

ОПЫТ ДОКЛИНИЧЕСКОГО И КЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

И.Н. Васильева

к.б.н., ст. науч. сотрудник, научная лаборатория химиопрофилактики рака и онкофармакологии,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург)
E-mail: iravasilyeva@hotmail.com

В.Г. Беспалов

д.м.н., зав. научной лабораторией химиопрофилактики рака и онкофармакологии,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Университет ИТМО (Санкт-Петербург)

А.Л. Семенов

науч. сотрудник,
научная лаборатория химиопрофилактики рака и онкофармакологии,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург)

Г.В. Точильников

к.м.н., науч. сотрудник,
научная лаборатория химиопрофилактики рака и онкофармакологии,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург)

Представлены результаты собственных экспериментальных исследований внеклеточной ДНК (вкДНК) после воздействия ионизирующей радиации и низкочастотного шума с целью изучения механизма действия витаминов у животных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы; а также клинических исследований у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения и хроническими заболеваниями бронхолегочной системы. Рассмотрены возможности применения тестов определения вкДНК для малоинвазивной диагностики различных патологий, мониторинга заболеваний, изучения механизмов действия и индивидуальной чувствительности к лекарственной терапии.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, нуклеосомы, апоптоз, патологии.

Для цитирования: Васильева И.Н., Беспалов В.Г., Семенов А.Л., Точильников Г.В. Опыт доклинического и клинического изучения внеклеточной ДНК при различных патологиях. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019; 22(10):50-56. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-10-08>

Феномен циркуляции ДНК в биологических жидкостях человека и животных известен давно, однако в настоящее время активно ведутся исследования внеклеточной ДНК (вкДНК) в рамках разработки методов минимально инвазивной диагностики, в качестве замены или дополнения тканевой биопсии. Такие исследования основаны на определении специфичных участков вкДНК крови и других биологических жидкостей. Они находят практическое применение в неонатологии для определения пола, группы крови и наличия хромосомных болезней плода, а в области онкологии исследование вкДНК позволяют преодолеть ограничения, связанные с гетерогенностью и пластичностью опухоли, и отражает динамику индивидуальной биологии опухоли [1].

Получены данные об источнике происхождения, функции и структуре вкДНК [1-3]. Основное количество вкДНК образуется в результате гибели клеток и циркулирует в виде апоптотных телец; активированные клетки выделяют ДНК в составе

микровезикул, а покоящиеся – в составе экзосом. Мембранные частицы, несущие нуклеиновые кислоты, имеют несколько механизмов связывания с циркулирующими в крови клетками: нуклеиновые кислоты могут оставаться обратимо связанными с клеточной поверхностью, могут быть инкорпорированы в клетки в результате опосредованного рецепторами пути или в результате слияния частиц с клеточными мембранами [4]. Функцией вкДНК считают участие в иммунном ответе и злокачественной трансформации клеток [1-3]. Продемонстрировано поглощение вкДНК культуральными клетками с последующей интеграцией в хроматин хозяина [5]. Секвенирование вкДНК доказало ее происхождение преимущественно из ДНК генома [2, 3, 6]. Представленность ДНК генома в плазме крови у человека исследована методом глубокого секвенирования и определения позиционирования нуклеосом, в результате показано лимфоидное и миелоидное происхождение вкДНК у человека в норме [3, 7, 8].

Цель работы – проанализировать клиническое значение изменений содержания внеклеточной ДНК при различных патологиях.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Началом работы было исследование содержания вкДНК в плазме крови экспериментальных животных после воздействия ионизирующей радиации [9]. Определение вкДНК проводили в плазме крови спектрофлуориметрическим методом [9]. Обнаружено, что после облучения в дозах от 2 до 100 Гр концентрация вкДНК в плазме крови возрастала с увеличением дозы, и это наблюдалось для временного интервала от одного часа до трех дней. Концентрации вкДНК были наибольшими через 5 ч после облучения в дозах от 8 до 100 Гр.

При электрофоретическом разделении вкДНК плазмы крови четко различимы ее основные фракции: высокомолекулярная, 3,5–6 тыс. п.н., и низкомолекулярная, нуклеосомного размера, 160–180 п.н. Содержание нуклеосомной вкДНК значительно возрастало с увеличением дозы облучения: до 20 Гр зависимость была прямо пропорциональная, от 20 до 100 Гр – логарифмическая [2, 6, 9]. Получены уравнения линейной и логарифмической регрессии, позволяющие достоверно рассчитать дозу облучения по содержанию нуклеосомной вкДНК [2, 9]. Известно, что лучевая патология во многом определяется процессами программированной клеточной гибели: белок P53 блокирует клеточный цикл в фазе G1, стимулирует репарационные процессы, а если активность репарационных систем недостаточна, то модулирует апоптоз, защищая организм от появления мутантных клеток [2, 6, 9].

Возникли предположения, что, во-первых, содержание нуклеосомной вкДНК в плазме крови увеличивается при экспериментальных воздействиях и заболеваниях, механизм патогенеза которых связан с усилением процессов программированной клеточной гибели. Во-вторых, экспериментальные воздействия различной степени тяжести могут вызывать зависимые от дозы изменения количества нуклеосомной вкДНК крови. В-третьих, исследование уровня нуклеосомной вкДНК крови и других биологических жидкостей позволит оценить роль клеточной гибели в развитии патологического процесса. Увеличение количества нуклеосомной вкДНК свидетельствует об усилении процессов апоптоза, а уменьшение – об их ингибировании.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕОСОМНОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

Была секвенирована нуклеосомная вкДНК плазмы крови крыс после воздействия ионизирующего облучения в дозах 8 и 100 Гр, приводящих к возникновению различных форм лучевой болезни – костно-мозговой и церебральной соответственно. Для этого нуклеосомную фракцию (160–180 п.н.) вкДНК от облученных крыс элюировали из геля после электрофореза. Очищенную вкДНК клонировали в *E. coli* в фазмиде Bluescript M13+ и секвенировали по Сенгеру [2, 6]. Анализ 80 полученных рекомбинантных клонов показал, что после облучения в дозе 8 Гр длина вставки вкДНК составляла 123–180 п.н., а после облучения 100 Гр – 80–400 п.н. [6]. Увеличение разброса свидетельствует о более значительном повреждении ДНК (двунитевые разрывы) после воздействия в дозе 100 Гр. Вне зависимости от дозы во вкДНК обнаружено повышенное содержание G/C-пар: 49% против 44% в референсном геноме грызунов [2, 6]. Исследование по программе RECON подтвердило вероятность формирования нуклеосом для секвенированной вкДНК облученных крыс. Эта вероятность определяется чередованием G/C-обогащенных участков приблизительно через каждые 10 п.н. с динуклеотидом ApT, определяющим оптимальное для позиционирования нуклеосом искривление молекулы ДНК [2]. Значимые различия обнаружены в распределении динуклеотидов. В геноме среднее содержание CpG составляет 1,2%, а CpT – 7,0%, в отличие от 6,2% при случайном распределении. В нуклеосомной вкДНК крыс, облученных в дозах 8 и 100 Гр, содержание CpG составляет 0,7 и 1,7%, а CpT – 9,6 и 7,8%, соответственно [2, 6]. Предположение о выделении вкДНК после облучения в дозах 8 или 100 Гр из различных типов тканей вполне закономерно, поскольку современные исследования показывают возможность определять тканевую принадлежность на основании тканеспецифичного паттерна метилирования ДНК и особенностей позиционирования нуклеосом [7, 9].

Скрининг сиквенсов вкДНК по банку данных показал их гомологию участкам генома грызунов [6]. К настоящему времени геном грызунов считают собранным, за исключением пропусков размером до 3 Мб, соответствующим участкам сателлитной ДНК [2, 6]. Остается предположить, что идентифицированные с низкой вероятностью кло-

ны принадлежат к неаннотированным последовательностям сателлитов. К настоящему времени исследованы сиквенсы вкДНК здоровых доноров, беременных женщин, больных раком простаты, культуральной среды HUVES и облученных крыс [2]. Обнаружено, что вкДНК представлена ДНК генома, позиционирует нуклеосомы, обогащена G/C-парами и элементами повторов. Полагают, что эти особенности обусловлены свойствами ДНК в кровотоке или механизмом апоптоза.

Работы по исследованию вкДНК при радиационных воздействиях проводятся некоторыми другими исследователями и, наряду с использованием в дозиметрии, нашли теоретическое продолжение. Так, обнаружено, что выделяемая гибнущими клетками вкДНК содержит значительную часть окисленных нуклеотидов, и эта окисленная ДНК опосредует эффект свидетеля и адаптивный эффект [2]. Показано, что хроматин, выделяемый из умирающих клеток, способен встраиваться в хромосомы, приводя к увеличению репарационных процессов [5]. Впервые выявленное авторами повышение содержания вкДНК через 5 ч после облучения с последующим снижением через 1 сутки может использоваться в качестве показателя эффективности лучевой терапии онкологических больных, в том числе применимо для ее новых методов, таких как селективная внутренняя радиотерапия с адресной доставкой меченых микросфер [2].

ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕОСОМНОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Изучена апоптотическая активность α -токоферола ацетата (витамин Е) и аскорбиновой кислоты (витамин С) у крыс, подвергавшихся воздействию ионизирующей радиации. Животным вводили однократно перорально комбинацию витаминов Е и С в профилактических дозах до или после общего однократного гамма-облучения 8 Гр, вызывающей костномозговую форму лучевой болезни. Апоптотическое действие оценивали по уровню циркулирующей вкДНК в плазме крови через 5 ч после общего облучения животных. Комбинация витаминов Е и С при введении за 10 мин до облучения в дозе 8 Гр значительно увеличивало содержание вкДНК в крови. Таким образом, радиопротекторный эффект смеси витаминов Е и С объясняется ее апоптотическим действием [10].

НУКЛЕОСОМНАЯ ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ДЛЯ ОЦЕНКИ ВРЕДНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНОГО ШУМА

Исследования показали, что содержание нуклеосомной вкДНК значительно увеличивалось в результате действия низкочастотного шума (НЧШ) [11]. Через 1 сутки после однократного действия НЧШ с максимальным диапазоном 250 Гц и уровнем звукового давления 120 или 150 дБ было обнаружено 7,6-кратное повышение содержания нуклеосомной вкДНК в плазме крови крыс по сравнению с животными, не подвергавшимися воздействию НЧШ. Повышенное содержание вкДНК сохранялось не менее 7 дней. Воздействие НЧШ в течение 13 недель по 17 мин 5 раз в неделю вызывало дальнейшее повышение содержания нуклеосомной вкДНК в плазме крови [11]. Известно, что острое воздействие НЧШ проявляется структурными нарушениями во внутренних органах крыс, преимущественно в легких, и изменениями клеток крови [11]. Хроническое действие НЧШ вызывает структурные изменения, характерные для очаговой эмфиземы легких по геморрагическому типу с изменениями состояния клеток крови. Полученные результаты позволяют предположить, что воздействие НЧШ вызывает развитие патологического процесса с участием массивированной клеточной гибели. Возможно, акустические воздействия представляют собой значительно более вредный фактор, чем представлялось ранее [11, 12].

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В КРОВИ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИНДУКЦИИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Изучено содержание вкДНК в плазме крови молодых (3 мес.) и старых (2 года) самцов крыс с индуцированной доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) в сравнении с интактными молодыми и старыми животными [13]; ДГПЖ индуцировали с помощью введения пролонгированного препарата тестостерона после кастрации. Содержание вкДНК в плазме крови определяли сэндвич-иммуноферментным анализом (Cell Death Detection ELISA PLUS Kit, Roche). У интактных старых самцов крыс по сравнению с молодыми обнаружено значимое увеличение уровня вкДНК. У пожилых людей также отмечается повышенный уровень вкДНК в крови по сравнению с молодыми; а помимо этого, вкДНК

выделяется не только в связи системной потерей клеток, но и в результате хронических воспалительных процессов [14, 15]. Через 1 мес. от начала введения тестостерона как у старых, так и молодых крыс развивалась ДГПЖ, что проявлялось увеличением всех долей простаты и гиперплазией ацинусов и мышечной ткани при морфологическом исследовании по сравнению с интактными животными, при этом у старых крыс степень ДГПЖ была значимо выше, чем у молодых. Наблюдались различные реакции на введение экзогенного тестостерона молодым и старым животным. У молодых крыс с увеличением уровня тестостерона в крови содержание вкДНК не изменялось значимо, тогда как у старых крыс при том же уровне тестостерона в крови содержание вкДНК было существенно выше, чем у молодых животных. Согласно общепринятым представлениям, в основе развития ДГПЖ лежит снижение апоптоза в тканях простаты [16], однако к появлению в кровотоке вкДНК может привести формирование провоспалительного фенотипа из-за присутствия в тканях большого количества дефектных клеток, а также ишемического некроза и сопутствующих процессов апоптоза. Таким образом, впервые выявлено, что у старых крыс при развитии ДГПЖ наблюдается усиление гибели клеток в тканях, проявляемой в увеличении содержания вкДНК, с одновременным ингибированием апоптоза и усилением пролиферации клеток в тканях простаты [14]. Полученные результаты обосновывают возможность применения вкДНК в качестве диагностического критерия при исследовании состояния здоровья пожилых мужчин с ДГПЖ.

ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕОСОМНОЙ ВНЕКЛЕТочНОЙ ДНК У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Клиническое исследование показало, что острое нарушение мозгового кровообращения характеризуется повышением содержания нуклеосомной вкДНК в течение 3 суток после острого периода [6, 9]. В случае геморрагического инсульта максимальное увеличение содержания нуклеосомной вкДНК в плазме крови отмечено через 3 ч после начала болезни, а в случае ишемического – через 24 ч. Аналогичная фракция вкДНК в том же количестве была обнаружена в спинномозговой жидкости больных с ишемией [6, 9]. Результаты собственных исследований и данные литературы

обосновывают возможность использования определения нуклеосомной вкДНК для дифференциальной диагностики острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому или геморрагическому типу на ранних стадиях заболевания, а также подтверждают роль апоптоза в развитии инсультов и могут служить показателем тяжести повреждения головного мозга [6, 17, 18].

НУКЛЕОСОМНАЯ ВНЕКЛЕТочНАЯ ДНК У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ СИСТЕМЫ

В исследованиях у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) в состоянии ремиссии отмечено пониженное содержание нуклеосомной вкДНК в плазме крови по сравнению больными хроническим необструктивным бронхитом (ХНБ) и здоровыми донорами, причем содержание нуклеосомной вкДНК у больных ХНБ и здоровых доноров не различалось достоверно [6, 19]. Были обследованы также родственники первой линии пациентов ХОБЛ и ХНБ, содержание нуклеосомной вкДНК у них не различалось значимо и не отличалось от содержания у здоровых доноров [19]. У больных ХОБЛ в возрасте 60–80 лет по сравнению с больными ХОБЛ 45–59 лет наблюдалась тенденция к увеличению содержания нуклеосомной вкДНК, однако ее содержание было значимо ниже, чем у здоровых доноров того же возраста. Возрастные увеличения уровня вкДНК отмечены другими авторами [14, 15]. Снижение содержания нуклеосомной вкДНК в крови у пациентов ХОБЛ в ремиссии согласуется с общими представлениями о снижении апоптоза в патогенезе развития заболевания [2, 6]. Если обострение ХОБЛ характеризуется усилением апоптоза в легочной ткани, то при ремиссии могут происходить восстановительные процессы в легочной ткани, когда процессы регенерации преобладают над процессами апоптоза [19]. Снижение уровня нуклеосомной вкДНК у больных ХОБЛ соответствует современным представлениям о происхождении значительной ее части из нейтрофилов (эозинофилов, тучных клеток, макрофагов) в результате нетоза в ответ на провоспалительные агенты [3]. Снижение уровня вкДНК при ХОБЛ в ремиссии сопровождается снижением уровня нейтрофилов [20].

Количественные показатели содержания вкДНК в плазме крови, полученные в собственных экспериментальных и клинических исследованиях, приведены в таблице.

Таблица. Количество внеклеточной ДНК в плазме крови в норме и при различных патологиях

Вид	Норма/Патология	Способ определения	Количество вкДНК в плазме крови	Литературный источник
Крыса	Норма	Выделение фенолом, спектрофлюорометрия с дигидрохлоридом диаминобензойной кислоты	26,3±1,8 нг/мл	[9]
	Облучение 2–100 Гр, 5 ч	Тот же	34,8–396,0 нг/мл	[9]
	Норма	Выделение фенолом, электрофорез в градиенте полиакриламида	5,5–11,0 нг/мл	[6]
	Облучение 8–100 Гр, 5 ч	Тот же	53,2–338,5 нг/мл	[6]
	Однократное воздействие НЧШ	Тот же	84–85 нг/мл	[11]
	Множественное воздействие НЧШ	Тот же	396–644 нг/мл	[11]
	Норма у молодых	ИФА, Cell Death Detection ELISA PLUS	1,02±0,30 нг/мкл	[13]
	Норма у старых	Тот же	2,00±0,14 нг/мкл	[13]
	ДГПЖ у молодых	Тот же	0,80±0,14 нг/мкл	[13]
	ДГПЖ у старых	Тот же	3,14±0,76 нг/мкл	[13]
Человек	Норма	Выделение фенолом, электрофорез в градиенте полиакриламида	30–32 нг/мл	[19]
	Ишемический инсульт, 24 ч	Тот же	77,8 нг/мл	[6]
	Геморрагический инсульт, 3 ч	Тот же	81,5 нг/мл	[6]
	ХОБЛ в ремиссии	Тот же	7,8±2,0 нг/мл	[19]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень вкДНК отражает процессы апоптоза в организме. В проведенных экспериментальных и клинических исследованиях выявлены изменения содержания вкДНК в плазме крови при различных патологиях. Ионизирующее облучение крыс вызывает увеличение содержания нуклеосомной вкДНК пропорционально дозе облучения. Секвенирование вкДНК облученных крыс показывает, что вкДНК выделяется из различных участков генома и различных тканей. Низкочастотный шум как при однократной, так и при множественной экспозиции приводит к увеличению содержания вкДНК, значимо большему при хроническом акустическом воздействии. Следовательно, ионизирующая радиация и НЧШ усиливают апоптоз клеток. Введение крысам перед облучением комбинации витаминов А и Е повышает уровень вкДНК, данный проапоптотический эффект витаминов объясняет их радиопротекторное действие в результате гибели поврежденных клеток.

У старых интактных крыс самцов уровень вкДНК значимо повышается по сравнению с молодыми самцами крыс; при индукции ДГПЖ тестостероном у молодых крыс уровень вкДНК не меняется, тогда как у старых значительно увеличивается, что говорит об усилении процессов апоптоза с возрастом и при развитии ДГПЖ у старых животных.

У больных с острым нарушением мозгового кровообращения содержание вкДНК увеличено в течение трех суток после острого периода, причем динамика уровней вкДНК у больных с ишемическим и геморрагическим инсультом разная, что может использоваться как для оценки тяжести повреждения головного мозга, так и для дифференциальной диагностики различных типов инсультов.

У пациентов с ХОБЛ в период ремиссии содержание вкДНК снижается, что говорит об уменьшении гибели клеток в легких и ослаблении воспалительного процесса. Таким образом, определение вкДНК в плазме крови может быть ис-

пользовано для диагностики различных патологий, мониторинга и оценки эффективности лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aucamp J., Bronkhost A.J., Badenhorst C.P.S., Pretorius R.J. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society*. 2018; 93:1649–1683.
2. Васильева И.Н., Подгорная О.И., Беспалов В.Г. Нуклеосомная фракция внеклеточной ДНК как показатель апоптоза // *Цитология*. 2015; 57: 87–94.
3. Thierry A.R., Messaoudi S.El., Gahan P.B., Anker P., Strounet M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology // *Cancer Metastasis Rev*. 2016; 35:347–376.
4. Rykova E.Y., Morozkin E.V., Ponomareva A.A. Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012; 12(S1):S141–S153.
5. Mittra I., Khare N.K., Raghuram G.V., Chaubal R. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes // *Journal of Biosciences*. 2015; 40:91–111.
6. Васильева И.Н., Зинкин В.Н. Значение низкомолекулярной ДНК плазмы крови в диагностике патологических процессов различного генеза. // *Биомедицинская химия*. 2013; 59:358–373.
7. Зинкин В.Н., Васильева И.Н., Вознюк И.А. Определение внеклеточной низкомолекулярной ДНК в крови как диагностический метод для клинических и экспериментальных исследований // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2011; 5:47–51.
8. Lehmann-Werman R., Neiman D., Zemmour H. et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2016; 113:1826–1834.
9. Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J., Daza R.M. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin // *Cell*. 2016; 164:57–68.
10. Vasilyeva I., Bepalov V., Baranova A. Radioprotective combination of α -tocopherol and ascorbic acid promotes apoptosis that is evident by release of low-molecular weight DNA fragments into circulation // *Intern. J. Radiat. Biol*. 2015; 91:872–877.
11. Vasilyeva I.N., Bepalov V.G., Semenov A.L., Zinkin V.N. The effects of low-frequency noise on rats: evidence of chromosomal aberrations in the bone marrow cells and release of low-molecular-weight DNA in the blood plasma // *Noise Health*. – 2017; 19:79–83.
12. Antunes E., Oliveira P., Oliveira M.J. et al. Effect of large pressure amplitude low frequency noise in the parotid gland perivascular-ductal connective tissue // *Acta Med. Port*. 2013; 26:229–240.
13. Vasilyeva I.N., Bepalov V.G., Von J.D., Baranenko D. Cell-free DNA plasma levels differ in age-specific pattern in healthy rats and castrated with testosterone-induced benign prostatic hyperplasia // *Int. J. Genomics*. 2019; 2019:8173630.
14. Zhong X.Y., Hahn S., Kiefer V., Holzgreve W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? // *Annals of Hematology*. – 2006; 86:139–143.
15. Jylhävä J., Nevalainen T., Marttila S., Jylhä M., Hervonen A., Hurme M. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty // *Aging Cell*. 2013; 12:388–397.
16. Gonzaga A.C.R., Campolina-Silva G.H., Werneck-Gomes H. Moura-Cordeiro J.D Santos L.C., Mahecha G.A. B., Morais-Santos M., Oliveira C.A. Profile of cell proliferation and apoptosis activated by the intrinsic and extrinsic pathways in the prostate of aging rats // *Prostate*. 2017; 77:937–48.
17. Bustamante A., Simats A., Vilar-Bergua A., García-Berrosco T., Montaner J. Blood/Brain Biomarkers of Inflammation After Stroke and Their Association with Outcome: From C-Reactive Protein to Damage-Associated Molecular Patterns // *Neurotherapeutics*. 2016; 3:671–684.
18. O'Connell G.C., Petrone A.B., Tennant C.S., Barr T. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischemic stroke and associated with innate immune system activation // *Brain Inj*. 2017; 6:1–7.
19. Васильева И.Н., Беспалов В.Г. Низкомолекулярная ДНК плазмы крови у больных хронической обструктивной болезнью легких // *Терапевтический архив*. 2017; 3:24–28.
20. Liu J., Pang Z., Wang G., Guan X., Fang K., Wang Z., Wang F. Advanced role of neutrophils in common respiratory diseases // *J. Immunol. Res*. 2017; 6710278.

Поступила после доработки 11 сентября 2019 г.

EXPERIENCE OF PRECLINICAL AND CLINICAL STUDY OF EXTRACELLULAR DNA IN VARIOUS PATHOLOGIES

© Authors, 2019

I.N. Vasilyeva

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist,

Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology

E-mail: iravasilyeva@hotmail.com

V.G. Bepalov

Dr.Sc. (Med.), Head of Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology,

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology

A.L. Semenov

Research Scientist,

Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology

G.V. Tochilnikov

Ph.D. (Med.), Research Scientist,

Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology

Our experimental and clinical studies revealed changes in the content of extracellular DNA (exDNA) in the blood plasma for various pathologies. Ionizing irradiation of rats causes an increase in the content of nucleosomal exDNA in proportion to the radiation dose. Sequencing of exDNA of the irradiated rats shows that this exDNA is released from various parts of the genome and various tissues. Low-frequency noise in single or repeated exposure leads to increase in the content of exDNA, significantly greater in chronic acoustical exposure. Consequently, ionizing radiation and low-frequency noise increase the apoptosis of cells. Administering to rats a combination of vitamins A and E before irradiation raises the level of exDNA, this pro-apoptotic effect of vitamins explains their radio-protective effect as a result of the death of damaged cells. The exDNA level is significantly increased in old intact male rats in comparison with young male rats; exDNA level does not change with testosterone induction of benign hyperplasia of the prostate (BPH) in the young rats, whereas in the old rats increases significantly, which indicates the intensification of apoptosis processes with age and with the development of BPH in old animals. The content of exDNA is increased within 3 days after an acute period in patients with acute impairment of cerebral circulation, and dynamics of change of exDNA levels in patients with ischemic and hemorrhagic stroke is different, which can be used both: to assess the severity of brain damage, and for differential diagnosis of various types of strokes. In patients with COPD the content of exDNA decreases during remission, which indicates the reduction of cell death in the lungs and the reduction of inflammatory process. Thus, the finding of exDNA in blood plasma can be used for the diagnosis of various pathologies, monitoring and evaluating the effectiveness of treatment.

Key words: *extracellular DNA, nucleosomes, apoptosis, pathologies.*

For citation: Vasilyeva I.N., Bepalov V.G., Semenov A.L., Tochilnikov G.V. Experience of preclinical and clinical study of extracellular DNA in various pathologies. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(10):50–56. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-10-08>

REFERENCES

1. Aucamp J., Bronkhost A.J., Badenhorst C.P.S., Pretorius R.J. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society*. 2018; 93:1649–1683.
2. Vasil'eva I.N., Podgornaja O.I., Bepalov V.G. Nukleosomnaja frakcija vnekletčnoj DNK kak pokazatel' apoptoza // *Citologija*. 2015; 57: 87–94.
3. Thierry A.R., Messaoudi S.El., Gahan P.B. et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology // *Cancer Metastasis Rev*. 2016; 35:347–376.
4. Rykova E.Y., Morozkin E.V., Ponomareva A.A. Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content // *Expert Opin. Biol. Ther*. 2012; 12(S1):S141–S153.
5. Mitra I., Khare N.K., Raghuram G.V., Chaubal R. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes // *Journal of Biosciences*. 2015; 40:91–111.
6. Vasil'eva I.N., Zinkin V.N. Znachenie nizkomolekuljarnoj DNK plazmy krovi v diagnostike patologicheskikh processov razlichnogo geneza. // *Biomedicinskaja himija*. 2013; 59:358–373.
7. Zinkin V.N., Vasil'eva I.N., Voznjuk I.A. Opredelenie vnekletčnoj nizkomolekuljarnoj DNK v krovi kak diagnosticheskij metod dlja klinicheskikh i jeksperimental'nyh issledovanij // *Aviakosmicheskaja i jekologicheskaja medicina*. – 2011; 5:47–51.
8. Lehmann-Werman R., Neiman D., Zemmour H. et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2016; 113:1826–1834.
9. Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J., Daza R.M. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin // *Cell*. – 2016; 164:57–68.
10. Vasilyeva I., Bepalov V., Baranova A. Radioprotective combination of α -tocopherol and ascorbic acid promotes apoptosis that is evident by release of low-molecular weight DNA fragments into circulation // *Intern. J. Radiat. Biol*. 2015; 91:872–877.
11. Vasilyeva I.N., Bepalov V.G., Semenov A.L., Zinkin V.N. The effects of low-frequency noise on rats: evidence of chromosomal aberrations in the bone marrow cells and release of low-molecular-weight DNA in the blood plasma // *Noise Health*. – 2017; 19:79–83.
12. Antunes E., Oliveira P., Oliveira M.J. et al. Effect of large pressure amplitude low frequency noise in the parotid gland perivascularo-ductal connective tissue // *Acta Med. Port*. 2013; 26:229–240.
13. Vasilyeva I.N., Bepalov V.G., Von J.D., Baranenko D. Cell-free DNA plasma levels differ in age-specific pattern in healthy rats and castrated with testosterone-induced benign prostatic hyperplasia // *Int. J. Genomics*. 2019; 2019:8173630.
14. Zhong X.Y., Hahn S., Kiefer V., Holzgreve W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? // *Annals of Hematology*. 2006; 86:139–143.
15. Jylhävä J., Nevalainen T., Marttila S., Jylhä M., Hervonen A., Hurme M. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty // *Aging Cell*. 2013; 12:388–397.
16. Gonzaga A.C.R., Campolina-Silva G.H., Werneck-Gomes H. Moura-Cordeiro J.D Santos L.C. , Mahecha G.A. B., Morais-Santos M., Oliveira C.A. Profile of cell proliferation and apoptosis activated by the intrinsic and extrinsic pathways in the prostate of aging rats // *Prostate*. 2017; 77:937–48.
17. Bustamante A., Simats A., Vilar-Bergua A., Garcia-Berrocoso T., Montaner J. Blood/Brain Biomarkers of Inflammation After Stroke and Their Association with Outcome: From C-Reactive Protein to Damage-Associated Molecular Patterns // *Neurotherapeutics*. 2016; 3:671–684.
18. O'Connell G.C., Petrone A.B., Tennant C.S., Barr T. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation // *Brain Inj*. 2017; 6:1–7.
19. Vasil'eva I.N., Bepalov V.G. Nizkomolekuljarnaja DNK plazmy krovi u bol'nyh hronicheskoy obstruktivnoj bolezni'ju legkih // *Terapevticheskij arhiv*. 2017; 3:24–28.
20. Liu J., Pang Z., Wang G., Guan X., Fang K., Wang Z., Wang F. Advanced role of neutrophils in common respiratory diseases // *J. Immunol. Res*. 2017; 6710278.