $k_{\text{eff}} = (1.4 \pm 0.5) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

Таблица 8. Влияние ДНКазы I на ДНКазную активность сыворотки крови мышей с опухолями (B16, LLC, RLS₄₀) при снижении инвазивного потенциала опухолей

Линия мышей	ДНКазная активность, $k_{\text{eff}} \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$	Тип опухоли	ДНКазная активность, $k_{\text{eff}} \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$	
	Здоровые мыши		Контроль	ДНКазы I
C57Bl	6.3 ± 0.5	B16	2.9 ± 0.6 ^{αα}	5.5 ± 0.4**
		LLC	2.8 ± 1 ^{αα}	6.6 ± 2.5**
СВА	6.2 ± 1.2	RLS ₄₀	1.4 ± 0.5 ^{αα}	3.5 ± 1.2*

Контроль – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ. раствора; ДНКазы I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 мг/кг). Данные были статистически проанализированы с использованием Т-теста Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. ^{αα} – достоверные отличия между группами здоровых мышей и мышей-опухоленосителей без лечения, $p < 0.001$; * – достоверные отличия между группами мышей-опухоленосителей без лечения и получавших лечение ДНКазой I (0.12 мг/кг), $p < 0.05$, ** – достоверные отличия, $p < 0.001$.

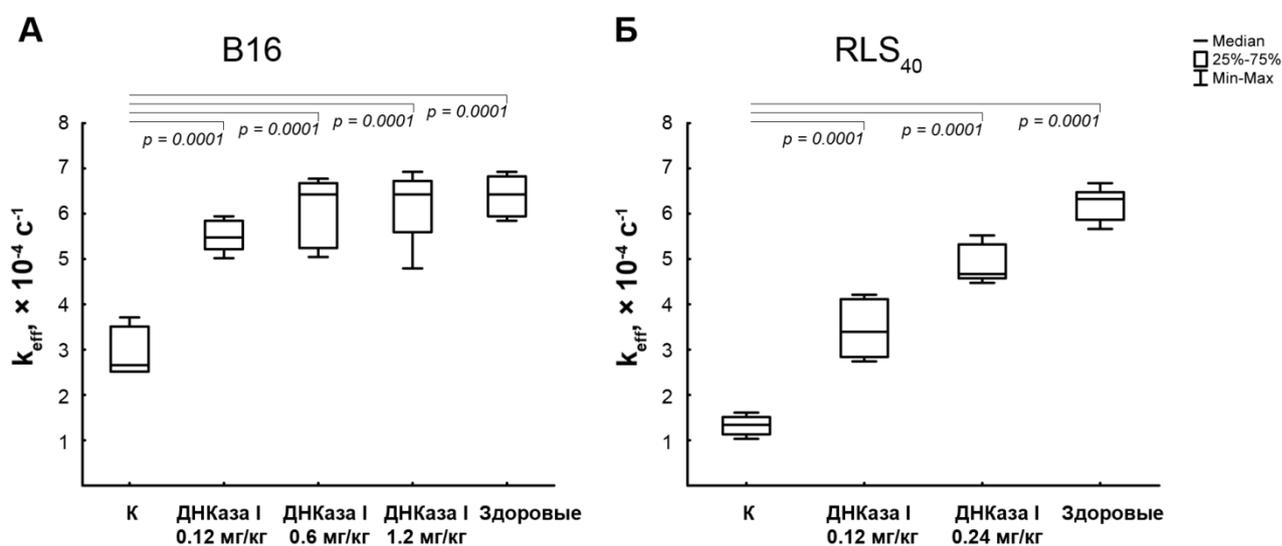


Рисунок 14. Влияние ДНКазы I на ДНКазную активность сыворотки крови мышей с B16 и RLS₄₀. А и Б - мыши с имплантированными опухолями B16 или RLS₄₀, соответственно, получали в/м физ. раствор (К) или ДНКазу I (0.12 – 1.2 мг/кг). Данные были статистически проанализированы с использованием дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде MEAN ± SE. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Введение ДНКазы I в дозе 0.12 мг/кг приводило к двукратному повышению уровня ДНКазной активности для моделей LLC и B16 и трехкратному повышению для RLS₄₀: значения k_{eff} были $(3.5 \pm 1.2) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ для RLS₄₀, $(5.5 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ для B16 и $(6.6 \pm 2.5) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ для LLC (таблица 8). Стоит отметить, что введение ДНКазы I мышам с B16 уже в дозе 0.12 мг/кг приводило к восстановлению ДНКазной активности сыворотки крови до уровня здоровых

животных (рисунок 14, А), аналогично животным с LLC (таблица 9). На модели RLS₄₀ повышение дозы ДНКазы I в два раза с 0.12 до 0.24 мг/кг приводило к значительному повышению ДНКазной активности ($k_{\text{eff}} = (4.8 \pm 0.8) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$), однако, не до уровня здоровых животных (рисунок 14, Б).

Таким образом, несмотря на повышение ДНКазной активности сыворотки крови мышей с RLS₄₀ после введения мышам ДНКазы I количество вДНК, тем не менее, не снижалось. Наблюдаемый эффект на модели RLS₄₀ можно объяснить быстрым накоплением вДНК в кровотоке. Клетки культуры RLS₄₀ *in vitro* характеризуются повышенной способностью впадать в апоптоз, что приводит к выбросу большого количества ДНК. *In vivo* при развитии опухоли RLS₄₀ также было отмечено большое число апоптозов в опухолевой ткани, что по всей вероятности, обеспечивает постоянный источник возобновления вДНК.

3.2.6. Влияние ДНКазы I на морфофункциональное состояние органов иммунной системы мышей с меланомой B16

Исследование морфофункционального состояния органов иммунной системы проводилось к.м.н. Сеньковой А.В. В нашей работе впервые показано, что ДНКазы I вызывает неспецифическую активацию иммунной системы. Для оценки влияния ДНКазы I на морфофункциональное состояние органов иммунной системы (селезенки, тимуса) мышей с меланомой B16 было проведено морфологическое и морфометрическое исследование гистологических срезов этих органов. При морфологическом исследовании было выявлено, что селезенка мышей с меланомой B16, получавших инъекции физиологического раствора (контрольная группа), имела типичное строение: белая пульпа умеренно развита и представлена лимфоидными фолликулами, большая часть которых лежала изолированно; герминативные центры фолликулов не сформированы (рисунок 15, А). После лечения мышей-опухоленосителей ДНКазой I в дозе 1.2 мг/кг в селезенке обнаружили признаки значительной антигенной стимуляции: увеличение размеров и числа фолликулов, их слияние между собой, появление в фолликулах герминативных центров (рисунок 15, Б). При морфометрическом исследовании было выявлено, что лечение ДНКазой I приводит к увеличению объемной плотности белой пульпы и диаметра лимфоидных фолликулов селезенки у мышей с меланомой B16 по сравнению с контрольными животными в 2 и 1.9 раз, соответственно (таблица 9).

Тимус мышей с меланомой B16, получавших инъекции физиологического раствора (контрольная группа), был представлен двумя долями и состоял из коркового и мозгового вещества. Корковое вещество было хорошо развито и представлено плотно лежащими лимфоцитами (рисунок 15, В). В мозговом веществе обнаружено большое количество

лимфоцитов, встречались небольшого размера тимические тельца, состоящие из 3 – 4 ретикулоэпителиоцитов (рисунок 15, В). Граница между мозговым и корковым веществом была четкой.

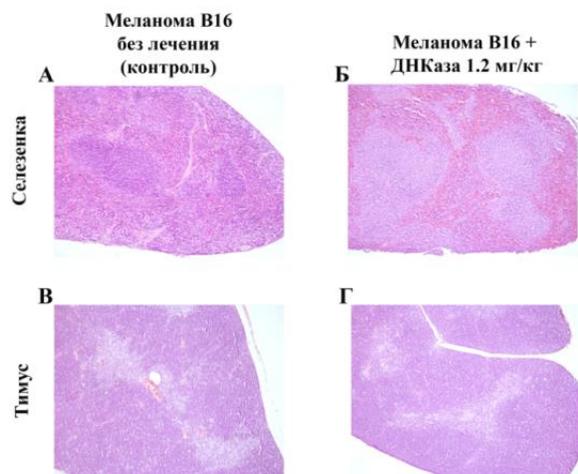


Рисунок 15. Морфологические изменения в селезенке и тимусе мышей с меланомой В16 без лечения (А, В) и при введении ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг (Б, Г). Окраска гематоксилином и эозином; увеличение $\times 100$.

Таблица 9. Морфофункциональные изменения в селезенке и тимусе мышей с меланомой В16 после введения ДНКазы I

Орган	Определяемые параметры	Контроль	ДНКазы I
Селезенка	Объемная плотность белой пульпы, V_v , %	32.2 ± 4.4	63.8 ± 1.9
	Объемная плотность красной пульпы, V_v , %	62.5 ± 5.0	34.6 ± 1.8
	Диаметр фолликулов, мкм	297.0 ± 24.5	566.0 ± 31.5
Тимус	Объемная плотность коркового вещества, V_v , %	67.8 ± 1.2	83.5 ± 1.4
	Объемная плотность мозгового вещества, V_v , %	32.2 ± 1.2	16.5 ± 1.4
	Корково-мозговой индекс, КМИ	2.3 ± 0.1	7.1 ± 1.3

Контроль - мыши с опухолями, получавшие инъекции физ. раствора; ДНКазы I - мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 мг/кг). Данные были статистически проанализированы с использованием одностороннего ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде MEAN \pm SE. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Тимус мышей с меланомой В16, получавших инъекции ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг, также имел типичное строение (рисунок 15, Г). Однако по сравнению с контрольной группой граница между корковым и мозговым веществом была менее четкой, и количество лимфоцитов в мозговом веществе было меньше. При морфометрическом исследовании тимуса выявлено, что лечение ДНКазой I приводило к нарастанию объемной плотности коркового вещества и уменьшению объемной плотности мозгового вещества тимуса соответственно в 1.2 и 2 раза по

сравнению с контрольной группой (таблица 9). Корково-мозговой индекс (КМИ) – возрастал в 3.1 раза у мышей с меланомой B16, получавших ДНКазу I, по сравнению с контролем (таблица 9).

Таким образом, представленные морфофункциональные изменения в селезенке и тимусе могут свидетельствовать об активации иммунной системы и улучшении процессинга (процессирования) антигена в органах иммуногенеза [338]. Кроме того, следует отметить, что токсические эффекты исследуемого соединения (ДНКазы I) на селезенку и тимус не выявлены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные показали, что *in vivo* ДНКазы I проявляла выраженное антиметастатическое действие на трех опухолевых моделях - карциноме легких Льюис LLC, меланоме B16 и лимфосаркоме RLS₄₀, и достоверно сокращала количество и площадь метастазов в легких и печени мышей. Ранее, на нескольких опухолевых моделях было показано, что внутримышечное и внутривенное введение ДНКазы I приводило к достоверному снижению количества поверхностных метастазов [23 – 25]. В современных исследованиях авторы применяют ДНКазу I в виде внутрибрюшинных инъекций. Так ДНКазы I при ежедневном внутрибрюшинном введении в дозах 1 – 50 ед.акт./мышь приводила к существенному сокращению количества метастазов у мышей с раком поджелудочной железы [277]. Также снижение количества метастазов было отмечено при внутрибрюшинном введении бычьей панкреатической ДНКазы I в дозе 75 ед.акт./мышь мышам с протоковой аденокарциномой и раком молочной железы [339,340]. В работе Park с соавторами было показано, что внутрибрюшинное введение наночастиц, покрытых рекомбинантной ДНКазой I (75 ед.акт./мышь), приводило к снижению количества метастазов на 80% в легких у мышей со спонтанным раком легких [327]. В нашей работе применение внутрибрюшинных инъекций тоже оказалось весьма эффективным, несмотря на то, что нами были использованы на порядок меньшие дозы по сравнению с исследованиями других авторов. Тем не менее, наиболее эффективным способом введения ДНКазы I оказались ежедневные (по схеме 5+2) внутримышечные инъекции ДНКазы I в дозе 5 ед.акт./мышь, которые примерно с той же эффективностью подавляли рост метастазов, что и внутрибрюшинные инъекции в дозах 50 – 75 ед.акт./мл. В нашей работе впервые было показано, что ДНКазы I при внутримышечном введении подавляет рост первичного опухолевого узла на моделях LLC и RLS₄₀.

Как было указано в Главе 1, часто развитие опухоли и образование метастазов коррелирует с патологическим повышением общей концентрации вДНК крови [55 – 58]. При этом концентрации вДНК может возрастать в 5 – 10 раз и превышать концентрацию

1000 нг/мл плазмы крови [59 – 61]. При этом повышенный уровень внДНК часто коррелирует со снижением ДНКазной активности плазмы крови [318]. В некоторых работах отмечалось, что уровень активности ДНКаз крови коррелировал с эффективностью лечения [319,320].

В нашей работе было показано, что снижение количества метастазов сопровождается снижением концентрации внДНК в кровотоке и повышением ДНКазной активности крови. По всей вероятности снижение уровня метастазирования опухолей LLC, B16 и RLS₄₀ под действием ДНКазы I в экспериментах *in vivo* может быть обусловлено неспецифической деградацией как циркулирующих в кровотоке опухолевых внДНК, так и внДНК, входящих в состав нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET).

На модели меланомы B16 было обнаружено, что ДНКазы I вызывает активацию иммунной системы. ДНКазы I представляет собой экзогенный фермент и поэтому может вызывать неспецифическую антигенную стимуляцию. Метастатическая модель меланомы характеризуется системным воспалительным ответом [341,342], а препараты с иммуностимулирующими свойствами обладают антиметастатическим и противоопухолевым действием [343]. На основании этих данных мы предполагаем, что иммуностимулирующее действие ДНКазы I может вносить некоторый вклад в наблюдаемый антиметастатический эффект.

Таким образом, эффективное антиметастатическое и противоопухолевое действие ДНКазы I, наблюдаемое на различных метастатических моделях *in vivo*, может определяться как ингибирующим действием ДНКазы I на молекулярном уровне (т.е. разрушением внДНК), так и действием на уровне иммунной системы организма.

3.3. Поиск молекулярных мишеней ДНКазы I среди вДНК сыворотки крови на модели карциномы легких Льюис

3.3.1 Дизайн эксперимента и приготовление ДНК-библиотек

В настоящее время накоплено много данных, указывающих на возможную роль вДНК в прогрессии опухоли, в связи с чем вДНК стали объектом исследования в качестве возможных опухолевых маркеров, а также мишеней противоопухолевой терапии. Несмотря на то, что существуют данные, подтверждающие антиметастатическую активность ДНКазы I на ряде опухолевых моделей, фактически нет работ, в которых был бы проведен поиск корреляций между этой активностью и вДНК, которые могут вносить вклад в диссеминацию опухоли.

Целью данного раздела работы был поиск молекулярных мишеней ДНКазы I среди опухоль-ассоциированных циркулирующих вДНК, а также выяснение механизма ее антиметастатического действия. Для идентификации возможных молекулярных мишеней ДНКазы I среди циркулирующих вДНК, необходимо было получить ДНК-библиотеки вДНК, полученных из крови здоровых животных, животных с LLC, получавших инъекции физиологического раствора и животных с LLC, получавших инъекции ДНКазы I, и провести секвенирование библиотек методом массового параллельного секвенирования. Схема эксперимента представлена на рисунке 16. Модель LLC была выбрана, потому что для нее была продемонстрирована высокая эффективность антиметастатического действия ДНКазы I, которая коррелировала со снижением патологически повышенного уровня вДНК и увеличением ДНКазной активности плазмы крови до уровня здоровых животных.

Мышам имплантировали клетки LLC в/м, и, начиная с 4-го дня после имплантации, животные получали в/м физ. раствор (контроль) или ДНКазу I. На 15 день эксперимента через один час после последней инъекции ДНКазы I кровь животных собирали, получали из нее сыворотку, объединяли по группам и выделяли из сыворотки вДНК (см. раздел 2.2.5.3).

Количество вДНК, выделенное из сыворотки экспериментальных животных, приведено в таблице 10. Измерение концентрации вДНК в образцах сыворотки показало, что у здоровых животных уровень вДНК составил 77 ± 2 нг/мл. Развитие опухоли приводило к повышению уровня вДНК до 162 ± 5 нг/мл. Лечение ДНКазой I приводило к снижению уровня вДНК до 110 ± 4 нг/мл, что близко к значениям, характерным для здоровых животных (таблица 10).

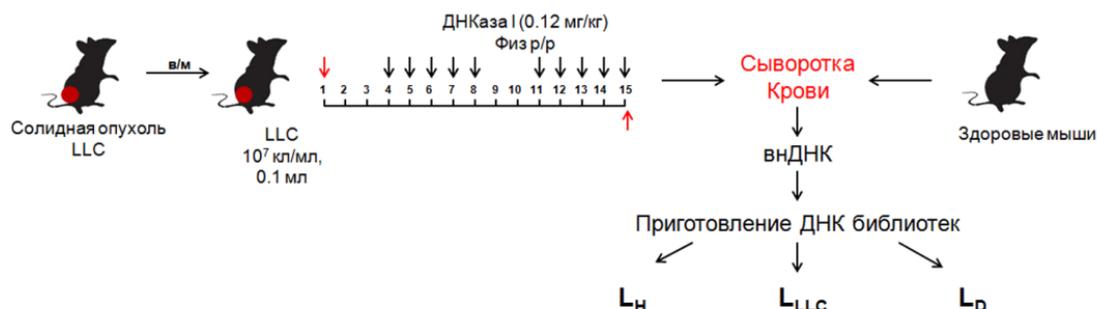


Рисунок 16. Схема эксперимента для получения библиотек вДНК. Клетки LLC (10^7 кл./мл, 0.1 мл) имплантировали в/м мышам С57В1. Начиная с 4-го дня после имплантации опухоли, животные получали в/м физ./раствор или ДНКазу I (0.12 мг/кг). Режим введения указан на схеме. На 15-й день через 1 час после инъекции ДНКазы I кровь собирали и получали сыворотку. ВДНК выделяли из сыворотки крови, готовили библиотеки ДНК и секвенировали на платформе SOLiD 5.500.

Таблица 10. Концентрация вДНК и ДНК-библиотек L_H , L_{LLC} и L_D на разных стадиях конструирования

Стадия конструирования ДНК-библиотеки	Тип библиотеки		
	L_H	L_{LLC}	L_D
Концентрация вДНК в сыворотке, нг/мл	77 ± 2	162 ± 5^a	$110 \pm 4^*$
Стартовое количество ДНК для конструирования библиотеки (этап I), нг	230 ± 15	244 ± 22	220 ± 17
Количество ДНК после лигирования (этап IV), нг	5.0 ± 1.0	3.7 ± 0.5	4.1 ± 0.6
Количество ДНК-библиотеки после амплификации (этап V), нг	31.8 ± 5	54.8 ± 10	10.2 ± 1.5

L_H – здоровые мыши; L_{LLC} – мыши с LLC, получавшие инъекции физ./раствора; L_D – мыши с LLC, получавшие инъекции ДНКазы I (0.12 мг/кг). Данные были статистически проанализированы с использованием Т-теста Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде MEAN \pm SE. ^a – достоверные отличия между группами здоровых мышей и мышей-опухоленосителей без лечения, $p < 0.05$, * – достоверные отличия между группами мышей-опухоленосителей без лечения и получавших лечение ДНКазой I (0.12 мг/кг), $p < 0.05$.

ДНК библиотеки готовили по модифицированному протоколу ABS SOLiD™ Fragment Library Construction Kit (см. раздел 2.2.8). ДНК-библиотеки конструировали из полученных вДНК по схеме, представленной на рисунке 17. Учитывая тот факт, что из образца вДНК одной мыши мы не могли получить достаточное количество материала для приготовления

библиотек, мы были вынуждены пулировать образцы (объединяли по 6 образцов каждой группы). Стартовое количество ДНК на этапе I составило 230 ± 15 нг, 244 ± 22 нг и 220 ± 17 нг, соответственно (таблица 10).

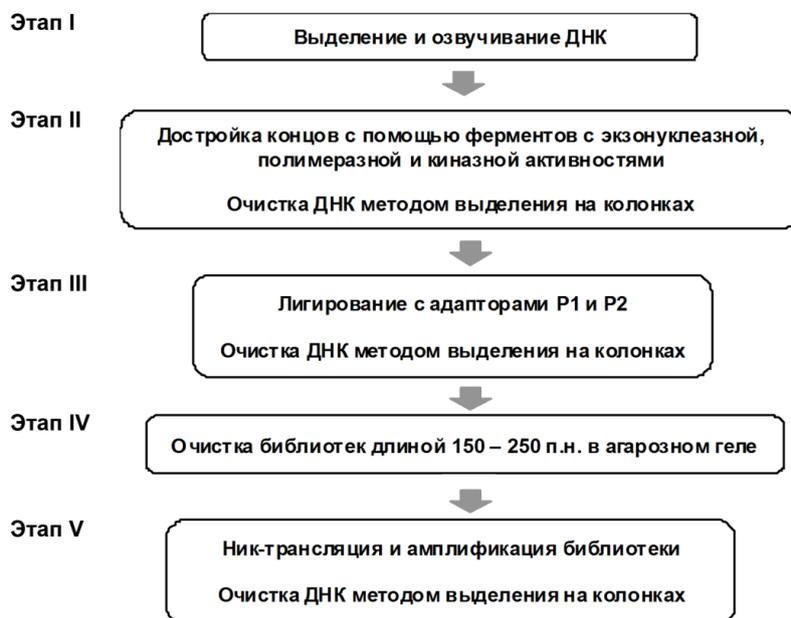


Рисунок 17. Схема конструирования ДНК-библиотек.

Техника секвенирования с наибольшей эффективностью позволяет секвенировать фрагменты длиной ~ 50 п.н. Однако для приготовления библиотек представляется наиболее рациональным работать с фрагментами длиной 100 – 250 п.н., поэтому первой модификацией протокола была фрагментация выделенной вДНК с помощью ультразвука, как описано в разделе 2.2.8.1. Длину фрагментов вДНК из разных групп животных оценивали с помощью электрофореза в микроканалах на приборе Agilent (рисунок 18).

Как видно из рисунка 18, профили вДНК до и после обработки ультразвуком схожи. Для необработанной ДНК характерно наличие фрагментов длиной 400 – 10000 п.н. и фрагментов длиной 150 – 200 п.н. в концентрации 2 – 3 раза большей по сравнению с концентрацией длинных фрагментов, тогда как фрагменты короче 150 п.н. практически отсутствуют (возможно, в связи с их отрицательной селекцией при выделении колоночным методом). В профиле обработанной ультразвуком ДНК практически отсутствуют фрагменты длиннее 250 п.н., однако присутствуют короткие фрагменты (до 150 п.н.). По данным электрофореза можно говорить о том, что в результате ультразвукового фрагментирования высокомолекулярная фракция ДНК длиной 400 – 10000 п.н. переходит в низкомолекулярную фракцию длиной 150 – 200 п.н. Концентрация выделенной ДНК-библиотеки представлена в

таблице 10. Выход составил 5.0 ± 1.0 для библиотеки из вДНК сыворотки крови здоровых мышей (L_H), 3.7 ± 0.5 для библиотеки из сыворотки крови мышей с LLC (L_{LLC}), 4.1 ± 0.6 для библиотеки из вДНК сыворотки крови мышей с LLC, получавших лечение ДНКазой I (L_D) (таблица 10).

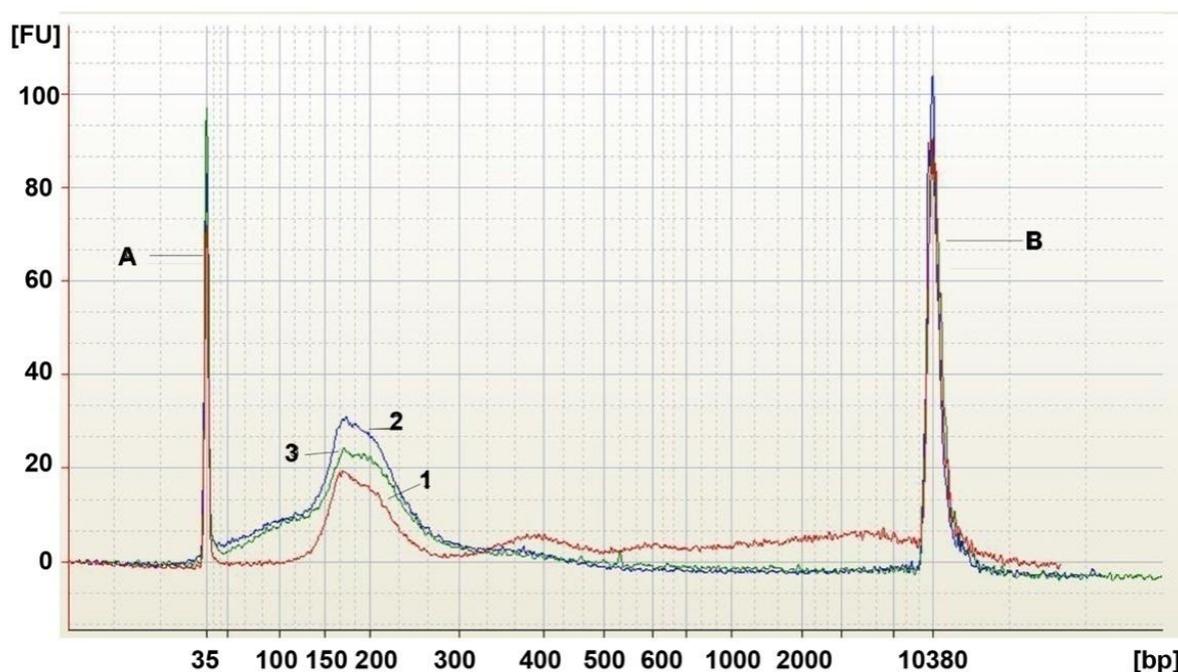


Рисунок 18. Сравнение профилей вДНК сыворотки крови мышей с LLC, получавших физ./раствор в/м до и после обработки ультразвуком. 1 – вДНК без обработки ультразвуком, 2 – вДНК, обработанная ультразвуком в течение 155 сек при коэффициенте мощности 20%, 3 – вДНК, обработанная ультразвуком в течение 330 сек при коэффициенте мощности 10%. А – ДНК-маркер длиной 35 п.н., В – ДНК-маркер длиной 10380 п.н.

На этапах II и III концы молекул озвученной вДНК достраивали и лигировали с помощью двуцепочечных адапторов P1 и P2, как описано в разделе 2.2.8, после чего анализировали в 1.5% LE-агарозе (рисунок 19, А). Участок геля в области 150 – 250 п.н. соответствовал фрагментам ДНК-библиотеки с лигированными адапторами. Полоса с высоким содержанием ДНК соответствует по подвижности избытку непрореагировавших адапторов. Далее ДНК-библиотеку амплифицировали методом ПЦР с использованием праймеров, комплементарных последовательностям адапторов. Для этого проводили ник-трансляцию, которая необходима для репарации однонитевых разрывов, оставшихся после процедуры лигирования двуцепочечных адапторов, и ПЦР. Второй модификацией протокола конструирования ДНК библиотек было снижение количества циклов ПЦР до шести, что позволило, с одной стороны, избежать перепредставленности фрагментов, а с другой стороны, получить достаточное количество материала для запуска секвенирования. ДНК-библиотеку

выделяли из реакционной смеси на колонках Qiagen. Выход составил 31.8 ± 5 нг для библиотеки L_H , 54.8 ± 10 нг для библиотеки L_{LLC} и 10.2 ± 1.5 нг для библиотеки L_D (таблица 10).

Визуализацию ДНК-библиотек после амплификации проводили с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле (рисунок 19, Б). Видны четкие полосы ДНК-библиотеки в районе 200 п.н., которые соответствуют фрагментам длиной 150 п.н., лигированных с адапторами общей длиной 60 п.н.

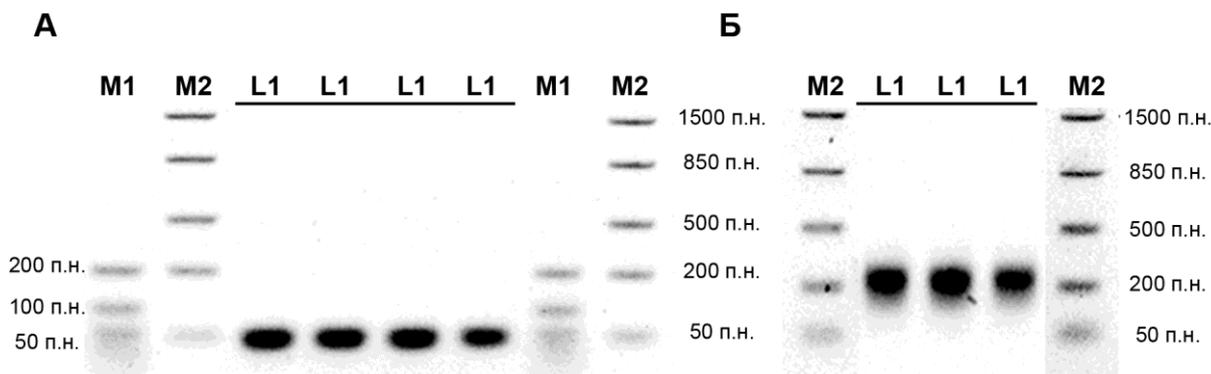


Рисунок 19. Разделение фрагментов ДНК с помощью электрофореза 1.5%-ном LE-агарозном геле. (А). Разделение фрагментов после лигирования с адапторами (Этап III). (Б). Разделение фрагментов ДНК после ПЦР. L_1 – библиотека, приготовленная из вДНК сыворотки крови мышей с LLC (Этап V). M1 – ДНК-маркер Fast Ruler™ Ultra Low Range (ready-to-use), M2 – ДНК-маркер FastRuler™ Low Range (ready-to-use).

3.3.3 Получение микрочастиц с иммобилизованными амплифицированными фрагментами ДНК-библиотек с помощью эмульсионной ПЦР.

С помощью эмульсионной ПЦР получали микрочастицы с иммобилизованными амплифицированными фрагментами ДНК-библиотек и проводили обогащение этих микрочастиц. Для этого эмульсию разрушали, центрифугировали на глицериновой «подушке» с использованием обогащающих микрочастиц, как описано в разделе 2.2.8.4, и подвергали денатурации для разделения комплексов. Примерная концентрация микрочастиц после обогащения составляла 750 тыс. мкч./мкл.

Далее проводили модификацию 3'-концов амплифицированных ДНК-библиотек, иммобилизованных на магнитные микрочастицы, с помощью терминальной трансферазы, (раздел 2.2.8.4). В результате были получены библиотеки L_H – вДНК сыворотки крови здоровых мышей; L_{LLC} – вДНК сыворотки крови животных с LLC, получавших инъекции физ./раствора; L_D – вДНК сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I.

Для библиотеки L_H были приготовлены два технических репликата (L_{H1} и L_{H2}). Библиотеки анализировали методом массового параллельного секвенирования на платформе Solid 5.500.

3.3.3. Анализ данных секвенирования

Для каждой библиотеки вДНК было получено 55 – 67 млн прочтений (таблица 11). Данные секвенирования были обработаны с помощью инструментария Trimmomatic 0.32 А.М. Курильщикова (ЛММ, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) для исключения адаптерных последовательностей и последовательностей с низким качеством. Далее качество последовательностей оценивали с помощью программного обеспечения FastQC, и картировали полученные последовательности на референсный геном *Mus musculus* (MM9, Ensemble release 67) с помощью программного обеспечения Bowtie version 1. Степень картирования варьировала от 6.95% до 8.33%, что соответствует количеству прочтений от 3.8 до 5.6 млн.

Поскольку мишенями для ДНКазы I могли быть любые ДНК в кровотоке, при анализе библиотек обращали внимание на перераспределение между фрагментами вДНК в крови здоровых мышей, мышей с LLC и мышей с LLC, получавших лечение ДНКазой I. Для анализа были выбраны как фрагменты, обладающие высокой стабильностью (тандемные повторы, расположенные в гетерохроматиновых регионах), так и низкой стабильностью (тандемные повторы эухроматина и фрагменты онкогенов).

Таблица 11. Данные первичной обработки данных секвенирования

Параметр	L_{LLC}	L_D	L_H	
			L_{H1}	L_{H2}
Общее количество последовательностей	66 294 365	66 294 365	54 759 466	55 499 574
Количество картированных последовательностей	5 522 321	4 158 677	4 141 543	3 857 220
Процент картирования	8.33%	7.41%	7.56%	6.95%

3.3.3.1. GC-состав вДНК

Данные первичной обработки FastQC показали, что по GC-составу профиль вДНК в крови здоровых животных приближен к профилю геномной ДНК. ВДНК в библиотеке L_{LLC} характеризовалась присутствием 3×10^6 GC-обедненных последовательностей ($0 \pm 2\%$ от общего содержания), что в 3 – 6 раз больше, чем в библиотеке L_H . Введение ДНКазы I (L_D) приводило к снижению содержания GC-обедненных последовательностей до 1.0×10^6

последовательностей, близких к содержанию этих последовательностей в вДНК здоровых мышей ($0.5 \pm 0.1 \times 10^6$, L_H).

3.3.3.2. Представленность тандемных повторов в пуле вДНК

Наиболее яркие различия между библиотеками L_{LLC} , L_D и L_H наблюдались для тандемных повторов. ВДНК мышей с LLC характеризовалась присутствием большего количества тандемных повторов по сравнению с вДНК здоровых мышей (таблица 12). В результате сравнительного анализа 980 типов тандемных повторов, представленных в геноме *Mus musculus*, для дальнейшего анализа были отобраны 250 типов тандемных повторов с представленностью, по меньшей мере, одна последовательность на миллион последовательностей библиотеки (RPM) и характеризующихся достоверными различиями между группами (таблица 12, рисунок 20)

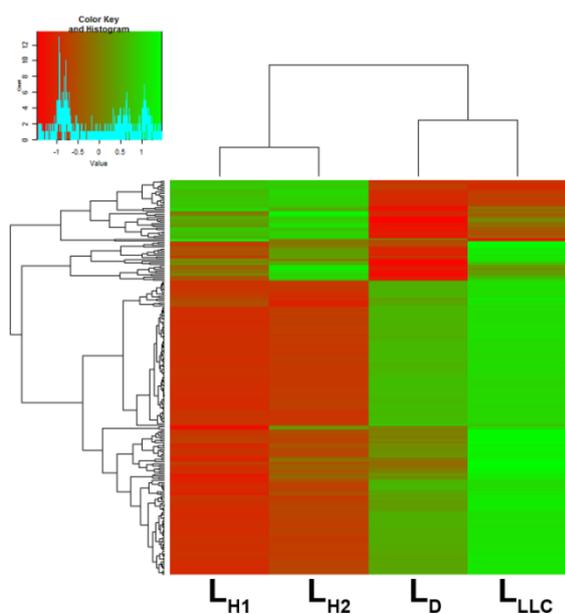


Рисунок 20. Тепловая карта представленности тандемных повторов в ДНК-библиотеках L_{H1} , L_{H2} , L_{LLC} и L_D . Повышение и снижение представленности уровня тандемных повторов показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Дендрограммы были получены с помощью кластеризации тандемных повторов или образцов с использованием Евклидовых расстояний между нормированными логарифмическими величинами RPM (ColourKey), соответственно. RPM – количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке.

Было обнаружено, что при развитии опухоли состав вДНК характеризовался более высокой представленностью 204 типов тандемных повторов по сравнению со здоровыми мышами (библиотеки L_{LLC} и L_{H1} , L_{H2}). При этом представленность 158 типов тандемных повторов в L_{LLC} была в 1.5 – 2 раза выше, а представленность 46 типов повторов была уже в 2.5 ± 3 раза выше, по сравнению с L_H (таблица 12, рисунок 20). Лечение ДНКазой I приводило к уменьшению количества тандемных повторов, которые были перепредставлены у мышей с LLC: наблюдалось снижение в 1.5 раза количества тандемных повторов в L_D по сравнению с L_{LLC} . В 30% случаев снижение количества повторов в L_D достигало уровня L_H (Таблица 12, рисунок 20).

Таблица 12. Представленность 250 типов тандемных повторов в внднк-библиотеках

	Число типов тандемных повторов	Представленность RPM ¹			
		L _{LLC}	L _D	L _H	
				L _{H1}	L _{H2}
L _{LLC} > L _H : 204	158*	53193	43612	34469	36318
	46 [#]	10221	8341	3635	3859
L _{LLC} < L _H : 46	39 [□]	17827	15726	28777	30996
	7 [£]	431	504	1502	1489
Всего	250	81674	68186	38104	40176

* – Типы повторов, представленность которых в 1.5 – 2 раза повышалась при развитии LLC и снижалась после лечения ДНКазой I;

– типы повторов, представленность которых в 2.5 – 3 раза повышалась при развитии LLC и снижалась после лечения ДНКазой I;

□ – типы повторов, представленность которых в 1.5 – 2 раза снижалась при развитии LLC и далее снижалась после лечения ДНКазой I;

£ – типы повторов, представленность которых в 3 раза снижалась при развитии LLC и повышалась после лечения ДНКазой I;

¹RPM – количество последовательностей на миллион последовательностей библиотеки.

Представленность 46 типов тандемных повторов в L_{LLC} была в 1.5 ± 2 раза ниже, чем в L_H (L_{LLC} < L_H, таблица 12). Лечение ДНКазой I приводило к снижению численности 39 типов повторов на 10 – 30% и увеличению численности 7 типов повторов на 20 – 50% (таблица 12, рисунок 20).

Внднк мышей с LLC характеризовалась более высокой представленностью повторов, относящихся к 11 крупным семействам, по сравнению со здоровыми мышами (таблица 12). После обработки ДНКазой I мы наблюдали уменьшение представленности этих повторов на 15 – 25% (таблица 12). Необходимо добавить, что введение ДНКазы I приводило к тому, что количество повторов, принадлежащих семействам B, IAP, LTRIS, ORR и RSINE, достигало уровня здоровых мышей (L_D, L_H, таблица 13).

Иные тенденции наблюдались в случае повторов, принадлежащих семействам Lx, MMERV и RMER. Представленность 14, 5 и 22 типов повторов (Lx, MMERV и RMER соответственно) увеличивалась в 1.5 ± 2 раза при развитии LLC (таблица 13), и после введения ДНКазы I наблюдалось снижение их представленности на 30 – 50% по сравнению с представленностью тех же повторов у здоровых мышей (таблица 13). Однако при развитии LLC представленность 2, 2 и 7 типов повторов (Lx, MMERV и RMER), соответственно, была ниже, чем у здоровых мышей (таблица 13), и дополнительно уменьшалась после лечения ДНКазой I (таблица 13). Представленность же большинства типов повторов, относящихся к подсемействам ERVB, L1 и RLTR, увеличивалась при развитии LLC и уменьшалась после лечения ДНКазой I до уровня, сопоставимого с уровнем здоровых мышей (таблица 13).

Таблица 13. Представленность тандемных повторов, принадлежащих 11 основным семействам в внДНК библиотеках

Семейства	Число типов тандемных повторов	Представленность RPM ¹			
		L _{LLC}	L _D	L _H	
				L _{H1}	L _{H2}
B	19*	7548	6156	3326	3541
ERVВ	11*	930	770	693	688
IAP	24*	6682	5583	3104	3272
L1	19*	27508	23523	23984	25066
LTRIS	5*	373	308	177	192
Lx	14*	3471	2861	2076	2222
	2 [#]	51	46	55	59
MERV	5*	1461	1247	995	1032
MMERV	5*	812	688	451	482
	2 [#]	80	72	98	103
ORR	14*	2158	1785	1237	1317
RLTR	52*	10201	7603	5877	6380
RMER	22*	895	1119	667	753
	7 [□]	1518	1934	1916	2713
RSINE	3*	201	178	132	123

* – Типы повторов, представленность которых в 1.5 – 2 раза повышалась при развитии LLC и снижалась после лечения ДНКазой I;

– типы повторов, представленность которых в 2.5 – 3 раза повышалась при развитии LLC и снижалась после лечения ДНКазой I;

□ – типы повторов, представленность которых в 1.5 – 2 раза снижалась при развитии LLC и далее снижалась после лечения ДНКазой I;

‡ – типы повторов, представленность которых в 3 раза снижалась при развитии LLC и повышалась после лечения ДНКазой I;

¹RPM – количество последовательностей на миллион последовательностей библиотеки.

Особое внимание было уделено 19 типам повторов В-семейства и его подсемействам В1, В2, В3 и В4, имеющих высокую гомологию с ALU-повторами человека (SINE элементы) (рисунок 21). При развитии LLC представленность этих повторов в составе внДНК увеличивалась в два раза по сравнению с внДНК здоровых мышей (7.5×10^3 RPM в L_{LLC} и 3.4×10^3 RPM в L_H), а введение ДНКазы I приводило к снижению на 20% (до 6.1×10^3 RPM в L_D). Для подсемейства В1, имеющего максимальную гомологию с ALU повторами, наблюдалось двукратное их повышение в L_{LLC} по сравнению здоровыми животными (4×10^3 RPM в L_{LLC} и 2×10^3 RPM в L_H) и снижение в L_D до уровня здоровых животных (2×10^3 RPM в L_D) (таблица 13). Аналогичное воздействие ДНКазы I оказала на перераспределение фрагментов семейства L1 и других повторов, относящихся к LINE элементам.

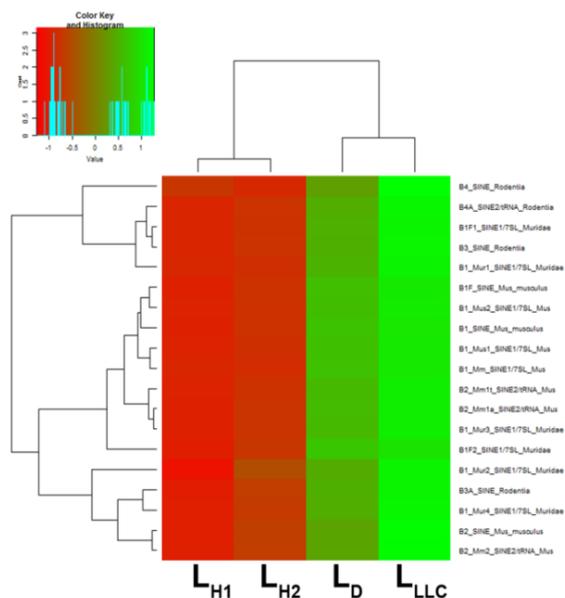


Рисунок 21. Тепловая карта представленности тандемных повторов В-семейства в ДНК-библиотеках L_{H1}, L_{H2}, L_{LLC} и L_D. Повышение и снижение представленности уровня тандемных повторов показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Дендрограммы были получены с помощью кластеризации тандемных повторов или образцов с использованием Евклидовых расстояний между нормированными логарифмическими величинами RPM (ColourKey), соответственно. RPM – количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке.

3.3.3.3. Представленность фрагментов онкогенов в пуле вДНК

Чтобы найти возможные молекулярные мишени ДНКазы I среди онкогенов, был проведен анализ генов *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *N-ras* и *Jun*, которые, как известно, являются маркерами канцерогенеза [292,344 – 347] (таблица 14, рисунок 22). В пуле вДНК здоровых мышей количество фрагментов, кодирующих эти гены, было низким: общее количество не превышало 6.9 – 10.8 RPM (L_{H1}, таблица 14). Было обнаружено, что количество фрагментов гена *Myc* в крови здоровых животных в четыре-пять раз превышало количество фрагментов других онкогенов (L_H, таблица 14). При развитии LLC количество фрагментов онкогенов повышалось в 15 раз по сравнению со здоровыми животными (L_{LLC}, L_H, таблица 14), и 90% всех фрагментов приходилось на последовательность гена *Myc*. Таким образом, при развитии опухоли количество специфичных для *Myc* фрагментов возросло в 15 раз, а количество специфичных для *Hmga2*, *Fos* и *Jun* фрагментов увеличилось в два-три раза по сравнению со здоровыми животными, тогда как количество специфичных для *N-ras* фрагментов не изменялось (таблица 14). После введения ДНКазы I наблюдалось снижение количества фрагментов *Myc*, *Hmga2* и *Jun* в 1.5 – 2 раза. Уровень специфичных для *Hmga2* фрагментов падал до уровня здоровых животных. Содержание *Fos*-специфичных фрагментов увеличивалось, но статистически недостоверно (таблица 14).

Таблица 14. Представленность фрагментов, онкогенов *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *N-ras* и *Jun* в ДНК библиотеках

Онкогены	Представленность, RPM ¹			
	L _{LLC}	L _D	L _H	
			L _{H1}	L _{H2}
<i>Hmga2</i>	1.90	1.35	1.27	0.82
<i>Fos</i>	2.74	2.93	0.95	0.84
<i>Myc</i>	86.14	73.38	6.40	3.62
<i>N-ras</i>	1.14	1.39	1.25	0.97
<i>Jun</i>	2.16	1.39	0.90	0.62
Общее	94.08	81.00	10.78	6.87

¹RPM – количество последовательностей на миллион последовательностей библиотеки.

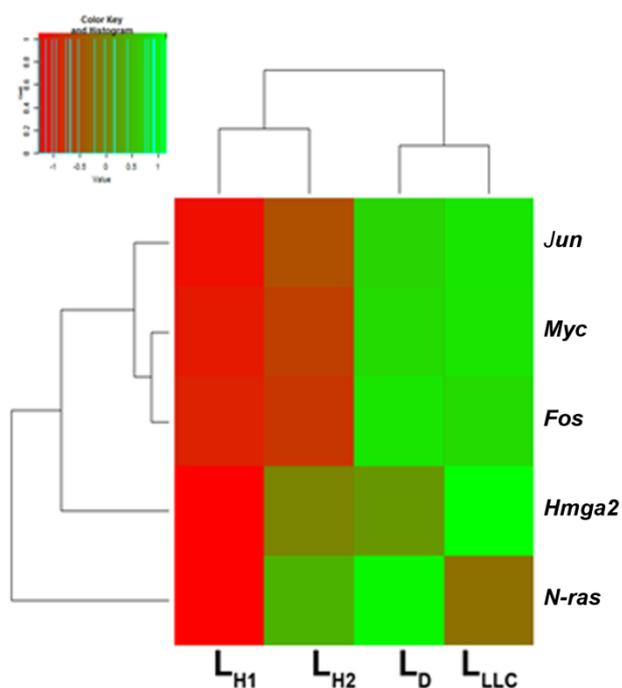


Рисунок 22. Тепловая карта представленности фрагментов, кодирующих онкогены *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *N-ras* и *Jun* в ДНК-библиотеках L_{H1}, L_{H2}, L_{LLC} и L_D. Повышение и снижение представленности уровня тандемных повторов показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Дендрограммы были получены с помощью кластеризации тандемных повторов или образцов с использованием Евклидовых расстояний между нормированными логарифмическими величинами RPM (ColourKey), соответственно. RPM – количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке.

Валидацию количества фрагментов генов в профиле вДНК сыворотки крови проводили с использованием технологии qPCR. Валидация результатов секвенирования была проведена на примере гена *Myc*. Было исследовано по шесть образцов сыворотки крови из каждой группы мышей, вДНК которых была использована для секвенирования. Как видно из представленных данных при прогрессии LLC наблюдается повышение уровня фрагментов гена *Myc* в вДНК сыворотки крови (рисунок 23). Введение мышам с LLC ДНКазы I приводило к трехкратному снижению количества фрагментов гена *Myc* (рисунок 23), что коррелирует с данными секвенирования.

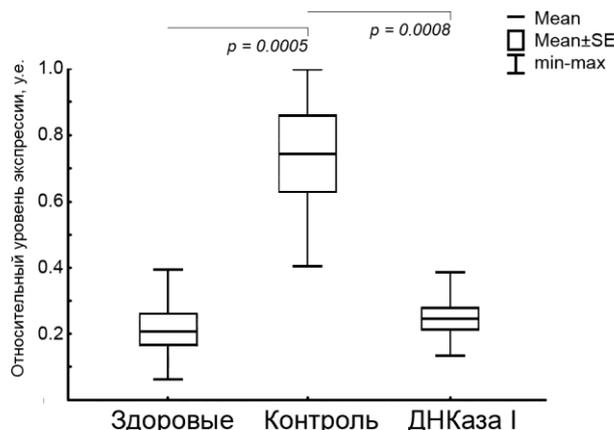


Рисунок 23. Уровень *Myc*-специфических фрагментов в пуле вДНК сыворотки крови мышечной с LLC, получавших инъекции физ./раствора (контроль) и ДНКазы I (данные qПЦР). Уровень *Myc* определяли во вДНК, на основе которой конструировали библиотеки L_H , L_{LLC} и L_D . Уровень *Myc* нормализовали на уровень β -актина. Данные статистически анализировали с помощью дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Фишера. Данные представлены как $MEAN \pm SE$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном разделе работы было исследовано влияние ДНКазы I на профиль вДНК в сыворотке крови мышечной с LLC. Одним из важных результатов было обнаружение повышения не только уровня вДНК при прогрессировании опухоли, но и повышения представленности среди вДНК определенных специфических фрагментов – около 200 типов tandemных повторов (последовательности с высокой стабильностью) и фрагментов онкогенов (*Hmga2*, *Fos*, *Myc* и *Jun*). Полученные результаты позволяют предложить новые потенциальные онкомаркеры, которые в перспективе при экстраполяции на человека могут применяться как онкомаркеры рака легкого.

При развитии LLC также было отмечено увеличение содержания GC-обедненных последовательностей среди вДНК, которые являются нестабильными и чувствительными к деградации дезоксирибонуклеазами крови, что может служить дополнительным свидетельством падения ДНКазной активности крови. Снижение представленности GC-обедненных последовательностей до уровня здоровых мышечных, наблюдаемое после лечения ДНКазой I, может являться следствием повышения ДНКазной активности крови.

Фрагменты генов *RAS*, *HMGA2*, *JUN*, *MYC* и других нередко обнаруживаются в пуле вДНК онкологических больных. Тем не менее, увеличение общего количества фрагментов онкогенов в пуле вДНК было отмечено в относительно небольшом количестве работ. Так, в крови пациентов с нейробластомой было обнаружено повышенное содержание общего количества фрагментов *N-MYC* [106], а у 50% пациенток с раком молочной железы было обнаружено увеличенное содержание фрагментов гена *HER-2* в пуле вДНК [129]. В нашей работе было обнаружено, что развитие LLC сопровождается увеличением количества вДНК-

фрагментов всех выбранных для анализа онкогенов, кроме *N-ras* (представленность которого увеличивалась недостоверно). Принимая во внимание то, что уровень *Jun*- и *Fos*-специфических фрагментов в пуле вДНК мышей с LLC повышался в 2.5 – 3 раза по сравнению со здоровыми мышами, эти гены могут быть предложены в качестве возможных маркеров злокачественных заболеваний, в частности, для выявления рака легких.

Наиболее интересным результатом можно назвать тот факт, что внутримышечное введение мышам с LLC ДНКазы I вызывает снижение уровня повторов В-подсемейства, имеющих гомологию с повторами ALU человека, до уровня здоровых животных, а также повторов семейств L1 и Lx, имеющих гомологию с повторами LINE1 человека, и эти события коррелируют со снижением уровня метастазирования и замедлением роста первичного опухолевого узла.

Накоплены некоторые данные о роли SINE и LINE элементов в канцерогенезе [348 – 350]. Микровезикулы опухолевого происхождения нередко обогащены фрагментами ДНК, содержащими инсерции LINE-1 и Alu [252]. Показано, что образование опухоли может быть инициировано посредством активации онкогена путем ретротранспозиции, либо аналогичной инактивации онкосупрессора [165,166]. Так, развитие базально-клеточной карциномы и рака молочной железы связано со вставкой полноразмерных SVA (человеческих ретротранспозонов SINE-VNTR-Alu) в интрон 8 гена каспазы 8 (CASP8) [351]. Избыточное количество фрагментов Alu-повторов в пуле вДНК встречается у абсолютного большинства пациентов с онкологическими заболеваниями, и на сегодняшний день qPCR анализ Alu-повторов используют для подсчета количества опухолеспецифической вДНК [352]. Кроме того, было показано, что развитие некоторых типов рака сопровождается увеличением содержания элементов и LINE элементов (в частности, LINE1) в пуле вДНК [58,169,171,353].

Повышение содержания тандемных повторов, которые являются участками повышенной стабильности, при прогрессировании LLC может быть следствием пониженной активности ДНКаз крови. Кроме того, как было указано выше, появление подобных фрагментов среди вДНК может являться следствием процессов обратной транскрипции в геноме клеток первичного опухолевого узла, которые после гибели опухолевой клетки выбрасываются в кровотоки.

3.4. Исследование роли SINE и LINE элементов как возможных маркеров опухолевой прогрессии и их связи с метастазированием

3.4.1. Анализ представленности повторов SINE и LINE элементов в крови мышей с различными типами опухолей

Роль SINE и LINE элементов в канцерогенезе и метастазировании до конца не раскрыта. В предыдущей части работы при анализе профилей вДНК мышей с LLC методом массового параллельного секвенирования было продемонстрировано повышение представленности многих типов тандемных повторов, включая LINE и SINE элементы. Чтобы оценить содержание фрагментов повторов SINE и LINE элементов в крови мышей с разными типами метастатических опухолями и выявить корреляцию с распространением метастазов, был проведен ПЦР-анализ SINE и LINE в пуле вДНК, выделенных из крови здоровых мышей и мышей с опухолями, получавших инъекции физраствора или ДНКазы I.

Для анализа были выбраны четыре SINE и четыре LINE элемента, хорошо представленные в пуле вДНК по данным секвенирования, уровень которых значительно увеличивался при прогрессии LLC и падал после лечения ДНКазой I. Четыре типа повторов принадлежат подсемейству B1 (B1_Mm, B1_mur4, B1_mus1 и B1_mus2), три типа повторов принадлежат подсемейству L1 (L1_mus 1, L1Md_F и L1Md_Gf), один тип принадлежит подсемейству Lx (Lx2_mus 1).

Для того чтобы выяснить влияние ДНКазы I на представленность тандемных повторов, относящихся к SINE и LINE элементам, мышам были имплантированы клетки опухолей B16, LLC и RLS₄₀, как описано в Материалах и методах. Лечение ДНКазой I проводилось согласно схемам, описанным в разделе 3.2.3 и 3.2.4 (рисунки 11 и 13). Уровни фрагментов SINE и LINE в образцах вДНК, выделенных из крови мышей разных групп, определяли с помощью ПЦР в реальном времени.

В случае анализа данных ПЦР, как правило, для расчета количества ПЦР-ампликонов принято нормализовать значение порогового цикла реакции (C_t) образца к значению порогового цикла референсного гена, в качестве которого обычно используют ген домашнего хозяйства с представленностью одна копия на геном [354]. Однако мы обнаружили, что значение C_t тандемных повторов SINE и LINE значительно превышает C_t обычно используемых референсных генов (Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и β -актина), что делает некорректной подобную нормализацию. В частности для разных повторов значение C_t

колеблется в пределах 20 – 25 цикла, тогда как C_t референсных генов составляет 38 и более. В связи с этим, был использован другой способ нормализации уровня ПЦР-фрагментов, как и в работах других исследователей [355 – 358].

Для расчета количества фрагментов использовали метод ΔC_t с использованием стандартных кривых. Представленности фрагментов (ΔC_t) были рассчитаны автоматически относительно значений одного и того же образца вДНК здоровых мышей и выражены в условных единицах (а.у.). Нормализованные уровни повторов SINE и LINE в образцах вДНК здоровых мышей, мышей с опухолями без лечения (контроль) и получавших лечение ДНКазой I приведены на рисунках 24 и 25.

Как видно из представленных данных, содержание повторов SINE и LINE среди вДНК здоровых мышей было очень низким и несколько варьировало в зависимости от линии мыши. В крови здоровых мышей C57Bl/6J уровень этих элементов составлял 0.05 – 0.08 а.у. (рисунки 24 и 25, панели B16 и LLC). Для вДНК мышей CBA был характерен более низкий уровень всех типов SINE (0.012 – 0.017 а.у.) и двух типов LINE (0.015 а.у. для L1_mus1 и Lx_mus1), тогда как два других типа LINE (L1Md_F и L1Md_Gf) были представлены в больших количествах, и их уровень был ближе к среднему уровню здоровых мышей C57Bl/6J (0.025 а.у.) (рисунки 24 и 25, панель RLS₄₀).

Развитие опухолей B16 и LLC сопровождалось значительным увеличением представленности SINE и LINE. В случае опухоли B16 уровень фрагментов SINE увеличивался в 3 – 4 раза (рисунок 24, панель B16), а уровень элементов LINE увеличивался в 3 – 3.5 раза (рисунок 25, панель B16).

Аналогичным образом, развитие LLC приводило к увеличению уровня элементов SINE в 3.5 – 5 раз (Рисунок 24, панель LLC), в то время как уровень LINE увеличивался еще более значительно по сравнению с SINE: представленность LINE увеличивалась от 3 раз (для L1_mus1 и Lx_mus1) до 8 раз (для L1Md_F) и 12 раз (для L1Md_Gf) (рисунок 25, панель LLC). Развитие RLS₄₀ также сопровождалось повышением уровня элементов SINE и LINE в 2 раза, тем не менее, уровень этих элементов оставался довольно низким и достигал максимума в 0.4 а.у. для SINE элементов (рисунки 24 и 25, панель RLS₄₀).

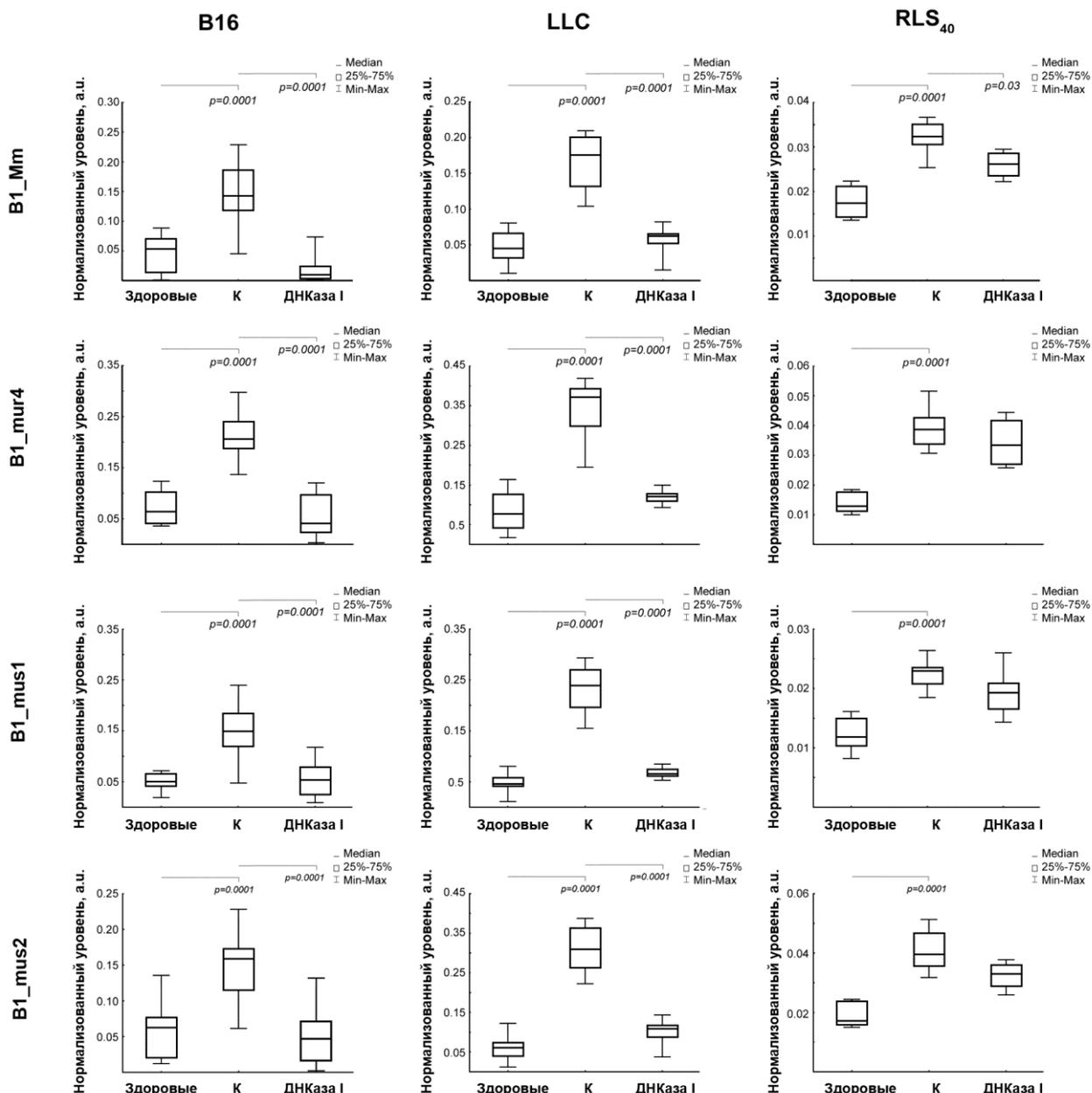


Рисунок 24. Уровень SINE элементов B1_Mm, B1_mur4, B1_mus1 и B1_mus2 в пуле вДНК сыворотки крови здоровых мышей, мышей с B16, LLC или RLS₄₀ без и после лечения ДНКазой I. Представленность циркулирующих SINE элементов была проанализирована с помощью qPCR. Представленность фрагментов приведена в виде условных единиц (a.u., arbitrary unit). Данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены как медиана. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Здоровые – мыши без опухолей; K – мыши с опухолями, получавшие инъекции физиологического раствора; ДНКаза I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 мг/кг).

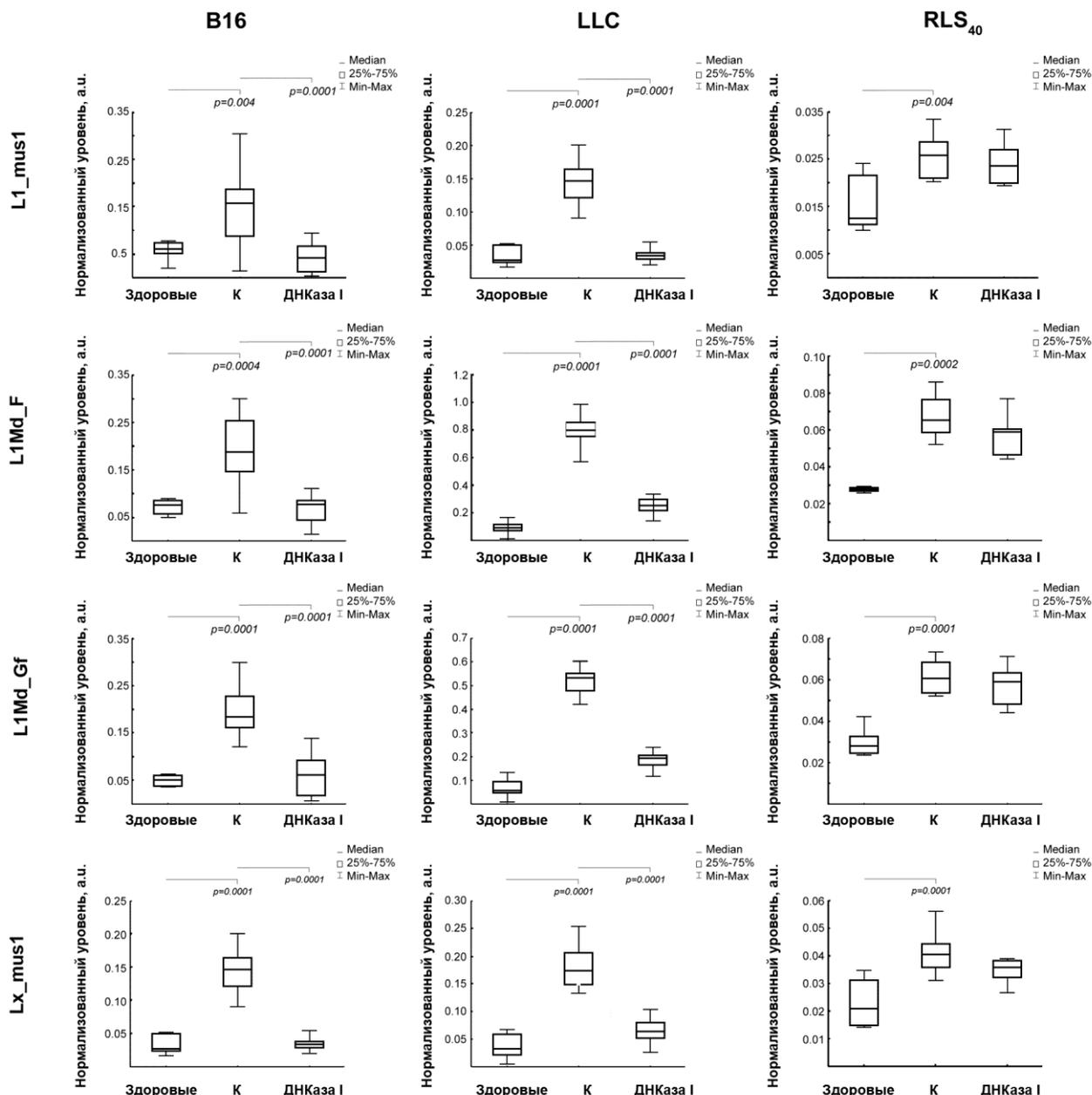


Рисунок 25. Уровень LINE элементов L1_mus1, L1Md_F, L1Md_Gf и Lx_mus1 в пуле вДНК сыворотки крови здоровых мышей, мышей с B16, LLC или RLS₄₀ без и после лечения ДНКазой I. Представленность циркулирующих SINE элементов была проанализирована с помощью qPCR. Представленность фрагментов приведена в виде условных единиц (a.u., arbitrary unit). Данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены как медиана. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Здоровые – мыши без опухолей; K – мыши с опухолями, получавшие инъекции физиологического раствора; ДНКаза I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 мг/кг).

Лечение ДНКазой I мышей с опухолями B16 и LLC приводило к снижению уровней повторов SINE и LINE до уровня, близкого к уровню здоровых животных (рисунки 24 и 25). В случае мышей с RLS₄₀, мы наблюдали лишь тенденцию к уменьшению представленности SINE и LINE, но эти изменения были в основном статистически незначимыми, за исключением B1_Mm (рисунки 24 и 25, панель RLS₄₀).

Поскольку исследования уровня SINE и LINE элементов были проведены с использованием сыворотки крови животных, получавших ДНКазу I лишь в дозе 0.12 мг/кг, и на модели RLS₄₀ не наблюдалось снижение уровня элементов для этой дозы ДНКазы I, представлялось интересным оценить влияние дозы ДНКазы I на изменение уровней SINE и LINE элементов. Для анализа использовали сыворотки крови, полученные в эксперименте, схема которого приведена на рисунке 13. Данные qPCR приведены на рисунке 26.

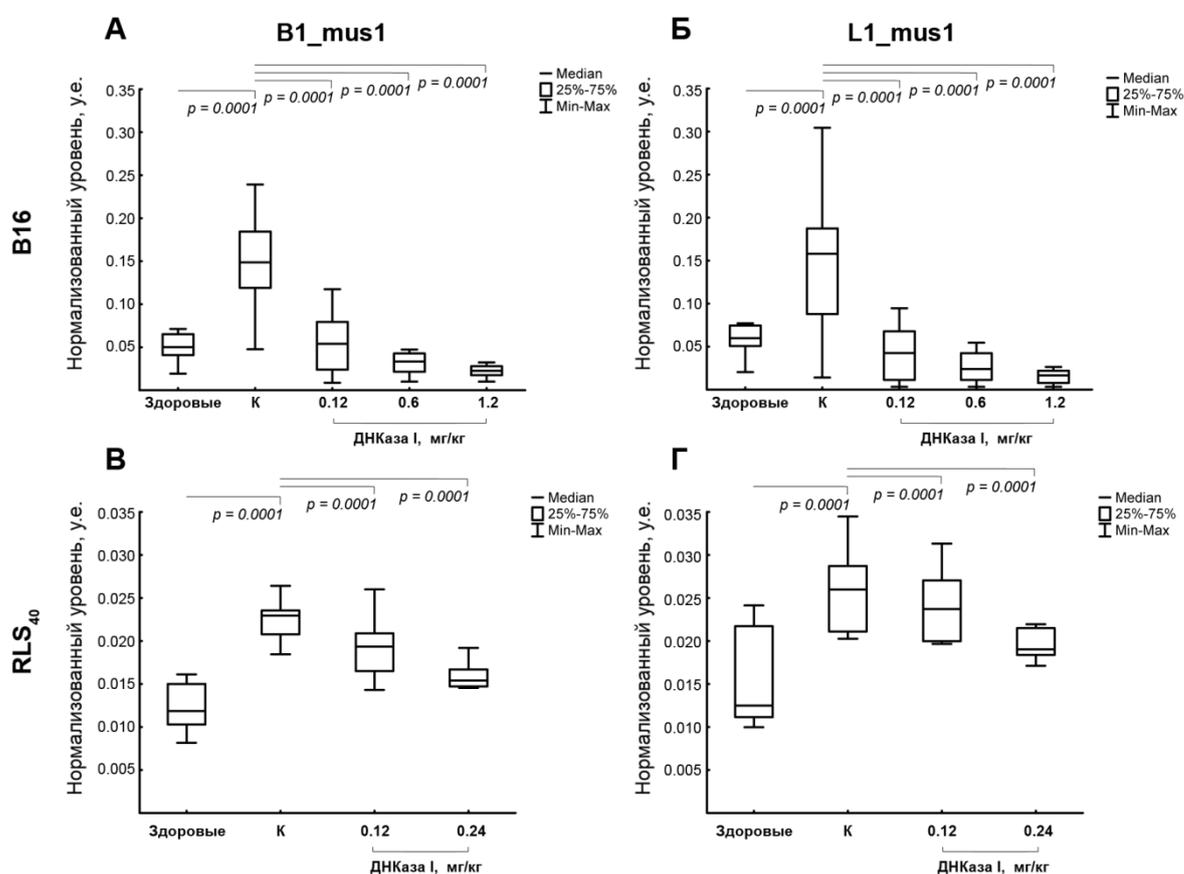


Рисунок 26. Эффект дозы ДНКазы I, вводимой мышам-опухоленосителям, на уровень SINE/LINE элементов в сыворотке крови мышей с B16 и RLS₄₀. (A) и (B) Уровень циркулирующих элементов B1_mus1 и L1_mus1 для модели B16. (V) и (Г) Уровень циркулирующих элементов B1_mus1 и L1_mus1 для модели RLS₄₀. Представленность циркулирующих элементов B1_mus1 и L1_mus1 определяли с помощью qPCR. Представленность фрагментов приведена в виде условных единиц (a.u., arbitrary unit). Статистическая обработка данных проведена с помощью однофакторного дисперсионного

анализа с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены как медиана. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Здоровые – мыши без опухолей; К – мыши с опухолями, получавшие физ. раствор; ДНКазы I – мыши с опухолями, получавшие ДНКазу I в дозах 0.12 – 1.2 мг/кг.

Как видно из представленных данных, развитие B16 приводило к 3 – 4-кратному увеличению представленности SINE и 3 – 5-кратному увеличению LINE повторов в сыворотке крови, с 0.05 ± 0.02 а.у. и 0.06 ± 0.015 а.у. для здоровых мышей до 0.15 ± 0.045 а.у. и 0.17 ± 0.055 а.у. для мышей с меланомой B16, соответственно (рисунок 26, А, Б). Введение ДНКазы I в дозе 0.12 мг/кг приводило, как говорилось выше, к значительному снижению представленности B1_mus1 и L1_mus1 среди вДНК: 0.05 ± 0.03 а.у. и 0.045 ± 0.03 а.у. соответственно (рисунок 26, А, Б), а увеличение дозы ДНКазы I до 0.6 и 1.2 мг/кг вызывало еще большее выраженное снижение уровней B1_mus1 и L1_mus1, до 0.03 ± 0.01 а.у. и 0.02 ± 0.01 а.у., соответственно, приближаясь к уровням в крови здоровых мышей (рисунок 26, А, Б).

В случае RLS₄₀ развитие опухоли приводило к значительному увеличению представленности SINE и LINE повторов, а введение ДНКазы I мышам с RLS₄₀ вызывало менее выраженное (по сравнению с моделью меланомы B16), но также дозозависимое снижение уровней SINE и LINE повторов, которое достигало B1_mus1 (0.015 ± 0.0015 а.у.) и L1_mus1 (0.021 ± 0.0025 а.у.) для ДНКазы I в дозе 0.24 мг/кг и было статистически достоверным (рисунок 26, В, Г).

3.4.2. Исследование способности вДНК крови мышей с LLC проникать в клетки KB-3-1 человека

Для исследования способности гетерогенной вДНК, и, в частности, повторов SINE и LINE проникать в клетки, была использована линия клеток эпидермоидной карциномы человека KB-3-1. Даная клеточная линия была выбрана для оценки как способности циркулирующей вДНК проникать в клетки, так и возможности межвидового переноса ДНК. Схема эксперимента приведена на рисунке 27. Стоит отметить, что SINE и LINE элементы мыши и человека имеют определенную степень гомологии, и поэтому в результате ПЦР геномной ДНК человека с использованием праймеров к SINE и LINE элементам мыши возможно выявление неспецифических продуктов. Поэтому в первую очередь был измерен базовый уровень SINE и LINE элементов (B1-mus1 и L1_mus1) в клетках KB-3-1. Оказалось, что уровень SINE и LINE элементов в клетках KB-3-1 оказался в 10^5 раз ниже по сравнению с клетками B16, LLC и RLS₄₀, и этот базовый уровень фактически и представляют собой неспецифические продукты амплификации SINE и LINE элементов человека.

Эксперимент проводили по стандартной схеме. Клетки LLC имплантировали мышам как описано выше (рисунок 27). На 15-й день эксперимента вДНК выделяли методом обратимой сорбции на силикатном сорбенте. ВДНК, полученную из крови мышей разных групп, добавляли к клеткам KB-3-1 в количестве $100 \text{ нг}/10^5 \text{ кл.}$ и инкубировали в течение трех дней. В качестве отрицательного контроля использовались клетки KB-3-1, не обработанные вДНК. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные вДНК разных групп животных после прекомплеобразования с Lipofectamine 2000.

Для исключения возможного токсического эффекта через 3 дня оценивали количество клеток в лунках. Оказалось, что количество клеток составляет 30 – 40 тыс. кл. на лунку, и статистически значимых различий между разными препаратами не было обнаружено. Клетки собирали, удаляли связанные с поверхностью вДНК, чтобы исключить их из анализа, как описано в разделе 2.2.9. Из клеток выделяли суммарную ДНК, измеряли ее концентрацию и определяли представленность повторов SINE и LINE элементов методом qPCR. Концентрации выделенной ДНК представлена в таблице 15. Было обнаружено, что концентрация суммарной ДНК, выделенной из клеток, обработанных вДНК мышей, несколько выше концентрации суммарной ДНК из клеток KB-3-1 без обработки, что может указывать на проникновение вДНК мыши в клетки человека (таблица 15). Более низкая концентрация вДНК в клетках, обработанных вДНК в комплексе с Lipofectamine 2000, может объясняться токсическим эффектом последнего. Тем не менее, влияние Lipofectamine 2000 на количество клеток обнаружено не было.

Таблица 15. Концентрация ДНК в клетках KB-3-1 после обработки вДНК

Источник вДНК	Концентрация вДНК, $\text{нг}/10^4 \text{ кл}$	
	- Lf	+ Lf
–	3.60 ± 0.30	3.20 ± 0.3
СВА/ здоровые	4.60 ± 0.25	3.45 ± 0.2
СВА/ LLC / физ. раствор /	4.00 ± 0.02	3.5 ± 0.07
СВА/ LLC / ДНКза I /	4.06 ± 0.02	3.80 ± 0.04

-Lf – вДНК без Lipofectamine 2000, +Lf – вДНК в комплексе с Lipofectamine 2000.

На рисунке 27, В и Г приведены данные представленности SINE и LINE элементов мыши в суммарной ДНК клеток KB-3-1. Было обнаружено, что обработка клеток KB-3-1 вДНК, полученной из сыворотки крови здоровых мышей, не приводила к увеличению представленности повторов SINE и LINE элементов в пуле суммарной ДНК клеток KB-3-1: уровни этих элементов мало отличались от уровней в интактных клетках KB-3-1 (рисунок 27, В, Г).

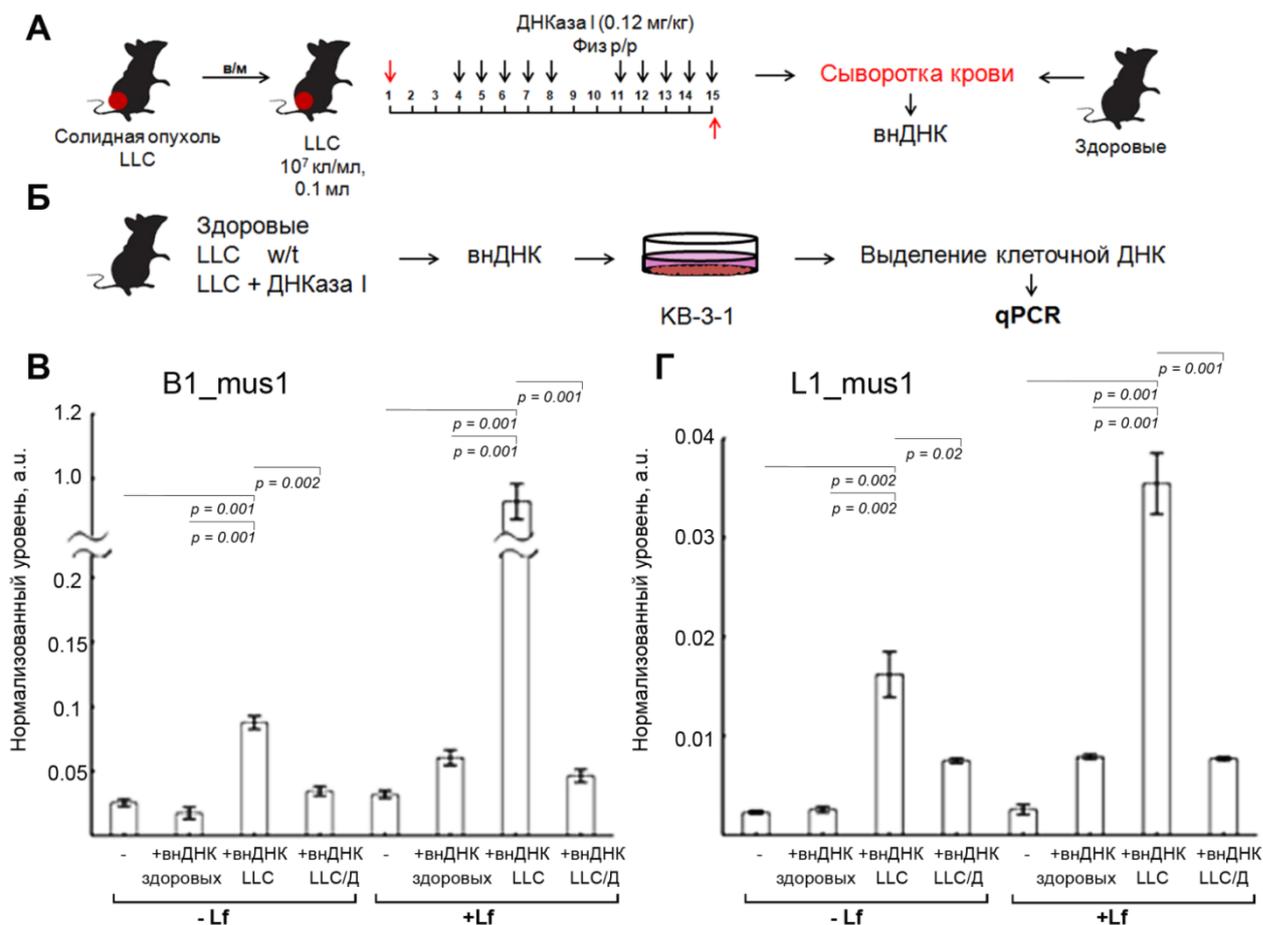


Рисунок 27. Исследование способности SINE и LINE из вДНК, полученной из крови мышей с LLC, проникать в клетки KB-3-1 человека. (А) Схема эксперимента. Клетки LLC (10⁶ клеток, 0.1 мл) имплантировали в/м мышам C57Bl. Начиная с 4-го дня после имплантации опухоли, животные получали в/м физ. раствор или ДНКазу I (0.12 мг/кг). Режим введения указаны на схеме. На 15-й день кровь собирали и получали сыворотку, выделяли вДНК из сыворотки крови, параллельно получали вДНК из сыворотки здоровых животных. (Б) ВДНК, полученную из сыворотки крови экспериментальных животных, добавляли к клеткам KB-3-1 и клетки инкубировали в течение 3 дней. Из клеток KB-3-1 выделяли ДНК и оценивали количество SINE и LINE элементов методом qPCR. (В) Уровень элементов B1_mus1 в составе суммарной ДНК клеток KB-3-1. (Г) Уровень элементов L1_mus1 в составе суммарной ДНК клеток KB-3-1. Статистическая обработка данных проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены как MEAN ± SE. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. – – интактные клетки, вДНК здоровых – вДНК, выделенная из сыворотки крови здоровых животных; вДНК LLC – вДНК, выделенная из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции физ. раствора; вДНК LLC/Д – вДНК, выделенная из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I в дозе 0.12 мг/кг; -Lf – вДНК без Lipofectamine 2000, +Lf – вДНК в комплексе с Lipofectamine 2000.

Обработка клеток внДНК, полученной из сыворотки крови мышей с LLC (контроль), приводила к 5-кратному увеличению представленности элементов B1_mus1 (рисунок 27, В), и 8-кратному повышению представленности L1_mus1 (рисунок 27, Г). Обработка клеток KB-3-1 внДНК, полученной из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I, не приводила к достоверному повышению представленности повторов SINE в суммарной ДНК клеток KB-3-1: их представленность была сопоставима с таковой для интактных клеток и клеток, обработанных внДНК сыворотки крови здоровых животных (рисунок 27, В). Что касается представленности LINE элементов, их уровень был несколько выше в клетках, обработанных внДНК, полученной из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I, по сравнению с интактными клетками и клетками, обработанными внДНК сыворотки крови здоровых животных (рисунок 27, Г).

После обработки клеток внДНК, полученной из сыворотки крови здоровых мышей и мышей, получавших инъекции ДНКазы I, в комплексе с Lipofectamine 2000 не было обнаружено достоверного возрастания концентрации ДНК. Обработка клеток KB-3-1 внДНК, полученной из сыворотки крови мышей с LLC в комплексе с Lipofectamine 2000 привела к возрастанию представленности элементов B1_mus1 в 50 раз и L1_mus1 в 12 раз (рисунок 27, В и Г). Таким образом, контроль с Lipofectamine 2000 доказывает, что проникновение внДНК в клетки было не случайным наблюдаемым артефактом, а воспроизводимым научным результатом.

Полученные результаты позволяют предположить, что SINE и LINE элементы из внДНК мышей-опухоленосителей способны проникать в клетки человека. Возрастание представленности SINE и LINE элементов при трансфекции клеток после прекомплексобразования внДНК с Lipofectamine 2000 также указывает на то, что наблюдалось именно проникновение фрагментов внДНК в клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, развитие всех трех типов опухолей сопровождается как увеличением общей концентрации внДНК в крови мышей-опухоленосителей, так и увеличением уровня SINE и LINE элементов в внДНК. Было продемонстрировано, что ДНКазы I вызывает снижение уровня SINE и LINE в крови мышей с опухолью, что коррелирует со степенью ингибирования роста первичной опухоли и развитием метастазов. Мы предполагаем, что ДНКазы I расщепляет внДНК в крови неслучайным образом, и наблюдаемое снижение уровня SINE и LINE может быть связано с их значительно более высокой доступностью для расщепления. На моделях B16

и RLS₄₀ наблюдалось дозозависимое снижение представленности SINE и LINE элементов под действием ДНКазы I, что коррелировало со снижением количества метастазов, а так же со снижением общей концентрации внДНК, так и восстановлением ДНКазной активности сыворотки крови.

Обнаруженные данные о достоверном увеличении SINE элементов в крови мышей при развитии опухоли согласуются с недавними данными об увеличении количества повторов Alu в крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), раком груди и раком яичников [359 – 361]. Несмотря на тот факт, что избыточное количество копий обратной транскриптазы, кодируемой в LINE элементах, ранее было обнаружено как в опухолевой ткани, так и в пуле внДНК [362,363], впервые было продемонстрировано изменение уровней tandemных повторов LINE в циркулирующей внДНК при прогрессировании опухоли.

Наши данные показали, что SINE и LINE элементы из крови мышей с LLC могут проникать в клетки человека, что свидетельствует о способности tandemных повторов участвовать в межвидовом переносе ДНК. Принимая во внимания многочисленные данные о повышении уровней SINE и LINE при развитии опухоли и их трансформирующий потенциал, можно выдвинуть предположение об их участии в распространении метастазов [168]. Дополняя генометастатическую гипотезу, мы предполагаем, что присутствие больших количеств внДНК опухолевого происхождения, содержащих SINE и LINE элементы, в крови опухоленосителей может привести к тому, что они могут передать определенные «опухолевые» свойства нормальным клеткам [16]. Наши данные показывают, что специфичные SINE и LINE, полученные из крови мышей с LLC, могут проникать в клетки человека, что свидетельствует о способности tandemных повторов участвовать в межвидовом переносе. Полученные данные об отсутствии переноса в клетки внДНК, полученных из сыворотки крови мышей с LLC после лечения ДНКазой I, также может быть свидетельством того, что антиметастатический эффект ДНКазы I объясняется генометастатической гипотезой: ДНКазы I вызывает деградацию внДНК, в том числе содержащих SINE и LINE, что приводит к снижению скорости распространения метастазов.

3.5. Исследование антиметастатического, противоопухолевого и иммуномодулирующего действия препарата Пульмозим™ *in vitro* и *in vivo*

Препарат Пульмозим™, содержащий дорназу α (человеческую рекомбинантную ДНКазу I), является коммерчески доступным препаратом, лицензированным для лечения редких заболеваний дыхательных путей в качестве отхаркивающего, муколитического средства. Фармакологическое действие Пульмозима заключается в разрушении внДНК гнойного секрета в легких, высвобождающегося из разрушающихся лейкоцитов, которые накапливаются в ответ на инфекцию. Учитывая доказанную клиническую эффективность препарата в разрушении внДНК, представлялось интересным оценить влияние Пульмозима™ на внДНК крови у мышей с метастатическими моделями опухолей, а также оценить потенциальное антиметастатическое или противоопухолевое действие Пульмозима™.

3.5.1. Определение ДНКазной активности и цитотоксичности препарата Пульмозим™ *in vitro*

Главным компонентом препарата Пульмозим™ является человеческая рекомбинантная ДНКазы I в концентрации 1000 ед. акт./мл. Кроме того, в состав входят вспомогательные вещества: хлорид натрия (8.772 мг/мл); дигидрат хлорида кальция (0.152 мг/мл); вода (mQ). Представлялось необходимым выяснить, соответствуют ли единицы активности Пульмозима™ единицам активности бычьей панкреатической ДНКазы I.

ДНКазную активность определяли в реакции расщепления плазмиды pMDR670 и рассчитывали эффективные константы скорости расщепления, как описано в разделе п. 2.2.7.1. Для этого плазмиду pMDR670 инкубировали при 37 С в присутствии ДНКазы I или Пульмозима™ (0.001 – 0.1 ед. акт./мл) в течение 5 – 30 мин. Для достоверности сравнения в реакционную смесь с ДНКазой I были добавлены те же компоненты в тех же пропорциях, что и в препарате Пульмозим™. На рисунке 28, А представлена зависимость эффективности расщепления плазмиды pMDR670 Пульмозима™.

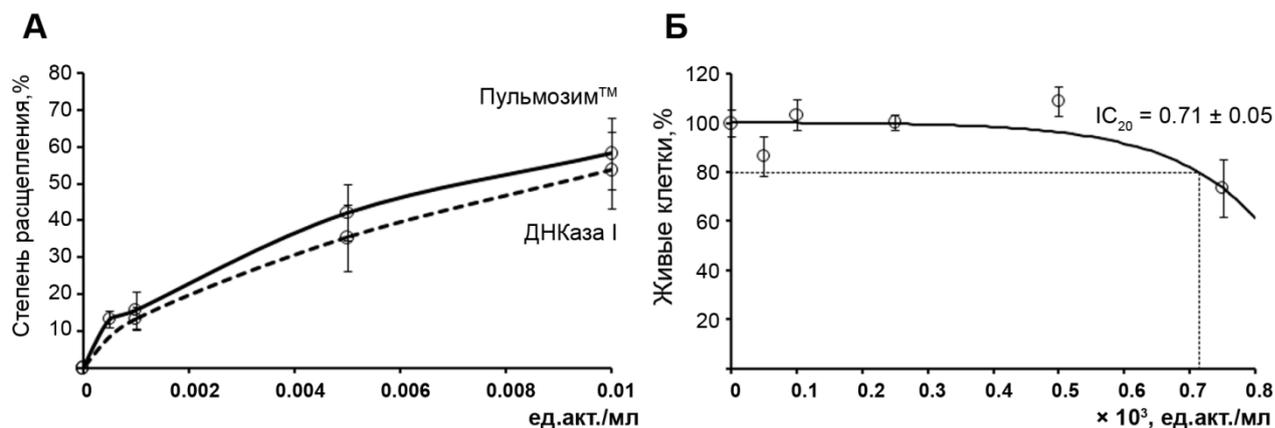


Рисунок 28. (А) Концентрационная зависимость степени расщепления плазмиды рМDR670 ДНКазой I и препаратом Пульмозим™. (Б) Влияние Пульмозима™ на жизнеспособность клеток меланомы В16. Клетки В16 инкубировали в присутствии Пульмозима™ в концентрационном диапазоне $(0.1 - 1) \times 10^3$ ед. акт./мл. За 100% принимали количество живых клеток в контроле (клетки инкубировали в отсутствие фермента). Данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде MEAN ± SE.

Как видно на рисунок 28 (А), кривые расщепления плазмиды рМDR670 ДНКазой I и Пульмозимом™ весьма схожи, что означает наличие у препарата Пульмозим™, содержащего рекомбинантную ДНКазу I человека, такой же ДНКазной активности, как и у бычьей панкреатической ДНКазы I.

С помощью МТТ-теста была проведена оценка чувствительности клеток меланомы В16 к Пульмозиму™ (рисунок 28, Б). Из представленных данных видно, что при использовании препарата в диапазоне концентраций $0.1 - 0.5 \times 10^3$ ед. акт./мл жизнеспособность клеток В16 достоверно не снижалась и составляла 90 – 100%. При повышении концентрации препарата до 0.75×10^3 ед. акт./мл жизнеспособность клеток снижалась лишь до 80%. Дальнейшее увеличение концентрации препарата в среде не приводило к дополнительному снижению жизнеспособности клеток.

Таким образом, для Пульмозима™ было вычислено значение IC₂₀ – доза фермента, при которой гибнет 20% клеток меланомы В16, и это значение составило $(0.71 \pm 0.05) \times 10^3$ ед. акт./мл. Стоит отметить, что для ДНКазы I в тех же концентрациях влияние на жизнеспособность клеток меланомы В16 обнаружено не было.

3.5.2. Влияние Пульмозима™ на миграционную активность опухолевых клеток В16

Влияние Пульмозима™ на миграционную активность клеток меланомы В16 исследовали с помощью метода зарастания царапины. Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и отслеживали скорость ее заполнения опухолевыми клетками в отсутствие препарата (контроль) и в присутствии Пульмозима™ в концентрации $(0.1 - 0.5) \times 10^3$ ед. акт./мл (рисунок 29, А).

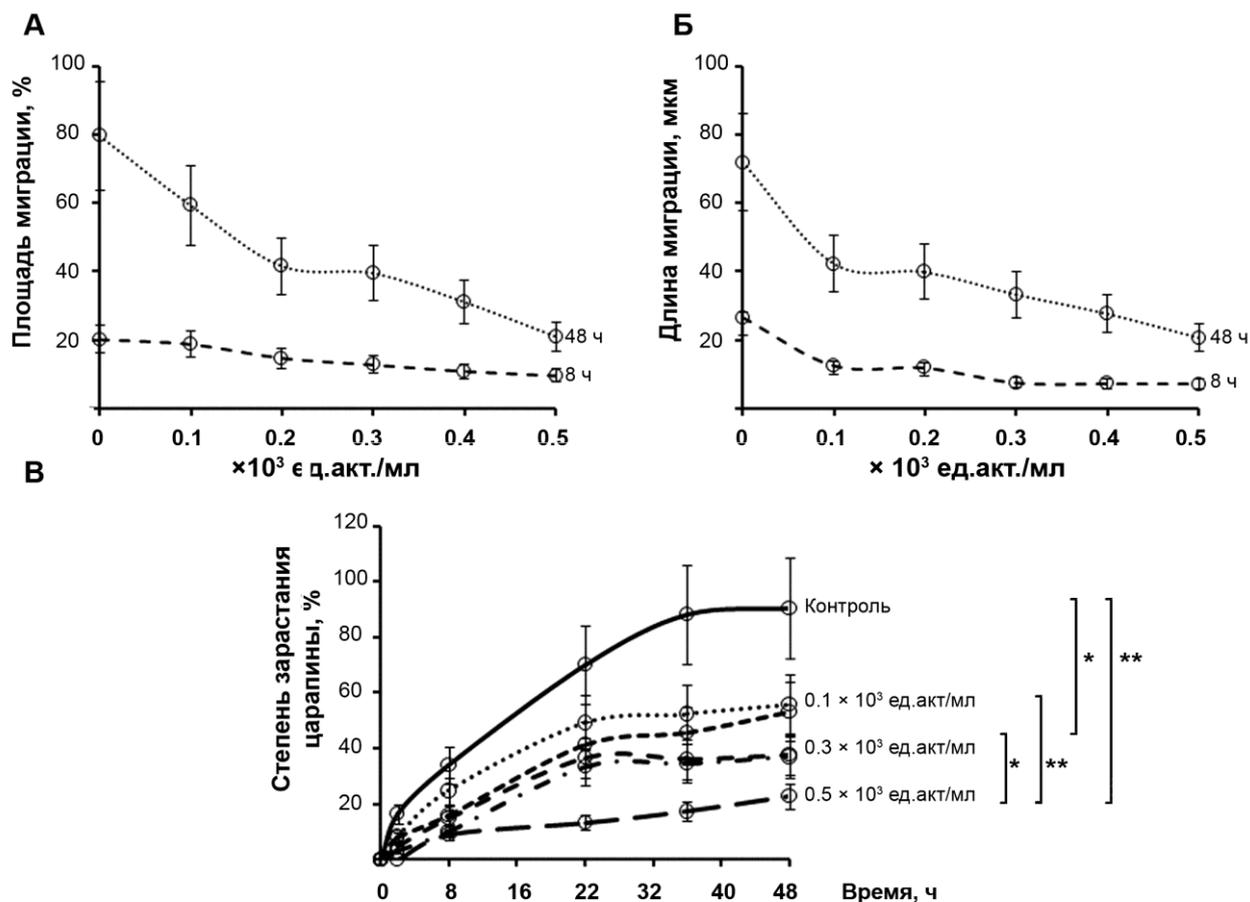


Рисунок 29. Влияние Пульмозима™ на миграционную активность клеток меланомы В16 под действием. Клетки В16 культивировали в течение двух суток в присутствии препарата Пульмозим™ в концентрации $(0.1 - 0.5) \times 10^3$ ед. акт./мл. **(А)** и **(Б)** Площадь миграции клеток и длина зоны миграции клеточного фронта в через 8 и 48 ч инкубации клеток в присутствии Пульмозима™ (относительно контроля). **(В)** Кинетика зарастания царапины опухолевыми клетками через 2 – 48 ч инкубации в присутствии Пульмозима™ в концентрациях $(0.1 - 0.5) \times 10^3$ ед. акт./мл. Данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде MEAN ± SE. * - достоверные отличия, $p < 0.05$, ** - достоверные отличия, $p < 0.001$.

При анализе миграционной активности клеток было выявлено, что в присутствии Пульмозима™ происходит снижение миграции клеток пропорционально концентрации препарата (рисунок 29, А – В). Так, через 48 ч Пульмозим™ уже в дозе 0.1×10^3 ед.акт./мл вызывал уменьшение общей площади миграции на 15% и двукратное сокращение длины миграции клеточного фронта (рисунок 29, А и Б). При пятикратном повышении концентрации препарата было отмечено сокращение площади и длины миграции в 5 раз (рисунок 29, А и Б). При анализе скорости миграции было замечено ее снижение в 2 – 5 раз в зависимости от дозы препарата уже через 8 ч, и через 48 ч было отмечено сокращение скорости миграции клеток в 4 раза при использовании препарата в наибольшей концентрации (рисунок 29, В).

Как видно из представленных данных, Пульмозим™ примерно в 10 раз эффективнее влияет на скорость миграции опухолевых клеток, чем ДНКазы I. При использовании ДНКазы I в концентрации 0.5×10^3 ед.акт./мл было обнаружено относительно незначительное сокращение как скорости, так и площади миграции (см. рисунок 9, раздел 3.1.3), хотя и было обнаружено почти двукратное сокращение длины миграции клеточного фронта. В то же время использование Пульмозима™ в той же концентрации привело к практически полной остановке миграции (рисунок 29, А – В).

3.5.3. Антиметастатическое действие Пульмозима™ на модели меланомы В16.

Для оценки влияния Пульмозима™ на инвазивный потенциал опухоли была выбрана метастатическая модель меланомы В16. В качестве положительного контроля наличия антиметастатического эффекта была взята ДНКазы I в дозе, показавшей наилучший результат – 1.2 мг/кг, что соответствует 20×10^3 ед.акт./кг. Схема эксперимента приведена на рисунке 30 А. Клетки меланомы В16 имплантировали в/в мышам, и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали в/м либо физ./раствор, ДНКазу I (1.2 мг/кг), либо Пульмозим™ (1 – 10 мг/кг, или $1 - 10 \times 10^3$ ед.акт./кг, или 5 – 50 ед.акт./мышь) по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). По окончании эксперимента подсчитывали число поверхностных метастазов в легких и забирали кровь для анализа уровня фрагментов повторов SINE и LINE в пуле вДНК.

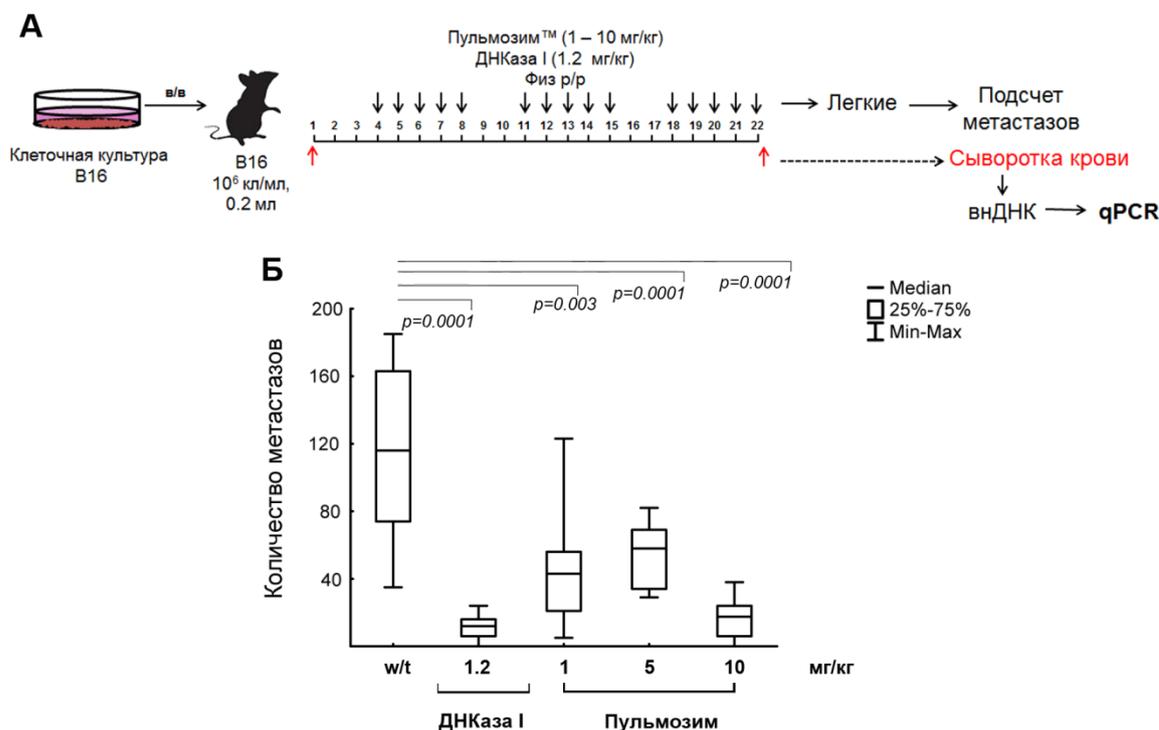


Рисунок 30. Исследование антиметастатического действия Пульмозима™ на модели метастатической меланомы В16. (А). Схема эксперимента. Животные получали внутримышечно физ./раствор, ДНКазу I (1.2 мг/кг) или Пульмозим™ (1 – 10 мг/кг) по схеме 5+2 (5 дней инъекции, затем 2 дня перерыв). (Б) Количество метастазов в легких мышей. Данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены в виде медианы. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

На рисунке 30 (Б) представлено влияние Пульмозима™ на количество метастазов. Было обнаружено, что в/м введение мышам с В16 Пульмозима™ приводило к значительному сокращению количества поверхностных метастазов (рисунок 30, Б): было обнаружено 2-кратное сокращение количества метастазов под действием Пульмозима™ в дозе 2 мг/кг и 10 мг/кг и 10-кратное снижение числа метастазов при использовании как Пульмозима в дозе 20 мг/кг (рисунок 30). Таким образом, Пульмозим™ показал антиметастатическую активность, близкую к активности ДНКазы I.

3.5.4. Действие Пульмозима™ на уровни SINE и LINE элементов в пуле вДНК.

Уровни фрагментов повторов SINE и LINE элементов в образцах вДНК, полученных от разных групп мышей определяли с помощью ПЦР в реальном времени, так же, как было описано выше в разделе 3.4.1. Значения C_t фрагментов согласно данным ПЦР были рассчитаны относительно значений одного из образцов вДНК здоровых мышей и выражены в условных единицах (а.у.) (рисунки 31 и 32).

Так же, как и введение ДНКазы I, введение Пульмозима™ мышам с опухолями B16 приводило к дозозависимому снижению уровня как SINE, так и LINE элементов. При использовании Пульмозима™ в дозе 10 мг/кг наблюдалось снижение уровней повторов до уровня, близкого к уровню здоровых животных, что коррелирует с ранее представленными результатами (рисунок 31 и 32). Наблюдалось снижение представленности SINE элементов в пуле вДНК в 5 – 10 раз (до 0.005 – 0.010 а.у. в среднем) (рисунок 31, А – Г). В случае LINE было показано снижение представленности в 2 – 3 раза при лечении препаратом в дозе 1 мг/кг (с 0.025 – 0.35 а.у. в контроле до 0.015 – 0.02 а.у.) и в 3 – 4 раза при лечении препаратом в дозе 10 мг/кг (до 0.01 – 0.015 а.у.) (рисунок 32, А – Г).

При использовании более низкой дозы так же наблюдалось снижение представленности SINE и LINE элементов, причем в случае B1_mus2 и всех LINE элементов не было выявлено различий в их представленности в зависимости от дозы. Лечение Пульмозимом™ в низкой дозе (1 мг/кг) приводило к снижению SINE элементов в среднем в 2–3 раза (с 0.025 – 0.045 а.у. в контроле до 0.015 – 0.025 а.у.).

Полученные нами данные хорошо согласуются как с полученными ранее данными о влиянии ДНКазы I на представленность SINE и LINE элементов, так и с немногочисленными литературными данными. Те не менее, данные о влиянии Пульмозима™ на уровень SINE и LINE элементов, так же как и на другие последовательности, в пуле вДНК, отсутствуют.

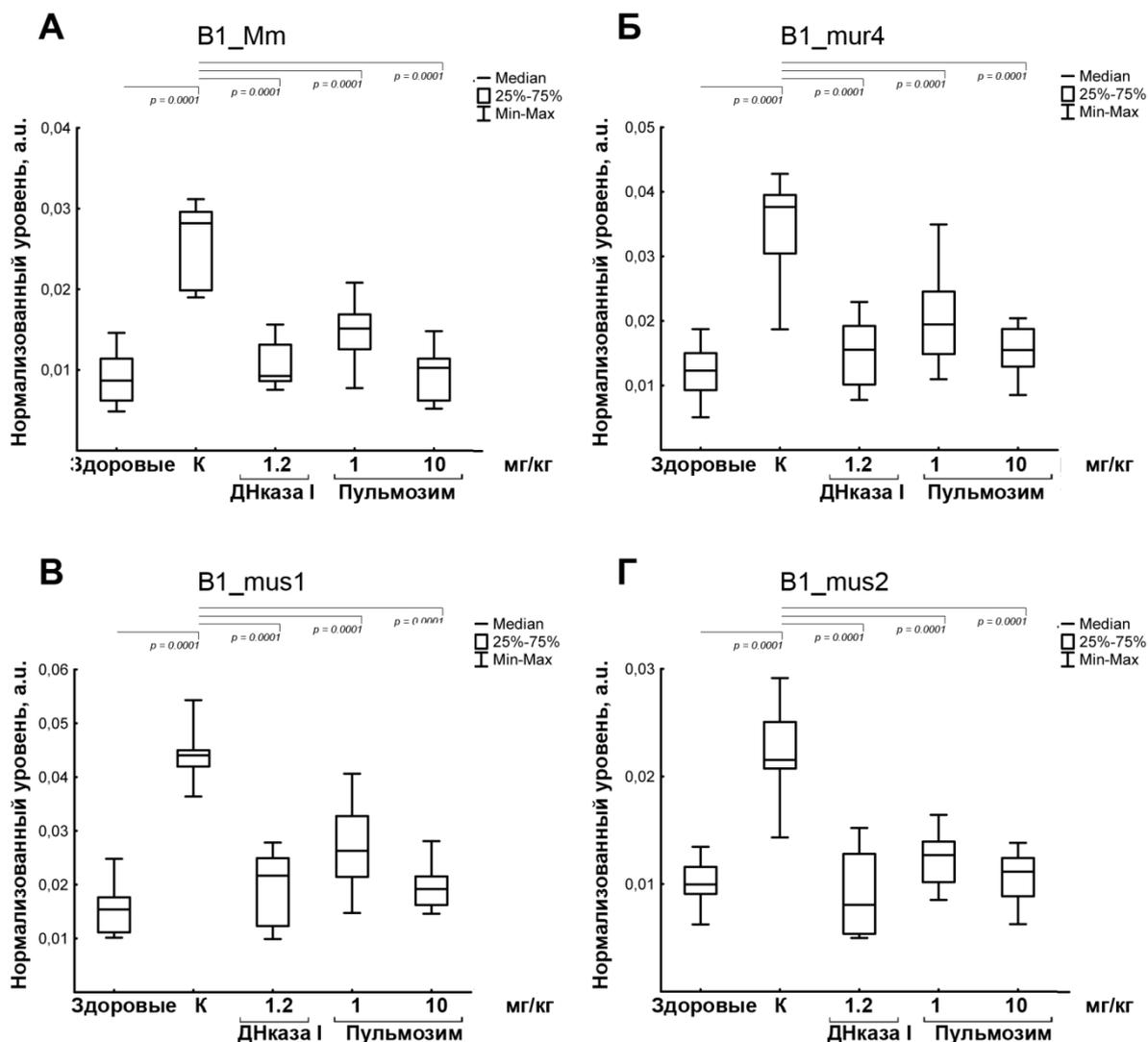


Рисунок 31. Уровень SINE элементов в пуле внДНК сыворотки крови здоровых мышей, мышей с B16 без и после лечения ДНКазой I и Пульмозимом™. (А) – (Г) Представленность элементов B1_Mm, B1_mur4, B1_mus1 и B1_mus2, соответственно. Представленность циркулирующих элементов была проанализирована с помощью qPCR и приведена в виде условных единиц (a.u., arbitrary unit). Данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены как медиана. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Здоровые – мыши без опухолей; w/t – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ./раствора; ДНКаза I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (1.2 мг/кг), Пульмозим™ – мыши с опухолями, получающие Пульмозим™ (1 – 10 мг/кг)

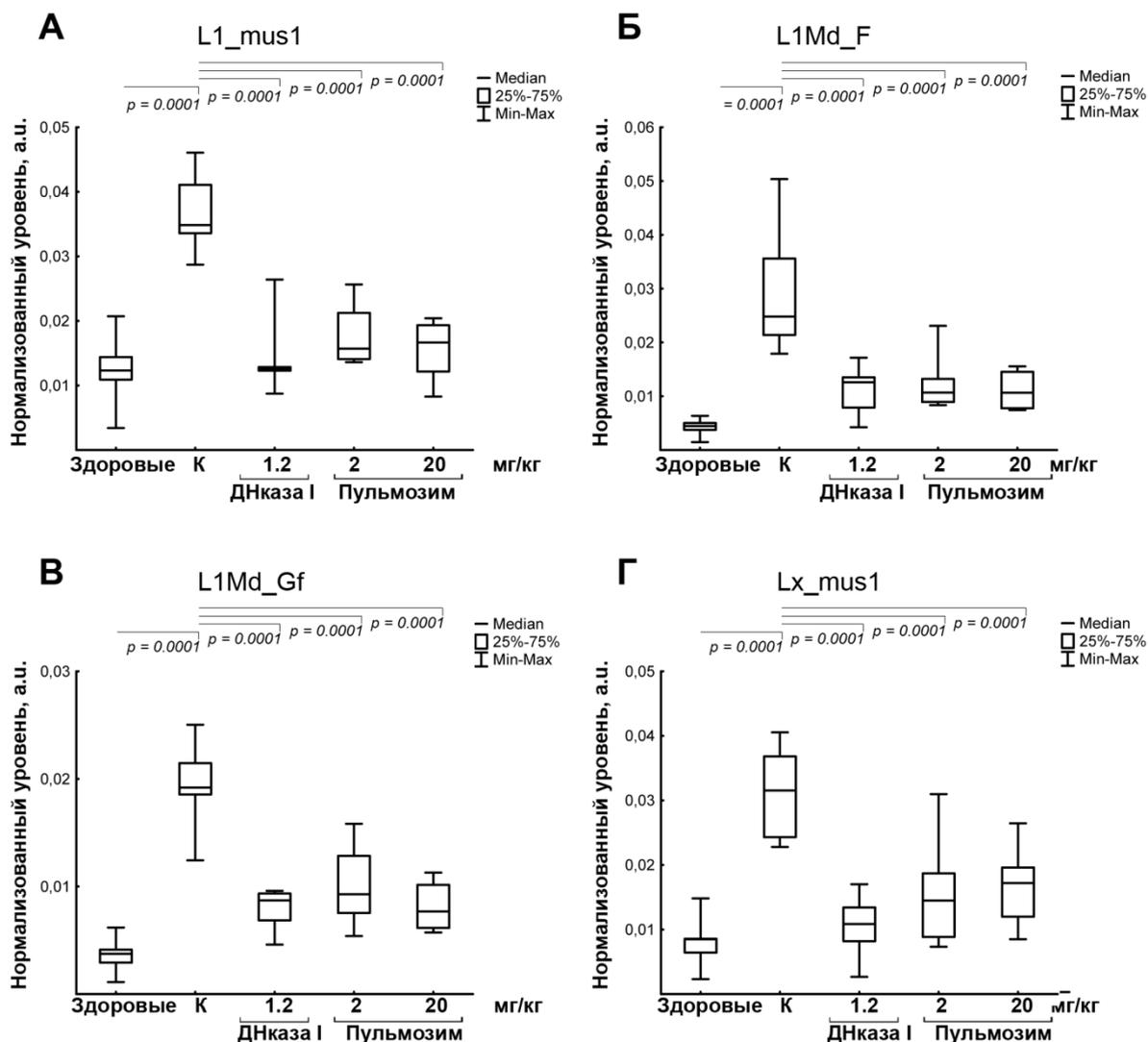


Рисунок 32. Уровень LINE элементов в пуле вДНК сыворотки крови здоровых мышей, мышей с B16 без и после лечения ДНказой I и Пульмозимом™. (А) – (Г) Представленность элементов L1_mus1, L1Md_F, L1Md_Gf и Lx_mus1, соответственно. Представленность циркулирующих элементов была проанализирована с помощью qPCR и приведена в виде условных единиц (a.u., arbitrary unit). Данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные представлены как медиана. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Здоровые – мыши без опухолей; w/t – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ./раствора; ДНКаза I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (1.2 мг/кг), Пульмозим™ – мыши с опухолями, получающие Пульмозим™ (1 – 10 мг/кг).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе было продемонстрировано, что бычья панкреатическая ДНКаза I *in vitro* оказывает воздействие на инвазивные параметры опухолевых клеток, в высоких дозах оказывая прямое токсическое воздействие на клетки В16, а в более низких негативно влияя на параметры миграционной активности клеток меланомы В16, что так же сопровождалось существенным снижением концентрации вДНК в культуральной среде и на поверхности клеток. Коммерчески доступный препарат Пульмозим™, представляющий собой рекомбинантную ДНКазу I человека (дорназа альфа), также эффективно подавлял миграционные параметры клеток меланомы В16, причем воздействие Пульмозима™ было в 10 раз эффективнее по сравнению с бычьей панкреатической ДНКазой I. Пульмозим™ снижал в некоторой степени жизнеспособность клеток В16: значение IC₂₀ Пульмозима™ (доза фермента, при которой выживает 80% клеток) составило $(0.71 \pm 0.05) \times 10^3$ ед. акт./мл.

В тех же концентрациях не было обнаружено токсического действия ДНКазы I ни в нашей работе, ни в исследованиях других авторов [277,323]. Токсический эффект Пульмозима™ либо других форм дорназы альфа на опухолевых клетках ранее не был исследован. Тем не менее, Пульмозим™ не оказывал токсического влияния на клетки эпителия почки Vero и мононуклеарные клетки периферической крови [364]. Кроме того, показано, что Пульмозим обладает слабым общим токсическим действием *in vivo* [365].

Нами было показано, что ДНКазы I обладает *in vivo* выраженным антиметастатическим эффектом, коррелирующим со снижением концентрации вДНК сыворотки крови и специфической деградацией таких ее компонентов, как онкогенов и tandemных повторов, в том числе SINE и LINE элементов. При лечении Пульмозимом™ также было выявлено снижение количества метастазов, сопоставимое со снижением под действием ДНКазы I, которое коррелировало как с общим снижением вДНК сыворотки крови, так и с деградацией ее компонентов, в частности, SINE и LINE элементов.

Полученные результаты позволяют рекомендовать Пульмозим™ в качестве нового антиметастатического препарата для клинических исследований для широкого спектра метастатических опухолей.

ВЫВОДЫ

В данной работе было проведено всестороннее исследование антиметастатического потенциала бычьей панкреатической ДНКазы I и рекомбинантной ДНКазы I человека (Пульмозим™) на экспериментальных метастатических опухолевых моделях.

1. Показано, что ДНКазы I практически не влияет на жизнеспособность клеток меланомы B16, но значительно снижает их миграционную активность *in vitro*.

2. Показано, что внутримышечное введение ДНКазы I мышам с меланомой B16, карциномой легких Льюис LLC и лимфосаркомой RLS₄₀ приводит к снижению количества и площади метастазов, а также замедлению роста первичного опухолевого узла. Показано, что снижение инвазивного потенциала опухолей под действием ДНКазы I коррелирует с повышением ДНКазной активности сыворотки крови до уровня здоровых животных.

3. Показано, что молекулярными мишенями ДНКазы I в крови животных с карциномой легких Льюис LLC являются фрагменты онкогенов *Hmga2*, *Myc* и *Jun* и около 200 типов тандемных повторов, включая повторы семейств B (SINE) и L1 (LINE), уровень которых повышается при развитии опухоли и снижается при введении ДНКазы I. Показано, что снижение инвазивного потенциала опухолей под действием ДНКазы I коррелирует со снижением представленности фрагментов SINE и LINE элементов в крови животных-опухоленосителей, что позволяет предложить SINE и LINE элементы в качестве новых онкомаркеров.

4. Показано, что SINE и LINE элементы из крови мышей с карциномой легких Льюис могут проникать в клетки эпидермоидной карциномы KB-3-1 человека, что свидетельствует о способности тандемных повторов участвовать в межвидовом переносе ДНК.

5. Показано, что рекомбинантная ДНКазы I человека (препарат Пульмозим™), так же как и бычья панкреатическая ДНКазы I, практически не влияет на жизнеспособность клеток B16, но снижает их миграционную активность. Показано, что Пульмозим™ снижает число и площадь метастазов на модели метастатической меланомы B16 мыши так же эффективно, как и ДНКазы I, и антиметастатическое действие Пульмозима™ коррелирует со снижением представленности фрагментов SINE и LINE элементов в крови животных-опухоленосителей.

Список литературы

1. Mandel P., Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme // C R Seances Soc Biol Fil. - 1948. - V. 142 - № 3-4 - P. 241–243.
2. Stroun M., Anker P., Maurice P., Gahan P.B. Circulating nucleic acids in higher organisms // Int Rev Cytol. - 1977. - V. 51 - P. 1–48
3. 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. - V. 46 - № 5 - P. 318–322
4. Corcoran R.B., Chabner B.A. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment // N Engl J Med. - 2018. - V. 379 - № 18 - P. 1754–1765
5. Bianchi D.W., Chiu R.W.K. Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy // N Engl J Med. - 2018. - V. 379 - № 5 - P. 464–473
6. Stewart C.M., Kothari P.D., Mouliere F., Mair R., Somnay S., Benayed R., Zehir A., Weigelt B., Dawson S.-J., Arcila M.E., Berger M.F., Tsui D.W. The value of cell-free DNA for molecular pathology // J Pathol. - 2018. - V. 244 - № 5 - P. 616–627
7. Huang J., Wang L. Cell-Free DNA Methylation Profiling Analysis-Technologies and Bioinformatics // Cancers (Basel). - 2019. - V. 11 - № 11 - P. 1741
8. Li B., Pu K., Ge L., Wu X. Diagnostic significance assessment of the circulating cell-free DNA in ovarian cancer: An updated meta-analysis // Gene. - 2019. - V. 714 - P. 143993
9. Mäbert K., Cojoc M., Peitzsch C., Kurth I., Souchelnytskyi S., Dubrovskaya A. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives // Int J Radiat Biol. - 2014. - V. 90 - № 8 - P. 659–677
10. Dar P., Shani H., Evans M. Cell-free DNA: Comparison of Technologies // Clin Lab Med. - 2016. - V. 36 - № 2 - P. 199–211
11. Lee K.-H., Shin T.-J., Kim W.-H., Cho J.-Y. Methylation of LINE-1 in cell-free DNA serves as a liquid biopsy biomarker for human breast cancers and dog mammary tumors // Sci Rep. - 2019. - V. 9 - № 1 - P. 175
12. Ulrich B.C., Paweletz C.P. Cell-Free DNA in Oncology: Gearing up for Clinic // Ann Lab Med. - 2018. - V. 38 - № 1 - P. 1–8
13. Oellerich M., Schütz E., Beck J., Kanzow P., Plowman P.N., Weiss G.J., Walson P.D. Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy // Crit Rev Clin Lab Sci. - 2017. - V. 54 - № 3 - P. 205–218

14. Bedin C., Enzo M.V., Del Bianco P. 3, Pucciarelli S., Nitti D., Agostini M. Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients // *Int J Cancer*. - 2017. - V. 140 - № 8 - P. 1888–1898
15. García-Olmo D., García-Olmo D.C., Ontañón J., Martínez E., Vallejo M. Tumour DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis // *Histol Histopathol*. - 1999. - V. 14 - № 4 - P. 1159–1164
16. 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. - V. 70 - № 2 - P. 560–567
17. Trejo-Becerril C., Pérez-Cárdenas E., Taja-Chayeb L., Anker P., Herrera-Goepfert R., Medina-Velázquez L.A., Hidalgo-Miranda A., Pérez-Montiel D., Chávez-Blanco A., Cruz-Velázquez J., Díaz-Chávez J., Gaxiola M., Dueñas-González A. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model // *PLoS One*. - 2012. - V. 7 - № 12 - P. e52754
18. Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M., Bratt A., Folkman M.J., Spetz A.L., Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2001. - V. 98 - № 11 - P. 6407–6411
19. Gaiffe E., Prétet J.L., Launay S., Jacquin E., Saunier M., Hetzel G., Oudet P., Mougin C. Apoptotic HPV positive cancer cells exhibit transforming properties // *PLoS One*. - 2012. - V. 7 - № 5 - P. e36766
20. Beyer C., Pisetsky D.S. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases // *Nat Rev Rheumatol*. - 2010. - V. 6 - P. 21–29
21. Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis // *J Leukoc Biol*. - 1996. - V. 59 - № 2 - P. 229–240
22. Wartha F., Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway // *Sci Signal*. - 2008. - V. 1 - № 21 - P. pe25
23. Salganik R.I., Martynova R.P., Matienko N.A., Ronichevskaya G.M. Effect of deoxyribonuclease on the course of lymphatic leukaemia in AKR mice // *Nature*. - 1967. - V. 214 - № 5083 - P. 100–102
24. Sugihara S., Yamamoto T., Tanaka H., Kambara T., Hiraoka T., Miyauchi Y. Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice // *Br J Cancer*. - 1993. - V. 67 - № 1 - P. 66–70

25. Patutina O., Mironova N., Ryabchikova E., Popova N., Nikolin V., Kaledin V., Vlassov V., Zenkova M. Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I // *Biochimie*. - 2011. - V. 93 - № 4 - P. 689–696
26. A service of the US National Institutes of Health, ClinicalTrials.gov (2012) Evaluation of the Safety and Efficacy of Oshadi D and Oshadi R for Cancer Treatment // Clinical Trials.gov, Identifier: NCT01201018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01201018>.
27. Rosner K. DNase1: a new personalized therapy for cancer? *Expert Rev Anticancer Ther*. - 2011. - V. 11 - № 7 - P. 981–984.
28. Beck J., Urmovitz H.B., Riggert J., Clerici M., Schütz E. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals // *Clin Chem*. - 2009. - V. 55 - № 4 - P. 730–738
29. Hiorns L.R., Nicholls J., Sloane J.P., Horwich A., Ashley S., Brada M. Peripheral blood involvement in non-Hodgkin's lymphoma detected by clonal gene rearrangement as a biological prognostic marker // *Br J Cancer*. - 1994. - V. 69 - № 2 - P. 347–351
30. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — A survey // *Biochim Biophys Acta*. - 2007. - V. 1775 - № 1 - P. 181–232
31. 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. - V. 61 - № 4 - P. 1659–1665
32. Deligezer U., Yaman F., Erten N., Dalay N. Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients // *Clin Chim Acta. Sep*. - 2003. - V. 335 - № 1-2 - P. 89–94
33. Holdenrieder S., Stieber P. Therapy control in oncology by circulating nucleosomes // *Ann N Y Acad Sci*. - 2004. - V. 1022 - P. 211–216
34. Schorey J.S., Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology // *Traffic*. - 2008. - V. 9 - № 6 - P. 871–881
35. Gahan P.B., Stroun M. The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger // *Cell Biochem Funct*. - 2010. - V. 28 - № 7 - P. 529–538
36. Gosse C., Le Pecq J.B., Defrance P., Paoletti C. Initial degradation of deoxyribonucleic acid after injection in mammals // *Cancer Res*. - 1965. - V. 25 - № 6 - P. 877–883
37. Cherepanova A., Tamkovich S., Pyshnyi D., Kharkova M., Vlassov V., Laktionov P. Immunochemical assay for deoxyribonuclease activity in body fluids // *J Immunol Methods*. - 2007. - V. 325 - № 1-2 - P. 96–103
38. Wilson K.D., Raney S.G., Sekirov L., Chikh G., deJong S.D., Cullis P.R., Tam Y.K. Effects of intravenous and subcutaneous administration on the pharmacokinetics, biodistribution,

cellular uptake and immunostimulatory activity of CpG ODN encapsulated in liposomal nanoparticles // *Int Immunopharmacol.* - 2007. - V. 7 - № 8 - P. 1064–1075

39. Hoch S.O., McVey E. Purification and characterization of two major DNA-binding proteins in human serum // *J Biol Chem.* - 1977. - V. 252 - № 6 - P. 1881–1887

40. Cristiano S., Leal A., Phallen J., Fiksel J., Adleff V., Bruhm D.C., Jensen S.Ø., Medina J.E., Hruban C., White J.R., Palsgrove D.N., Niknafs N., Anagnostou V., Forde P., Naidoo J., Marrone K., Brahmer J., Woodward B.D., Husain H., van Rooijen K.L., Ørntoft M.W., Madsen A.H., van de Velde C.J.H., Verheij M., Cats A., Punt C.J.A., Vink G.R., van Grieken N.C.T., Koopman M., Fijneman R.J.A., Johansen JS., Nielsen H.J., Meijer G.A., Andersen C.L., Scharpf R.B., Velculescu V.E. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer // *Nature.* - 2019. - V. 570 - № 7761 - P. 385–389

41. Holdenrieder S., Stieber P. Clinical use of circulating nucleosomes // *Crit Rev Clin Lab Sci.* - 2009. - V. 46 - № 1 - P. 1–24

42. Rumore P., Muralidhar B., Lin M., Lai C., Steinman C.R. Haemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA: oligonucleosome-like structure and clearance // *Clin Exp Immunol.* - 1992. - V. 90 - № 1 - P. 56–62

43. Wu T.L., Zhang D., Chia J.H., Tsao K., Sun C.F., Wu J.T. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range // *Clin Chim Acta.* - 2002. - V. 321 - № 1-2 - P. 77–87

44. Underhill H.R., Kitzman J.O., Hellwig S., Welker N.C., Daza R., Baker D.N., Gligorich K.M., Rostomily R.C., Bronner M.P., Shendure J. Fragment Length of Circulating Tumor DNA// *PLoS Genet.* - 2016. - V. 12 - № 7 - P. e1006162

45. Diehl F., Li M., Dressman D., He Y., Shen D., Szabo S., Diaz L.A. Jr., Goodman S.N., David K.A., Juhl H., Kinzler K.W., Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2005. - V. 102 - № 45 - P. 16368–16373

46. Wang B.G., Huang H.Y., Chen Y.C., Bristow R.E., Kassauei K., Cheng C.C., Roden R., Sokoll L.J., Chan D.W., Shih I.M. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. // *Cancer Res.* - 2003. - V. 63 - № 14 - P. 3966–3968

47. Han D.S.C., Ni M., Chan R.W.Y., Chan V.W.H., Lui K.O., Chiu R.W.K., Lo Y.M.D. The Biology of Cell-free DNA Fragmentation and the Roles of DNASE1, DNASE1L3, and DFFB. // *Am J Hum Genet.* - 2020. - V. 106 - № 2 - P. 202–214

48. Kawabata K., Takakura Y., Hashida M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake // *Pharm Res.* - 1995. - V. 12 - № 6 - P. 825–830

49. De Oliveira M.C., Boutet V., Fattal E., Boquet D., Grognet J.M., Couvreur P., Deverre J.R. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice // *Life Sci.* - 2000. - V. 67 - № 13 - P. 1625–1637
50. Ko Y.T., Bhattacharya R., Bickel U. Liposome encapsulated polyethylenimine/ODN polyplexes for brain targeting // *J Control Release.* - 2009. - V. 133 - № 3 - P. 230–237
51. Chia D., Dorsch C.A., Levy L., Barnett E.V. The metabolism of nucleic acids in mice // *Immunology.* - 1979. - V. 36 - № 2 - P. 323–329
52. Lau T.W., Leung T.N., Chan L.Y., Lau T.K., Chan K.C., Tam W.H., Lo Y.M. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia // *Clin Chem.* - 2002. - V. 48 - № 12 - P. 2141–2146
53. Winter O., Musiol S., Schablowsky M., Cheng Q., Khodadadi L., Hiepe F. Analyzing pathogenic (double-stranded (ds) DNA-specific) plasma cells via immunofluorescence microscopy // *Arthritis Res Ther.* - 2015. - V. 17 - P. 293
54. 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. - V. 37 - № 3 - P. 646–650
55. Boddy J.L., Gal S., Malone P.R., Harris A.L., Wainscoat J.S. Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease // *Clin Cancer Res.* - 2005. - V. 11 - № 4 - P. 1394–1399
56. Wimberger P., Roth C., Pantel K., Kasimir-Bauer S., Kimmig R., Schwarzenbach H. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients // *Int J Cancer.* - 2011. - V. 128 - № 11 - P. 2572–2580
57. Kamat A.A., Baldwin M., Urbauer D., Dang D., Han L.Y., Godwin A., Karlan B.Y., Simpson JL, Gershenson DM, Coleman RL, Bischoff FZ, Sood AK. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker // *Cancer.* - 2010. - V. 116 - № 8 - P. 1918–1925
58. Sunami E., Vu A.T., Nguyen S.L., Giuliano A.E., Hoon D.S. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer // *Ann N Y Acad Sci.* - 2008. - V. 1137 - P. 171–174
59. Allen D., Butt A., Cahill D., Wheeler M., Popert R., Swaminathan R. Role of cell-free plasma DNA as a diagnostic marker for prostate cancer // *Ann N Y Acad Sci.* Jun. - 2004. - V. 1022 - P. 76–80
60. Schwarzenbach H., Stoehlmacher J., Pantel K., Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer // *Ann N Y Acad Sci.* - 2008. - V. 1137 - P. 190–196

61. Chun F.K., Müller I., Lange I., Friedrich M.G., Erbersdobler A., Karakiewicz P.I., Graefen M., Pantel K., Huland H., Schwarzenbach H. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer // *BJU Int.* - 2006. - V. 98 - (3) - P. 544–548
62. Ryan J.L., Fan H., Swinnen L.J., Schichman S.A., Raab-Traub N., Covington M., Elmore S., Gulley M.L. Epstein–Barr Virus (EBV) DNA in plasma is not encapsidated in patients with EBV-related malignancies // *Diagn Mol Pathol. Jun.* - 2004. - V. 13 - № 2 - P. 61–68
63. Gormally E., Hainaut P., Caboux E., Airoidi L., Autrup H., Malaveille C., Dunning A., Garte S., Matullo G., Overvad K., Tjonneland A., Clavel-Chapelon F., Boffetta P., Boeing H., Trichopoulou A., Palli D., Krogh V., Tumino R., Panico S., Bueno-de-Mesquita H.B., Peeters P.H., Lund E., Gonzalez C.A., Martinez C., Dorronsoro M., Barricarte A., Tormo M.J., Quiros J.R., Berglund G., Hallmans G., Day N.E., Key T.J., Veglia F., Peluso M., Norat T., Saracci R., Kaaks R., Riboli E., Vineis P. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study // *Int J Cancer.* - 2004. - V. 111 - № 5 - P. 746–749
64. Sozzi G., Conte D., Leon M., Ciricione R., Roz L., Ratcliffe C., Roz E., Cirenei N., Bellomi M, Pelosi G., Pierotti M.A., Pastorino U. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer // *J Clin Oncol.* - 2003. - V. 21 - № 21 - P. 3902–3908
65. Jung K., Stephan C., Lewandowski M., Klotzek S., Jung M., Kristiansen G., Lein M., Loening S.A., Schnorr D. Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer // *Cancer Lett.* - 2004. - V. 205 - № 2 - P. 173–180
66. Xie G.S., Hou A.R., Li L.Y., Gao Y.N., Cheng S.J. Quantification of plasma DNA as a screening tool for lung cancer // *Chin Med J (Engl).* - 2004. - V. 117 - № 10 - P. 1485–1488
67. Gautschi O., Bigosch C., Huegli B., Jermann M., Marx A., Chassé E., Ratschiller D., Weder W., Joerger M., Betticher D.C., Stahel R.A., Ziegler A. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy // *J Clin Oncol.* - 2004. - V. 22 - № 20 - P. 4157–4164
68. Sozzi G., Conte D., Mariani L., Lo Vullo S., Roz L., Lombardo C., Pierotti M.A., Tavecchio L. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients // *Cancer Res.* - 2001. - V. 61 - № 12 - P. 4675–4678
69. Thijssen M.A., Swinkels D.W., Ruers T.J., de Kok J.B. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases // *Anticancer Res.* - 2002. - V. 22 - № 1A - P. 421–425
70. Catarino R., Ferreira M.M., Rodrigues H., Coelho A., Nugal A., Sousa A., Medeiros R. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer // *DNA Cell Biol.* - 2008. - V. 27 - № 8 - P. 415–421

71. Peters D.L., Pretorius P.J. Continuous adaptation through genetic communication - a putative role for cell-free DNA // *Expert Opin Biol Ther.* - 2012. - V. 12 Suppl 1 - P. S127–32
72. Suzuki T., Katz R., Jenny N.S., Zakai N.A., LeWinter M.M., Barzilay J.I., Cushman M. Metabolic syndrome, inflammation, and incident heart failure in the elderly: the cardiovascular health study // *Circ Heart Fail.* - 2008. - V. 1 - № 4 - P. 242–248
73. Chan K.C., Hui A.B., Wong N., Lau T.K., Leung T.N., Lo K.W., Lo Y.M. Investigation of the genomic representation of plasma DNA in pregnant women by comparative genomic hybridization analysis: a feasibility study // *Clin Chem.* - 2005. - V. 51 - № 12 - P. 2398–401
74. Vasil'eva I.N., Zinkin V.N. The value of low-molecular-weight DNA of blood plasma in the diagnostic of the pathological processes of different genesis // *Biomed Khim.* - 2013. - V. 59 - № 3 - P. 358–373
75. Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В., Калашникова Е.А., Кокаровцева С.Н., Еголина Н.А., Вейко Н.Н. CpG-ДНК ингибирует клеточные реакции, сопровождающие развитие адаптивного ответа в лимфоцитах человека после воздействия рентгеновского излучения в малых дозах // *Радиационная биология. Радиоэкология.* - 2009. - V. 49 - № 1 - P. 34–41
76. Васильева И.Н., Подгорная О.И., Беспалов В.Г. Нуклеосомная фракция внеклеточной ДНК как показатель апоптоза // *Цитология.* - 2015. - V. 57 - № 2 - P. 87–94
77. 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 myelogenousleukaemia // *Br J Haematol.* - 1994. - V. 86 - № 4 - P. 774–779
78. 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 Biomarkers Prev.* - 1994. - V. 3 - № 1 - P. 67–71
79. Goebel G., Zitt M., Zitt M., Müller H.M. Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias // *Dis Markers.* - 2005. - V. 21 - № 3 - P. 105–120
80. Ramirez J.L., Sarries C., de Castro P.L., Roig B., Queralt C., Escuin D., de Aguirre I., Sanchez J.M., Manzano J.L., Margelí M., Sanchez J.J., Astudillo J., Taron M., Rosell R. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients // *Cancer Lett.* - 2003. - V. 193 - № 2 - P. 207–216

81. Hayashi T., Sugahara K., Dateki N., Yamada Y., Sudou R., Kanematsu T., Kamihira S. Characteristics of plasma DNA and its application for detection of K-ras gene mutation // *Rinsho Byori*. - 2000. - V. 48 - № 6 - P. 547–553
82. Domínguez G., Carballido J., Silva J., Silva J.M., García J.M., Menéndez J., Provencio M., España P., Bonilla F. p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients // *Clin Cancer Res.* - 2002. - V. 8 - № 4 - P. 980–985
83. 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. - V. 115 - № 1 - P. 55–62
84. Dianxu F., Shengdao Z., Tianquan H., Yu J., Ruoqing L., Zurong Y., Xuezhi W. A prospective study of detection of pancreatic carcinoma by combined plasma K-ras mutations and serum CA19-9 analysis // *Pancreas.* - 2002. - V. 25 - № 4 - P. 336–341
85. Kopreski M.S., Benko F.A., Borys D.J., Khan A., McGarrity T.J., Gocke C.D. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA // *J Natl Cancer Inst.* - 2000. - V. 92 - № 11 - P. 918–923
86. Gonzalez R., Silva J.M., Sanchez A., Dominguez G., Garcia J.M., Chen X.Q., Stroun M., Provencio M., España P., Anker P., Bonilla F. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance // *Ann Oncol.* - 2000. - V. 11 - № 9 - P. 1097–1104
87. Swisher E.M., Wollan M., Mahtani S.M., Willner J.B., Garcia R., Goff B.A., King M.C. Tumor-specific p53 sequences in blood and peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer // *Am J Obstet Gynecol.* - 2005. - V. 193 - № 3 Pt 1 - P. 662–667
88. Su P.C., Zhang L.H., Wan W.H., Ren H., Zhang G.G., Wang Y., Deng G.R., Ji J.F. Detection of p53 gene mutation in the plasma of gastric cancer patients // *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* - 2005. - V. 37 - № 5 - P. 523–526
89. Wang J.Y., Hsieh J.S., Chen C.C., Tzou W.S., Cheng T.L., Chen F.M., Huang T.J., Huang Y.S., Huang S.Y., Yang T., Lin S.R. Alterations of APC, c-met, and p53 genes in tumor tissue and serum of patients with gastric cancers // *J Surg Res.* - 2004. - V. 120 - № 2 - P. 242–248
90. Wang Y., Yamaguchi Y., Watanabe H., Ohtsubo K., Motoo Y., Sawabu N. Detection of p53 gene mutations in the supernatant of pancreatic juice and plasma from patients with pancreatic carcinomas // *Pancreas.* - 2004. - V. 28 - № 1 - P. 13–9
91. Ito T., Kaneko K., Makino R., Konishi K., Kurahashi T., Ito H., Katagiri A., Kushima M., Kusano M., Mitamura K., Imawari M. Clinical significance in molecular detection of p53 mutation in serum of patients with colorectal carcinoma // *Oncol Rep.* - 2003. - V. 10 - № 6 - P. 1937–1942

92. Hibi K., Robinson C.R., Booker S., Wu L., Hamilton S.R., Sidransky D., Jen J. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients // *Cancer Res.* - 1998. - V. 58 - № 7 - P. 1405–1407
93. Kimbi G.C., Kew M.C., Yu M.C., Arakawa K., Hodgkinson J., Kimbi G.C., Kew M.C., Yu M.C., Arakawa K., Hodgkinson J. 249ser p53 mutation in the serum of black southern African patients with hepatocellular carcinoma // *J Gastroenterol Hepatol.* - 2005. - V. 20 - № 8 - P. 1185–1190
94. Kirk G.D., Lesi O.A., Mendy M., Szymańska K., Whittle H., Goedert J.J., Hainaut P., Montesano R. 249(ser) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma // *Oncogene.* - 2005. - V. 24 - № 38 - P. 5858–5867
95. Di G.H., Liu G., Wu J., Shen Z.Z., Shao Z.M. Peripheral blood mutated p53 DNA and its clinical value in human breast cancer // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* - 2003. - V. 25 - № 2 - P. 137–140
96. Montesano R., Hainaut P., Wild C.P. Hepatocellular carcinoma: from gene to public health // *J Natl Cancer Inst.* - 1997. - V. 89 - № 24 - P. 1844–1851
97. Jackson P.E., Kuang S.Y., Wang J.B., Strickland P.T., Muñoz A., Kensler T.W., Qian G.S., Groopman J.D. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients // *Carcinogenesis.* - 2003. - V. 24 - № 10 - P. 1657–1663
98. Dong-Dong L., Xi-Ran Z. Plasma 249Ser p53 mutation in patients with hepatocellular carcinoma residing in a high risk area // *J Cell Mol Med.* - 2003. - V. 7- № 1 - P. 89–92
99. Jiao L., Zhu J., Hassan M.M., Evans D.B., Abbruzzese J.L., Li D. K-ras mutation and p16 and preproenkephalin promoter hypermethylation in plasma DNA of pancreatic cancer patients: in relation to cigarette smoking // *Pancreas.* - 2007. - V. 34 - № 1 - P. 55–62
100. Magistrelli P., Neri M., Granone P., Cesario A., Paleari L., Russo P. K-ras mutations in circulating DNA from pancreatic and lung cancers: bridging methodology for a common validation of the molecular diagnosis value // *Pancreas.* - 2008. - V. 37 - № 1 - P. 101–102
101. Rosell R., Molina M.A., Serrano M.J. EGFR mutations in circulating tumour DNA // *Lancet* - 2012. - V. 13 - № 10 - P. 971–973
102. Goto K., Ichinose Y., Ohe Y., Yamamoto N., Negoro S., Nishio K., Itoh Y., Jiang H., Duffield E., McCormack R., Saijo N., Mok T., Fukuoka M. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer // *J Thorac Oncol.* - 2012. - V. 7 - № 1 - P. 115–121
103. Taniguchi K., Uchida J., Nishino K., Kumagai T., Okuyama T., Okami J., Higashiyama M., Kodama K., Imamura F., Kato K. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas // *Clin Cancer Res.* - 2011. - V. 17 - № 24 - P. 7808–7815

104. Center for Drug Evaluation and Research. Approved Drugs - cobas EGFR Mutation Test v2 [Internet]. U S Food and Drug Administration Home Page. Center for Drug Evaluation and Research; [Updated on Jun 2016]

<https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm504540.htm>.

105. Krishnamurthy N., Spencer E., Torkamani A., Nicholson L. Liquid Biopsies for Cancer: Coming to a Patient near You // *J Clin Med.* - 2017. - V. 6 - № 1 - P. pii: E3

106. Combaret V., Audouy C., Iacono I., Favrot M.C., Schell M., Bergeron C., Puisieux A. Circulating MYCN DNA as a tumor-specific marker in neuroblastoma patients // *Cancer Res.* - 2002. - V. 62 - № 13 - P. 3646–3648

107. Gotoh T., Hosoi H., Iehara T., Kuwahara Y., Osone S., Tsuchiya K., Ohira M., Nakagawara A., Kuroda H., Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction // *J Clin Oncol.* - 2005. - V. 23 - № 22 - P. 5205–5210

108. Krishnamurthy N., Spencer E., Torkamani A., Nicholson L. Liquid Biopsies for Cancer: Coming to a Patient near You // *J Clin Med.* - 2017. - V. 6 - № 1 - P. pii: E3

109. Azad A.A., Volik S.V., Wyatt A.W., Haegert A., Le Bihan S., Bell R.H., Anderson S.A., McConeghy B., Shukin R., Bazov J., Youngren J., Paris P., Thomas G., Small E.J., Wang Y., Gleave M.E., Collins C.C., Chi K.N. Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer // *Clin Cancer Res.* - 2015. - V. 21 - № 10 - P. 2315–2324

110. Couraud S., Vaca-Paniagua F., Villar S., Oliver J., Schuster T., Blanché H., Girard N., Trédaniel J., Guillemainault L., Gervais R., Prim N., Vincent M., Margery J., Larivé S., Foucher P., Duvert B., Vallee M., Le Calvez-Kelm F., McKay J., Missy P., Morin F., Zalcman G., Olivier M., Souquet P.J.; BioCAST/IFCT-1002 investigators. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002 // *Clin Cancer Res.* - 2014. - V. 20 - № 17 - P. 4613–4624

111. Oxnard G.R., Paweletz C.P., Kuang Y., Mach S.L., O'Connell A., Messineo M.M., Luke J.J., Butaney M., Kirschmeier P., Jackman D.M., Jänne P.A. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA // *Clin Cancer Res.* - 2014. - V. 20 - № 6 - P. 1698–1705

112. Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? // *Ann Transl Med.* - 2017. - V. 5 - № 3 - P. 46

113. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma // *Nature.* - 2014. - V. 511 - № 7511 - P. 543–550

114. Piciocchi M., Cardin R., Vitale A., Vanin V., Giacomini A., Pozzan C., Maddalo G., Cillo U., Guido M., Farinati F. Circulating free DNA in the progression of liver damage to hepatocellular carcinoma // *Hepatol Int.* - 2013. - V. 7 - № 4 - P. 1050–1057

115. Liao W., Yang H., Xu H., Wang Y., Ge P., Ren J., Xu W., Lu X., Sang X., Zhong S., Zhang H., Mao Y. Noninvasive detection of tumor-associated mutations from circulating cell-free DNA in hepatocellular carcinoma patients by targeted deep sequencing // *Oncotarget.* - 2016. - V. 7 - № 26 - P. 40481–40490

116. Hamakawa T., Kukita Y., Kurokawa Y., Miyazaki Y., Takahashi T., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Taniguchi K., Takiguchi S., Mori M., Doki Y., Kato K. Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA // *Br J Cancer.* - 2015. - V. 112 - № 2 - P. 352–356

117. Shoda K., Ichikawa D., Fujita Y., Masuda K., Hiramoto H., Hamada J., Arita T., Konishi H., Komatsu S., Shiozaki A., Kakihara N., Okamoto K., Taniguchi H., Imoto I., Otsuji E. Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer // *Gastric Cancer.* - 2017. - V. 20 - № 1 - P. 126–135

118. De Mattos-Arruda L., Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer // *Mol Oncol.* - 2016. - V. 10 - № 3 - P. 464–74

119. Sato K.A., Hachiya T., Iwaya T., Kume K., Matsuo T., Kawasaki K., Abiko Y., Akasaka R., Matsumoto T., Otsuka K., Nishizuka S.S. Individualized Mutation Detection in Circulating Tumor DNA for Monitoring Colorectal Tumor Burden Using a Cancer-Associated Gene Sequencing Panel // *PLoS One.* - 2016. - V. 11 - № 1 - P. e0146275

120. Malapelle U., Mayo de-Las-Casas C., Rocco D., Garzon M., Pisapia P., Jordana-Ariza N., Russo M., Sgariglia R., De Luca C., Pepe F., Martinez-Bueno A., Morales-Espinosa D., González-Cao M., Karachaliou N., Viteri Ramirez S., Bellevicine C., Molina-Vila M.A., Rosell R., Troncone G. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients // *Br J Cancer.* - 2017. - V. 116 - № 6 - P. 802–810

121. Zeng Q., Xie L., Zhou N., Liu M., Song X. Detection of PIK3CA Mutations in Plasma DNA of Colorectal Cancer Patients by an Ultra-Sensitive PNA-Mediated PCR // *Mol Diagn Ther.* - 2000. - V. 21 - № 4 - P. 443–451

122. Ling E, Fich A, Man S, Wolfson M, Mikhailowsky R, Lamprecht SA. Detection of tumor mutant APC DNA in plasma of patients with sporadic colorectal cancer // *In Vivo.* 2000 Jul-Aug;14(4):543-6.

123. Ueda M., Iguchi T., Masuda T., Nakahara Y., Hirata H., Uchi R., Niida A., Momose K., Sakimura S., Chiba K., Eguchi H., Ito S., Sugimachi K., Yamasaki M., Suzuki Y., Miyano S., Doki Y., Mori M., Mimori K. Somatic mutations in plasma cell-free DNA are diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma recurrence // *Oncotarget.* - 2016. - V. 7 - № 38 - P. 62280–62291

124. Wang Y., Springer S., Mulvey C.L., Silliman N., Schaefer J., Sausen M., James N., Rettig E.M., Guo T., Pickering C.R., Bishop J.A., Chung C.H., Califano J.A., Eisele D.W., Fakhry C., Gourin C.G., Ha P.K., Kang H., Kiess A., Koch W.M., Myers J.N., Quon H., Richmon J.D., Sidransky D., Tufano R.P., Westra W.H., Bettegowda C., Diaz L.A. Jr., Papadopoulos N., Kinzler K.W., Vogelstein B., Agrawal N. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas // *Sci Transl Med.* - 2015. - V. 7 - № 293 - P. 293ra104
125. Vdovichenko K.K., Markova S.I., Belokhvostov A.S. Mutant form of BRAF gene in blood plasma of cancer patients // *Ann N Y Acad Sci.* - 2004. - V. 1022 - P. 228–231
126. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways // *Nature.* - 2008. - V. 455 - № 7216 - P. 1061–1068
127. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma // *Nature.* - 2011. - V. 474 - № 7353 - P. 609–615
128. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C., Schultz N., Cherniack A.D., Akbani R., Liu Y., Shen H., Robertson A.G., Pashtan I., Shen R., Benz C.C., Yau C., Laird P.W., Ding L., Zhang W., Mills G.B., Kucherlapati R., Mardis E.R., Levine D.A. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma // *Nature.* - 2013. - V. 497 - № 7447 - P. 67–73
129. Sorensen B.S., Mortensen L.S., Andersen J., Nexø E. Circulating HER2 DNA after trastuzumab treatment predicts survival and response in breast cancer // *Anticancer Res.* - 2010. - V. 30 - № 6 - P. 2463–2468
130. Rhodes C.H., Honsinger C., Sorenson G.D. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid // *J Neuropathol Exp Neurol.* - 1994. - V. 53 - № 4 - P. 364–368
131. Diehl F., Li M., Dressman D., He Y., Shen D., Szabo S., Diaz L.A. Jr., Goodman S.N., David K.A., Juhl H., Kinzler K.W., Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2005. - V. 102 - № 45 - P. 16368–16373
132. Gocke C.D., Benko F.A., Kopreski M.S., McGarrity T.J. P53 and APC mutations are detectable in the plasma and serum of patients with colorectal cancer (CRC) or adenomas // *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Apr;906:44-50. - 2000. - V. 906 - P. 44–50
133. Frickhofen N., Müller E., Sandherr M., Binder T., Bangerter M., Wiest C., Enz M., Heimpel H. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia // *Blood.* Dec - 1997. - V. 90 - № 12 - P. 4953–4960
134. López-Flores I., Garrido-Ramos M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes // *Genome Dyn.* - 2012. - V. 7 - P. 1–28

135. Mittra I., Khare N.K., Raghuram G.V., Chaubal R., Khambatti F., Gupta D., Gaikwad A., Prasanna P., Singh A., Iyer A., Singh A., Upadhyay P., Nair N.K., Mishra P.K., Dutt A. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes // *J Biosci.* - 2015. - V. 40 - № 1 - P. 91–111
136. Pumpernik D., Oblak B., Borstnik B. Replication slippage versus point mutation rates in short tandem repeats of the human genome // *Mol Genet Genomics.* - 2008. - V. 279 - № 1 - P. 53–61
137. Podgornaya O.I., Vasilyeva I.N., Bepalov V.G. Heterochromatic Tandem Repeats in the Extracellular DNA // *Adv Exp Med Biol.* - 2016. - V. 924 - P. 85–89
138. Schwarzenbach H., Alix-Panabières C., Müller I., Letang N., Vendrell J.P., Rebillard X., Pantel K. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer // *Clin Cancer Res.* - 2009. - V. 15 - № 3 - P. 1032–1038
139. Li J., Harris L., Mamon H., Kulke M.H., Liu W.H., Zhu P., Makrigiorgos G.M. Whole genome amplification of plasma-circulating DNA enables expanded screening for allelic imbalance in plasma // *J Mol Diagn.* - 2006. - V. 8 - № 1 - P. 22–30
140. Kohler C., Barekati Z., Radpour R., Zhong X.Y. Cell-free DNA in the circulation as a potential cancer biomarker. // *Anticancer Res.* - 2011. - V. 31 - № 8 - P. 2623–2628
141. Sozzi G., Musso K., Ratcliffe C., Goldstraw P., Pierotti M.A., Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res.* - 1999. - V. 5 - № 10 - P. 2689–2692
142. Yegnasubramanian S. Preparation of fragment libraries for next-generation sequencing on the applied biosystems SOLiD platform // *Methods Enzymol.* - 2013. - V. 529 - P. 185–200
143. Carpagnano G.E., Foschino-Barbaro M.P., Spanevello A., Resta O., Carpagnano F., Mulé G., Pinto R., Tommasi S., Paradiso A. 3p microsatellite signature in exhaled breath condensate and tumor tissue of patients with lung cancer // *Am J Respir Crit Care Med.* - 2008. - V. 177 - № 3 - P. 337–341
144. Goessl C., Müller M., Straub B., Miller K. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. // *Eur Urol.* - 2002. - V. 41 - № 6 - P. 668–676
145. Chen X., Bonnefoi H., Diebold-Berger S., Lyautey J., Lederrey C., Faltin-Traub E., Stroun M., Anker P. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer // *Clin Cancer Res.* - 1999. - V. 5 - № 9 - P. 2297–2303
146. Nunes D.N., Kowalski L.P., Simpson A.J. Circulating tumor-derived DNA may permit the early diagnosis of head and neck squamous cell carcinomas // *Int J Cancer.* - 2001. - V. 92 - № 2 - P. 214–219

147. Von Knobloch R., Hegele A., Brandt H., Varga Z., Wille S., Kälble T., Heidenreich A., Hofmann R. High frequency of serum DNA alterations in renal cell carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis // *Int J Cancer*. - 2002. - V. 98 - № 6 - P. 889–894
148. Silva J.M., Dominguez G., Garcia J.M., Gonzalez R., Villanueva M.J., Navarro F., Provencio M., San Martin S., España P., Bonilla F. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations // *Cancer Res*. - 1999. - V. 59 - № 13 - P. 3251–3256
149. Batzer M.A., Deininger P.L. Alu repeats and human genomic diversity // *Nat Rev Genet*. - 2002. - V. 3 - № 5 - P. 370–379
150. Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 2008. - V. 105 - № 42 - P. 16266–16271
151. Van der Vaart M., Semenov D.V., Kuligina E.V., Richter V.A., Pretorius P.J. Characterisation of circulating DNA by parallel tagged sequencing on the 454 platform // *Clin Chim Acta*. - 2009. - V. 409 - № 1-2 - P. 21–27
152. Singer M.F. SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes // *Cell*. - 1982. - V. 28 - № 3 - P. 433–434
153. Kriegs J.O., Churakov G., Jurka J., Brosius J., Schmitz J. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates // *Trends Genet*. - 2007. - V. 23 - № 4 - P. 158–161
154. Umylny B., Presting G., Efird J.T., Klimovitsky B.I., Ward W.S. Most human Alu and murine B1 repeats are unique // *J Cell Biochem*. - 2007. - V. 102 - № 1 - P. 110–121
155. Noutsopoulos D. On the Concept Of Retrotransposons: Controlling Genome and Making Stress Memories // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research*. - 2016. - V. 2 - № 4 - P. 194–202
156. Beck A., Bergman D.A., Rahm A.K., Dearing J.W., Glasgow R.E. Using Implementation and Dissemination Concepts to Spread 21st-century Well-Child Care at a Health Maintenance Organization // *Perm J*. - 2009. - V. 13 - № 3 - P. 10–18
157. Lehner J., Stötzer O.J., Fersching D.M., Nagel D., Holdenrieder S. Plasma DNA integrity indicates response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally confined breast cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther*. - 2013. - V. 51 - № 1 - P. 59–62
158. Adams J.W., Kaufman R.E., Kretschmer P.J., Harrison M., Nienhuis A.W. A family of long reiterated DNA sequences, one copy of which is next to the human beta globin gene // *Nucleic Acids Res*. - 1980. - V. 8 - № 24 - P. 6113–6128
159. Singer MF. SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes // *Cell*. 1982 - 1982. - V. 28 - № 3 - P. 433–434

160. Servomaa K., Rytömaa T. UV light and ionizing radiations cause programmed death of rat chloroleukaemia cells by inducing retropositions of a mobile DNA element (L1Rn) // *Int J Radiat Biol.* - 1990. - V. 57 - № (2) - P. 331–343
161. Казаков В.И., Божков В.М., Линде В.А., Репина М.А., Михайлов В.М. Внеклеточная ДНК в крови беременных женщин // *Цитология.* - 1995. - V. 37 - № 3 - P. 232–235
162. Holmes S.E., Dombroski B.A., Krebs C.M., Boehm C.D., Kazazian H.H.Jr. A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion // *Nat Genet.* - 1994. - V. 7 - № 2 - P. 143–148
163. Katzir N., Rechavi G., Cohen J.B., Unger T., Simoni F., Segal S., Cohen D., Givol D. "Retroposon" insertion into the cellular oncogene c-myc in canine transmissible venereal tumor // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1985. - V. 82 - № 4 - P. 1054–1058
164. Kingsmore S.F., Giros B., Suh D., Bieniarz M., Caron M.G., Seldin M.F. Glycine receptor beta-subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion // *Nat Genet.* - 1994. - V. 7 - № 2 - P. 136–141
165. Helman E., Lawrence M., Stewart C., Sougnez C., Getz G., Meyerson M. Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing // *Genome Res.* - 2014. - V. 24 - № 7 - P. 1053–1063
166. Rodríguez-Martín C., Cidre F., Fernández-Teijeiro A., Gómez-Mariano G., de la Vega L., Ramos P., Zaballos Á., Monzón S., Alonso J. Familial retinoblastoma due to intronic LINE-1 insertion causes aberrant and noncanonical mRNA splicing of the RB1 gene // *J Hum Genet.* - 2016. - V. 61 - № 5 - P. 463–466
167. Roberts S.A., Lawrence M.S., Klimczak L.J., Grimm S.A., Fargo D., Stojanov P., Kiezun A., Kryukov G.V., Carter S.L., Saksena G., Harris S., Shah R.R., Resnick M.A., Getz G., Gordenin D.A. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers // *Nat Genet.* - 2013. - V. 45 - № 9 - P. 970–976
168. Stacey S.N., Kehr B., Gudmundsson J., Zink F., Jonasdottir A., Gudjonsson S.A., Sigurdsson A., Halldorsson B.V., Agnarsson B.A., Benediktsdottir K.R., Aben K.K., Vermeulen S.H., Cremers R.G., Panadero A., Helfand B.T., Cooper P.R., Donovan J.L., Hamdy F.C., Jinga V., Okamoto I., Jonasson J.G., Tryggvadottir L., Johannsdottir H., Kristinsdottir AM., Masson G., Magnusson OT., Iordache PD., Helgason A., Helgason H., Sulem P., Gudbjartsson DF., Kong A., Jonsson E., Barkardottir RB., Einarsson G.V., Rafnar T., Thorsteinsdottir U., Mates I.N., Neal D.E., Catalona W.J., Mayordomo J.I., Kiemeny L.A., Thorleifsson G., Stefansson K. Insertion of an SVA-E retrotransposon into the CASP8 gene is associated with protection against prostate cancer // *Hum Mol Genet.* - 2016. - V. 25 - № 5 - P. 1008–1018

169. Xue X., Zhu Y.M., Woll P.J. Circulating DNA and lung cancer // *Ann N Y Acad Sci.* - 2006. - V. 1075 - P. 154–164
170. Akers S.N., Moysich K., Zhang W., Collamat Lai G., Miller A., Lele S., Odunsi K., Karpf A.R. LINE1 and Alu repetitive element DNA methylation in tumors and white blood cells from epithelial ovarian cancer patients // *Gynecol Oncol.* - 2014. - V. 132 - № 2 - P. 462–467
171. Park S.Y., Seo A.N., Jung H.Y., Gwak J.M., Jung N., Cho N.Y., Kang G.H. Alu and LINE-1 hypomethylation is associated with HER2 enriched subtype of breast cancer // *PLoS One.* - 2014. - V. 9 - P. e100429
172. Lo Y.M., Chan L.Y., Lo K.W., Leung S.F., Zhang J., Chan A.T., Lee J.C., Hjelm N.M., Johnson P.J., Huang D.P. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Res.* - 1999. - V. 59 - № 6 - P. 1188–1191
173. Dong SM., Pai S.I., Rha S.H, Hildesheim A., Kurman R.J., Schwartz P.E., Mortel R., McGowan L., Greenberg M.D., Barnes W.A., Sidransky D. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* - 2002. - V. 11 - № 1 - P. 3–6
174. Gudleviciene Z., Smailyte G., Mickonas A., Pikelis A. Prevalence of human papillomavirus and other risk factors in Lithuanian patients with head and neck cancer // *Oncology.* - 2009. - V. 76 - № 3 - P. 205–208
175. Liang J., Xu A., Xie Y., Awonuga A.O., Lin Z. Some but not all of HLA-II alleles are associated with cervical cancer in Chinese women // *Cancer Genet Cytogenet.* - 2008. - V. 187 - № 2 - P. 95–100
176. Ziegler A., Zangemeister-Wittke U., Stahel R.A. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? // *Cancer Treat Rev.* - 2002. - V. 28 - № 5 - P. 255–271
177. Zachariah R.R., Schmid S., Buerki N., Radpour R., Holzgreve W., Zhong X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors // *Obstet Gynecol.* - 2008. - V. 112 - № 4 - P. 843–850
178. Mehra N., Penning M., Maas J., van Daal N., Giles R.H., Voest E.E. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer // *Clin Cancer Res.* - 2007. - V. 13 - № 2 Pt 1 - P. 421–426
179. Jerónimo C., Nomoto S., Caballero O.L., Usadel H., Henrique R., Varzim G., Oliveira J., Lopes C., Fliss M.S., Sidransky D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids // *Oncogene.* - 2001. - V. 20 - № (37) - P. 5195–5198
180. Fliss M.S., Usadel H., Caballero O.L., Wu L., Buta M.R., Eleff S.M., Jen J., Sidransky D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. // *Science* - 2000. - V. 287 - № 5460 - P. 2017–2019

181. Hibi K., Nakayama H., Yamazaki T., Takase T., Taguchi M., Kasai Y., Ito K., Akiyama S., Nakao A. Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients // *Int J Cancer*. - 2001. - V. 94 - № 3 - P. 429–431
182. Nomoto S., Yamashita K., Koshikawa K., Nakao A., Sidransky D. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clin Cancer Res*. - 2002. - V. 8 - № 2 - P. 481–487
183. Takeuchi H., Fujimoto A., Hoon D.S. Detection of mitochondrial DNA alterations in plasma of malignant melanoma patients // *Ann N Y Acad Sci*. - 2004. - V. 1022 - P. 50–54
184. Chiu R.W., Chan L.Y., Lam N.Y., Tsui N.B., Ng E.K., Rainer T.H., Lo Y.M. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma // *Clin Chem*. - 2003. - V. 49 - № 5 - P. 719–726
185. Tuboly E., McIlroy D., Briggs G., Lott N., Balogh Z.J. Clinical implications and pathological associations of circulating mitochondrial DNA // *Front Biosci (Landmark Ed)*. - 2017. - V. 22 - P. 1011–1022
186. Morshed M., Hlushchuk R., Simon D., Walls A.F., Obata-Ninomiya K., Karasuyama H., Djonov V., Eggel A., Kaufmann T., Simon H.U., Yousefi S. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils // *J Immunol*. - 2014. - V. 192 - P. 5314–5323
187. Yousefi S., Gold J.A., Andina N., Lee J.J., Kelly A.M., Kozlowski E., Schmid I., Straumann A., Reichenbach J., Gleich G.J., Simon H.U. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense // *Nat Med*. - 2008. - V. 14 - № 9 - P. 949–953
188. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E., Schmid I., Simon H.U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps // *Cell Death Differ*. - 2009. - V. 16 - № 11 - P. 1438–1444
189. Yousefi S., Morshed M., Amini P., Stojkov D., Simon D., von Gunten S., Kaufmann T., Simon H.U. Basophils exhibit antibacterial activity through extracellular trap formation // *Allergy*. - 2015. - V. 70 - № 9 - P. 1184–1188
190. Thieblemont N., Wright H.L., Edwards S.W., Witko-Sarsat V. Human neutrophils in auto-immunity // *Semin Immunol*. - 2016. - V. 28 - № 2 - P. 159–173
191. Cossarizza A., Pinti M., Nasi M., Gibellini L., Manzini S., Roat E., De Biasi S., Bertoncelli L., Montagna J.P., Bisi L., Manzini L., Trenti T., Borghi V., Mussini C. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation // *Mitochondrion*. - 2011. - V. 11 - № 5 - P. 750–755
192. Liu S., Feng M., Guan W. Mitochondrial DNA sensing by STING signaling participates in inflammation, cancer and beyond // *Int J Cancer*. - 2016. - V. 139 - № 4 - P. 736–741

193. Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K., Malech H.L., Ledbetter J.A., Elkon K.B., Kaplan M.J. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease // *Nat Med.* - 2016. - V. 22 - № (2) - P. 146–153
194. Kim D.D., Kim T.T., Walsh T., Kobayashi Y., Matisse T.C., Buyske S., Gabriel A. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. *Genome Res.* - 2004. - V. 14 - № 9 - P. 1719–1725
195. Wong I.H., Lo Y.M., Zhang J., Liew C.T., Ng M.H., Wong N., Lai P.B., Lau W.Y., Hjelm N.M., Johnson P.J. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients // - 1999. - V. 59 - № 1 - P. 71–73
196. Chang H., Yi B., Li L., Zhang H.Y., Sun F., Dong S.Q., Cao Y. Methylation of tumor associated genes in tissue and plasma samples from liver disease patients // *Exp Mol Pathol.* - 2008. - V. 85 - № 2 - P. 96–100
197. 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., Kiviat N.B., Sidransky D. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer // *J Clin Oncol.* - 2006. - V. 24 - № 26 - P. 4262–4269
198. Seeber L.M., van Diest P.J. Epigenetics in ovarian cancer // *Methods Mol Biol.* - 2012. - V. 863 - P. 253–269
199. Ibanez de Caceres I., Battagli C., Esteller M., Herman J.G., Dulaimi E., Edelson M.I., Bergman C., Ehya H., Eisenberg B.L., Cairns P. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients // *Cancer Res.* - 2004. - V. 64 - № 18 - P. 6476–6481
200. Dulaimi E., Hillinck J., Ibanez de Caceres I., Al-Saleem T., Cairns P. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients // *Clin Cancer Res.* - 2004. - V. 10 - № 18 Pt 1 - P. 6189–6193
201. 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. - V. 1137 - P. 36–40
202. 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. - V. 115 - № 1 - P. 55–62
203. Anker P., Stroun M., Maurice P.A. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes // *Cancer Res.* - 1976. - V. 36 - № 8 - P. 2832–2839
204. Tang P.S., Mura M., Seth R., Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* - 2007. - V. 294 - № 4 - P. L632–L641

205. Weerasinghe P., Buja L.M. Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death // *Exp Mol Pathol.* - 2012. - V. 93 - № 3 - P. 302–308
206. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science.* - 2004. - V. 303 - № 5663 - P. 1532–1535
207. Jiang N., Reich C.F. 3rd, Pisetsky D.S. Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells // *Blood.* - 2003. - V. 102 - № 6 - P. 2243–2250
208. Wan J.C.M., Massie C., Garcia-Corbacho J., Mouliere F., Brenton J.D., Caldas C., Pacey S., Baird R., Rosenfeld N. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. // *Nat Rev Cancer.* - 2017. - V. 17 - № 4 - P. 223–238
209. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation // *Exp Cell Res.* - 2000. - V. 256 - № (1) - P. 12–18
210. Kuroi K., Tanaka C., Toi M. Plasma Nucleosome Levels in Node-Negative Breast Cancer Patients // *Breast Cancer.* - 1999. - V. 6 - № 4 - P. 361–364
211. Pepys M.B., Butler P.J. Serum amyloid P component is the major calcium-dependent specific DNA binding protein of the serum // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1987. - V. 148 - № 1 - P. 308–313
212. Butler P.J., Tennent GA, Pepys MB. Pentraxin-chromatin interactions: serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin // *J Exp Med.* - 1990. - V. 172 - № 1 - P. 13–18
213. Holdenrieder S., Nagel D., Schalhorn A., Heinemann V., Wilkowski R., von Pawel J., Raith H., Feldmann K., Kremer A.E., Müller S., Geiger S., Hamann G.F., Seidel D., Stieber P. Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer // *Ann N Y Acad Sci.* - 2008. - V. 1137 - P. 180–189
214. Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA--a new paradigm in genetic behaviour // *Clin Chim Acta.* - 2011. - V. 412 - № 11-12 - P. 806–811
215. Lee K.H, Cavanaugh L., Leung H., Yan F., Ahmadi Z., Chong B.H., Passam F. Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in patients with thrombosis and sepsis // *Int J Lab Hematol.* - 2018. - V. 40 - № 4 - P. 392–399
216. Kuroi K., Tanaka C., Toi M. Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients. *Int J Oncol.* - 2001. - V. 19 - № 1 - P. 143–148
217. Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmüller H., Busch M., Fertig G., Fürst H., Schalhorn A., Schmeller N., Untch M., Seidel D. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases // *Int J Cancer.* - 2001. - V. 95 - № 2 - P. 114–120

218. Pilszczek F.H., Salina D., Poon K.K., Fahey C., Yipp B.G., Sibley C.D., Robbins S.M., Green F.H., Surette M.G., Sugai M., Bowden M.G., Hussain M., Zhang K., Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus* // *J Immunol.* - 2010. - V. 185 - № 12 - P. 7413–7425
219. Halicka H.D., Bedner E., Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis // *Exp Cell Res.* - 2000. - V. 260 - № 2 - P. 248–256
220. Morozkin ES, Loseva EM, Morozov IV, Kurilshikov AM, Bondar AA, Rykova EY, Rubtsov NB, Vlassov VV, Laktionov PP. A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing // *Expert Opin Biol Ther.* - 2012. - V. Suppl 1 - P. S11–17
221. Akers J.C., Gonda D., Kim R., Carter B.S., Chen C.C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies // *J Neurooncol.* - 2013. - V. 113 - № 1 - P. 1–11
222. Martelli A.M., Zweyer M., Ochs R.L., Tazzari P.L., Tabellini G., Narducci P., Bortul R.. Nuclear apoptotic changes: an overview // *J Cell Biochem.* - 2001. - V. 82 - № 4 - P. 634–646
223. Huynh K.K., Kay J.G., Stow J.L., Grinstein S. Fusion, fission, and secretion during phagocytosis // *Physiology (Bethesda).* - 2007. – V. 22. - P. 366–372
224. De Almeida C.J., Linden R. Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cell Mol Life Sci.* - 2005. - V. 62 - № (14) - P. 1532–1546
225. Bickerstaff M.C., Botto M., Hutchinson W.L., Herbert J., Tennent GA., Bybee A., Mitchell D.A., Cook H.T., Butler P.J., Walport M.J., Pepys M.B. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity // *Nat Med.* - 1999. - V. 5 - № 6 - P. 694–697
226. Fournié G.J., Courtin J.P., Laval F., Chalé J.J., Pourrat J.P., Pujazon M.C., Lauque D., Carles P. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours // *Cancer Lett.* - 1995. - V. 91 - № 2 - P. 221–227
227. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Sumarokov S.V., Kolomiets S.A., Sevostianova N.V., Vlassov V.V. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2004. - V. 23 - № 6-7 - P. 879–883
228. Lam N.Y., Rainer T.H., Chan L.Y., Joynt G.M., Lo Y.M. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients // *Clin Chem.* - 2003. - V. 49 - № 8 - P. 1286–1291

229. Jiang P., Chan C.W., Chan K.C., Cheng S.H., Wong J., Wong V.W., Wong G.L., Chan S.L., Mok T.S., Chan H.L., Lai P.B., Chiu R.W., Lo Y.M. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. // *Oncology*. - 2015. - V. 112 - № 11 - P. E1317–E1325
230. Mouliere F., Thierry A.R. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. // *Expert Opin Biol Ther*. - 2012. - V. 12 Suppl 1 - P. S209–S215
231. Rogers J.C., Boldt D., Kornfeld S., Skinner A., Valeri C.R. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 1972. - V. 69 - № 7 - P. 1685–1689
232. Morozkin E.S., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Vlassov V.V. Extracellular nucleic acids in cultures of long-term cultivated eukaryotic cells // *Ann N Y Acad Sci*. - 2004. - V. 1022 - P. 244–249
233. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation // *Br J Cancer*. - 2006. - V. 94 - № 10 - P. 1492–1495
234. García-Olmo D.C., Samos J., Picazo M.G., Asensio A.I., Toboso I., García-Olmo D. Release of cell-free DNA into the bloodstream leads to high levels of non-tumor plasma DNA during tumor progression in rats // *Cancer Lett*. - 2008. - V. 272 - № 1 - P. 133–140
235. Морозкин Е.С., Сильников В.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В.В., Лактионов П.П. Внеклеточная ДНК в культуре первичных и трансформированных клеток, инфицированных и не инфицированных микоплазмой // *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* - 2009. - V. 147 - P. 67–70
236. Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brügger B., Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes // *Science*. - 2008. - V. 319 - № 5867 - P. 1244–1247
237. Cai J., Guan W., Tan X., Chen C., Li L., Wang N., Zou X., Zhou F., Wang J., Pei F., Chen X., Luo H., Wang X., He D., Zhou L., Jose P.A., Zeng C. SRY gene transferred by extracellular vesicles accelerates atherosclerosis by promotion of leucocyte adherence to endothelial cells // *Clin Sci (Lond)*. - 2015. - V. 129 - № 3 - P. 259–269
238. Zomer A., Maynard C., Verweij F.J., Kamermans A., Schäfer R., Beerling E., Schiffelers R.M., de Wit E., Berenguer J., Ellenbroek S.I.J., Wurdinger T., Pegtel D.M., van Rheeën J. In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior // *Cell*. - 2015. - V. 161 - № 5 - P. 1046–1057
239. Guescini M., Genedani S., Stocchi V., Agnati L.F. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA // *J Neural Transm (Vienna)*. - 2010. - V. 117 - № 1 - P. 1–4

240. Thakur B.K., Zhang H., Becker A., Matei I., Huang Y., Costa-Silva B., Lyden D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. // *Cell Research*. - 2014. - V. 24 - № 6 - P. 766–769
241. Thierry A.R., El Messaoudi S., Gahan P.B., Anker P., Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. // *Cancer Metastasis Rev*. - 2016. - V. 35 - № 3 - P. 347–376.
242. Yoshida Y., Yamamoto H., Morita R., Oikawa R., Matsuo Y., Maehata T., Nosho K., Watanabe Y., Yasuda H., Itoh F. Detection of DNA methylation of gastric juice-derived exosomes in gastric cancer. // *Integr. Mol. Med*. - 2014. - V. 1 - P. 17–21.
243. Kahlert C., Melo S.A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., Kalluri R. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. // *J Biol Chem*. - 2014. - V. 289 - № 7 - P. 3869–3875.
244. Clayton A., Turkes A., Dewitt S., Steadman R., Mason M.D., Hallett M.B. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins // *FASEB J*. - 2004. - V. 18 - № 9 - P. 977–979
245. Denzer K., Kleijmeer M.J., Heijnen H.F., Stoorvogel W., Geuze H.J. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device // *J Cell Sci*. - 2000. - V. 113 - № Pt 19 - P. 3365–3374
246. Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W.T. Jr., Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // *Nat Cell Biol*. - 2008. - V. 10 - № 12 - P. 1470–1476
247. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nat Cell Biol*. - 2007. - V. 9 - № 6 - P. 654–659
248. Waldenström A., Genneback N., Hellman U., Ronquist G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells // *PLoS One*. - 2012. - V. 7 - № 4 - P. e34653
249. Von Köckritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P., Heinemann K., Norrby-Teglund A., Rohde M., Medina E. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation // *Blood*. - 2008. - V. 111 - № 6 - P. 3070–3-80

250. Cai J., Wu G., Tan X., Han Y., Chen C., Li C., Wang N., Zou X., Chen X., Zhou F., He D., Zhou L., Jose P.A., Zeng C. Transferred BCR/ABL DNA from K562 extracellular vesicles causes chronic myeloid leukemia in immunodeficient mice // *PLoS One*. - 2014. - V. 9 - № 8 - P. e105200
251. Guescini M., Guidolin D., Vallorani L., Casadei L., Gioacchini A.M., Tibollo P., Battistelli M., Falcieri E., Battistin L., Agnati L.F., Stocchi V. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction // *Exp Cell Res*. - 2010. - V. 316 - № 12 - P. 1977–1984
252. Balaj L., Lessard R., Dai L., Cho Y.J., Pomeroy S.L., Breakefield X.O., Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences // *Nat Commun*. - 2011. - V. 2 - P. 180
253. Lázaro-Ibáñez E., Sanz-Garcia A., Visakorpi T., Escobedo-Lucea C., Siljander P., Ayuso-Sacido A., Yliperttula M. Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes // *Prostate*. - 2014. - V. 74 - № 14 - P. 1379–1390
254. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции // *Иммунопатология, Аллергология, Инфектология*. - 2012. - V. 4 - P. 23–32
255. Palmer L.J., Chapple I.L., Wright H.J., Roberts A., Cooper P.R. Extracellular deoxyribonuclease production by periodontal bacteria // *J Periodontal Res*. - 2012. - V. 47 - № 4 - P. 439–445
256. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // *J Cell Biol*. - 2007. - V. 176(2) - P. 231–241
257. Douda D.N., Yip L., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis // *Blood*. - 2014. - V. 123 - № 4 - P. 597–600
258. Lippolis J.D., Reinhardt T.A., Goff J.P., Horst R.L. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk // *Vet Immunol Immunopathol*. - 2006. - V. 113 - № 1-2 - P. 248–255
259. Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, DeLeo FR. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2003. - V. 100 - № 19 - P. 10948–10953
260. Miyata T., Fan X. A second hit for TMA // *Blood*. - 2012. - V. 120 - № (6) - P. 1152–1154

261. 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. - V. 7 - № 2 - P. e32366
262. Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D., Weiss J., Zychlinsky A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria // *Nature*. - 2002. - V. 417 - № 6884 - P. 91–94
263. Papayannopoulos V., Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons // *Trends Immunol.* - 2009. - V. 30 - № 11 - P. 513–521
264. Flo T.H., Smith K.D., Sato S., Rodriguez D.J., Holmes M.A., Strong R.K., Akira S., Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron // *Nature*. - 2004. - V. 432 - № 7019 - P. 917–921
265. Cheng O.Z., Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases // *Front Immunol.* - 2013. - V. 4 - P. 1
266. Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J., Barthwal M.K., Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition // *PLoS One*. - 2012. - V. 7 - № 10 - P. e48111
267. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H., Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood // *Nat Med*. - 2007. - V. 13 - № 4 - P. 463–469
268. Doua D.N., Jackson R., Grasemann H., Palaniyar N. Innate immune collectin surfactant protein D simultaneously binds both neutrophil extracellular traps and carbohydrate ligands and promotes bacterial trapping // *J Immunol.* - 2011. - V. 187 - № 4 - P. 1856–1865
269. Sangaletti S., Tripodo C., Chiodoni C., Guarnotta C., Cappetti B., Casalini P., Piconese S., Parenza M., Guiducci C., Vitali C., Colombo M.P. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity // *Blood*. - 2012. - V. 120 - № 15 - P. 3007–3018
270. Jorch S.K., Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease // *Nat Med*. - 2017. - V. 23 - № 3 - P. 279–287
271. Fuchs T.A., Brill A., Wagner D.D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2012. - V. 32- № 8 - P. 1777–1783
272. Wieland C.W., Florquin S., Maris N.A., Hoebe K., Beutler B., Takeda K., Akira S., van der Poll T. The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung // *J Immunol.* - 2005. - V. 175 - № 9 - P. 6042–6049

273. Farrera C., Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process // *J Immunol.* - 2013. - V. 191 - № 5 - P. 2647–2656
274. Schauer C., Janko C., Munoz L.E., Zhao Y., Kienhöfer D., Frey B., Lell M., Manger B., Rech J., Naschberger E., Holmdahl R., Krenn V., Harrer T., Jeremic I., Bilyy R., Schett G., Hoffmann M., Herrmann M. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines // *Nat Med.* - 2014. - V. 20 - № 5 - P. 511–517
275. Pham D.L., Ban G.Y., Kim S.H., Shin Y.S., Ye Y.M., Chwae Y.J., Park H.S. Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma // *Clin Exp Allergy.* - 2017. - V. 47 - № 1 - P. 57–70
276. Côté O., Clark M.E., Viel L., Labbé G., Seah S.Y., Khan M.A., Douada D.N., Palaniyar N., Bienzle D. Secretoglobin 1A1 and 1A1A differentially regulate neutrophil reactive oxygen species production, phagocytosis and extracellular trap formation // *PLoS One.* - 2014. - V. 9 - № 4 - P. e96217
277. Wen F., Shen A., Choi A., Gerner E.W., Shi J. Extracellular DNA in pancreatic cancer promotes cell invasion and metastasis. *Cancer Res.* - 2013. - V. 73 - № 14 - P. 4256–4266
278. Randhawa A.K., Hawn T.R. Toll-like receptors: their roles in bacterial recognition and respiratory infections // *Expert Rev Anti Infect Ther.* - 2008. - V. 6 - № 4 - P. 479–495
279. Lechner M.G., Epstein A.L. A new mechanism for blocking myeloid-derived suppressor cells by CpG // *Clin Cancer Res.* - 2011. - V. 17 - № 7 - P. 1645–1648
280. Patole P.S., Anders H.J. Nucleic acids modulate autoimmunity through nucleic-acid-specific toll-like receptors // *Curr Med Chem.* - 2006. - V. 13 - № 25 - P. 3061–3067
281. 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. - V. 183 - № 5 - P. 3109–3117
282. Notley C.A., Jordan C.K., McGovern J.L., Brown M.A., Ehrenstein M.R. DNA methylation governs the dynamic regulation of inflammation by apoptotic cells during efferocytosis // *Sci Rep.* - 2017. - V. 7 - P. 42204
283. Martínez-Campos C., Burguete-García A.I., Madrid-Marina V. Role of TLR9 in Oncogenic Virus-Produced Cancer // *Viral Immunol.* - 2017. - V. 30 - № 2 - P. 98–105
284. Krieg A.M. Signal transduction induced by immunostimulatory CpG DNA // *Springer Semin Immunopathol.* - 2000. - V. 22 - № 1-2 - P. 97–105
285. 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.* - 2007. - V. 120 - № 3 - P. 295–302

286. 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. - V. 7 - № 1 - P. 49–56
287. Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types // *J Hyg (Lond).* - 1966. - V. 64 - № 2 - P. 129–144
288. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types — Induction of transformation by a deoxyribonucleic-acid fraction isolated from pneumococcus type-III // *Journal of Experimental Medicine.* - 1979. - V. 149 - № 2 - P. 137–158
289. Shih C., Padhy L.C., Murray M., Weinberg R.A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts // *Nature.* - 1981. - V. 290 - № 5803 - P. 261–264
290. Ronquist G.K., Larsson A., Ronquist G., Isaksson A., Hreinsson J., Carlsson L., Stavreus-Evers A. Prostatomal DNA characterization and transfer into human sperm // *Mol Reprod Dev.* - 2011. - V. 78 - № 7 - P. 467–476
291. Regev-Rudzki N., Wilson D.W., Carvalho T.G., Siqueira X, Coleman BM, Rug M, Bursac D, Angrisano F, Gee M, Hill AF, Baum J, Cowman AF. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles // *Cell.* - 2013. - V. 153 - № 5 - P. 1120–1133
292. Lee T.H., Chennakrishnaiah S., Audemard E., Montermini L., Meehan B., Rak J. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2014. - V. 451 - № 2 - P. 295–301
293. Cai J., Han Y., Ren H., Chen C., He D., Zhou L., Eisner G.M., Asico L.D., Jose P.A., Zeng C. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells // *J Mol Cell Biol.* - 2013. - V. 5 - № 4 - P. 227–238
294. Fischer S., Cornils K., Speiseder T., Badbaran A., Reimer R., Indenbirken D., Grundhoff A., Brunswig-Spickenheier B., Alawi M., Lange C. Indication of Horizontal DNA Gene Transfer by Extracellular Vesicles // *PLoS One.* - 2016. - V. 11 - № 9 - P. e0163665
295. Ronquist K.G., Ronquist G., Carlsson L., Larsson A. Human prostatomes contain chromosomal DNA // *Prostate.* - 2009. - V. 69 - № 7 - P. 737–743
296. Sahlén G.E., Egevad L., Ahlander A., Norlén B.J., Ronquist G., Nilsson B.O. Ultrastructure of the secretion of prostatomes from benign and malignant epithelial cells in the prostate // *Prostate.* - 2002. - V. 53 - № 3 - P. 192–199
297. Demers M., Wagner D.D. NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis // *Semin.Thromb.Hemost.* 40, 277–283 (2014). - 2000. - V. 40 - № 3 - P. 277–283

298. Jorch S.K., Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. // *Nat Med.* - 2017. - V. 23 - № 3 - P. 279–287
299. Gregory A.D., Houghton A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* - 2011. - V. 71 - № 7 - P. 2411–2416
300. Ho-Tin-Noé B., Carbo C., Demers M., Cifuni S.M., Goerge T., Wagner D.D. Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia // *Am J Pathol.* - 2009. - V. 175 - № 4 - P. 1699–1708
301. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abed U. A., Kühn L. I., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting // *Front Immunol* - 2013. - V. 4 - P. 48
302. Tohme S., Yazdani H.O., Al-Khafaji A.B., Chidi A.P., Loughran P., Mowen K., Wang Y., Simmons R.L., Huang H., Tsung A. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. // *Cancer Res* - 2016. - V. 76 - № 6 - P. 1367–1380
303. Guglietta S., Chiavelli A., Zagato E., Krieg C., Gandini S., Ravenda P.S., Bazolli B., Lu B., Penna G., Rescigno M. Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. // *Nat. Commun.* - 2016. - V. 7 - P. 11037
304. McInturff A.M., Cody M.J., Elliott E.A., Glenn J.W., Rowley J.W., Rondina M.T., Yost C.C. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 α // *Blood.* - 2012. - V. 120 - № 15 - P. 3118–3125
305. Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K., Voorhees J.R., Fuchs T.A., Scadden D.T., Wagner D.D. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2012. - V. 109 - № 32 - P. 13076–13081
306. Gould T.J., Vu T.T., Swystun L.L., Dwivedi D.J., Mai S.H., Weitz J.I., Liaw P.C. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2014. - V. 34 - № 9 - P. 1977–1984
307. von Brühl M.L., Stark K., Steinhart A., Chandraratne S., Konrad I., Lorenz M., Khandoga A., Tirniceriu A., Coletti R., Köllnberger M., Byrne R.A., Laitinen I., Walch A., Brill A., Pfeiler S., Manukyan D., Braun S., Lange P., Riegger J., Ware J., Eckart A., Haidari S., Rudelius M., Schulz C., Ehtler K., Brinkmann V., Schwaiger M., Preissner K.T., Wagner D.D., Mackman N., Engelmann B., Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo // *J Exp Med.* - 2012. - V. 209 - № 4 - P. 819–835
308. Kambas K., Chrysanthopoulou A., Vassilopoulos D., Apostolidou E., Skendros P., Girod A., Arelaki S., Froudarakis M., Nakopoulou L., Giatromanolaki A., Sidiropoulos P., Koffa M.,

Boumpas D.T., Ritis K., Mitroulis I. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombo-philic state associated with the disease // *Ann Rheum Dis.* - 2013. - V. 73 - № 10 - P. 1854–1863

309. Kambas K., Mitroulis I., Apostolidou E., Girod A., Chrysanthopoulou A., Pneumatikos I., Skendros P., Kourtzelis I., Koffa M., Kotsianidis I., Ritis K. Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis // *PLoS One.* - 2012. - V. 7 - № 9 - P. e45427

310. Cedervall J., Zhang Y., Huang H., Zhang L., Femel J., Dimberg A., Olsson A.K. Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals // *Cancer Res.* - 2015. - V. 75 - № 13 - P. 2653–2662

311. Janus N., Launay-Vacher V., Byloos E., Machiels J.P., Duck L., Kerger J., Wynendaele W., Canon J.L., Lybaert W., Nortier J., Deray G., Wildiers H. Cancer and renal insufficiency results of the BIRMA study // *Br J Cancer.* - 2010. - V. 103 - № 12 - P. 1815–1821

312. Launay-Vacher V. Epidemiology of chronic kidney disease in cancer patients: lessons from the IRMA study group // *Semin Nephrol.* - 2010. - V. 30 - № 6 - P. 548–556

313. Launay-Vacher V., Oudard S., Janus N., Gligorov J., Pourrat X., Rixe O., Morere J.F., Beuzeboc P., Deray G.; Renal Insufficiency and Cancer Medications (IRMA) Study Group. Prevalence of renal insufficiency in cancer patients and implications for anticancer drug management: the renal insufficiency and anticancer medications (IRMA) study // *Cancer.* - 2007. - V. 110 - № 6 - P. 1376–1384

314. Thålin C., Demers M., Blomgren B., Wong S.L., von Arbin M., von Heijne A., Laska A.C., Wallén H., Wagner D.D., Aspberg S. NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation // *Thromb Res.* - 2016. - V. 139 - P. 56–64

315. Olsson A.K, Cedervall J. NETosis in Cancer - Platelet-Neutrophil Crosstalk Promotes Tumor-Associated Pathology. // *Cancer.* - 2016. - V. 7 - P. 373

316. Breitbach C.J., De Silva N.S., Falls T.J., Aladl U., Evgin L., Paterson J., Sun Y.Y., Roy D.G., Rintoul J.L., Daneshmand M., Parato K., Stanford M.M., Lichty B.D., Fenster A., Kirn D., Atkins H., Bell J.C. Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus. // *Mol. Ther.* - 2011. - V. 19 - № 5 - P. 886–894

317. 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* - 2013. - V. 123 - № 8 - P. 3446–3458

318. Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V., Rykova E.Y., Pyshnyi D.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Circulating DNA and DNase activity in human blood // *Ann N Y Acad Sci.* - 2006. - V. 516 - № 3 - P. 790–795
319. Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Vlasov V.V., Laktionov P.P. Blood deoxyribonuclease activity in health and diseases // *Biomed Khim.* - 2007. - V. 53 - № 5 - P. 488–96
320. Dewez B., Lans M., Allaeyts V., Karaoglou A., Taper H., Roberfroid M. Serum alkaline deoxyribonuclease activity, a sensitive marker for the therapeutic monitoring of cancer patients: methodological aspects // *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* - 1993. - V. 31 - № 11 - P. 793–797
321. Golonka R.M., Yeoh B.S., Petrick J.L., Weinstein S.J., Albanes D., Gewirtz A.T., McGlynn K.A., Vijay-Kumar M. Deoxyribonuclease I Activity, Cell-Free DNA, and Risk of Liver Cancer in a Prospective Cohort. // *JNCI Cancer Spectr.* - 2018. - V. 2 - № 4 - P. pky083
322. Yasuda T., Kawai Y., Ueki M., Kishi K. Clinical applications of DNase I, a genetic marker already used for forensic identification. // *Review Leg Med (Tokyo).* - 2005. - V. 7 - № 4 - P. 274–277
323. Alcázar-Leyva S., Cerón E., Masso F., Montaña L.F., Gorocica P., Alvarado-Vásquez N. Incubation with Dnase I inhibits tumor cell proliferation // *Med Sci Monit.* - 2009. - V. 15 - № 2 - P. CR51–CR55
324. Zou Y., Chen X., Xiao J., Bo Zhou D., Xiao Lu X., Li W., Xie B., Kuang X., Chen Q. Neutrophil extracellular traps promote lipopolysaccharide-induced airway inflammation and mucus hypersecretion in mice. // *Oncotarget.* - 2018. - V. 9 - № 17 - P. 13276–13286
325. Mohanty T., Fisher J., Bakochi A., Neumann A., Cardoso J.F.P., Karlsson C.A.Q., Pavan C., Lundgaard I., Nilson B., Reinstrup P., Bonnevier J., Cederberg D., Malmström J., Bentzer P., Linder A. Neutrophil extracellular traps in the central nervous system hinder bacterial clearance during pneumococcal meningitis. // *Nat Commun.* - 2019. - V. 10 - № 1 - P. 1667
326. Hisada Y., Grover S.P., Maqsood A., Houston R., Ay C., Noubouossie D.F., Cooley B.C., Wallén H., Key N.S., Thålin C., Farkas Á.Z., Farkas V.J., Tenekedjiev K., Kolev K., Mackman N. Neutrophils and neutrophil extracellular traps enhance venous thrombosis in mice bearing human pancreatic tumors // *Haematologica.* - 2020. - V. 105 - № 1 - P. 218–225
327. Park J., Wysocki R.W., Amoozgar Z., Maiorino L., Fein M.R., Jorns J., Schott A.F., Kinugasa-Katayama Y., Lee Y., Won N.H., Nakasone E.S., Hearn S.A., Küttner V., Qiu J., Almeida A.S., Perurena N., Kessenbrock K., Goldberg M.S., Egeblad M. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps // *Sci Transl Med.* - 2016. - V. 8 - № 361 - P. 361ra138
328. Mironova N., Shklyayeva O., Andreeva E., Popova N., Kaledin V., Nikolin V., Vlassov V., Zenkova M. Animal model of drug-resistant tumor progression // *Ann N Y Acad Sci.* - 2006. - V.1091 - P. 490–500

329. Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 1989. - V. 24 - № 3 - P. 148–154
330. Ting R., Thomas J.M., Lermer L., Perrin D.M. Substrate specificity and kinetic framework of a DNAzyme with an expanded chemical repertoire: a putative RNaseA mimic that catalyzes RNA hydrolysis independent of a divalent metal cation // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - V. 32 - № 22 - P. 6660–6672
331. Park J.G., Kramer B.S., Steinberg S.M., Carmichael J., Collins J.M., Minna J.D., et al. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay // *Cancer Res.* - 1987. - V. 47 - № 22. P. 5875–5879
332. Liang C.C., Park A.Y., Guan J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro // *Nat. Protocols.* - 2007. - V. 2. - P. 329–333.
333. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* - 2014. - V. 30 - № 15 - P. 2114–2120
334. Yang Y., Cai H., Yuan X., Xu H., Hu Y., Rui X., Wu J., Chen J., Li J., Gao X., Yin D. Efficient targeting drug delivery system for Lewis lung carcinoma, leading to histomorphological abnormalities restoration, physiological and psychological statuses improvement, and metastasis inhibition // *Mol. Pharm.* - 2018. - V. 15 - № 5 - P. 2007–2016
335. Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.V., Zenkova M.A., Makarov A.A. Ribonucleaseinase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells // *Cell Cycle.* - 2013. - V. 2 - № 13 - P. 2120–2131
336. Giavazzi R., Decio A. Syngeneic murine metastasis models: B16 melanoma // *Methods Mol Med.* - 2014. - V. 58 - P. 223–229
337. Trejo-Becerril C., Pérez-Cardenas E., Gutiérrez-Díaz B., De La Cruz-Sigüenza D., Taja-Chayeb L., González-Ballesteros M., García-López P., Chanona J., Dueñas-González A. Antitumor Effects of Systemic DNase I and Proteases in an In Vivo Model // *Integr Cancer Ther* - 2016. - V. 15 - № 4 - P. NP35–NP43
338. Cesta M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen // *Toxicol.Pathol.* - V. 34 - № 5 - P. 455–465
339. Shi L., Yao H., Liu Z., Xu M., Tsung A., Wang Y. Endogenous PAD4 in Breast Cancer Cells Mediates Cancer Extracellular Chromatin Network Formation and Promotes Lung Metastasis // *Mol Cancer Res.* - 2020. - V. 18 - № 5 - P. 735–747
340. Takesue S., Ohuchida K., Shinkawa T., Otsubo Y., Matsumoto S., Sagara A., Yonenaga A., Ando Y., Kibe S., Nakayama H., Iwamoto C., Shindo K., Moriyama T., Nakata K., Miyasaka Y., Ohtsuka T., Toma H., Tominaga Y., Mizumoto K., Hashizume M., Nakamura M. Neutrophil

extracellular traps promote liver micrometastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma via the activation of cancer-associated fibroblasts // *Int J Oncol.* - 2020. - V. 56 - № 2 - P. 596–605

341. Markov O.V., Mironova N.L., Sennikov S.V., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Prophylactic dendritic cell-based vaccines efficiently inhibit metastases in murine metastatic melanoma // *PLoS One.* - 2015. - V. 10 - № 9 - P. e0136911

342. Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V., Serikov R.N., Morozova N.G., Maslov M.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Multicomponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in murine immature dendritic cells and provide productive antitumour response in murine melanoma model // *J. Control. Release.* - V. 213 - P. 45–56

343. Kabilova T.O., Sen'kova A.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Antitumor and antimetastatic effect of small immunostimulatory RNA against B16 melanoma in mice // *PLoS One.* - 2016. - V. 11 - № 3 - P. e0150751

344. Casadio V., Salvi S., Martignano F., Gunelli R., Ravaioli S., Calistri D. Urine cell-free DNA integrity as a marker for early prostate cancer diagnosis: a pilot study // *Biomed Res Int.* - 2013. - V. 2013 - № 119 - P. 270457

345. Salvi S., Gurioli G., Martignano F., Foca F., Gunelli R., Cicchetti G., De Giorgi U., Zoli W., Calistri D., Casadio V. Urine cell-free DNA integrity analysis for early detection of prostate cancer patients // *Dis Markers.* - 2015. - V. 2015 - P. 574120

346. Winter N., Neumann A., Bullerdiek J. Cell-free DNA in amniotic fluid remains to be attached to HMGA2-implications for noninvasive prenatal diagnosis // *Prenat Diagn.* - 2008. - V. 28 - № 12 - P. 1126–1130

347. Qin J., Alt J.R., Hunsley B.A., Williams T.L., Fernando M.R. Stabilization of circulating tumor cells in blood using a collection device with a preservative reagent // *Cancer Cell Int.* - 2000. - V. 14 - № 1 - P. 23

348. Belancio V.P., Roy-Engel A.M., Deininger P.L. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. // *Semin Cancer Biol.* - 2010. - V. 20 - № 4 - P. 200–210

349. Carreira P.E., Richardson S.R., Faulkner G.J. L1 retrotransposons, cancer stem cells and oncogenesis // *FEBS J.* - 2014. - V. 281 - № 1 - P. 63–73

350. Kemp J.R., Longworth M.S. Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer // *Front Chem.* - 2015. - V. 3 - P. 68

351. Stacey S.N., Kehr B., Gudmundsson J., Zink F., Jonasdottir A., Gudjonsson S.A., Sigurdsson A., Halldorsson B.V., Agnarsson B.A., Benediktsdottir K.R., Aben K.K., Vermeulen S.H., Cremers R.G., Panadero A., Helfand B.T., Cooper P.R., Donovan J.L., Hamdy F.C., Jinga V., Okamoto I., Jonasson J.G., Tryggvadottir L., Johannsdottir H., Kristinsdottir A.M., Masson G.,

Magnusson O.T., Iordache P.D., Helgason A., Helgason H., Sulem P., Gudbjartsson D.F., Kong A., Jonsson E., Barkardottir R.B., Einarsson G.V., Rafnar T., Thorsteinsdottir U., Mates I.N., Neal D.E., Catalona W.J., Mayordomo J.I., Kiemeny L.A., Thorleifsson G., Stefansson K. Insertion of an SVAE retrotransposon into the CASP8 gene is associated with protection against prostate cancer. *Hum Mol Genet // Oncology*. - 2016. - V. 25 - № 5 - P. 1008–1018

352. Lin X., Stenvang J., Rasmussen M.H., Zhu S., Jensen N.F., Tarpgaard L.S., Yang G., Belling K., Andersen C.L., Li J., Bolund L., Brünner N. The potential role of Alu Y in the development of resistance to SN38 (Irinotecan) or oxaliplatin in colorectal cancer. *BMC Genomics // Oncology*. - 2015. - V. 16 - № 1 - P. 404

353. Contreras-Galindo R., Kaplan M.H., Leissner P., Verjat T., Ferlenghi I., Bagnoli F., Giusti F., Dosik M.H., Hayes D.F., Gitlin S.D., Markovitz D.M. Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer // *J Virol*. - 2008. - V. 82- № 19 - P. 9329–9336

354. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // *Clin Chem*. - 2009. - V. 55- № 4- P. 611–622

355. Mitra I., Khare N.K., Raghuram G.V., Chaubal R., Khambatti F., Gupta D., Gaikwad A., Prasannan P., Singh A., Iyer A., Singh A., Upadhyay P., Nair N.K., Mishra P.K., Dutt A. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes // *J Biosci*. - 2015. - V. 40- № 1- P. 91–111

356. Albano M.S., Scaradavou A., Stevens C.E., Rubinstein P. Extracellular DNA in cord blood plasma and applications in cord blood banking for sample identification // *Transfusion*. - 2009. - V. 49- № 8- P. 1685–1691

357. Rihani A., Van Maerken T., Pattyn F., Van Peer G., Beckers A., De Brouwer S., Kumps C., Mets E., Van der Meulen J., Rondou P., Leonelli C., Mestdagh P., Speleman F., Vandesompele J. Effective Alu repeat based RT-Qpcr normalization in cancer cell perturbation experiments // *PLoS One*. - 2013. - V. 8- № 8- P. e71776

358. Utomo W.K., Janmaat V.T., Verhaar A.P., Cros J., Lévy P., Ruzsniowski P., den Berg M.S., Jenster G., Bruno M.J., Braat H., Fuhler G.M., Peppelenbosch M.P. DNA integrity as biomarker in pancreatic cyst fluid // *Am J Cancer Res*. - 2016. - V. 6- № 8 - P. 1837–1841

359. Zhang R., Pu W., Zhang S., Chen L., Zhu W., Xiao L., Xing C., Li K. Clinical value of ALU concentration and integrity index for the early diagnosis of ovarian cancer: A retrospective cohort trial // *PLoS One*. - 2018. - V. 13 - № 2 - P. e0191756

360. Sobhani N., Generali D., Zanconati F., Bortul M., Scaggiante B. Cell-free DNA integrity for the monitoring of breast cancer: Future perspectives? // *World J. Clin. Oncol.* - 2018. - V. 9 - № 2 - P. 26–32
361. Leng S., Zheng J., Jin Y., Zhang H., Zhu Y., Wu J., Xu Y., Zhang P. Plasma cell-free DNA level and its integrity as biomarkers to distinguish non-small cell lung cancer from tuberculosis // *Clin. Chim. Acta.* - 2018. - V. 477 - P. 160–165
362. Oricchio E., Sciamanna I., Beraldi R., Tolstonog G.V., Schumann G.G., Spadafora C. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression // *Oncogene.* - 2007. - V. 26 - № 29 - P. 4226–4233
363. Sciamanna I., Landriscina M., Pittoggi C., Quirino M., Mearelli C., Beraldi R., Mattei E., Serafino A., Cassano A., Sinibaldi-Vallebona P., Garaci E., Barone C., Spadafora C. Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth // *Oncogene.* - 2005. - V. 24 - № 24 - P. 3923–3931
364. Okur H.K., Yalcin K., Tastan C., Demir S., Yurtsever B., Karakus G.S., Kancagi D.D., Abanuz S., Seyis U., Zengin R., Hemsinlioglu C., Kara M., Yildiz M.E., Deliceo E., Birgen N., Pelit N.B., Cuhadaroglu C., Kocagoz A.S., Ovali E. Preliminary report of in vitro and in vivo effectiveness of dornase alfa on SARS-CoV-2 infection // *New microbes and new infections.* - 2020. - V. 37- № 24 - P. 10075
365. Yang C., Chilvers M., Montgomery M., Nolan S.J. Dornase alfa for cystic fibrosis. The Cochrane database of systematic reviews // *New microbes and new infections.* - 2016. - V. 4 - P. CD001127