

## ОБЗОРЫ

УДК 57.017.2-57.05-577.2.04-577.29-612.1-616-066

©Брызгунова, Лактионов

### ФОРМИРОВАНИЕ ПУЛА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ДНК КРОВИ: ИСТОЧНИКИ, ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И ЦИРКУЛЯЦИИ

*О.Е. Брызгунова\*, П.П. Лактионов*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
630090 Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8; тел.: (383)3635144; факс: (383)3635153;  
эл. почта: olga.bryzgunova@niboch.nsc.ru

Внеклеточные нуклеиновые кислоты (внНК) в циркуляции как здоровых, так и больных людей были впервые описаны в 1948 г., однако оставались без внимания до середины 60-х годов прошлого века. внНК особенно интенсивно исследуются в последние 5 лет. Основное внимание уделяется исследованию внНК как источнику диагностического материала; однако механизмы генерации внеклеточных нуклеиновых кислот, а также механизмы, обеспечивающие их долговременную циркуляцию в кровотоке, однозначно не установлены. По данным одних авторов, основным источником циркулирующих дезоксирибонуклеиновых кислот в крови (цирДНК) являются процессы некроза и апоптоза, другие ссылаются на возможную секрецию нуклеиновых кислот как здоровыми, так и опухолевыми клетками. Известно, что цирДНК могут циркулировать в крови в течение длительного времени, ускользая от действия ДНК-гидролизующих ферментов крови и, по-видимому, находясь в составе надмолекулярных комплексов. В этом обзоре представлены данные разных авторов и приведены доказательства в пользу всех предложенных теорий появления цирДНК, описаны особенности строения цирДНК, а также факторы, влияющие на время циркуляции ДНК в крови.

**Ключевые слова:** циркулирующая ДНК, апоптоз, некроз, активная секреция, ДНКазы, метилирование.

**DOI:** 10.18097/PBMC20156104409

#### ВВЕДЕНИЕ

Ещё в 60-х годах прошлого столетия появились первые сообщения о присутствии очень малых количеств ДНК в плазме крови человека и животных [1]. В настоящее время известно, что ДНК свободно циркулирует в крови как в норме, так и при развитии различных патологий. Концентрация внеклеточной ДНК в плазме здоровых доноров в среднем не превышает 53 нг/мл [2-4]. При развитии онкологических заболеваний концентрация внДНК возрастает и, по данным разных авторов, составляет от 10-1200 нг/мл [5-7] до 2160 нг/мл [2]. В крови онкологических больных ДНК опухолевого происхождения в суммарном пуле циркулирующих ДНК (цирДНК) составляет от ~1,9% [8] до 93% [5].

#### 1. ИСТОЧНИКИ ЦИРКУЛЯТОРНЫХ ДНК

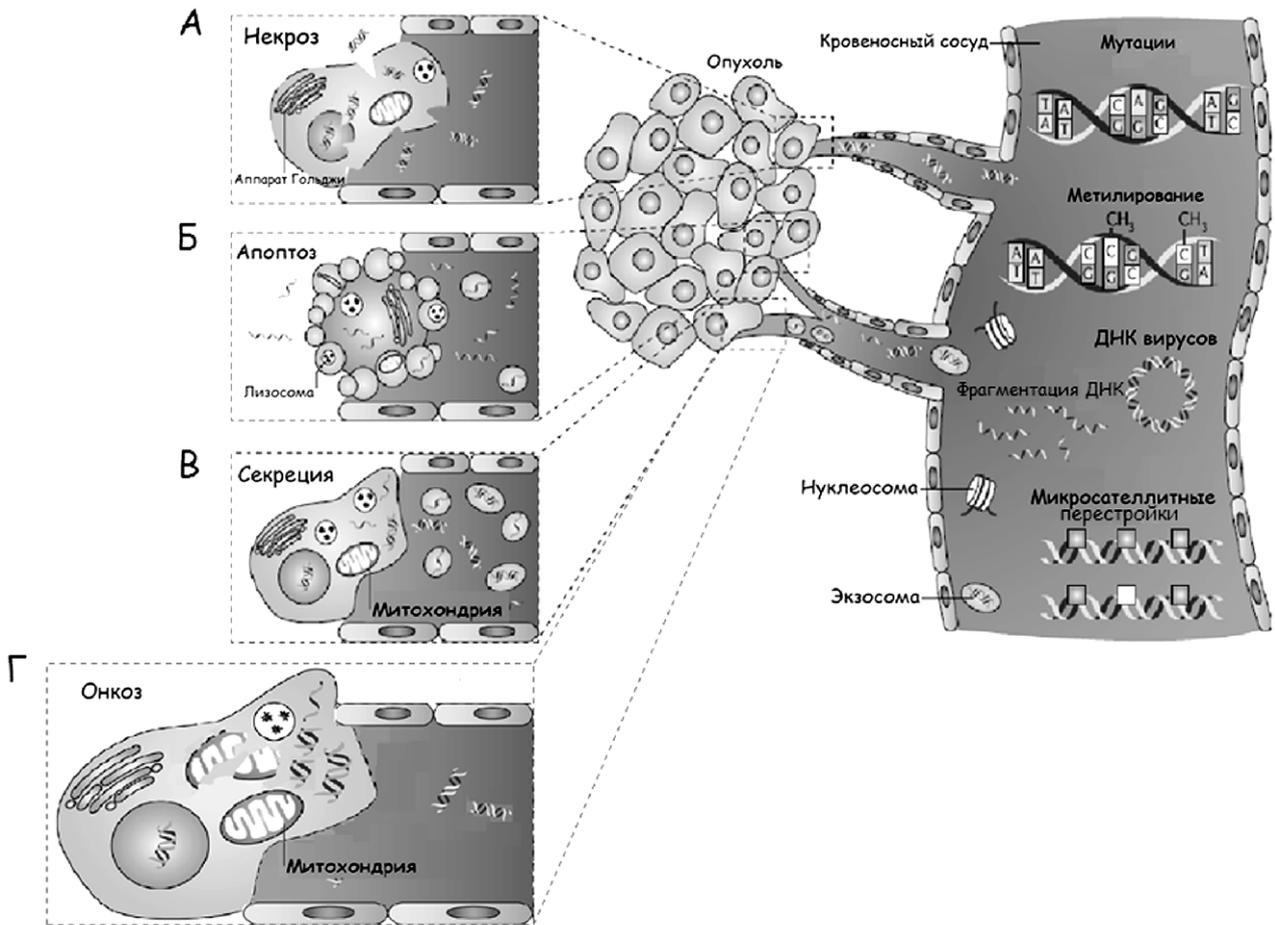
Основными источниками цирДНК в настоящее время принято считать апоптоз, некроз нормальных и опухолевых клеток и секрецию ДНК нормальными и/или трансформированными клетками (рис. 1).

##### *1.1. Происхождение цирДНК в результате апоптоза (рис. 1Б).*

Известно, что апоптоз является запрограммированной формой гибели клеток на протяжении всей жизни организма, начиная с ранних стадий эмбриогенеза и до смерти. В организме человека ежедневно минимум  $10^9$  клеток проходят стадии деления [9] и для поддержания гомеостаза часть клеток погибает, генерируя 1-10 г ДНК в сутки. Признаками апоптоза являются уменьшение объёма всей клетки и её ядра, а также межнуклеосомная фрагментация ДНК (с размером фрагментов кратных нуклеосоме) с последующим формированием апоптотических телец [10].

Обнаружение низкомолекулярных фрагментов ДНК размером 180 пар нуклеотидов (п.н.) и 200 п.н. в плазме [5, 11] и сыворотке [12] онкологических больных и 185-200 п.н. в плазме здоровых доноров [13], а также фрагментов ДНК размером 370-470 п.н., 150-240 п.н., 30-40 п.н. и 20 п.н. в сыворотке больных системной красной волчанкой и здоровых доноров (хоть и в меньшем количестве) [14] служит доказательством её апоптотического происхождения.

\* - адресат для переписки



**Рисунок 1.** Циркулирующие внеклеточные нуклеиновые кислоты крови. Источниками внеклеточной ДНК в крови могут служить процессы некроза (А), апоптоза (Б), онкоза (Г) и активной секреции (В). В составе циркулирующих в крови внеклеточных ДНК были обнаружены ДНК, имеющие характерные для опухолевых клеток мутации, aberrантное метилирование, перестройки микросателлитной ДНК, вирусная ДНК. Общая схема кровеносного сосуда и панели А, Б и В адаптированы из [226].

Обнаружение ДНК плода в крови матери [15-16] также согласуется с теорией происхождения циркулирующей ДНК в крови в результате апоптоза. Показано, что клетки трофобласта и около половины фетальных ядросодержащих эритроцитов гибнут именно путём апоптоза. Количество фетальной ДНК (составляющее 3,4%-6,2% от общего пула внеклеточной ДНК) в крови матери в 25 раз больше, чем её же количество в интактных фетальных клетках этого же кровяного русла [17].

Доказательства апоптотического происхождения циркулирующей ДНК получены и в работах, проведённых на культурах клеток [18-20]. Апоптоз индуцировали обработкой клеток такими химическими реагентами как стауроспорин (ингибитор протеинкиназы широкого спектра действия), камптотецин (индуцирует апоптоз за счёт связывания с комплексом ДНК-топоизомеразы I) или этопозид (ингибитор ДНК-топоизомеразы II). Апоптотические клетки, меченые аннексин V-флуоресцеин изотиоцианатом, выявляли при помощи проточной цитометрии. Концентрацию ДНК измеряли при помощи окраски флуорометрическим красителем PicoGreen.

Этими исследованиями показано, во-первых, что апоптотические Т-клетки (Jurkat) высвобождают значительно большее количество ДНК в культуральную среду, чем необработанные клетки (максимальные значения концентраций ДНК наблюдались после обработки клеток стауроспорином). Во-вторых, высвобождение ДНК из апоптотических клеток является процессом, зависимым от времени, с количеством ДНК пропорциональным степени апоптоза, причем характер фрагментации высвобождаемой ДНК подобен характеру фрагментации ДНК, активируемой после инициации апоптоза нуклеазами.

Известно, что фагоцитирующие клетки интенсивно участвуют в удалении как клеточного дебриса [21], так и апоптотических тел [22]. В работе группы Pissetsky [23] клетки Jurkat, вступающие в апоптоз, культивировали вместе с макрофагами. Такое культивирование с макрофагами приводило к уменьшению количества высвобождаемой в культуральную среду ДНК.

Этой же группой ученых в экспериментах *in vivo* было показано, что при введении самкам мышей

апоптотических клеток Jurkat наблюдается рост концентрации внДНК. Концентрация ДНК достигает максимума в крови через 6 ч после инъекции, а уже через 24 ч падает ниже уровня детекции используемого метода [23].

### 1.2. Происхождение цирДНК в результате некроза (рис. 1А)

В отличие от апоптоза, некроз не имеет такого чёткого сценария развития. Процесс некроза может быть вызван жёстким и необратимым вмешательством, например, травмой, высоко-дозовой радиацией, высокой температурой и/или обработкой веществами, приводящими к разрушению клеточной мембраны или блокирующими энергетические процессы. Признаками некротической гибели клеток являются набухание цитоплазмы, разрыв цитоплазматической мембраны, набухание цитоплазматических органелл, умеренная конденсация хроматина и отсутствие фрагментации ДНК, характерной для апоптоза [10]. Так, например, в плазме крови как больных пациентов, так и здоровых доноров были обнаружены высокомолекулярные фрагменты ДНК (~10000 п.н.), что навело авторов на мысль о появлении ДНК в циркуляции вследствие некротической гибели клеток [5, 12, 24]. Однако из-за отсутствия в норме некротических клеток, процесс некроза не может являться основным источником цирДНК у здоровых доноров. Что же касается онкологических больных, то некротическая гибель клеток, часто наблюдаемая в опухолевых тканях в результате недостаточной васкуляризации и устойчивой ишемии, вполне может служить источником цирДНК крови [25].

Увеличение уже через 20 мин концентрации ДНК в крови больных, получивших травму, может объясняться как происходящими процессами некроза, так и ускоренным апоптозом. Корреляция между количеством ДНК в крови и тяжестью повреждения, полученного пациентом [26], а также быстрое увеличение концентрации внДНК свидетельствуют в пользу некротического происхождения цирДНК при травме.

Гипотезам о некротическом и апоптотическом происхождении цирДНК противоречат данные о 90%-ном снижении уровня ДНК в плазме онкологических больных после окончания курса радиотерапии [27]. Известно, что радиация индуцирует некроз (или апоптоз, в зависимости от дозы облучения), и такая обработка должна была бы приводить к повышению концентрации дезоксирибонуклеиновых кислот [28].

Доказательства в пользу появления внеклеточных ДНК в результате некротической гибели клеток, также как и в случае апоптотической гибели (см. выше), были получены группой Pisetsky в экспериментах, проведенных на клеточных культурах Jurkat [18-19]. Некроз индуцировали обработкой клеток 10% этанолом или нагреванием при температуре 56°C в течение 30 минут. Для того, чтобы идентифицировать живые,

апоптотические и некротические клетки, их инкубировали с анексином V, меченым флуоресцеин изотиоцианатом и пропидиум иодидом и анализировали при помощи проточной цитофлуорометрии. Концентрацию ДНК измеряли при помощи флуорометрической окраски PicoGreen. Оказалось, что в отличие от апоптотических клеток, в культуре некротических клеток концентрация внДНК существенно ниже, что авторы объясняют тем, что ДНК из некротических клеток не попадает во внеклеточную среду. Как уже упоминалось выше, макрофаги являются основными клетками, которые утилизируют клеточный дебрис [21]. В то время как при совместном культивировании макрофагов с клетками Jurkat, в которых был инициирован некроз, наблюдается высокая концентрация внДНК.

В экспериментах *in vivo*, при введении самкам мышей клеток Jurkat после индукции некроза, так же, как и в случае клеток после индукции апоптоза (см. выше), наблюдается значительное увеличение концентрации внДНК. Концентрация ДНК также достигает максимума в крови через 6 ч после инъекции и падает ниже уровня детекции спустя 24 ч [23].

### 1.3. Происхождение цирДНК в результате онкоза (рис. 1Г)

Наряду с апоптозом и некрозом выделяют ещё один тип клеточной смерти – онкоз [29-30]. Термин онкоз происходит от греческого слова, означающего “опухоль”. Онкоз относится к запрограммированной клеточной смерти, характеризующейся набуханием клетки и её органелл, а также увеличением проницаемости мембраны. Морфологические изменения клетки при онкозе включают в себя агрегацию хроматина при отсутствии явных уплотнений хроматиновых телец, разрушение лизосом, а также набухание и разрушение митохондрий. На биохимическом уровне онкоз обычно индуцируется такими патологическими стимулами как ишемия и/или реперфузия (восстановление кровотока после ишемии). Онкоз часто приводит к неспецифической фрагментации ДНК [29], сопровождается нарушением синтеза АТФ и повреждением митохондрий, повышением проницаемости плазматической мембраны и дисфункцией ионных насосов, которые приводят к утечке лизосомальных ферментов и внутриклеточных белков [29], в результате чего в кровотоке могут появляться высокомолекулярные фрагменты ДНК.

### 1.4. Появление внеклеточных ДНК в крови в процессе секреции нормальными и опухолевыми клетками (рис. 1В)

Ещё в 1972 году была показана возможность секреции ДНК лимфоцитами, стимулированными фитомитогенами [31]. Немного позднее Anker с соавт. были получены доказательства в пользу рассматриваемой теории, которые в то же время опровергали апоптозно/некротическую теорию появления внеклеточных ДНК. Авторами [32-33]

было показано, что после инкубации клеток в течение 2-16 ч (при смене среды каждые 2 ч) количество внДНК не изменяется. Показано, что внДНК является двуцепочечной и её молекулярная масса составляет от  $3,5 \cdot 10^5$  до  $3,7 \cdot 10^6$  Да. Авторы делают вывод о том, что источником ДНК являются живые, а не умирающие или мёртвые клетки на основании следующих данных: а) одинаковое количество ДНК было обнаружено в культуральной среде после инкубации клеток в течение 2 ч и 16 ч; б) уровень клеточной смерти не влиял на количество внДНК; в) после того, как лимфоциты были центрифугированы и помещены в новую культуральную среду несколько раз подряд, одинаковое количество внДНК было выделено из каждых последующих супернатантов, тогда как, если после центрифугирования лимфоциты помещали обратно в их “старую” культуральную среду, увеличения количества внДНК не наблюдалось; г) для получения максимальной концентрации внДНК требуется более одного часа; д) клетки, секретирующие ДНК, сохраняли свою функциональную целостность, что подтверждалось их способностью к увеличению синтеза ДНК после стимуляции.

Получены данные и о том, что опухолевые клетки секретируют большее количество ДНК в среду, чем нормальные клетки [34], например, лейкоциты больных лейкемией по сравнению с лейкоцитами здоровых доноров. Данные о том, что концентрация внДНК в плазме онкологических больных значительно выше, чем в плазме здоровых доноров, рассматриваются этими авторами как доказательство активной секреции ДНК опухолевыми клетками. Косвенным свидетельством секреторного происхождения цирДНК может служить и обнаруженная положительная и статистически значимая корреляция между диаметром опухоли и ростом уровня нормальной ДНК на ранних стадиях развития опухоли [35].

Однако внДНК могут циркулировать в крови не только в свободном виде, но и в связанном с поверхностью клеток крови за счёт ионных или белковых взаимодействий (о чем более подробно речь пойдет в следующей главе). О том, что механизмы, приводящие к появлению ДНК на клеточной поверхности и в культуральной среде первичных (HUVES) и раковых (HeLa) клеток отличаются, доказывают работы Морозкина с соавторами [36]. Авторы предположили, что активная секреция ДНК клетками может быть заблокирована ингибиторами известных секреторных механизмов, ответственных за активную секрецию белков, протеогликанов и протеолипидов. Авторы использовали ингибиторы двух основных путей секреции белка: классического (Гольджи-зависимого) и неклассического (Гольджи-независимого). Обработка клеток HUVES монензином (ингибитор функций аппарата Гольджи), глибуридом (ингибитор семейства мембранных транспортеров ABC1) и метиламином (ингибитор эндо/экзоцитоза) уменьшает количество связанной с клеточной поверхностью ДНК на 30%, 35% и 19%, соответственно, тогда как хлорохин (увеличивает pH в эндосомах, лизосомах и пузырьках Гольджи)

увеличивает эту концентрацию на 90%. Только монензин уменьшает количество ДНК на клеточной поверхности HeLa на 15%, тогда как глибурид увеличивает концентрацию ДНК на 50%. Обработка обеих клеточных линий этими ингибиторами не влияла на концентрацию ДНК в культуральной среде, кроме хлорохина, обработка которым вдвое увеличивала концентрацию внДНК в культуральной среде клеток линии HUVES. Полученные авторами данные показали участие везикулярного и белкового транспорта в высвобождении ДНК. Кроме того, эти эксперименты доказывают, что механизмы, приводящие к появлению ДНК на клеточной поверхности и в культуральной среде первичных и раковых клеток, отличаются.

Нетривиальная гипотеза о механизме возникновения внДНК в результате внеклеточного синтеза ДНК была высказана и описана в работе [33]. Однако более позднее исследование внеклеточного синтеза ДНК при помощи не проникающих в клетки биотинилированных нуклеотидтрифосфатов показало, что синтез ДНК вне клеток действительно наблюдается, но только в случаях, когда клетки (HeLa) инфицированы микоплазмой. В клетках, свободных от микоплазмы, внеклеточного синтеза ДНК не было обнаружено [37]. Здесь необходимо упомянуть о том, что во всех вышеописанных экспериментах используемые клетки не были протестированы на присутствие микоплазмы, хотя ей заражено от 10% до 87% клеточных культур [37].

Доказательства в пользу обеих высказанных гипотез о механизмах секреции ДНК (в результате апоптоза и активной секреции) были получены в экспериментах по культивированию клеток линии HL-60, меченных [ $^3\text{H}$ ]-тимидином, в присутствии стауроспорина (увеличивает продукцию каспазы 3, способствующую апоптозу [38]) или z-VAD-fmk (флуорометилкетон, антиапоптотический трипептид, ингибирующий каспазы) [24]. Авторы обнаружили, что вся внеклеточная ДНК имеет вид “апоптотической” фрагментации независимо от условий эксперимента. С другой стороны, клеточная ДНК имеет “апоптотическую” фрагментацию только в случае экспериментов со стауроспорином; в контроле (культивировали клетки без каких-либо добавлений) и в присутствии z-VAD-fmk клеточная ДНК представлена только высокомолекулярной фракцией. Кроме того, как в контрольной группе, так и в экспериментальной группе с z-VAD-fmk было обнаружено, что инкубация клеток HL-60, меченных [ $^3\text{H}$ ]-тимидином в течение 20 ч, приводит к появлению небольшого количества меченой вновь синтезированной ДНК в супернатанте [24]. Однако, в такой же серии экспериментов, инкубация меченых клеток со свежей средой, не содержащей метку, в течение 5 ч приводит к значительному повышению удельной радиоактивности внеклеточной ДНК. Это может указывать на то, что удаление немеченой внеклеточной ДНК после 20 ч культивирования, индуцирует высвобождение вновь синтезированной меченой ДНК во внеклеточную среду, как это ранее было показано Anker и Stroun в культуре лимфоцитов

человека [32]. В противоположность вышеописанным данным, в серии экспериментов со стауроспорином синтез ДНК блокируется (в результате обнаружено лишь незначительное количество меченой ДНК в клетках и супернатанте). Тем не менее, дальнейшие эксперименты показали, что общее количество внДНК в 20 мл среды после 20 ч инкубации было значительно выше в “апоптотической” серии экспериментов (8,2 мкг), чем в контроле (2,05 мкг) или в серии экспериментов с использованием z-VAD-fmk (2,27 мкг). Авторы считают, что эти эксперименты подтверждают существование двух отдельных механизмов высвобождения внДНК, а именно апоптоза и активной секреции. Какой из них, в конечном счёте ответственен за появление основной массы цирДНК в крови до сих пор не ясно, хотя в последнее время большинство исследователей считает, что цирДНК имеет апоптотическое происхождение.

## 2. СОСТАВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ КОМПЛЕКСОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ДНК

Ещё в начале второй половины прошлого века появились первые данные о том, что экзогенная ДНК циркулирует в кровотоке лабораторных животных очень короткое время [39]. Эти данные позднее были неоднократно подтверждены разными группами исследователей [40-42]. Оказалось, что время циркуляции ДНК практически не зависит от её структуры (нативная, одноцепочечная), размера фрагментов и уже через 5 мин после введения в кровь остается не более 25% экзогенной ДНК [41, 43]. На примере эндогенной эмбриональной внДНК плода было показано, что после родов такая ДНК быстро выводится из материнского кровотока; время полужизни составляет в среднем 16,3 мин (4-30 мин) [44].

Общее количество ДНК, размер фрагментов и время её циркуляции в крови определяются активностью нуклеаз крови [39, 45], структурой ДНК (наличием/отсутствием метилированных цитозинов) [46], формой цирДНК (свободная или в составе комплексов) [47], а также наличием биополимеров [48-49], которые могут связываться с нуклеиновыми кислотами, защищая их от нуклеазной атаки или, напротив, дестабилизируя нуклеопротеиновые компоненты. Эти аспекты циркуляции ДНК в кровотоке будут более детально рассмотрены ниже.

Данные о том, что ДНК в крови присутствует как в свободной форме, так и в составе комплексов с определенными белками появились в научной литературе ещё в 1979 г. [50]. В настоящее время достоверно известно, что эндогенные нуклеиновые кислоты могут циркулировать в крови в составе апоптотических телец, микровезикул, нуклеосом, экзосом, нуклеопротеиновых комплексов с белками крови и, возможно, в свободном виде [5, 11, 51-53] (таблица).

Известно, что в ядрах эукариотических клеток ДНК связана с гистонами и формирует комплексы известные как нуклеосомы [54]. Увеличение количества клеток, вступивших в апоптоз или некроз, приводит к повышению количества нуклеосом в циркуляции [55]. Доказательством этого факта является возрастание концентрации нуклеосом как в плазме, так и в сыворотке крови при различных формах онкологических заболеваний, травмах и сепсисе по сравнению с плазмой/сывороткой крови здоровых доноров [56]. Концентрация нуклеосом в сыворотке не является специфическим признаком [57], концентрация нуклеосом коррелирует со стадией онкологического заболевания и присутствием метастазов только у больных раком желудочно-кишечного тракта [56, 58].

Размер цирДНК в составе моно- и олигонуклеосомных фрагментов, а также в составе нуклеосомо-подобных частиц в плазме/сыворотке крови больных системной красной волчанкой и онкологических пациентов преимущественно составляет 150-200 п.н, 400 п.н, 600 п.н и 800 п.н. [5, 13, 59, 60].

Определение концентрации циркулирующих нуклеосом может быть использовано для мониторинга эффективности цитотоксической терапии. Интенсивно снижающаяся концентрация нуклеосом наблюдается у пациентов с ремиссией заболевания, тогда как увеличение концентрации характерно для прогрессирующих опухолей и во время сеансов химио- и радиотерапии [54, 56]. По данным некоторых авторов, основная часть внДНК циркулирует в крови в составе нуклеосом. Действительно, время жизни нуклеосом, введённых внутривенно мышам, сопоставимо со временем жизни циркулирующей плодной ДНК в крови матери [60, 61]. Однако прямые доказательства того, что основная часть ДНК опухолевых или

Таблица. Состав циркулирующих в крови комплексов внеклеточных нуклеиновых кислот.

Название	ссылка
<i>Микрочастицы, покрытые мембраной</i>	
Апоптотические тельца	73
Микровезикулы	225
Поверхностные пузырьки	75
Экзосомы	53
<i>Микрочастицы, не содержащие мембран</i>	
Нуклеосомы	55-58
Нуклеопротеиновые комплексы с белками крови	48, 77-83, 227
Нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью форменных элементов крови	82, 84-101, 104-106

плодных клеток циркулирует в крови в виде свободных нуклеосом, отсутствуют. Нуклеосомы, обнаруживаемые в плазме, могут высвободиться в кровь по ходу созревания цитологических элементов, в процессе нормального функционирования тканей, из белых кровяных клеток, погибающих *in vivo* и в процессе подготовки сыворотки/плазмы *in vitro*. Следует отметить, что основные работы, в которых была исследована концентрация нуклеосом были выполнены под руководством Holdenrieder, который измерял концентрацию нуклеосом при помощи иммуноферментного-сэндвич анализа "The Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>" ("Roche Diagnostics"), основанного на использовании моноклональных антител к нуклеосомам и, измеряя в образцах концентрацию нуклеосом, не определял в этих же образцах истинную концентрацию ДНК [54, 62]. Таким образом, полученные в цикле работ данные не позволяют оценить соотношение между упакованной и не упакованной в нуклеосомы ДНК [54, 62].

Известно, что олигонуклеосомы, содержащие гистон H1, нерастворимы в физиологической ионной среде (в присутствии 3 мМ двухвалентных ионов), которой и является нормальная плазма. Тем не менее, их обнаруживают в крови различных больных [63]. Интересное объяснение этому факту было предложено в 1987 г. [64], когда было показано, что сывороточный амилоидный компонент Р, присутствующий в плазме, способен эффективно связываться с нуклеосомами, замещая гистон H1, защищая ДНК от действия нуклеаз и повышая растворимость олигонуклеосом в плазме [65].

Показано, что в составе цирДНК есть локус, ответственный за связывание ДНК с гистоном H3K27me2. Существуют предположения, что этот гистон необходим для экспорта и стабилизации внДНК [66].

Апоптотические тельца также могут защищать внДНК от действия нуклеаз. Эти структуры образуются при фрагментации ядер и клеток во время апоптоза, сопровождающегося гидролизом ДНК и конденсацией хроматина и представляют собой мембранные частицы размером от 50 нм до 5000 нм [67, 68]. Макрофаги, незрелые дендритные клетки [69, 70] или соседние клетки [55, 71] связывают и фагоцитируют как неповрежденные апоптотические клетки, так и апоптотические тельца [72]. Очевидно, что вероятность избежать поглощения и затем появиться в кровотоке у маленьких апоптотических телец больше, чем у интактных клеток.

Циркулирующие апоптотические тельца были получены и исследованы в работе Морозкина с соавт. [73]. При помощи FISH-анализа и массового параллельного секвенирования было показано, что такие свободно циркулирующие апоптотические тельца обогащены Alu-повторами и обеднены L1-элементами, а также обогащены специализированными последовательностями, как, например, ДНК района 9q12.

Наличие ДНК (отдельно от РНК) в апоптотических тельцах было показано при помощи красителей Hoechst 33342 и 7-аминоактиномицина D [74].

Наряду с апоптотическими тельцами, хроматин может присутствовать в описанных в работе Casciola-Rosen [75] поверхностных пузырьках, отделяющихся от клеток на ранних стадиях апоптоза. Глобальная разница между апоптотическими тельцами и этими пузырьками неясна; к тому же известно, что упомянутый выше амилоидный компонент Р в экспериментах *in vivo* связывается как с поверхностью пузырьков, несущих в себе фрагменты хроматина, так и с апоптотическими тельцами, а также с ядерным дебрисом образующимся в результате некроза [76], что может свидетельствовать о наличии нуклеосомной упакованной ДНК не только внутри, но и на поверхности мембранных структур субклеточного размера.

Известно, что комплексы с ДНК могут образовывать 2-3% сывороточных белков. По данным Егоровой и Блинова, основными ДНК-связывающими белками сыворотки крови здоровых и больных людей являются фракции высокомолекулярных белков с молекулярной массой 470-760 кДа и иногда, в крови здоровых доноров, встречается фракция белков с молекулярной массой 150-200 кДа [77]. При бластном кризе хронического миелолейкоза и у больных рефрактерной анемией с увеличением бластов была обнаружена дополнительная фракция ДНК-связывающих белков с молекулярной массой около 30-40 кДа [77]. Свободно циркулирующая ДНК может связываться с компонентом комплемента (C1q) [78], альбумином [79] и иммуноглобулинами М и G [80]. В экспериментах *in vitro* было обнаружено связывание лактоферина и лизоцима с ДНК [81]. Впоследствии было показано, что эти белки формируют комплексы с радиоактивно-меченным синтетическим олигонуклеотидом в слюнной и слезной жидкостях и, по видимому, в крови [82]. На основании того, что фибронектин, формирующий комплексы с ДНК, является гепарин-связывающим белком, было высказано предположение о том, что и другие белки свертывающей системы крови, имеющие центры связывания гепарина и других полианионов, могут связывать ДНК [83].

В сыворотке крови человека были обнаружены ещё 2 основных ДНК-связывающих белка с молекулярной массой 126 кДа и 86 кДа, названные ДНК-связывающий белок 1 и ДНК-связывающий белок 2 соответственно [48]. При помощи аминокислотного анализа было показано, что оба белка обогащены остатками пролина и цистеина, и практически не содержат остатков метионина.

О том, что внДНК может циркулировать, связавшись с форменными элементами крови (таблица), говорят факты обнаружения ДНК-связывающих белков на внешней поверхности плазматической мембраны клеток. Например, белков с молекулярной массой 20-143 кДа в мембране человеческих лейкоцитарных клеток [84] и с массой 28 кДа, 59 кДа и 79 кДа в клеточной мембране лимфоцитов [85]. Лейкоциты не только содержат ДНК на своей поверхности, но и связывают её

по механизму “лиганд-рецептор” [86]. Кроме того, показано, что ДНК на поверхности лимфоцитов могут связывать мембранные иммуноглобулины и иммуноглобулиноподобные рецепторы [82]. Связывание цирДНК с клетками крови может проходить и за счёт взаимодействия белковых или липидных компонентов, находящихся в комплексах с ДНК и защищающих её от действия нуклеаз. Это предположение основывается на присутствии рецепторов для иммуноглобулинов [87] и альбумина [79] на поверхностях клеток крови. Кроме того, была показана возможность связывания ДНК, в том числе и на примере ДНК фага  $\lambda$ , с моноцитами, Т- и В-клетками, нейтрофилами [88, 89]. Причём, было показано, что связывание ДНК с лейкоцитами крови является насыщаемым и ингибируется предварительной обработкой клеток трипсином или добавлением немеченой ДНК, но не РНК, поли [d(A)-d(T)] или мононуклеотидов [90]. Обработка клеток пепсином, нейраминидазой, фосфолипазой или РНКазой практически не влияла на связывание ДНК с клетками. Более того, было показано, что при увеличении в среде концентрации ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  до 1 мМ увеличивается и количество ДНК, связанной с клетками. Авторы показали, что в связывании ДНК с поверхностью нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов человека участвует белок с молекулярной массой 30 кДа [90]. Кроме того, лимфоциты экспрессируют на своей поверхности рецепторы к лактоферину, имеющие нуклеиновую природу [91].

Тромбоциты, которых в 10-15 раз меньше эритроцитов, также способны связывать ДНК [92]. Они связывают бактериальную одноцепочечную ДНК; связывание такой ДНК является насыщаемым, и в максимальной точке составляет 0,5-2,75 нг на миллион клеток, предварительно отмытых от ДНК. При обработке этих клеток ДНКазой I, связанная с клеточной поверхностью ДНК не разрушалась; более того, при последующей активации тромбоцитов аспирином их агрегация не наблюдалась [92].

На поверхности основных клеток крови – эритроцитов, составляющих в среднем 40% объёма крови, был обнаружен ДНК-связывающий мембранный белок, молекулярная масса которого составляет 42 кДа [93]. Высказано предположение, что повышение уровня внДНК в крови больных системной красной волчанкой по сравнению со здоровыми донорами обусловлено нарушением функциональной активности этого белка [93].

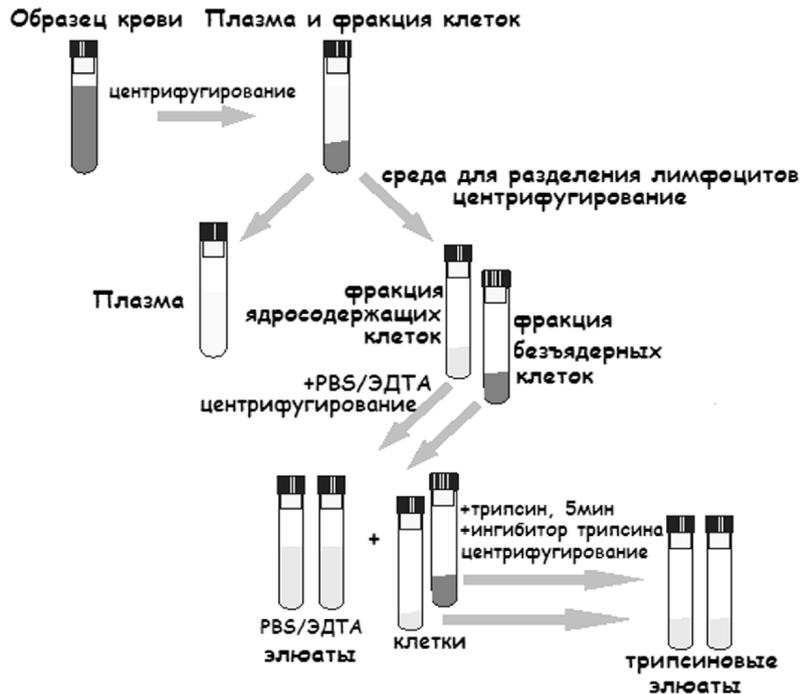
Рибонуклеиновые кислоты также могут связываться с поверхностью клеток крови. Ещё в 1974 году было обнаружено, что обработка клеток яичника китайского хомячка (СНО) трипсином, при которой клетки сохраняют фенотип и жизнеспособность и остаются в состоянии монослоя, приводит к элюции значительного количества РНК, которая, по-видимому, в норме связана с клеточной поверхностью [94]. Позднее подобные данные были получены в работах Морозкина с соавторами на клеточных культурах

A431 и HeLa [95]. Авторы проводили обработку клеток фосфатным буфером, содержащим ЭДТА, с последующей мягкой обработкой клеток раствором трипсина. Ими показано, что РНК контактирует с клеточной поверхностью как за счёт ионных, так и за счёт белковых взаимодействий, тогда как ДНК (размером, в основном, около 10 т.п.н.) – только за счёт белковых взаимодействий.

### 2.1. Внеклеточные ДНК на поверхности форменных элементов крови

Присутствие белков, способных связывать ДНК и их комплексы, на плазматической мембране клеток крови доказывают эксперименты по элюции нуклеиновых кислот при помощи мягкой обработки клеток 0,125% раствором трипсина (рис. 2) [96]. С использованием этой обработки внДНК, связанная с поверхностью как ядерных, так и безъядерных клеток крови была обнаружена и у здоровых доноров, и у онкологических больных [97, 98]. Так, средняя концентрация ДНК, связанной с поверхностью эритроцитов за счёт ионных взаимодействий, в крови здоровых мужчин и женщин составила 298 нг и 57 нг, а с поверхностью лейкоцитов – 682 нг и 88 нг, соответственно. Средняя концентрация ДНК, связанной с поверхностью эритроцитов за счёт белковых взаимодействий, в крови здоровых мужчин и женщин составила 92 нг и 296 нг, а с поверхностью лейкоцитов – 246 нг и 88 нг, соответственно [99]. У больных раком желудка и толстой кишки средняя концентрация ДНК, связанной с поверхностью эритроцитов и лейкоцитов как за счёт ионных, так и за счёт белковых взаимодействий, от здоровых доноров достоверно не отличалась [100]. При раке молочной железы внДНК, связанная за счёт ионных взаимодействий со всеми клетками крови, была обнаружена только в двух случаях, а за счёт белковых взаимодействий в одном случае из 20 [101]. Размеры фрагментов внДНК, элюированных как с поверхности эритроцитов, так и с поверхности лейкоцитов здоровых доноров, находятся в диапазоне от 10 т.п.н. до 20-25 т.п.н. Более того, и на поверхности эритроцитов, и на поверхности лейкоцитов здоровых доноров была обнаружена низкомолекулярная фракция ДНК размером около 500 п.н., связанная с клеточной поверхностью преимущественно за счёт ионных взаимодействий [97].

Механизмы связывания нуклеиновых кислот с поверхностью клеток были исследованы в работах Будкера и Беляева [102, 103]. Было обнаружено, что полинуклеотиды в присутствии катионов двухвалентных металлов адсорбируются на природной и модельной фосфолипидной мембране, в том числе и на липосомах [102, 103]. Это взаимодействие осуществляется посредством связывания остатков фосфорной кислоты ДНК с фосфолипидами через катионы двухвалентных металлов [102]. Последние в присутствии 0,3 М сахарозы опосредуют связывание с мембраной более крупных молекул ДНК, как это было показано для фибробластов мыши и клеток миеломы



**Рисунок 2.** Подготовка образцов плазмы крови и элюатов с поверхностей клеток крови. Образцы крови разделяли на плазму и фракцию клеток крови, плазму переносили в новую пробирку. Форменные элементы крови разделяли на фракции ядросодержащих и безъядерных клеток при помощи среды для разделения лимфоцитов и центрифугирования. Клетки каждой из фракций последовательно обрабатывали раствором PBS/ЭДТА (для элюции нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью клеток крови за счёт ионных взаимодействий) и затем, раствором трипсина (для элюции нуклеиновых кислот, связанных с клеточной поверхностью за счёт белковых взаимодействий) в условиях, не приводящих к лизису клеток.

на примере ДНК фага Т7 и плазмиды рСКА2 [103]. Кроме того, белки клеточной поверхности, имеющие в своем составе остатки положительно заряженных аминокислот, могут взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, усиливая, таким образом, их связывание с мембраной. Это доказывают эксперименты по элюции нуклеиновых кислот с поверхностей клеток крови (как здоровых доноров, так и больных пациентов) буфером, содержащим 5 мМ ЭДТА [96].

Ещё одним механизмом связывания ДНК с клетками может быть связывание ДНК в составе нуклеосом с клеточной поверхностью или связывание через гистоны, каким-то образом экспонированные на поверхности клеток. Действительно, ДНК была обнаружена на поверхности клеток Raji при помощи антител к ДНК из сывороток больных системной красной волчанкой, причём обработка таких антител ДНКазой I существенно уменьшала эффективность их связывания с поверхностью клеток, так же как и добавление гистонов. В то же время антитела к гистонам образовывали комплексы с белками поверхности клеток, демонстрируя наличие гистонов на клеточной поверхности. Авторы предполагают, что антитела к ДНК связываются с поверхностью клеток через взаимодействие с гистонами, экспонированными на клеточной поверхности в составе комплексов с ДНК [104]. Однако это предположение может быть

не вполне верным, поскольку в другой работе было показано, что как ДНК, так и нуклеосомы могут связываться с белками клеточной поверхности с молекулярной массой 29 кДа и 69 кДа [105].

В работе Koutouzov с соавт. [106] было показано наличие рецептора нуклеосом на поверхности фибробластов линии CV-1. При помощи  $^{125}\text{I}$ -меченых мононуклеосом было обнаружено, что на поверхности клеток есть два сайта связывания (приблизительно  $9 \cdot 10^7$  сайтов на клетку) – высокоаффинный с  $K_d$  7 нМ и низкоаффинный с  $K_d$  400 нМ. Авторам удалось выяснить, что за связывание нуклеосом с поверхностью клеток отвечает белок с молекулярной массой 50 кДа. Более того, нуклеосомы, связанные с поверхностью клеток, могут взаимодействовать с антителами против ДНК и гистонов.

Связывание гистонов с поверхностью активированных Т-лимфоцитов было обнаружено в работе Watson с соавторами [89], однако основными компонентами, связывающими нуклеосомы, были не белки, а сульфатированные полисахаридные остатки поверхностных протеогликанов. Действительно, авторы обнаружили, что сульфатированные полисахариды хорошо связываются с нуклеосомами через N-концевые остатки гистонов, особенно H2A и H2B, а обработка клеток гепариназой уменьшает связывание нуклеосом с этими клетками. Описанные работы не дают прямого ответа относительно механизма связывания нуклеосом

с клеточной поверхностью, однако однозначно демонстрируют способность нуклеосом связываться с поверхностью разных типов клеток.

### 3. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ДНК КРОВИ

В составе цирДНК крови и внДНК различных биологических жидкостей онкологических больных были обнаружены практически все характеристические признаки геномной ДНК опухолевых клеток, а именно точечные мутации, нарушения состава микросателлитов, характерный профиль метилирования генов опухолевой супрессии и повторов, делеции и хромосомные перестройки и ДНК вирусов (рис. 1).

На сегодняшний день много работ посвящено изучению микросателлитных перестроек в цирДНК крови [107-113]. Микросателлиты – короткие повторяющиеся и высокополиморфные последовательности, состоящие из многократно повторяющегося мотива, например, ди-, три-, тетра-нуклеотида: (NN-N)<sub>n</sub>. Микросателлиты более или менее случайно распределены в геноме [114]. Они проявляют заметную нестабильность и могут мутировать, изменяя число повторов. Человеческий геном содержит несколько тысяч микросателлитных повторов, основная часть которых локализована в некодирующих последовательностях ДНК. Нарушения микросателлитных повторов могут проявляться в виде аллельного дисбаланса, в том числе и в виде потери гетерозиготности (сокращение изменчивости в участках генома, для которых обычно характерен полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Биологическая функция микросателлитов неясна, однако они часто используются в качестве генетических маркеров для анализа расположения генов-супрессоров опухолей и т.д.

Опухолеассоциированные нарушения микросателлитной ДНК были обнаружены в цирДНК плазмы крови при раке лёгких [107], головы и шеи [108], почки [109], мочевого пузыря [110], предстательной железы [111, 112] и гепатоцеллюлярной карциноме [113].

Однако для того, чтобы достоверно детектировать изменения микросателлитной ДНК во внеклеточной среде необходимо, чтобы соотношение опухолевой ДНК к контаминирующей нормальной ДНК составляло более 0,5%, в то время как для детекции потери гетерозиготности требуется, чтобы в препарате было не менее 20% опухолевой ДНК (и 80% нормальной ДНК), в противном случае повышается риск получения ложноположительных результатов [115]. Это утверждение подтверждают работы многих групп исследователей [116-118], в том числе и работа von Knobloch с соавт. [119], в которой ложноположительные результаты при анализе аллельной нестабильности в цирДНК сыворотки крови были обнаружены в группе здоровых доноров с частотой 15%; при этом

у больных раком почки в зависимости от маркера частота аллельной нестабильности варьировала от 0 до 23%.

Некоторые исследователи указывают на то, что опухолеассоциированные микросателлитные изменения (как аллельную нестабильность, так и потерю гетерозиготности) в цирДНК крови можно обнаружить уже на ранних стадиях заболевания [120, 121]. Например, у больных немелкоклеточным раком лёгкого в цирДНК плазмы крови при комбинации маркера аллельной нестабильности (D21S1245) и потери гетерозиготности (FHIT локус) микросателлитные изменения обнаруживались в 40% случаев [122]. Причем эти изменения детектировались в 43% случаев у пациентов с I стадией заболевания. Однако авторы не обнаружили корреляции между частотой микросателлитных изменений и стадией заболевания или его гистологией.

В ряде исследований приведены доказательства прогностической значимости анализа микросателлитных изменений ДНК в сыворотке/плазме онкологических больных, в том числе и в комбинации с изучением других изменений ДНК (гиперметиличивание, мутации и т.д.). Например, Silva с соавторами [3], исследуя комбинацию потерь гетерозиготности шести различных локусов цирДНК (D17S855, D17S654, D16S421, TH2, D10S197, D9S161), мутацию гена p53 и aberrантное метилирование первого экзона гена p16<sup>INK4a</sup> при помощи ПЦР в плазме крови больных раком молочной железы в сравнении со здоровыми донорами, обнаружили достоверную корреляцию изучаемых изменений цирДНК с такими клиникопатологическими параметрами как: (а) вовлечение в заболевание трёх и более лимфатических узлов; (б) инфильтрирующая протоковая карцинома (IDC); (в) высокий индекс пролиферации.

Достоверная корреляция между потерей гетерозиготности в цирДНК плазмы крови, анализируемой при помощи ПЦР, и увеличением показателя Глисона была обнаружена у больных раком предстательной железы [111] при комбинации маркеров D6S1631\*D8S286\*D9S171 и D8S286\*D9S171.

В аналогичной работе, посвящённой исследованию потери гетерозиготности с использованием ПЦР 10 микросателлитных маркеров, расположенных на шести хромосомах (D1S214 на 1p36.3; D1S228 на 1p36; D3S1293 на 3p-3p24.2; D6S264 на 6q25.2-6q27; IGF1R на 6q25-q27; D9S157 на 9p23-p22; D9S161 на 9p21; D10S212 на 10q26.12-10q26.13; D10S216 на 10q24-q26; D11S925 на 11q23.3-11q24) в цирДНК плазмы крови больных меланомой была показана корреляция между частотой обнаружения этих микросателлитных изменений и утяжелением стадии заболевания [123]. Для локуса D3S1293 показана достоверная корреляция с развитием заболевания. Кроме того, комбинация микросателлитных маркеров D9S157\*D3S1293, D9S157\*D1S228 и D11S925\*D3S1293 демонстрирует

достоверную корреляцию со стадией заболевания [123]. Позднее была показана не только корреляция между увеличением числа случаев потери гетерозиготности этих маркеров и стадией заболевания [124, 125], но и корреляция по локусу D1S228 у больных с “запущенными” заболеваниями с низкой выживаемостью пациента после хирургической резекции [124].

Микросателлитный анализ (как потеря гетерозиготности, так и аллельная нестабильность) на 28 различных маркеров (D1S251 (1pq), HTPO (2p), D3S1317 (3p), D3S587 (3p), D3S1560 (3p), D3S1289 (3p), D3S1286 (3p), D3S1038 (3p), D4S243 (4pq), FGA(4) (4q), CSF (5q), ACTBP2 (5p), D8S348 (8q), D8S307 (8p), D9S747 (9p), D9S242 (9p), IFN a (9p), D9S162 (9p), D11S488 (11q), THO (11p), vWA (12p), D13S802 (13q), MJD (14q), D17S695 (17p), D17S654 (17p), D18S51 (18q), MBP (18q) и D21S1245 (21q)) не только может быть использован для обнаружения опухолеспецифической цирДНК в сыворотке больных раком почки с помощью ПЦР, но и может давать информацию (потеря гетерозиготности) о возможном рецидиве этого заболевания [126, 127]. Корреляция между рецидивом заболевания и потерей гетерозиготности хотя бы одного из шести маркеров (D17S695, D17S654, D13S310, TH2, D9S747, D9S161) в цирДНК плазмы крови была также обнаружена и у больных раком мочевого пузыря [128].

Огромное количество исследований посвящено изучению делеций в составе некоторых генов в цирДНК крови. В первую очередь внимание исследователей привлекают мутации в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), определяющие терапию рака лёгкого; эти мутации могут быть обнаружены при помощи микрожидкостного или капельного ПЦР цирДНК больных раком лёгкого с чувствительностью 92% и специфичностью 100% [129]. Авторы обнаружили достоверную корреляцию между статусом мутации EGFR в цирДНК сыворотки крови и эффективностью лечения рака лёгкого [130]. Часть исследований в этой области посвящена анализу резистентной мутации EGFR T790M, доля которой к активирующим мутациям может составлять от 13,3% до 94% [131].

Среди мутаций в протоонкогенах, характерных для клеток опухолей, наиболее часто в пуле цирДНК исследовали мутации в семействе онкогенов *ras* и *p53* [118, 132]. Около 25% больных раком кишечника и 50% пациентов с раком поджелудочной железы имеют мутацию в гене *K-ras*, причём такую мутированную ДНК можно обнаружить в составе цирДНК плазмы крови [118]. Кроме того, мутации в гене *K-ras* были обнаружены в цирДНК у 23% больных немелкоклеточным раком лёгкого [133], у 11% больных раком мочевого пузыря [128] и у 27% пациентов с солидными опухолями (опухолями поджелудочной, молочной желёз, желудка, кишечника) [134].

Мутации в гене *p53* часто выявляются в цирДНК крови больных немелкоклеточным (30%) [135] и

мелкоклеточным (37%) [136] раком лёгкого, раком яичника (15%) [137], желудка (5-12%) [138, 139], у 19% больных раком поджелудочной железы [140], у 6%-21% больных раком кишечника [141, 142] и у 18%-40% больных раком печени [143, 144]. У больных раком кишечника наличие мутаций в этом гене коррелирует со стадией заболевания и метастазами в печень [141], а у больных раком молочной железы – со стадией заболевания, размером опухоли и метастазами в лимфатические узлы [145]. Следует отметить, что в цирДНК здоровых доноров также присутствуют мутированные формы гена *p53*. При исследовании цирДНК больных раком печени мутации в исследуемом гене были обнаружены у 40%-44% больных и у 3,5%-7% здоровых доноров [144, 146]. Мутации в генах *p53* и *K-ras* на уровне до 30% были обнаружены не только у здоровых доноров, но и у курильщиков, и больных, имеющих заболевания не онкологической природы [147, 148]. Наряду с мутациями в генах *p53* и *K-ras* в цирДНК крови больных раком кишечника при помощи ПЦР в 12%-43% случаев были обнаружены и мутации гена аденоматозного полипоза толстой кишки (APC) [139, 149, 150].

Необходимо также упомянуть работы, посвященные изучению амплификации гена *HER2* (рецептор эпидермального фактора роста человека) в плазме больных раком молочной железы с помощью ПЦР [151]. Авторы обнаруживали это изменение у 50% пациенток. Кроме того, сокращение числа копий *HER2* цирДНК после лечения трастузумабом в сочетании с химиотерапией было связано с ответом на лечение, а также с улучшением общей выживаемости пациентов. Показано, что высокий уровень гена *MYCN* в цирДНК представлен в крови пациентов с нейробластомой [152], для которой характерна множественная амплификация этого гена. Авторы при помощи ПЦР в реальном времени показали, что количество последовательностей *MYCN* в цирДНК плазмы/сыворотки больных с амплификацией гена *MYCN* (MNA) в 25-600 раз выше, чем в крови здоровых доноров и пациентов с нейробластомой, у которых нет амплификации *MYCN*.

В составе цирДНК крови человека обнаружены и нуклеиновые кислоты вирусов. Вирусы, такие как папилломавирусы человека и вирус Эпштейна-Барра, являются этиологическими факторами при различных злокачественных новообразованиях [118]. Эти вирусы обнаруживаются в крови больных раком молочной железы [153], раком головы и шеи [154], цервикальной карциномой [155], а также раком носоглотки [156]. Небольшой процент здоровых доноров имеют в составе цирДНК последовательности этих вирусов [156, 157]. В некоторых случаях, при анализе вирусной ДНК в составе цирДНК крови, можно говорить о возможной корреляции со стадией заболевания, ответом на терапию и склонностью к рецидивам [132].

Помимо вирусной ДНК в плазме крови человека многие исследователи не только обнаруживают митохондриальную ДНК [158, 159], но и детектируют

в крови онкологических больных характерные для раковых клеток мутации (16S pPНК, район D-петли). Эти мутации были обнаружены при раке легкого, мочевого пузыря, раке предстательной железы, опухолях головы и шеи [132, 160].

Огромное количество исследований посвящено изучению эпигенетических мутаций, а именно анализу статуса метилирования промоторных областей онкогенов в цирДНК крови. Известно, что метилирование ДНК – это физиологический процесс, который активно идет во всех нормальных клетках организма. Ещё в 1980 году Raptis с коллегами путём определения плавучей плотности внеклеточной ДНК в CsCl показали, что её G+C состав равен 50% [161]. В геноме человека доля 5-метилцитозина ( $m^5C$ ) составляет ~1% от всех оснований и немного варьирует в разных типах тканей, причём большинство (75%) из CpG динуклеотидов метилировано [162]. Известно, что, по меньшей мере 10% экспрессируемых генов регулируется метилированием и до 60% генов имеют локальные CpG-островки [163]. Метилированием регулируется экспрессия генов, вовлеченных в регуляцию и реализацию всех ключевых клеточных процессов, в частности, генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла и рост, вовлечённых в регуляцию стабильности генома и индукцию апоптоза и т.д.

Современные методы анализа позволяют детектировать метилирование цитозинов при соотношении опухолевой ДНК к нормальной около 0,1-0,001% [115]. Изменения в статусе метилирования ДНК наиболее часто встречаются при развитии онкологических заболеваний [118]. Они ассоциированы с изменениями в экспрессии генов, вовлечённых в контроль клеточного цикла и апоптоз, включающих p14ARF, p16<sup>ink4a</sup>, APC, H- и E-кадгерин, RASSF1A и многие другие [132]. Повышение статуса метилирования, не выявляющееся в норме, обнаруживается при помощи ПЦР в ДНК плазмы/сыворотки крови при раке поджелудочной (p16 в 24.6% случаев) [164], предстательной (RASSF1 – 24%, RARβ2 – 12%, GSTP1 в 13% случаев) [112] и молочной (APC – 17% и GSTP1 – 26%) [165] желез, гепатоцеллюлярной карциноме (p16 – от 19% до 81% случаев) [166, 167], раке яичника (при одновременном исследовании 6-ти генов: BRCA1, RASSF1A, APC, p14<sup>arf</sup>, p16<sup>ink4a</sup> и DAPK) со специфичностью 100% и чувствительностью 82% [168] и многих других. Известно, что некоторые эпигенетические изменения (гиперметилирование генов) происходят уже на ранних стадиях (IA или B) развития онкологических заболеваний [169, 170]. К сожалению, анализ статуса метилирования онкогенов также может давать ложноположительные результаты. Так, например, наряду с 32% метилированных форм генов RASSF1A и 26% RARβ2 в цирДНК крови больных раком молочной железы, метилированные формы этих же генов были обнаружены и в крови здоровых доноров в 5% и 8% случаев, соответственно [165]. При этом чувствительность анализа составила 62%, специфичность – 87%.

#### 4. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЦИРКУЛЯЦИЮ ДНК В КРОВИ

Известно, что на стабильность циркулирующей ДНК могут влиять как модификация оснований, влияющая на связывание с гистонами и негистоновыми белками, модификация гистонов, влияющая на структуру и прочность упаковки ДНК в нуклеосомы, связывание циркулирующей ДНК с белками плазмы и с поверхностью клеток крови.

##### 4.1. Метилирование

О том, что метилированная ДНК более стабильна, чем неметилированная, свидетельствуют эксперименты, проведённые на культурах клеток HeLa и HUVEC [46]. В этой работе было показано, что метилированные фрагменты гена RARβ2 (194 п.н.) в супернатантах клеток более стабильны, чем неметилированные фрагменты. Кроме того, метилирование цитозинов может влиять на модификацию гистонов [171, 172], формирование ДНК-триплексов, стабилизацию В-Z перехода [173], а также отрицательно сказываться на связывании транскрипционных факторов с ДНК и положительно – на взаимодействии белков, специфически связывающихся с метилированными участками ДНК [174-176].

В последнее время в научной литературе появились предложения о выделении в качестве шестого основания ДНК (наравне с  $m^5C$ ) 5-гидроксиметилцитозина ( $hm^5C$ ), обнаруженного ещё в 1950 году и способного так же влиять на структуру и, по-видимому, стабильность цирДНК [177, 178]. 5-гидроксиметилцитозин образуется в результате гидроксимирирования  $m^5C$  с помощью ферментов TET1, TET2 или TET3 (ten eleven translocation) и играет важную роль при эмбриональном развитии и клеточной дифференцировке [177-179]. Содержание  $hm^5C$  в геноме мыши около 0,032% [180] и составляет ~10-20% от  $m^5C$  в эмбриональных стволовых клетках мыши, нейронах Пуркинье и гранулярных клетках [178]. Находится  $hm^5C$  в тех же участках ДНК (как геномной, так и митохондриальной [181]), что и  $m^5C$  [178].

Описано несколько белков, связывающихся с метилированными CpG-динуклеотидами (в английской транскрипции MBPs), фрагменты которых обнаруживались и в плазме крови. Они являются репрессорами транскрипции, препятствующими формированию транскрипционного комплекса. Метилцитозин-связывающие белки MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4 эффективно связывают  $m^5CpG$ , но не  $hm^5CpG$ , через консервативный домен MBD (Methyl-CpG binding domain) [175, 180, 182-184], стабилизируют нуклеосомы в метилированных участках ДНК [185] и ингибируют транскрипцию в экспериментах *in vitro*. Уровень  $hm^5C$  в клетках мозжечка мыши находится в обратной зависимости от уровня экспрессии гена MeCP2 [184]. Кроме того, связывание MeCP2 с метилированной ДНК ингибирует активность TET1 *in vitro*.

Метилцитозин-связывающий белок Kaiso, содержащий в С-концевом домене цинковые пальцы, специфично связывающие 5-метилцитозин-содержащую ДНК, способен подавлять транскрипционную активность метилированных генов [186]. Хотя MBD белки распознают одиночные метилированные CpG, для оптимального связывания Kaiso нуждается в двух последовательно и симметрично метилированных CpG последовательностях. Кроме того, геном человека кодирует два белка, которые имеют Kaiso-подобные цинковые пальцы: ZBTB4 и ZBTB38 [187]. Оба белка, подобно Kaiso, соединяются с метилированной ДНК благодаря своим трём Kaiso-подобным цинковым пальцам. Однако в противоположность Kaiso, они могут связываться с одиночными метилированными CpG последовательностями. ZBTB4 и ZBTB38 репрессируют транскрипцию метилированных промоторов и локализуются в плотно упакованных метилированных перичентромерных гетерохроматиновых регионах в клетках мыши зависимым от метилирования ДНК способом.

Поскольку метилирование ДНК может приводить к модификации гистонов и изменению структуры хроматина [172], результатом этого процесса может быть изменение стабильности не только свободной ДНК, но и ДНК, циркулирующей в крови в составе нуклеосом и иных комплексов с белками. Действительно, было показано, что некоторые МВР, а также ДНК-метилтрансферазы могут привлекать деацетилазы гистонов к сайтам метилирования, что приводит к увеличению прочности нуклеосомной упаковки ДНК [188].

В отличие от ацетилирования гистонов – временного процесса, находящегося в равновесии с деацетилированием, – метилирование гистонов при помощи гистонметилтрансфераз рассматривается как маркер более продолжительной клеточной памяти [189]. Метилирование гистонов также может влиять на прочность упаковки ДНК и, соответственно, на стабильность ДНК в кровотоке. Наиболее распространенными сайтами метилирования являются лизиновые остатки гистонов H3 и H4. Например, метилирование 4-го остатка лизина гистона H3 (H3-K4), H3-K36 или H3-K79 является маркером транскрипционно-активного хроматина. Метилирование H3-K9, H3-K27 или H4-K20, напротив, соответствует неактивной структуре хроматина [190]. Метилирование гистонов ассоциировано с ДНК-метилированием; так, многие белки, вовлечённые в процесс метилирования ДНК, такие как DNMT и МВР, взаимодействуют с ферментами, участвующими в процессе метилирования гистонов [189]. Например, области деацетилизованного гистона H3 и метилированного H3-K9 ассоциированы с гиперметилированным промотором гена hMLH1, который, будучи неметилированным и активно экспрессируемым, ассоциирован с ацетилованным гистоном H3 и метилированным остатком лизина в 4 позиции [171].

#### 4.2. Активность дезоксирибонуклеаз

Активность нуклеаз является фактором отрицательной регуляции концентрации циркулирующей ДНК. Как уже упоминалось выше, одной из причин появления вДНК в кровотоке могут служить процессы апоптоза и некроза нормальных и/или опухолевых клеток. После гибели клеток их содержимое захватывается фагоцитами (макрофагами и дендритными клетками) или соседними клетками, в результате чего ДНК может полностью гидролизироваться в лизосомах до нуклеотидов ДНКазой II [191-193]. Вполне возможно, что именно это и является причиной того, что в плазме крови здоровых доноров присутствует лишь незначительное количество ДНК (0-30 нг/мл крови) [2, 4].

ДНКаза II не является основным ферментом, который гидролизует молекулы ДНК, попадающие в кровь (содержание её примерно в 30 раз ниже, чем ДНКазы I [194]); активность кислой ДНКазы II в крови здоровых доноров составляет  $8,2 \pm 2,36$  ед. акт./л сыворотки [195]. Основным ДНК-гидролизующим ферментом крови является ДНКаза I [193, 196-198]. ДНКаза I максимально активна при нейтральном значении pH, она эффективно связывается с малой бороздкой ДНК в В-форме; для гидролиза ДНК ей необходимо наличие ионов двухвалентных металлов [199, 200]. Метилирование цитозина по 5-му положению и локализация 5-метилцитозина в большой бороздке ДНК способствуют конформационному переходу ДНК из В в Z-форму [173], что в принципе может повышать стабильность такой ДНК к гидролизу под действием ДНКазы I [200]. ДНКаза I эффективно гидролизует транскрипционно-активные области хроматина. Такая чувствительность транскрипционно-активных областей к ДНКазе I, по-видимому, связана с “разрыхлением” упаковки ДНК в транскрипционно-активных областях [201]. Чувствительная к ДНКазе I фракция хроматина обогащена ацетилованным гистоном H4, имеет низкое содержание гистона H1 и высокий уровень негистоновых хромосомных белков (ННСР), включая НМГ-белки. Уровень ацетилирования гистона H4 напрямую коррелирует с уровнем чувствительности ДНКазы I к хроматину [201].

По литературным данным, концентрация в крови ДНКазы I составляет 3-10 нг/мл (удельная активность ДНКазы I составляет 2000 ед. акт./мг). В норме активность фермента составляет всего  $4,4 \pm 1,8$  ед. акт./л (ожидаемая активность 6-20 ед. акт./л) сыворотки, что объясняется присутствием в крови природного ингибитора ДНКазы I актина (до 100 мкг/мл) [197, 202]. Доказательством определяющей роли ДНКазы I в циркуляции ДНК в крови может служить увеличение концентрации циркулирующей ДНК в плазме крови больных системной красной волчанкой [203], которое коррелирует с уменьшением активности ДНКазы I [204-206] и увеличением концентрации актлина (содержание которого в норме может достигать 100 мкг/мл [207]) [202]. Однако

в крови больных раком молочной железы не наблюдается обратной корреляции между концентрацией цирДНК и активностью ДНКазы. Действительно, при раке молочной железы наблюдается как увеличение активности [196] и концентрации [208] ДНКазы I, так и концентрации свободной внДНК плазмы крови [2]. Прогревание сыворотки здоровых доноров и больных со злокачественными новообразованиями в течении 60 мин при температуре от 37°C до 50°C, в результате которого инактивируются ингибиторы ДНКазы, приводит к значительному увеличению нуклеазной активности (в 5-80 раз), что свидетельствует о важной роли ингибиторов ДНКазы I в регуляции ДНКазной активности крови и концентрации цирДНК [209].

Наряду с ДНКазой I цирДНК крови могут гидролизываться под действием нуклеотид-пирофосфатазы и фосфодиэстеразы I (рН оптимум около 9,8), которые локализованы на плазматической мембране клеток печени. Эти ферменты отщепляют нуклеозид 5'-фосфат с 3'-конца ДНК и РНК, отдавая предпочтение одноцепочечным или денатурированным субстратам [210-212]. Предполагается, что эти ферменты преимущественно гидролизуют нуклеотидпирофосфаты до нуклеозидов, которые затем транспортируются через плазматическую мембрану [213-215]. Согласно литературным данным, содержание фосфодиэстеразы I в крови здоровых людей варьирует от 2,5 нг/мл до 82,5 нг/мл, составляя в среднем 29,7±2,9 нг/мл [216], что с учётом средней удельной активности фермента в разных тканях 100 ед.акт/мг [217] достаточно для того, чтобы вносить вклад в гидролиз цирДНК.

Помимо дезоксирибонуклеаз, некоторые белки крови, обладающие нуклеазной активностью, также могут гидролизывать цирДНК. К числу таких белков могут быть отнесены, например, IgG и IgM, которые не обладают ДНК-гидролизующей активностью в норме, но проявляют такую активность при аутоиммунных заболеваниях [218, 219] и беременности [220], а также лактоферрин, обнаруживаемый, по данным разных авторов, в крови здоровых доноров в концентрации 198-400 нг/мл [221, 222], 450 нг/мл в крови больных с онкологическими заболеваниями яичников [222] и в концентрации 665 нг/мл при развитии острого аппендицита [221].

Таким образом, белки крови, обладающие ДНК-гидролизующей активностью, являются важным фактором, уменьшающим концентрацию цирДНК, а их влияние на концентрацию цирДНК может быть ограничено наличием природных ингибиторов и упаковкой цирДНК.

Известно, что основная часть экзогенных ДНК выводится из организма с мочой [223, 224], таким образом, эффективность транспорта ДНК через почечные каналы также является важным фактором уменьшения концентрации цирДНК. С другой стороны, скорость генерации цирДНК и форма циркуляции ДНК, а именно защищённость цирДНК в составе комплексов с гистонами/белками

или мембранных структур, принципиально важна для поддержания или возрастания концентрации цирДНК в крови.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать вывод о том, что цирДНК неоднородна по своему размеру и составу. В крови цирДНК может появляться в результате апоптоза, некроза, онкоза и активной секреции опухолевыми и нормальными клетками и циркулировать в ней как в свободном виде, так и связавшись с форменными элементами крови, находясь в составе апоптотических телец, нуклеосом или в комплексах с различными белками крови. Ясно, что на стабильность ДНК и время её нахождения в крови влияет множество факторов, начиная от структуры ДНК и присутствия различных нуклеаз в крови и заканчивая выведением её с мочой. На сегодняшний день биологические функции циркулирующей ДНК изучены мало, однако на основе тестирования онкоспецифических последовательностей ДНК ведутся активные разработки ранней неинвазивной диагностики онкологических заболеваний различных этиологий.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 12-04-31365 и 13-04-01460), БОР №VI.62.1.4., а также грантом Президента Российской Федерации для молодых учёных и аспирантов (Конкурс СП-1528.2013.4).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tan E., Schur P., Carr R., Kunkel H. (1966) J. Clin. Invest., **45**, 1732-1740.
2. Тамкович С., Лактионов П., Рыкова Е., Стариков А., Скворцова Т., Кузнецова Н., Пермякова В., Власов В. (2005) Бюлл. экп. биол. мед. **139**, 462-464.
3. Silva J., Dominguez G., Garcia J., Gonzalez R., Villanueva M., Navarro F., Provencio M., San Martin S., Espaca P., Bonilla F. (1999) Cancer Res., **59**, 3251-3256.
4. Roupert M., Hupertan V., Catto J., Yates D., Rehman I., Proctor L., Phillips J., Meuth M., Cussenot O., Hamdy F. (2008) Int. J. Cancer., **122**, 952-956.
5. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F., Hesch R., Knippers R. (2001) Cancer Res., **61**, 1659-1665.
6. Ludovini V., Pistola L., Gregorc V., Floriani I., Rulli E., Piattoni S., Di Carlo L., Semeraro A., Darwish S., Tofanetti F. et al. (2008) J. Thorac. Oncol., **3**, 365-373.
7. Hoque M. (2009) Expert. Rev. Mol. Diagn., **9**, 243-257.
8. Ellinger J., Bastian P., Haan K., Heukamp L., Buettner R., Fimmers R., Mueller S., Ruecker A. (2008) Int. J. Cancer., **122**, 138-143.
9. Umansky S. (1982) J. Theor. Biol., **97**, 591-602.
10. Белишукина Н., Хомякова Т., Хомяков Ю. (2009) Росс. физиол. журнал., **95**, 1093-1107.
11. Deligezer U., Yaman F., Erten N., Dalay N. (2003) Clin. Chim. Acta., **335**, 89-94.
12. Wu T., Zhang D., Chia J., Tsao K., Sun C., Wu J. (2002) Clin. Chim. Acta., **321**, 77-87.
13. Giacona M., Ruben G., Iczkowski K., Roos T., Porter D., Sorenson G. (1998) Pancreas, **17**, 89-97.

14. Ikebe K., Gupta C., Tan E. (1983) Clin. exp. Immunol., **53**, 169-177.
15. Litton C., Stone J., Eddleman K., Lee M. (2009) Mt. Sinai J. Med., **76**, 521-528.
16. Chiu R., Lo Y. (2011) Semin. Fetal Neonatal. Med., **16**, 88-93.
17. Sekizawa A., Samura O., Zhen D., Falco V., Farina A., Bianchi D. (2000) Prenatal. Diagnosis, **20**, 886-889.
18. Pisetsky D., Fairhurst A. (2007) Autoimmunity, **40**, 281-284.
19. Choi J., Reich III C., Pisetsky D. (2005) Immunology, **115**, 55-62.
20. Choi J., Reich III C., Pisetsky D. (2004) Scand. J. Immunol., **60**, 159-166.
21. Soehnlein O., Lindbom L. (2010) Nat. Rev. Immunol., **10**, 427-439.
22. Blankenberg F., Tait J., Ohtsuki K., Strauss H. (2000) Nucl. Med. Commun., **21**, 241-250.
23. Jiang N., Reich III C., Pisetsky D. (2003) Blood, **102**, 2243-2250.
24. Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Olson-Sand A., Anker P. (2001) Clin. Chim. Acta, **313**, 139-142.
25. Fournie G., Courtin J., Laval F. (1995) Cancer Lett., **2**, 221-227.
26. Lam N., Rainer T., Chan L., Joynt G., Lo Y. (2003) Clin. Chem., **49**, 1286-1291.
27. Leon S., Shapiro B., Sklaroff D., Yaros M. (1977) Cancer Res., **37**, 646-650.
28. Узденский А. (2010) Биологические мембраны, **27**, 7-17.
29. Tang P., Mura M., Seth R., Liu M. (2008) Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., **294**, L632-L641.
30. Weerasinghe P., Buja L. (2012) Exp. Mol. Pathol., **93**, 302-308.
31. Rogers J., Boldt D., Kornfeld S., Skinner S., Valery C. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 1685-1689.
32. Anker P., Stroun M., Maurice P. (1975) Cancer Res., **35**, 2375-2382.
33. Anker P., Stroun M., Maurice P. (1976) Cancer Res., **36**, 2832-2839.
34. Anker P., Mulcahy H., Chen X., Stroun M. (1999) Cancer Metastasis Rev., **18**, 65-73.
35. Garcia-Olmo D., Samos J., Picazo M., Asensio A., Toboso I., Garcia-Olmo D. (2008) Cancer Lett., **272**, 133-140.
36. Morozkin E., Babochkina T., Vlassov V., Laktionov P. (2008) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **1137**, 31-35.
37. Морозкин Е.С., Сильников В.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В.В., Лактионов П.П. (2009) Бюлл. Эксп. Биол. Мед., **147**, 67-70.
38. Jin Z., El-Deiry W. (2005) Cancer Biol. Ther., **4**, 139-163.
39. Gosse C., Le Pecq J., Defrance P., Paoletti C. (1965) Cancer Res., **25**, 877-883.
40. Kawabata K., Takakura Y., Hashida M. (1995) Pharm. Res., **12**, 825-830.
41. De Oliveira M., Boutet V., Fattal E., Boquet D., Grognet J., Couvreur P., Deverre J. (2000) Life Sci., **67**, 1625-1637.
42. Ko Y., Bhattacharya R., Bickel U. (2009) J. Control. Release., **133**, 230-237.
43. Chia D., Dorsch C., Levy L., Barnett E. (1979) Immunology, **36**, 323-329.
44. Lau T., Leung T., Chan L., Lau T., Chan K., Tam W., Lo Y. (2002) Clin. Chem., **48**, 2141-2146.
45. Cherepanova A., Tamkovich S., Pyshnyi D., Kharkova M., Vlassov V., Laktionov P. (2007) J. Immunol. Methods, **325**, 96-103.
46. Skvortsova T., Vlassov V., Laktionov P. (2008) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **1137**, 36-40.
47. Wilson K., Raney S., Sekirov L., Chikh G., deJong S., Cullis P., Tam Y. (2007) Int. Immunopharmacol., **7**, 1064-1075.
48. Hoch S., McVey E. (1977) J. Biol. Chem., **252**, 1881-1887.
49. De Smidt P., le Doan T., de Falco S., van Berkel T. (1991) Nucl. Acids Res., **19**, 4695-4700.
50. Dennin R. (1979) Klin. Wochenschr., **57**, 451-456.
51. Holdenrieder S., Stieber P. (2004) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **1022**, 211-216.
52. Schorey J., Bhatnagar S. (2008) Traffic, **9**, 871-881.
53. Gahan P., Stroun M. (2010) Cell Biochem. Funct., **28**, 529-538.
54. Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmuller H., Busch M., Fertig G., Furst H., Schalhorn A., Schmeller N., Untch M., Seidel D. (2001) Int. J. Cancer, **95**, 114-120.
55. Kiroi K., Tanaka C., Toi M. (1999) Breast Cancer, **6**, 361-364.
56. Holdenrieder S., Nagel D., Schalhorn A., Heinemann V., Wilkowski R., Pawel J., Raith H., Feldmann K., Kremer A., Muller S., Geiger S., Hamann G., Seidel D., Stieber P. (2008) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **1137**, 180-189.
57. Kiroi K., Tanaka C., Toi M. (2001) Int. J. Oncol., **19**, 143-148.
58. Holdenrieder S., Stieber P. (2009) Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., **46**, 1-24.
59. Rumore P., Steinman C. (1990) J. Clin. Invest., **86**, 69-74.
60. Rumore P., Muralidhar B., Lin M., Lai C., Steinman C. (1992) Clin. Exp. Immunol., **90**, 56-62.
61. Lo Y., Zhang J., Leung T., Lau T., Chang A., Hjelm N. (1999) Am. J. Hum. Genet., **64**, 218-224.
62. Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmuller H., Fertig G., Furst H., Schmeller N., Untch M., Seidel D. (2001) Clin. Chem. Lab. Med., **39**, 596-605.
63. Zeerleder S. (2006) Crit. Care., **10**, 142.
64. Pepys M., Butler P. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., **148**, 308-313.
65. Butler P., Tennent G., Pepys M. (1990) J. Exp. Med., **172**, 13-18.
66. Peters D., Pretorius P. (2011) Clin. Chim. Acta, **412**, 806-811.
67. Martelli A., Zweyer M., Ochs R., Tazzari P., Tabellini G., Narducci P., Bortul R. (2001) J. Cell. Biochem., **82**, 634-646.
68. Akers J., Gonda D., Kim R., Carter B., Chen C. (2013) J. Neurooncol., **113**, 1-11.
69. Lleo A., Selmi C., Invemizzi P., Podda M., Gershwin E. (2008) J. Autoimmun., **31**, 257-262.
70. Schultz D., Harrington W. (2003) Semin. Arthritis Rheum., **32**, 345-369.
71. De Almeida C., Linden R. (2005) Cell Mol. Life Sci., **62**, 1532-1546.
72. Huynh K., Kay J., Stow J., Grinstein S. (2007) Physiology, **22**, 366-372.
73. Morozkin E., Loseva E., Morozov I., Kurilshikov A., Bondar A., Rykova E., Rubtsov N., Vlassov V., Laktionov P. (2012) Expert Opin. Biol. Ther., **12**, S11-S17.
74. Halicka H., Bedner E., Darzynkiewicz Z. (2000) Exp. Cell Res. Commun., **260**, 248-256.
75. Casciola-Rosen L., Anhalt G., Rosen A. (1994) J. Exp. Med., **179**, 1317-1330.
76. Bickerstaff M., Botto M., Hutchinson W., Herber J., Tennent G., Bybee A., Mitchell D., Cook H., Butler P., Walport M., Pepys M. (1999) Nat. Med., **5**, 694-697.
77. Егорова В., Блинов М. (1993) Вопр. мед. хим., **39**, 36-38.

78. Van Schravendijk M., Dwek R. (1982) *Mol. Immunol.*, **19**, 1179-1187.
79. Geselowitz D., Neckers L. (1995) *Antisense Res. Dev.*, **5**, 213-217.
80. Власов В., Паутова Л., Рыкова Е., Якубов Л. (1993) *Биохимия*, **58**, 1247-1251.
81. Zou S., Magura C., Hurley W. (1992) *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **103**, 889-895.
82. Лактионов П., Рыкова Е., Крепкий Д., Брыксин А., Власов В. (1997) *Биохимия*, **62**, 716-723.
83. Hoch S. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 1353-1358.
84. Beltinger C., Saragovi H., Smith R., LeSauteur L., Shah N., DeDionisio L., Christensen L., Raible A., Jarett L., Gewirtz A. (1995) *J. Clin. Invest.*, **95**, 1814-1823.
85. Gasparro F., Dall'Amico R., O'Malley M., Heald P., Edelson R. (1990) *Photochem. Photobiol.*, **52**, 315-321.
86. Bennett R., Gabor G., Merritt M. (1985) *J. Clin. Invest.*, **76**, 2182-2190.
87. Huber H., Fudenberg H. (1968) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **34**, 18-31.
88. Bennett R., Kotzin B., Merritt M. (1987) *J. Exp. Med.*, **166**, 850-863.
89. Watson K., Gooderham N., Davies D., Edwards R. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 21707-21713.
90. Gabor G., Bennett R. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1034-1039.
91. Bennett R., Davis J., Campbell S., Portnoff S. (1983) *J. Clin. Invest.*, **71**, 611-618.
92. Dorsch C. (1981) *Thromb. Res.*, **24**, 119-129.
93. Huss R. (1988) *Immunobiology*, **178**, 141-142.
94. Rieber M., Bacalao J. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **71**, 4960-4964.
95. Morozkin E., Laktionov P., Rykova E., Vlassov V. (2004) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1022**, 244-249.
96. Skvortsova T., Rykova E., Tamkovich S., Bryzgunova O., Starikov A., Kuznetsova N., Vlassov V., Laktionov P. (2006) *Br. J. Cancer.*, **94**, 1492-1495.
97. Laktionov P., Tamkovich S., Rykova E., Bryzgunova O., Starikov A., Kuznetsova N., Vlassov V. (2004) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1022**, 221-227.
98. Kolesnikova E., Tamkovich S., Bryzgunova O., Shelestyuk P., Permyakova V., Vlassov V., Tuzikov A., Laktionov P., Rykova E. (2008) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1137**, 226-231.
99. Tamkovich S., Bryzgunova O., Rykova E., Permyakova V., Vlassov V., Laktionov P. (2005) *Clin. Chem.*, **51**, 1317-1319.
100. Тамкович С., Брызгунова О., Рыкова Е., Колесникова Е., Шелестюк П., Лактионов П., Власов В. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 321-328.
101. Тамкович С., Лактионов П., Брызгунова О., Стариков А., Рыкова Е., Кузнецова Н., Пермьякова В., Власов В. (2005) *Мол. мед.*, **2**, 46-50.
102. Budker V., Godovikov A., Naumova L., Slepneva I. (1980) *Nucl. Acids Res.*, **8**, 2499-2515.
103. Беляев Н., Будкер В., Горохова О., Соколов А. (1988) *Мол. биол.*, **22**, 1667-1672.
104. Kubota T., Kanai Y., Miyasaka N. (1990) *Immunol. Lett.*, **23**, 187-194.
105. Hefeneider S., Cornell K., Brown L., Bakke A., McCoy S., Bennett R. (1992) *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **63**, 245-251.
106. Koutouzov S., Cabrespines A., Amoura Z., Chabre H., Lotton C., Bach J. (1996) *Eur. J. Immunol.*, **26**, 472-486.
107. Beau-Faller M., Gaub M., Schneider A., Ducrocq X., Massard G., Gasser B., Chenard M., Kessler R., Anker P., Stroun M., Weitzenblum E., Pauli G., Wihlm J., Quoix E., Oudet P. (2003) *Int. J. Cancer*, **105**, 361-370.
108. Chen X., Stroun M., Magnenat J., Nicod L., Kurt A., Lyautey J., Lederrey C., Anker P. (1996) *Nat. Med.*, **2**, 1033-1035.
109. Perego R., Corizzato M., Brambilla P., Ferrero S., Bianchi C., Fasoli E., Signorini S., Torsello B., Invernizzi L., Bombelli S. et al. (2008) *Eur. J. Cancer*, **44**, 1039-1047.
110. Van Tilborg A., Kompier L., Lurkin I., Poort R., Bouazzaoui S., Keur K., Zuiverloon T., Dyrskjot L., Orntoft T., Roobol M. (2012) *PLoS One*, **7**, e43345.
111. Muller I., Beeger C., Alix-Panabieres C., Rebillard X., Pantel K., Schwarzenbach H. (2008) *Clin. Chem.*, **54**, 688-696.
112. Sunami E., Shinozaki M., Higano C., Wollman R., Dorff T., Tucker S., Martinez S., Singer F., Hoon D. (2009) *Clin. Chem.*, **55**, 559-567.
113. Chang Y., Ho C., Chen H., Chang T., Lai W., Dai Y., Lee W., Chow N. (2002) *Br. J. Cancer*, **87**, 1449-1453.
114. Anmarkrud J., Kleven O., Bachmann L., Lifjeld J. (2008) *BMC. Evol. Biol.*, **8**, 138.
115. Goessl C., Muller M., Straub B., Miller K. (2002) *Eur. Urology*, **41**, 668-676.
116. Chen X., Bonnefoi H., Diebold-Berger S., Lyautey J., Lederrey C., Faltin-Traub E., Stroun M., Anker P. (1999) *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2297-2303.
117. Nunes D., Kowalski L., Simpson A. (2001) *Int. J. Cancer.*, **92**, 214-219.
118. Goebel G., Zitt M., Zitt M., Muller H. (2005) *Disease Markers*, **21**, 105-120.
119. von Knobloch R., Hegele A., Brandt H., Varga Z., Wille S., Kälble T., Heidenreich A., Hofmann R. (2002) *Int. J. Cancer*, **98**, 889-894.
120. Schwarzenbach H., Alix-Panabieres C., Muller I., Letang N., Vendrell J., Rabillard X., Pantel K. (2009) *Clin. Cancer Res.*, **15**, 1032-1038.
121. Li J., Harris L., Mamon H., Kulke M., Liu W., Zhu P., Makrigiorgos M. (2006) *J. Mol. Diagn.*, **8**, 22-30.
122. Sozzi G., Musso K., Racliffé C., Goldstraw P., Pierotti M., Pastorino U. (1999) *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2689-2692.
123. Fujiwara Y., Chi D., Wang H., Keleman P., Morton D., Turner R., Hoon D. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 1567-1571.
124. Taback B., Fujiwara Y., Wang H., Foshag L., Morton D., Hoon D. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 5723-5726.
125. Taback B., O'Day S., Boasberg P., Shu S., Fournier P., Elashoff R., Wang H., Hoon D. (2004) *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 152-156.
126. Eisenberger C., Schoenberg M., Enger C., Hortopan S., Shah S., Chow N., Marshall F., Sidransky D. (1999) *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**, 2028-2032.
127. Gonzalgo M., Eisenberger C., Lee S., Trock B., Marshall F., Hortopan S., Sidransky D., Schoenberg M. (2002) *Clin. Cancer Res.*, **8**, 1878-1881.
128. Dominguez G., Carballido J., Silva J., Silva J., Garcia J., Menendez J., Provencio M., Espana P., Bonilla F. (2002) *Clin. Cancer Res.*, **8**, 980-985.
129. Rosell R., Molina M., Serrano M. (2012) *The Lancet*, **13**, 971-973.
130. 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. (2012) *J. Thorac. Oncol.*, **7**, 115-121.

131. Taniguchi K., Uchida J., Nishino K., Kumagai T., Okuyama T., Okami J., Higashiyama M., Kodama K., Imamura F., Kato K. (2011) Clin. Cancer Res., **17**, 7808-7815.
132. Ziegler A., Zangemeister-Witke U., Stahel R. (2002) Cancer Treat. Rev., **28**, 255-271.
133. Ramirez J., Sarries C., de Castro P., Roig B., Queralt C., Escuin D., de Aguirre I., Sanchez J., Manzano J., Margeli M., Sanchez J., Astudillo J., Taron M., Rosell R. (2003) Cancer Lett., **193**, 207-216.
134. Hayashi T., Sugahara K., Dateki N., Yamada Y., Sudou R., Kanematsu T., Kamihira S. (2000) Rinsho. Byori., **48**, 547-553.
135. Andriani F., Conte D., Mastrangelo T., Leon M., Ratcliffe C., Roz L., Pelosi G., Goldstraw P., Sozzi G., Pastorino U. (2004) Int. J. Cancer., **108**, 91-96.
136. Gonzalez R., Silva J., Sanchez A., Dominguez G., Garcia J., Chen X., Stroun M., Provencio M., Espana P., Anker P., Bonilla F. (2000) Ann. Oncol., **11**, 1097-1104.
137. Swisher E., Wollan M., Mahtani S., Willner J., Garcia R., Goff B., King M. (2005) Am. J. Obstet. Gynecol., **193**, 662-667.
138. Su P., Zhang L., Wan W., Ren H., Zhang G., Wang Y., Deng G., Ji J. (2005) Beijing Da Xue Xue Bao., **37**, 523-526.
139. Wang J., Hsieh J., Chen C., Tzou W., Cheng T., Chen F., Huang T., Huang Y., Huang S., Yang T., Lin S. (2004) J. Surg. Res., **120**, 242-248.
140. Wang Y., Yamaguchi Y., Watanabe H., Ohtsubo K., Motoo Y., Sawabu N. (2004) Pancreas, **28**, 13-19.
141. Ito T., Kaneko K., Makino R., Konishi K., Kurahashi T., Ito H., Katagiri A., Kushima M., Kusano M., Mitamura K., Imawari M. (2003) Oncol. Rep., **10**, 1937-1942.
142. Hibi K., Robinson C., Booker S., Wu L., Hamilton S., Sidransky D., Jen J. (1998) Cancer Res., **58**, 1405-1407.
143. Kimbi G., Kew M., Yu M., Arakawa K., Hodgkinson J. (2005) J. Gastroenterol. Hepatol., **20**, 1185-1190.
144. Kirk G., Lesi O., Mendy M., Szymaska K., Whittle H., Goedert J., Hainaut P., Montesano R. (2005) Oncogene, **24**, 5858-5867.
145. Di G., Liu G., Wu J., Shen Z., Shao Z. (2003) Zhonghua Zhong. Liu. Za. Zhi., **25**, 137-140.
146. Dong-Dong L., Xi-Ran Z. (2003) J. Cell. Mol. Med., **7**, 89-92.
147. Jiao L., Zhu J., Hassan M., Evans D., Abbruzzese J., Li D. (2007) Pancreas, **34**, 55-62.
148. Magistrelli P., Neri M., Granone P., Cesario A., Paleari L., Russo P. (2008) Pancreas, **37**, 101-102.
149. Gocke C., Benko F., Kopreski M., McGarrity T. (2000) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **906**, 44-50.
150. Ling E., Fich A., Man S., Wolfson M., Mikhailowsky R., Lamprecht S. (2000) In Vivo, **14**, 543-546.
151. Sorensen B., Mortensen L., Andersen J., Nexø E. (2010) Anticancer Res., **30**, 2463-2468.
152. Combaret V., Audouyraud C., Iacono I., Favrot M., Schell M., Bergeron C., Puisieux A. (2002) Cancer Res., **62**, 3646-3648.
153. Perkins R., Sahn K., Marando C., Dickson-Witmer D., Pahnke G., Mitchell M., Petrelli N., Berkowitz I., Soteropoulos P., Aris V., Dunn S., Krueger L. (2006) Breast Cancer Res., **8**, R70.
154. Gudleviciene Z., Smailyte G., Mickonas A., Pikelis A. (2009) Oncology, **76**, 205-208.
155. Liang J., Xu A., Xie Y., Awonuga A., Lin Z. (2008) Cancer Gen. Cytogen., **95**, e100
156. Lo Y., Chan L., Lo K., Leung S., Zhang J., Chan A., Lee J., Hjelm N., Johnson P., Huang D. (1999) Cancer Res., **59**, 1188-1191.
157. Dong S., Pai S., Rha S., Hildesheim A., Kurman R., Schwartz P., Mortel R., McGowan L., Greenberg M., Barnes W., Sidransky D. (2002) Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., **11**, 3-6.
158. Zachariah R., Schmid S., Buerki N., Radpour R., Holzgreve W., Zhong X. (2008) Obstet. Gynecol., **112**, 843-850.
159. Mehra N., Penning M., Maas J., van Daal N., Giles R., Voest E. (2007) Clin. Cancer Res., **13**, 421-426.
160. Jeronimo C., Nomoto S., Caballero O., Usadel H., Henrique R., Varzim G., Oliveira J., Lopes C., Fliss M., Sidransky D. (2001) Oncogene, **20**, 5195-5198.
161. Raptis L., Menard H. (1980) J. Clin. Invest., **66**, 1391-1399.
162. Bird A. (2002) Gen. Develop., **16**, 6e21.
163. Lorincz A. (2011) Expert Opin. Med. Diagn., **5**, 375-379.
164. Li J., Zhu J., Hassan M., Evans D., Abbruzzese J., Li D. (2007) Pancreas, **34**, 55-62.
165. Hoque M., Feng Q., Toure P., Dem A., Critchlow C., Hawes S., Wood T., Jeronimo C., Rosenbaum E., Stern J., Yu M., Trink B., Kiviat N., Sidransky D. (2006) J. Clin. Oncol., **24**, 4262-4269.
166. Wong I., Lo Y., Zhang J., Liew C., Ng M., Wong N., Lai P., Lau W., Hjelm N., Johnson P. (1999) Cancer Res., **59**, 71-73.
167. Chang H., Yi B., Li L., Zhang H., Sun F., Dong S., Cao Y. (2008) Exp. Mol. Pathol., **85**, 96-100.
168. Seeber L., van Diest P. (2012) Methods Mol. Biol., **863**, 253-269.
169. Ibanez de Caceres I., Battagli C., Esteller M., Herman J., Dulaimi E., Edelson M., Bergman C., Ehya H., Eisenberg B., Cairns P. (2004) Cancer Res., **64**, 6476-6481.
170. Dulaimi E., Hillinck J., Ibanez de Caceres I., Al-Saleem T., Cairns P. (2004) Clin. Cancer Res., **10**, 6189-6193.
171. Das P., Singal R. (2004) J. Clin. Oncol., **22**, 4632-4642.
172. Majumdar S., Buckles E., Estrada J., Koochekpour S. (2011) Curr. Genomics., **12**, 486-505.
173. Hodges-Garcia Y., Hagerman P. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 197-201.
174. Attwood J., Yung R., Richardson B. (2002) Cell. Mol. Life Sci., **59**, 241-257.
175. Prokhortchouk E., Hendrich B. (2002) Oncogene, **21**, 5394-5399.
176. Li L., Carroll P., Dahiya R. (2005) J. Natl. Cancer Inst., **97**, 103-115.
177. Ehrlich M., Lacey M. (2013) Adv. Exp. Med. Biol., **754**, 31-56.
178. Kinney S., Pradhan S. (2013) Adv. Exp. Med. Biol., **754**, 57-79.
179. Wang T., Pan Q., Lin Li., Szulwach K., Song C., He C., Wu H., Warren S., Jin P., Duan R., Li X. (2012) Hum. Mol. Genet., **21**, 5500-5510.
180. Webster A., Yan M., Marsden P. (2013) Can. J. Cardiology, **29**, 46-57.
181. Shocka L., Thakkara P., Peterson E., Moran R., Taylora S. (2011) PNAS, **109**, 3630-3635.
182. Hendrich B., Bird A. (1998) Mol. Cell. Biol., **18**, 6538-6547.
183. Hendrich B., Abbott C., McQueen H., Chambers D., Cross S., Bird A. (1999) Mamm. Genome, **10**, 906-912.
184. Hashimoto H., Liu Y., Upadhyay A., Chang Y., Howerton S., Vertino P., Zhang X., Cheng X. (2012) Nucl. Acids Res., **40**, 4841-4849.
185. Lin J., Jeong S., Liang G., Takai D., Fatemi M., Tsai Y., Egger G., Gal-Yam E., Jones P. (2007) Cancer Cell., **12**, 432-444.

186. Prokhortchouk A., Hendrich B., Jorgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 1613-1618.
187. Filion G., Zhenilo S., Salozhin S., Yamada D., Prokhortchouk E., Defosse P. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 169-181.
188. Majumder S., Kutay H., Datta J., Summers D., Jacob S., Ghoshal K. (2006) *J. Cell. Biochem.*, **97**, 1300-1316.
189. Iacobuzio-Donahue C. (2009) *Annu. Rev. Pathol.*, **4**, 229-249.
190. Martens J., O'Sullivan R., Braunschweig U., Opravil S., Radolf M., Steinlein P., Jenuwein T. (2005) *EMBO J.*, **24**, 800-812.
191. Kawane K., Nagata S. (2008) *Methods Enzymol.*, **442**, 271-287.
192. Nagata S. (2005) *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 853-875.
193. Peitsch M., Mannherz H., Tschopp J. (1994) *Trends Cell. Biol.*, **4**, 37-41.
194. Nadano D., Yasuda T., Kishi K. (1993) *Clin. Chem.*, **39**, 448-452.
195. Yasuda T., Takeshita H., Nakazato E., Nakajima T., Hosomi O., Nakashima Y., Kishi K. (1998) *Anal. Biochem.*, **255**, 274-276.
196. Sato S., Fujita K., Masanori K., Mukumoto K., Ohtsuka K., Takenaka S. (2009) *Anal. Chim. Acta.*, **645**, 30-35.
197. Eulitz D., Mannherz H. (2007) *Apoptosis*, **12**, 1511-1521.
198. Cragg M., Howatt W., Bloodworth L., Anderson V., Morgan B., Glennie M. (2000) *Cell Death Differ.*, **7**, 48-58.
199. Барановский А., Бунева В., Невинский Г. (2004) *Биохимия*, **69**, 725-742.
200. Kochanek S., Renz D., Doerfler W. (1993) *Nucl. Acids Res.*, **21**, 5843-5845.
201. Davie J., Candido E. (1980) *FEBS Lett.*, **110**, 164-168.
202. Pan C., Sinicropi D., Lazarus R. (2001) *Methods Mol. Biol.*, **160**, 309-321.
203. Galeazzi M., Morozzi G., Piccini M., Chen J., Bellisai F., Fineschi S., Marcolongo R. (2003) *Autoimmunity Rev.*, **2**, 50-55.
204. Martinez-Valle F., Balada E., Ordi-Ros J., Bujan-Rivas S., Sellas-Fernandez A., Vilardell-Tarres M. (2009) *Lupus*, **18**, 418-423.
205. Bodano A., Gonzalez A., Ferreiros-Vidal I., Balada E., Ordi J., Carreira P., Gomez-Reino J., Conde C. (2006) *Rheumatology*, **45**, 819-823.
206. Sallai K., Nagy E., Derfalvy B., Muzes G., Gergely P. (2005) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 56-59.
207. Gibson U., Chen A., Baker D., Sinicropi D. (1992) *J. Immunol. Methods.*, **155**, 249-256.
208. Macanovic M., Lachmann P. (1997) *Clin. Exp. Immunol.*, **108**, 220-226.
209. Dewez B., Lans M., Allaey V., Karaoglou A., Taper H., Roberfroid M. (1993) *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **31**, 793-797.
210. Ito K., Yamamoto T., Minamiura N. (1987) *J. Biochem.*, **102**, 359-367.
211. Belli S., Goding J. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **226**, 433-443.
212. Shaw J., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B. (1991) *Nucl. Acids Res.*, **19**, 747-750.
213. Sakura H., Takekuma M., Matsui H., Serizawa M., Takanaka C. (2003) *Thromb Res.*, **112**, 307-311.
214. Haugen H., Ritland S., Blomhoff J., Solberg H., Skrede S. (1981) *Clin. Chem.*, **27**, 1392-1396.
215. Bender J. (1979) *Med. Pediatr. Oncol.*, **7**, 401-404.
216. Frittitta L., Camastra S., Baratta R., Costanzo B., D'Adamo M., Graci S., Spampinato D., Maddux B., Vigneri R., Ferrannini E., Trischitta V. (1999) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 3620-3625.
217. Этингоф Р., Думлер И. (1981) *Укр. биохим. ж.*, **53**, 28-44.
218. Барановский А., Ershova N., Buneva V., Kanyshkova T., Mogelnitskii A., Doronin B., Boiko A., Gusev E., Favorova O., Nevinsky G. (2001) *Immunol. Lett.*, **76**, 163-167.
219. Shuster A., Gololobov G., Kvashuk O., Bogomolova A., Smirnov I., Gabibov A. (1992) *Science*, **256**, 665-667.
220. Бунева В., Кудрявцева А., Гальвита А., Дубровская В., Хохлова О., Калинина И., Галенок В., Невинский Г. (2003) *Биохимия*, **68**, 1088-1100.
221. Thuijls G., Derikx J., Prakken F., Huisman B., van Bijnen Ing A., van Heurn E., Buurman W., Heineman E. (2011) *Am. J. Emerg. Med.*, **29**, 256-260.
222. Lim R., Lappas M., Riley C., Borregaard N., Moller H., Ahmed N., Rice G. (2013) *J. Ovarian. Res.*, **6**, 5.
223. Sands H., Gorey-Feret L., Cocuzza A., Hobbs F., Chidester D., Trainor G. (1994) *Mol. Pharm.*, **45**, 932-943.
224. Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G., Shelerov V., Alechina R., Molyaka Y., Anan'ev V., Bazin I., Garin A., Narimanov M., Knysh V., Melkonyan H., Umansky S., Lichtenstein A. (2000) *Clin. Chem.*, **46**, 1078-1084.
225. Rak J. (2010) *Semin. Thromb. Hemost.*, **36**, 888-906.
226. Schwarzenbach H., Hoon D., Pantel K. (2011) *Nat. Rev. Cancer.*, **11**, 426-437.
227. Челобанов Б., Лактионов П., Власов В. (2006) *Биохимия*, **71**, 725-741.

Поступила: 01. 10. 2013.

**GENERATION OF BLOOD CIRCULATING DNA:  
THE SOURCES, PECULIARITIES OF CIRCULATION AND STRUCTURE**

*O.E. Bryzgunova, P.P. Laktionov*

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,  
8 Lavrentiev ave., Novosibirsk, 630090 Russia; tel.: +7(383) 3635144; fax: +7(383) 3635153;  
e-mail: olga.bryzgunova@niboch.nsc.ru

Extracellular nucleic acids (exNA) were described in blood of both healthy and illness people as early as in 1948, but staid overlooked until middle 60-th. Starting from the beginning of new millennium and mainly in the last 5 years exNA are intensively studied. Main attention is directed to investigation of exNA as the source of diagnostic material whereas the mechanisms of their generation, as well as mechanisms to providing long-term circulation of exNA in the bloodstream are not established unambiguously. According to some authors, the main source of circulating nucleic acids in blood are the processes of apoptosis and necrosis, while others refer to the possible nucleic acid secretion by healthy and tumor cells. Circulating DNA were found to be stable in the blood for a long time, escaping from the action of DNA hydrolyzing enzymes and are apparently packed in different supramolecular complexes. This review presents the opinions of various authors and evidence in favor of all the theories describing appearance of extracellular DNA, the features of the circulation and structure of the extracellular DNA and factors affecting the time of DNA circulation in blood.

**Key words:** circulating DNA, apoptosis, necrosis, oncosis, active secretion, Dnase.