

Громадська організація “Всеукраїнська асоціація клінічної хімії та лабораторної медицини”
ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України”
ДУ “Національний інститут хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова НАМН України”

ДУ “Національний науковий центр
“Інститут кардіології імені академіка М.Д. Стражеско НАМН України”
Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА

LABORATORY DIAGNOSTICS

науково-практичний журнал

Видається з червня 1997 р.
Свідоцтво про державну реєстрацію:
серія КВ № 22642-12542ПР від 24.03.2017 р.

1(82). 2019

ЗМІСТ

CONTENTS

БІОХІМІЯ. ІМУНОЛОГІЯ

- Гордієнко Ю.А., Шевцова А.І.*
Вільна ДНК у плазмі крові за норми
та при патологічних станах 3
- Мельник А.А.*
Использование комбинированных оральных
контрацептивов и риск тромбозов..... 14

BIOCHEMISTRY. IMMUNOLOGY

- Hordiienko Y.A., Shevtsova A.I.*
Cell free DNA in blood plasma in norm
and pathology 3
- Melnik A.A.*
Use of combined oral contraceptives
and thrombosis risk 14

ГЕМАТОЛОГІЯ

- Ліпкан Г.М.*
Пойкілоцитоз — найважливіша ознака
патологічних змін еритроцитів 24

HAEMATOLOGY

- Lipkan G.N.*
Poikilocytosis the most important indication
of pathological changes of erythrocytes 24

ЦИТОЛОГІЯ

- Туганова Т.Н., Болгова Л.С., Алексеєнко О.І.*
Цитологическая диагностика заболеваний
лимфатических узлов — первый этап
морфологической верификации 26
- Рибальська А.П., Немировська Л.М., Мельник О.А.,
Скачкова Н.К., Горяїнова Н.В., Третьак Н.М.*
Індигенна мікробіота організму як фактор
розвитку інфекційно-запальних ускладнень
у хворих на гостру та хронічну лейкомію
мієлоїдного походження 31

CYTOLOGY

- Tuganova T.N., Bolgova L.S., Alekseenko O.I.*
Cytological diagnostics of diseases
of lymphatic nodes — the first stage
of morphological verification 26
- Rybalska A.P., Nemirovska L.M., Melnik O.A.,
Skachkova N.K., Goryainova N.V., Tretyak N.M.*
Indigenous microbiote of organism as a factor
for the development of infectious-inflammatory
complications in patients with acute
and chronic leukemia by myeloid origin 31

МЕТОДИ

| | |
|--|----|
| <i>Мельник А.А.</i> Новый тест isoPSA™ для определения риска рака предстательной железы..... | 39 |
|--|----|

ОГЛЯДИ

| | |
|--|----|
| <i>Гареев А.Л.</i> Молекулярная аллергология в лабораторной практике | 46 |
|--|----|

METHODS

| | |
|---|----|
| <i>Melnik A.A.</i> New isoPSA™ test for determination of risk of prostate cancer..... | 39 |
|---|----|

REVIEWS

| | |
|---|----|
| <i>Gareev A.L.</i> Molecular allergology in laboratory practice | 46 |
|---|----|

**Рекомендовано до друку та розміщення на веб-сайті Інтернету
Вченою радою Національного інституту хірургії та трансплантології
імені О. О. Шалімова НАМН України.
Протокол № 11 від 01.11.2019 р.**

**Головний редактор Т. І. ГАВРИЛЕНКО
Заступник головного редактора В. А. ДЄЄВ**

Редакційна колегія:

Б. Г. Борзенко, С. В. Верьовка, Л. Л. Воронцова, Д. Ф. Глузман, В. І. Задорожна,
О. Т. Зубовська (Мінськ, Білорусія), С. В. Зяблінцев, Л. В. Кузнецова, Л. Є. Лаповець, Г. М. Ліпкан, В. І. Літус,
Г. Г. Луньова, С. Магомедов, А. П. Мироненко, Г. Г. Нікуліна, Д. Озолінс (Рига, Латвія), Л. Л. Пінський,
А. С. Прилуцький, С. Л. Рибалко, А. В. Руденко, А. Г. Салманов, Т. А. Сергєєва, Н. О. Сибірна, А. А. Стасенко,
О. М. Сулаєва, Ю. А. Сущенко (секретар), З. Й. Фабрі, І. В. Хомяк, В. Р. Шагінян, В. О. Шляховенко

Редакційна рада:

І. В. Абраменко (Київ), Т. І. Єльчанінова (Кривий Ріг), О. Й. Кизим (Київ),
А. Г. Короп (Харків), П. І. Попович (Івано-Франківськ), Л. С. Шевчишина (Хмельницький)

“ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА”
науково-практичне видання

Здано до набору 19.11.2019 р. Підписано до друку 19.12.2019 р. Формат 60×84 1/8. Друк офсетний. Ум. др. арк. 6,98. Обл.-вид. арк. 7,14.
Наклад 600 прим. Замовлення ЛД-19-1. Вид-во ТОВ “ДІА”, м. Київ, вул. Васильківська, 45, тел.: 257-16-15.

Адреса редакції:
03680, м. Київ, вул. Героїв Севастополя, 30
Національний інститут хірургії та трансплантології
імені О.О. Шалімова НАМН України,
телефон-факс (044) 408-63-55.

Надруковано ТОВ “ДІА”
Адреса типографії:
м. Київ, вул. Васильківська, 45

Сторінка в Інтернеті:
<http://acclmu.org.ua/journals/laboratory-diagnostics-journal/>

© Громадська організація “Всеукраїнська асоціація
клінічної хімії та лабораторної медицини”, 2019

УДК 577.213/.215:616-092

Ю.А. Гордієнко, А.І. Шевцова

**ВІЛЬНА ДНК У ПЛАЗМІ КРОВІ ЗА НОРМИ
ТА ПРИ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНАХ***ДЗ “Дніпропетровська медична академія
МОЗ України”, м. Дніпро*

Наявність ДНК у плазмі крові людини вперше була встановлена у 1948 році ще до визначення структури цієї молекули Уотсоном і Кріком [1]. Проте цей факт було проігноровано науковою спільнотою, і лише після доведення у 1966 році ролі неядерної ДНК у формуванні анти-ДНК-антитіл при системному червоному вовчаку її почали розглядати у клінічному аспекті [2]. Відтоді ДНК крові та інших біологічних рідин отримала назви циркулююча, поза(екстра)клітинна або вільна (вДНК). На сьогодні під вДНК розуміють фрагменти ДНК, що надходять у біологічні рідини внаслідок глибокого ушкодження або загибелі клітин, тому її відносять до так званих Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP-молекул) [3].

Інтерес до визначення вДНК значно підвищився за останнє десятиріччя: кількість щорічних публікацій на цю тему зросла у 15 разів у порівнянні з 2000–2004 роками, що, перш за все, обумовлено удосконаленням технологій та клінічним значенням цієї DAMP-молекули [4]. Метою цієї роботи є узагальнення сучасних даних стосовно джерел та біологічної ролі вДНК в організмі людини з акцентуванням уваги на клініко-лабораторних аспектах її визначення в плазмі крові.

**ДЖЕРЕЛА ВІЛЬНОЇ ДНК
У ПЛАЗМІ КРОВІ**

Зазвичай ДНК знаходиться у ядрі клітини у складі хроматину і близько 0,2% від її загальної кількості розташовується у мітохондріях. Однак, певні фізіологічні та патологічні процеси можуть сприяти появі ДНК у крові. До таких відносять дозрівання еритроцитів і тромбоцитів під час кінцевих стадій гемопоезу [5, 6], метаболізм клітин крові та ендотеліальних клітин [6, 7],

процеси нетозу [8], надходження фетальної ДНК у кровотоки матері з перших місяців вагітності [9], загибель соматичної або пухлинної клітини під час апоптозу та некрозу [10, 11]. Крім цього, джерелом вДНК у плазмі крові людини може бути вихід ДНК збудника під час інфекційних захворювань [12]. Тобто вДНК плазми крові являє собою суміш ДНК та її фрагментів з різних тканин та органів. У кров'яному руслі вДНК знаходиться у складі нуклеосом, макромолекулярних комплексів з білками, апоптичних тілець, екзосом, мікровезикул [13–15], які захищають вДНК від присутніх у крові нуклеаз.

Процеси еритро- і тромбоцитопоезу, що відбуваються у червоному кістковому мозку можуть бути постачальниками вДНК крові. Відомо, що наприкінці еритропоезу на стадії оксифільного еритробласта або міграції крізь стінку кровеносної судини ядро ущільнюється та виштовхується. Утворення тромбоцитів відбувається в процесі фрагментації мегакаріоцитів і неминуче пов'язаний з майже повним вичерпуванням цитоплазми мегакаріоцитів. Ядерний матеріал, що вивільняється під час еритро- та тромбоцитопоезу, руйнується макрофагами строми червоного кісткового мозку, селезінки та печінки, але частина ядерної ДНК може уникнути цього процесу, потрапивши до периферичного кровообігу [16, 17].

Нетоз. Дослідження останніх років переконливо свідчать, що значущим джерелом вДНК крові є нетоз. Цей термін походить від англійської назви Neutrophil Extracellular Traps (NETs), або нейтрофільні позаклітинні пастки (НПП). У 2004 році вперше Brinkmann et al. виявили, що нейтрофіли, стимульовані бактеріальними ліпополісахаридами та інтерлейкіном ІЛ8, виділяють сітчасті структури НПП, які побудовані на основі ДНК, гістонів та протеїнів цитоплазматичних гранул [18]. Процес утворення НПП можуть стимулювати різні агенти, серед яких мікроорганізми [18], цитокіни та фактори росту [19], компоненти системи комплементу [20], циркулюючі імунні комплекси та активні форми кисню (АФК) [21]. У процесі провадження реакцій вродженого та набутого імунітету нейтрофільні гранулоцити здатні до “суїцидального” нетозу, який завершується клітиною загибеллю,

та “вітального” нетозу, під час якого ДНК фрагментується та упаковується в утворені ядерною мембраною везикули, що мігрують крізь цитоплазму і шляхом екзоцитозу вивільняють ДНК назовні. Нейтрофіл стає без’ядерним, проте залишається здатним до руху і фагоцитозу [22]. Втім, у будь-якому разі, обидва процеси призводять до утворення пасток.

За стимуляції нейтрофілів можуть запускатись молекулярні механізми активації Raf-мітоген-активованої кінази, Ras2-шляху та ферменту, що здійснює деконденсацію хроматину, пептидиларгініндаїмінази 4 (ПАД4) [23]. ПАД4 — ядерний Ca^{2+} -залежний ензим, який перетворює аргінін та метиларгінін гістонів Н1, Н3 та Н4 на цитрулін, зменшуючи тим самим позитивний заряд гістонів (рис. 1). Процес цитрулінізації (деїмінації) неодмінно супроводжується деконденсацією хроматину, втратою сегментації ядра та наступним руйнуванням ядерної мембрани. Паралельно йде блокування системи каспаз, вивільнення вмісту нейтрофільних гранул і поступове руйнування всіх клітинних мембран. Зрештою відбувається індукція сигнальної системи із залученням фосфатидилінозитол-3-кінази та серинтреонін-кінази, що забезпечують функціонування мікротрубочок та актинових філаментів. Активовані білки цитоскелета скорочуються допоки не зруйнується плазматична мембрана. Руйнування мембрани зумовлює потрапляння внутрішньоклітинного вмісту у позаклітинний простір і формування пастки [24]. Необхідність ПАД4 для індукції НПП наразі залишається під сумнівом. З одного боку, експериментально доведено, що за дефіциту або інгібування ПАД4 нейтрофіли не здатні генерувати НПП [23], а з іншого — з’ясовано, що за дефіциту ПАД4 реєструється

незначне утворення НПП у відповідь на дію мікробних агентів [25], а здатність до утворення НПП у відповідь на дію вірусу грипу зберігається [26].

На сьогодні остаточно не визначено усі складники НПП, але вже відомо близько 30 компонентів. У складі НПП ДНК знаходиться у високомолекулярній формі в комплексі з гістоновими та негістоновими білками. До останніх відносять білки нейтрофільних гранул (БНГ), серед яких багато ферментів, таких як нейтрофільна еластаза, мієлопероксидаза, катепсин G, матриксна металопротеїназа 9, α -дефензин, лізоцим, які здатні посилювати деконденсацію хроматину. Крім того, до складу БНГ входять пептидоглікан-розпізнавальний протеїн S та лактоферин [27]. На відміну від інших компонентів НПП, лактоферин може виступати антагоністом нетозу. У N-термінальному домені лактоферину розташовані дві ділянки з різною афінністю до фосфатних груп ДНК, одна з яких складається з 25 позитивно заряджених амінокислот, що зв’язуються з цитидин-фосфат-гуанозин (СрG)-збагаченими послідовностями олігонуклеотидів. Отже, лактоферин зменшує негативний заряд дволанцюгової ДНК, запобігаючи таким чином руйнуванню молекули, та перешкоджає формуванню НПП. Втім, у патологічних умовах задля припинення вивільнення НПП лише самого впливу лактоферину недостатньо [28].

У процесі формування пастки, крім ферментів, з ДНК можуть зв’язуватись і плазмові білки, такі як альбумін та фібронектин [29]. По відношенню до ДНК альбумін виконує не лише транспортну функцію, сприяючи проникненню останньої у клітину шляхом ендоцитозу, а й може уповільнювати швидкість її деградації ДНКазми [30].

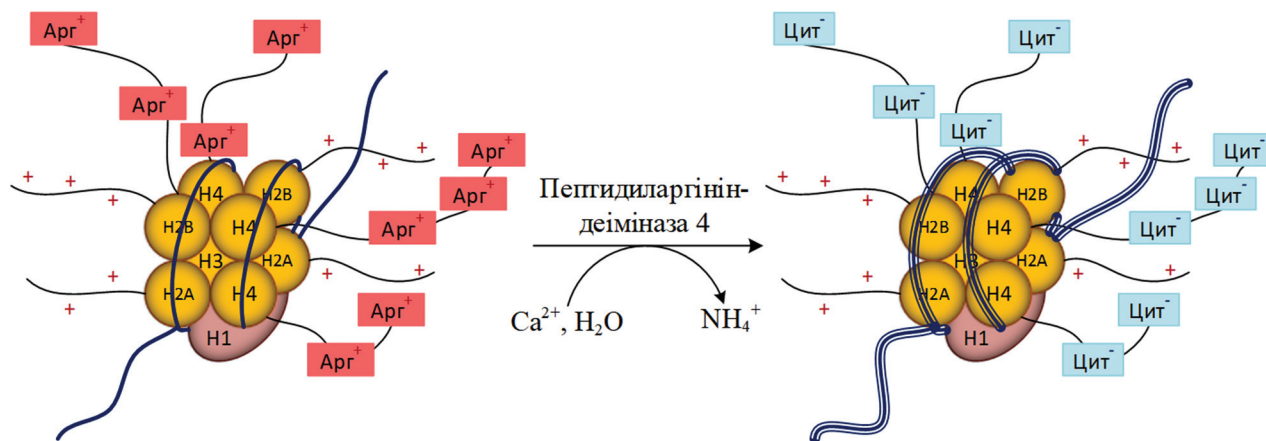


Рис. 1. Реакція цитрулінізації (деїмінації)

Нещодавно за допомогою мікроскопії структурованого освітлення було встановлено, що *in vitro* структура НПП представлена тонкими нитками, тоді як *in vivo* часто візуалізуються щільні шари ДНК. Yip B. G. et al. було висловлене припущення, що ущільнення НПП може відбуватись шляхом сполучення вДНК з плазмовим фібронектином [22], який опосередковує адгезію клітин до НПП за рахунок взаємодії з інтегринами $\alpha 5\beta 1$ та $\alpha v\beta 3$ [31].

Крім нейтрофілів, позаклітинні пастки можуть розгортати і еозинофіли, базофіли, макрофаги/моноцити, тому загалом цей процес прийнято називати етоз (від англ. Extracellular Traps) [32].

Активна секреція ДНК клітинами. Ще одним джерелом вДНК може слугувати активна метаболічна секреція ДНК клітинами у позаклітинне середовище. Механізми забезпечення активної секреції ДНК досконало не досліджені, проте експерименти Gahan P. et al. з використанням 3Н-тимідину довели, що стимульовані і нестимульовані лімфоцити можуть вивільняти у цитоплазму щойно синтезовану ДНК, яка утворює комплекс з РНК та ліпопротеїнами. Цей комплекс отримав назву віртосома [33]. Вивільнення віртосом у позаклітинний простір — енергетичний, строго контрольований процес, властивий живим клітинам. Віртосоми не мають обмежувальної мембрани, але завдяки фосфоліпідам та холестеролу, що входять до складу комплексу, можуть поглинатись іншими клітинами. Такий обмін нуклеїновими кислотами не обов'язково здійснюється між клітинами одного типу, але в результаті клітина-реципієнт завжди зазнає біологічної модифікації. Отже, вважають, що віртосома може діяти як міжклітинний месенджер [34].

Під час інфекційних захворювань будь-якої природи у кров може вивільнитись ДНК збудника, частина якої може залишатись у кров'яному руслі, а частина адсорбуватись на клітинах крові: В-лімфоцити, що мають на поверхні IgG, можуть зв'язувати екзогенну ДНК [35]. Кількість чужорідної ДНК у кровообігу хворих, зазвичай, не перевищує десятків пкг/мл, що замало у порівнянні із загальним пулом вДНК крові [25], тобто екзогенна ДНК, що з'являється в крові за інфекційних процесів, майже не впливає на загальний рівень вДНК у крові.

Апоптоз та некроз як джерела вДНК. Щодня значна кількість клітин піддається апоптозу

внаслідок дії специфічних та неспецифічних позаклітинних чинників (антигенів, цитокінів, гіпоксії, токсичних речовин та ін.) і вмикання внутрішньоклітинних механізмів, що призводять до руйнування клітинних органел та деградації їхніх складових [11, 13]. Активація каспаз спричиняє не лише руйнування білкових компонентів клітини, а й фрагментацію ДНК, що відбувається під дією локалізованої у ядрі Mg^{2+} -залежної ДНКазы типу CAD (caspase-3 activated DNase) [36], яка ініціює утворення великих і середніх фрагментів ДНК. Утворені фрагменти можуть входити до складу апоптичних тілець, частина яких фагоцитуються макрофагами, в яких відбувається їх подальше розщеплення до окремих нуклеотидів під дією лізосомальної ДНКазы II. Інша частина апоптичних тілець уникає цього процесу і, потрапляючи у кровоток, сприяє пролонгованому циркулюванню вДНК у крові [37]. Підраховано, що в процесі апоптозу деградує від 1 до 10 г ДНК, тому вважають, що за фізіологічної норми загальний вміст вДНК у крові визначається інтенсивністю саме апоптичних процесів [38]. Фрагменти ДНК, що циркулюють у крові, гідролізуються під дією ДНКаз I та II, які можуть вивільнитись клітинами у кров'яне русло і завершувати руйнування ДНК [39].

Тривалий вплив на клітини ушкоджувальних чинників (гіпоксії, гіпертермії, іонізуючого випромінювання та ін.) може спонукати процес некрозу. Некроз характеризується деструктивними змінами, що призводять до набухання клітини та гомогенізації її вмісту, тобто перед знищенням клітини ДНК знаходиться у дифузному стані в цитоплазмі. Хоча механізм вивільнення ДНК з некротичних клітин остаточно нез'ясований, вважають, що цей процес також відбувається за безпосередньої участі макрофагів [40]. Значна кількість фрагментів ДНК, що утворюється в результаті некрозу, має довжину більш ніж 10 тис. пар нуклеотидів (п.н.) [41].

Ще один шлях вивільнення ДНК у біологічні рідини пов'язаний з розвитком окисного стресу. Підвищення рівня АФК супроводжується зниженням мембранного потенціалу мітохондрій і дестабілізацією мітохондріальної ДНК (мтДНК). В результаті відкриваються пори перехідної проникності МРТР (mitochondrial permeability transition pores), через які мтДНК може надходити у цитоплазму, де вона або взаємодіє з рецепторами, або стимулює інфламасома-опосередкований синтез ІЛ1 β та ІЛ18. Крім цього, мтДНК може

вивільняються з клітини шляхом екзоцитозу, до-лучаючись до загального пула вДНК [42].

Отже, джерелами ДНК у периферичному кро-вообігу слугують процеси гемопоєзу, апоптозу, некрозу, вивільнення ДНК інфекційних агентів, надходження мтДНК через пори проміжної про-никності мітохондрій. Невід’ємну роль у появі ДНК у периферичній крові відіграють макрофаги, які сприяють як вивільненню, так і елімінації її з кровотоку.

МЕТАБОЛІЗМ ВІЛЬНОЇ ДНК

За сучасними даними у крові можуть знахо-дитись різні за походженням продукти деградації ядерної та мтДНК, які можуть бути представлені одно- чи дволанцюговою ДНК та ДНК з розри-вами обох ланцюгів. Гідроліз вДНК відбувається під впливом ДНКаз, які розщеплюють ДНК з утворенням великих (0,5–1 млн п.н), про-міжних (~300 тис. п.н) і оліго- та мононуклео-сомних фрагментів [43, 44]. Існування нуклео-сомної ДНК у плазмі підтверджено за допомогою електрофорезу в агарозному гелі за наявності так званої “апоптичної драбини” — фрагментів, що містять ~170 п.н. або кратних їм за розмірами [45]. Ультракорткі (~100 п.н.) мінорні фрагменти, зазвичай, мають довжину, кратну ~10 п.н., що пов’язано з особливістю розташування ділянок, чутливих до дії нуклеаз [46].

Посилене вивільнення ДНК внаслідок руй-нування клітин в організмі супроводжуються активацією процесів елімінації цієї нуклеїнової кислоти з крові. Чільну роль у цих процесах відіграють печінка, селезінка та нирки. Основна частина вДНК у крові піддається гідролізу за до-помогою ДНКаз I [47]. ДНКаз II долучається до руйнування вДНК в разі поглинання остан-ньої макрофагами [37]. За фізіологічних процесів період напівжиття вДНК у кров’яному руслі в середньому 16,3 хв (4–30 хв). Вивчення кінети-ки видалення циркулюючої ДНК на прикладі елімінації фетальної ДНК з кровотоку матері дозволило встановити, що цей процес носить двофазний характер. Впродовж швидкої фази, що триває близько 1 години, з плазми видаля-ється більшість вДНК. Наступна повільна фаза триває у середньому 13 годин [48]. За даними досліджень Ershova E. et al. у здорових донорів спостерігається зворотна залежність вмісту вДНК та активності ДНКаз I, але у 10% випадків низька концентрація вДНК виявляється на тлі низької активності ДНКаз I. Припускають,

що такі результати обумовлені високою актив-ністю антиоксидантної та репараційної систем та низьким рівнем апоптичних процесів [49]. Серед здорових осіб ретельно відстежено ди-наміку змін вДНК у плазмі крові спортсменів. На тлі аеробного навантаження одразу після короткочасних та тривалих інтенсивних фізич-них вправ цей показник зростає у 7–22,7 разів, а вже за 30–120 хв знижується до норми [50]. Це пов’язують з окисним стресом, що сприяє збільшенню експресії про- та антиапоптичних генів та білків теплового шоку, і свідчить на ко-ристь посилення апоптичних процесів. Двофазна кінетика видалення вДНК притаманна організму також за більшості інфекційних захворювань й відрізняється лише тривалістю фаз. З’ясовано, що швидка фаза елімінації вірусної ДНК у хворих на гепатит В під час лікування триває 1,1±0,3 доби, тоді як повільна подовжується до 18±7 діб [51]. Ступінь зниження концентрації вДНК розцінюють як прогностичний показник: швидке видалення ДНК вірусу з кровотоку су-проводжується кращою відповіддю організму на лікування та великою ймовірністю виживання [52].

Частина ДНК здатна перетинати нирковий бар’єр і з’являється у сечі. Така ДНК отримала назву трансренальна [53].

ВІЛЬНА ДНК ЯК УЧАСНИК ТА МАРКЕР ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ

Вільна ДНК при запальних процесах. Системне запалення пов’язане з вивільненням різних форм вДНК у кровообіг та активацією імунних клітин шляхом зв’язування з Toll-подібними (toll-like receptors, TLRs) та NOD-подібними (nucleo-tide-binding oligomerization domain like receptors, NLRs) рецепторами [54]. У людини ідентифі-ковано 11 TLRs, з яких лише TLR9 розпізнає патогенну та власну ДНК. Цей рецептор лока-лізований у лізосомах та ендоплазматичному ре-тикуліумі імуноасоційованих (В- і Т-лімфоцитів, моноцитів/макрофагів, плазматоїдних ден-дритних клітин) та неімунних (епітеліальних, ендотеліальних, нервових) клітин [55]. Таке роз-ташування TLR9 сприяє зв’язуванню з ДНК тільки після її фагоцитозу. Зв’язування вДНК з TLR9 залежить від ступеня метильованості CpG-ділянок ДНК. Цей рецептор розпізнає немети-льовані CpG ДНК-мотиви, миттєво запускаючи передачу сигналу через адаптерний фактор міело-їдної диференціації 88 (MyD88) [56], що призво-

дить до активації TAK1 (transforming growth factor beta-activated kinase 1) та мітоген-активованої протеїнкінази, які стимулюють фактори транскрипції NF κ B та AP1. Активація останніх спричиняє експресію прозапальних цитокінів — ІЛ1, ІЛ6, фактору некрозу пухлини α . За таких обставин власна ДНК сприяє миттєвому розвитку асептичного запалення та активації імуносоційованих клітин, одночасно вмикаючи процеси репарації та регенерації ушкоджених тканин [55]. Встановлено, що блокування TLR9-сигнального шляху призводить до посилення нетозу [57]. Було з'ясовано, що у відповідь на стимуляцію макрофагами або цитокінами/хемокінами поліморфноядерні нейтрофіли CD49d⁻CD11b⁺-фенотипу здатні спонтанно експонувати TLR9 на поверхні клітини. Припускають, що цей шлях спрацьовує, коли ліганди TLR9 не можуть дістатися ендосоми. Ці рецептори є менш функціонально ефективними ніж ендосомальні TLR9, тим не менш вони зв'язують велику кількість бактеріальної та власної ядерної або мтДНК, що вивільняється з клітин при запаленні [58].

Крім вДНК, тригерами запальних реакцій можуть виступати ДНК-асоційовані білки, в основному, гістони та білок високої мобільності В1 (HMGB1). Експериментальні дослі-

дження дозволили встановити, що за ішемічно-реперфузійного ушкодження міокарда цей білок може посилювати зв'язування вДНК з RAGE (receptor for advanced glycation end products), що призводить до пришвидшення інтерналізації останньої [59].

Показано, що рівень вДНК у плазмі збільшений у пацієнтів з тяжким сепсисом і септичним шоком, причому її концентрація в плазмі корелює зі ступенем тяжкості захворювання і значно вища у тих, хто не вижив у відділенні інтенсивної терапії [60].

Участь вільної ДНК у процесах зсідання крові. Нещодавно було встановлено, що вДНК може посилювати процеси зсідання крові. Прокоагулянтні властивості притаманні тільки дволанцюговим фрагментам молекул вДНК та обумовлені високою щільністю від'ємного заряду. Формування навіть коротких шпилькових структур також сприяє посиленню прокоагулянтного потенціалу вДНК [61]. В основі лежить зв'язування вДНК з високомолекулярним кініногеном, що призводить до активації калікреїну та фХІІ (рис. 2). Крім того, контакт з вДНК спричиняє аутоактивацію фХІІ.

Зв'язування з аніонною поверхнею пришвидшує також активацію фХІ шляхом утворення

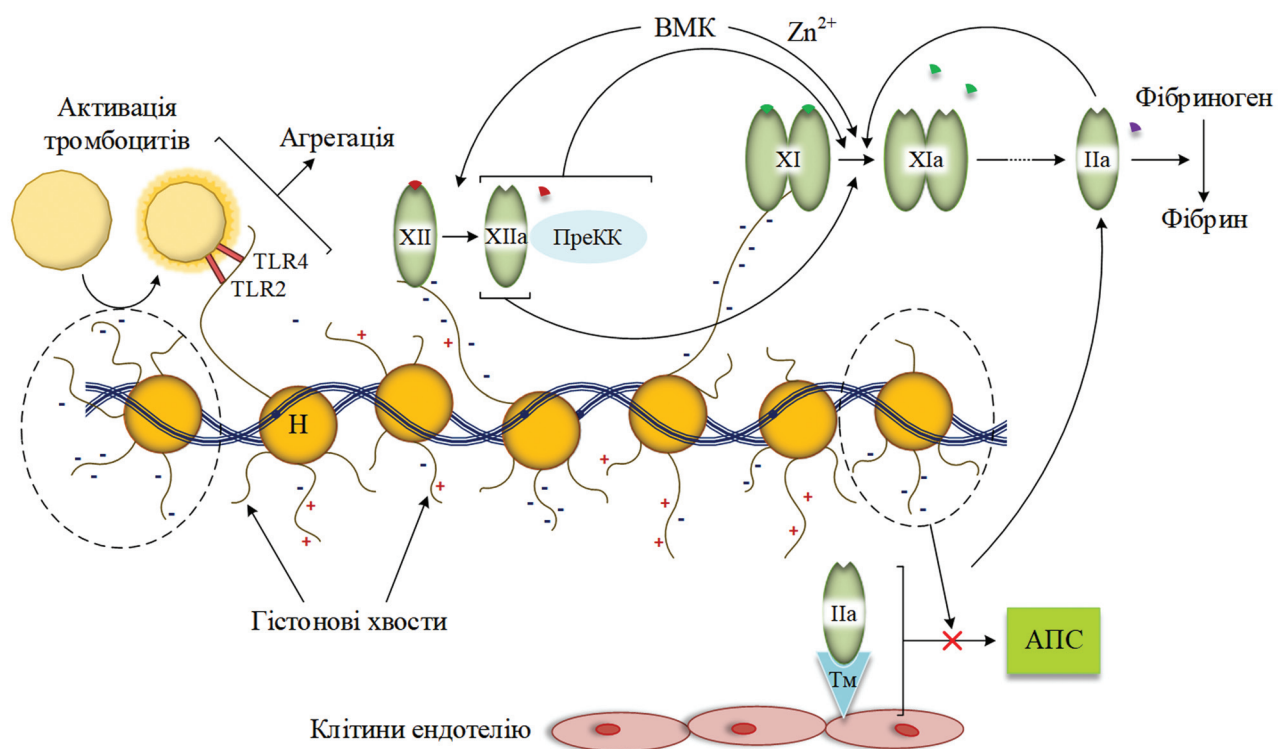


Рис. 2. Участь вільної ДНК у механізмах зсідання крові. ВМК — високомолекулярний кініноген, ПреКК — прекалікреїн, Тм — тромбомодулін, АПС — активований протеїн С, Н — нуклеосома, TLR — Toll-подібний рецептор

еквімолярних комплексів з фХІа та прекалікреїном за наявності іонів цинку [61]. В третьому та каталітичному доменах фХІа містяться аніонзв'язувальні сайти ABS1 та ABS2. ДНК виступає у ролі кофактора лише після зв'язування фХІа у ділянці ABS2, посилюючи подальше утворення тромбіну. Застосування ДНКаз повністю нейтралізує цей ефект, тобто блокування синтезу або активності фХІ може мінімізувати розвиток тромбозу [62].

Вільна ДНК у крові знаходиться переважно у комплексі з гістонами, які також володіють протромботичними властивостями: гістони H3 та H4 індують агрегацію тромбоцитів через зв'язування з TLR2 та TLR4. Додаткове внутрішньовенне введення рекомбінантних гістонів сприяє збільшенню тромбоцитів у тромбі, що може провокувати розвиток вторинної тромбоцитопенії [63]. Аналогічний результат було отримано під час дослідження прокоагулянтних властивостей структурних компонентів НПП. Встановлено, що додавання ДНКаз до НПП у збагаченій тромбоцитами плазмі супроводжується руйнуванням ланцюгів ДНК та вивільненням гістонів, які сприяють зростанню загальної кількості тромбоцитів та утворенню тромбу [64]. Крім того, гістони H3 та H4 здатні посилювати утворення тромбіну, порушуючи тромбомодулінзалежну активацію протеїну С. Активованій протеїн С (АПС) здатний блокувати нетоз, підтвердженням чого є той факт, що застосування антитіл проти EPCR, PAR3 та Mas-1, що є рецепторами АПС на поверхні нейтрофілів, перешкоджають цьому процесу. Встановлено, що попередня обробка протеїном С нейтрофілів у процесі нетозу перешкоджає адгезії тромбоцитів до НПП [65].

За допомогою флуоресцентної та темнопольної мікроскопії було доведено, що вивільнення НПП супроводжується взаємодією ДНК з фібриногеном. Ці дані припускають наявність на поверхні мембрани активованих нейтрофілів ділянок зв'язування факторів протромбіназного комплексу — протромбіну, фVII та фX. На користь такого припущення свідчить той факт, що втрата Gla-домену фX, а також блокування експонування фосфатидилсерину на мембрані нейтрофілів перешкоджає утворенню цього комплексу [66].

Позаклітинна ДНК може чинити вплив і на фібринолітичну систему. Встановлено, що дволанцюгові фрагменти вДНК сприяють активації

інгібітору активатора плазміногену (РАІ) 1 та інактивації активаторів плазміногену тканинного (tPA) та урокіназного (uPA) типів. За присутності α_2 -антиплазміну цей ефект знижується. Концентрація вДНК 0,1–1 мкг/мл майже не впливає на швидкість фібринолізу, тоді як за більш великих показників (1–20 мкг/мл) вДНК конкурує з фібрином за плазмін [67].

Отже, за ініціювання низки реакцій контактного шляху системи гемостазу та взаємодії з фібрoneктином екстраклітинна ДНК виявляється міцно вбудованою в тромб, механічно посилюючи його стійкість до лізису.

Втім Noubouossie D. F. et al. отримали супротивні результати. Дослідники виявили, що *in vitro* ані інтактні НПП, ані відновлений хроматин, окремі нуклеосоми чи гістоновий октамер не відтворюють жодного з прокоагулянтних ефектів. Вони дійшли висновку, що, на відміну від ДНК або окремих гістонів, інтактні мережі НПП безпосередньо не ініціюють і не посилюють процеси зсідання крові. Припускають, що це пов'язано з нейтралізацією від'ємного заряду ДНК та модифікацією властивостей деяких гістонів в результаті складної гістон-гістон і ДНК-гістон взаємодії та суперспіралізації хроматину [68].

Нещодавні дослідження показали, що, крім зупинки кровотечі, тромбоз в умовах транзиторної бактеріємії відіграє важливу фізіологічну роль, перешкоджаючи поширенню патогенів. Такий імунний захист з залученням активованих моноцитів, які експресують тканинний фактор, і нейтрофілів, що утворюють НПП, отримав назву імунотромбоз. У хворих з інфекційним ендокардитом імунотромбоз є важливою складовою тромбоемболії, яка завдає серйозних ускладнень [69]. Слід підкреслити, що використання антитіл проти ДНК-гістонових комплексів або руйнування мереж НПП під впливом ДНКаз знижує утворення тромбів, проте може призвести до дисемінації мікроорганізмів або вірусів [70].

Серцево-судинні захворювання. Ушкодження міокарда за ішемічної хвороби серця (ІХС) обумовлені активацією апоптозу, некрозу кардіоміоцитів або аутофагією окремих органел, зокрема мітохондрій, і супроводжується помірним підвищенням вДНК та НМGB1 у крові. Винятковістю спектру ДНК-фрагментів за ІХС є суттєве збільшення рівня рибосомних повторів, що транскрибуються (рДНК). Ці повтори містять метильовані CpG-збагачені послідовності, що забезпечують стійкість ДНК до дії ендонуклеаз

навіть в умовах підвищеної нуклеазної активності. Ця властивість обумовлює тривале циркулювання в крові в складі високомолекулярних фрагментів ДНК, які здатні впливати на гемодинаміку, знижуючи гідродинамічний опір крові [71]. При гострому інфаркті міокарда (ГІМ) рівень вДНК у плазмі значно вищий за такий при стабільній стенокардії. Підвищення рівня АТ-збагачених фрагментів вДНК при ГІМ провокує збільшення частоти серцевих скорочень у 2–2,5 рази, тоді як зростання вмісту СрG-збагачених рДНК фрагментів, навпаки, зменшує контрактильну активність міокарда у 1,5–2 рази [72].

На тлі первинної ангіопластики зі стентуванням, або черезшкірного коронарного втручання (ПЧКВ), у пацієнтів спостерігається підвищений рівень вДНК і нуклеосом. Некротичні зміни у пацієнтів з ГІМ з елевацією сегменту ST (STEMI) одразу після ПЧКВ спричиняють активацію нейтрофілів і, як наслідок, посилення нетозу. Вимірювання зони інфаркту після 6-тижневого спостереження виявило стійку кореляцію між її розміром та вмістом дволанцюгової ДНК, нуклеосом, тропоніну та МВ-форми креатинкінази [73].

Патологія печінки. Останнім часом поширилось застосування вДНК як додаткового маркера патології печінки. Вважають, що визначення цього показника може бути важливим за неоднозначних умов, коли відбувається ушкодження тканин, які, як і печінка, експресують стандартні маркери АЛАТ та АсАТ, наприклад, за м'язової дистрофії Дюшена. Аутоімунний гепатит та неалкогольний стеатогепатит зі схильністю до прихованого прогресування до цирозу не супроводжуються змінами АЛАТ чи АсАТ. У цих ситуаціях підрахунок молекул вДНК у плазмі дозволяє точно визначити масштаб ураження, а короткий період напіввиведення порівняно з повільним кліренсом печінкових ферментів — фактичний час ушкодження печінки [74].

Особливе значення має визначення рівня вДНК після трансплантації печінки. Вважають, що цей показник є інформативним маркером раннього відторгнення трансплантата. Втім Schütz et al. виявили, що підвищення вДНК може спостерігатись у 18–24% пацієнтів, які відповідають критеріям стабільного періоду, а відторгнення донорської печінки може трапитись на тлі її нормальної концентрації [75]. Paired-end ДНК секвенування дозволило порівняти рівні вДНК

у плазмі крові хворих, яким проведено трансплантацію печінки, та пацієнтів після пересадки гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК). З'ясовано, що після проведеної трансплантації печінки у крові реципієнта лише 27,2% загальної вДНК становила ДНК донора, тоді як після пересадки ГСК цей показник сягав 72,5%, причому різнився не тільки вміст ДНК, а й профіль ДНК-фрагментів. Загалом, незважаючи на те, що в обох випадках переважна більшість фрагментів була довжиною ~166 п.н., після пересадки печінки виявлені фрагменти ДНК були у середньому на 13,4% коротшими за такі пацієнтів після пересадки ГСК [76].

Патологічні процеси у мозку. При інсультах, черепно-мозкових травмах, ішемічному ураженні головного мозку після зупинки серця, розсіяному склерозі, нейродегенеративних процесах у кровотоку визначається ДНК, що має нейрональне походження.

За допомогою визначення вДНК можна діагностувати геморагічний інсульт протягом 6 і 24 год від виявлення перших симптомів. Встановлено, що за геморагічного інсульту вміст вДНК у крові суттєво підвищується, що дозволяє диференціювати його від ішемічного інсульту, за якого рівень вДНК або несуттєво зростає, або залишається у межах норми. Після тромболізису із застосуванням tPA при поліпшенні неврологічного стану пацієнта протягом 48 год відстежується тенденція до зниження вДНК, що дозволяє розглядати цей показник як прогностичний маркер перебігу хвороби [77].

Порушення функціонування мозку/клітин мозку при шизофренії супроводжується окисним стресом та/або вимиканням апоптичних процесів. Вивільнення значної кількості АФК сприяє окисненню гуаніну ДНК у 7,8-дигідро-8-оксогуанін (8-охоG). Вважають, що за наявності негативної кореляції між 8-охоG та співвідношенням 8-охоG/вДНК у хворих з порушенням апоптозу високий ступінь ушкодження ДНК клітин може бути пов'язаний не стільки з окисненням, скільки з порушенням кліренсу ушкодженої ДНК з кровотоку [78].

Онкологічні процеси. Визначення вДНК крові розглядають як альтернативу традиційному дослідженню біопсійного матеріалу у діагностиці онкологічних захворювань. Це так звана "рідка біопсія", основною перевагою якої є мінімальна інвазивність, можливість взяття зразків крові у будь-який час протягом лікування.

Leon et al. першими з'ясували, що у хворих з онкопатологією вміст ДНК у сироватці крові коливається від нормальних значень до екстремально високих, але в середньому вищий ніж у здорових донорів, а за раннього чи відтермінованого метастазування завжди відбувається додатковий стрибок рівня вДНК у плазмі крові [79]. Збільшення рівня вДНК у порівнянні з доброякісними новоутвореннями та нормою спостерігається при злоякісному раку молочної залози, причому вДНК визнають більш чутливим показником ніж визначення таких специфічних антигенів, як СЕА (carcinoembryonic antigen) та СА 15-3 (cancer antigen), які застосовують для оцінювання стану пацієнта після проведеного лікування [80].

Відомо, що при онкологічних захворюваннях ДНК зазнає генетичних та епігенетичних змін. Таку ДНК відрізняють від вДНК здорових клітин за наявністю специфічних геномних аберацій, властивих пухлинам, та позначають як пДНК. Визначення пДНК вважають доцільним не лише на ранніх стадіях захворювання, а й для вчасного виявлення рецидиву: підвищення цього показника корелює з подальшим рецидивом у 80% у хворих протягом 7–11 місяців [81].

Недрібноклітинний рак легень характеризується несуттєвим підвищенням пДНК, рівень якої не залежить від віку, статі, куріння та наявності запальних станів, проте залежить від стадії хвороби [82]. Вразі резекції пухлини пДНК зростає майже у 10 разів внаслідок хірургічного травмування, але за відсутності рецидиву цей показник повертається до норми протягом 3–6 місяців. Слід зауважити, що залежності між високою концентрацією пДНК та відповіддю на хіміотерапію не знайдено [83].

Нещодавні дослідження підтвердили, що для оцінювання прогресування меланоми пДНК є більш чутливим показником ніж визначення активності лактатдегідрогенази (82 і 40% відповідно) [84]. У хворих з мутаціями генів BRAF або NRAS та після проведеного хірургічного втручання підвищений рівень пДНК дозволяє ідентифікувати підгрупу пацієнтів з високим ризиком раннього рецидиву та низької виживаності [85].

Чималою перевагою у вивченні динаміки пухлинного процесу є дослідження не тільки рівня, але й ступеня фрагментованості пДНК. Зазвичай, відсоток пДНК від загальної вДНК становить менше 1%, причому пДНК-фрагменти

коротші за такі соматичних клітин (~166 п.н.) [86]. Особливістю плазмової вДНК при нирково-клітинній карциномі є виявлення великої кількості коротких фрагментів довжиною ~50–166 п.н., наявність яких асоціюється з агресивним перебігом хвороби. Видалення первинної пухлини згодом призводить до збільшення розміру фрагментів вДНК [53].

Дослідження останніх років свідчать про велику діагностичну значимість визначення ступеня метилювання окремих генів у складі вДНК. Так, гіперметилювання є характерною ознакою гену LRC3B при раку нирки та товстої кишки, гену RASSF1A — при меланомі, раку легень та молочної залози [87], BNC1, ADAMTS1 — аденокарциномі підшлункової залози [88], GSTP1, TIG1, DAPK1, PTGS2 — раку сечового міхура [89], APC, PTGS2, GSTP1 — нирково-клітинній карциномі та раку простати [90, 91].

Визначення вДНК у сечі вважають інформативним при злоякісних пухлинах нирок, сечового міхура, простати. Джерелом такої ДНК слугують пухлинні клітини, клітини сечових шляхів і трансренальна ДНК. Dudley J. C. et al. встановили, що поява ДНК у сечі передуює клінічній прогресії в 92% випадків [92].

Сучасні уявлення про процеси канцерогенезу довели існування феномену “генометастазування”, який полягає у можливості переносу генів у результаті трансфекційного поглинання вДНК та її інтегрування у геном клітини-реципієнта, що спричиняє трансформацію останньої. Цей феномен доповнюється припущенням про нестабільність соматичного геному і характеризується розривами дволанцюгової ДНК, делеціями, перестановками, однак не пояснює тропізм метастазування в цілому [93, 94].

Отже, ретельний аналіз вДНК розширює знання про механізми онкотрансформації та надає можливість визначити індивідуальну біологічну гетерогенність новоутворень. “Рідку біопсію” застосовують не тільки в онкології, а й для пренатальної діагностики, для оцінки ураження важкодоступних для біопсії тканин, таких як мозок [95].

Перспективним напрямком у терапії онкологічних та інших захворювань є розробка різних антидотів нуклеїнових кислот та блокаторів їхніх рецепторів. Одним із таких опрацювань є виготовлення наноконструкцій, які зможуть скеровано доставляти екзогенні препарати до тканин. Катіонні полімери, що зв'язують будь-які

нуклеїнові кислоти (nucleic acid-binding polymers, NABPs) — одно- чи дволанцюгову РНК, ДНК — відіграють роль скавенджерів. Серед NABPs найперспективнішим є поліамідоамін дендример третього покоління (РАММ-Г3), який шляхом ковалентного сполучення іммобілізують на мікроволокнистих сітках. Іммобілізовані NABPs виявляються більш ефективнішими терапевтичними чинниками ніж вільні [96]. Недоліком усіх NABPs є дозозалежна токсичність *in vivo* та нездатність нейтралізувати інші структури DAMPs, крім нуклеїнових кислот. Втім нещодавні дослідження показали, що РАММ-Г3/PSMA-полімер здатний зв'язувати та видаляти з кровотоку, крім нуклеїнових кислот, ще й НМGB1, демонструючи властивості ефективних протизапальних та антизсідальних агентів [97].

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Підсумовуючи вищевикладені дані, можна сказати, що широкий спектр сучасних досліджень, присвячених ґрунтовному аналізу та доведенню ролі вільної ДНК при захворюваннях та станах різної етіології свідчить на користь високої клінічної цінності цього показника. Перспективність визначення вДНК як додаткового маркера для діагностики, відстеження динаміки, прогнозування перебігу хвороби та оптимізації терапії полягає у можливості оцінити стан пацієнта у будь-який проміжок часу. Однак, зважаючи на короткий період напівжиття, високий ступінь фрагментації та низьку концентрацію у біологічних рідинах, визначення вДНК потребує оптимізації преаналітичних процедур, наявності стандартизованого методу та відповідного технічного оснащення, що наразі обмежує застосування цього показника. Розробка високочутливих специфічних методів визначення вДНК у найближчому майбутньому сприятиме заміні інвазійних процедур і розширенню застосування цього показника у клінічній практиці.

ЛІТЕРАТУРА

- Mandel P., Metais P. *Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme* // *C R Seances Soc Biol Fil.* — 1948. — Vol. 142, № 3–4. — P. 241–3.
- Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus / E.M. Tan, P.H. Schur, R.I. Carr [et al.] // *J Clin Invest.* — 1966. — Vol. 45, № 11. — P. 1732–40.
- Preissner K.T., Herwald H. *Extracellular nucleic acids in immunity and cardiovascular responses: between alert and disease* // *Thromb Haemost.* — 2017. — Vol. 117, № 7. — P. 1272–82.
- Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature* / R.M. Trigg, L.J. Martinson, S. Parpart-Li [et al.] // *Heliyon.* — 2018. — doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00699.
- The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature* / J. Aucamp, A.J. Bronkhorst, C.P. Badenhorst [et al.] // *Biol Rev Camb Philos Soc.* — 2018. Vol. 93, № 3. — P. 1649–83.
- False-Positive Plasma Genotyping Due to Clonal Hematopoiesis* / Y. Hu, B.C. Ulrich, J. Supplee [et al.] // *Clin Cancer Res.* — 2018. — Vol. 24, № 18. — P. 4437–43.
- Endotheliopathy is associated with higher levels of cell-free DNA following major trauma: A prospective* / D.N. Naumann, J. Hazeldine, R.J. Dinsdale [et al.] // *PLoS One.* — 2017. — Vol. 12, № 12. — e0189870. doi: 10.1371/journal.pone.0189870.
- NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers* / S. Masuda, D. Nakazawa, H. Shida [et al.] // *Clin Chim Acta* — 2016. — Vol. 1, № 459. — P. 89–93.
- Ni M., Peng X. L., Jiang P. *Bioinformatics Pipeline for Accurate Quantification of Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma* // *Methods Mol Biol.* — 2019. — Vol. 1909. — P. 177–80.
- Cell-free DNA as a biomarker of aging* / Y.V. Teo, M. Capri, C. Morsiani [et al.] // *Aging Cell.* — 2019. — Vol. 18, № 1. — e12890. — doi:10.1111/ace1.12890.
- Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression* / C. Roth, K. Pantel, V. Müller [et al.] // *BMC Cancer.* — 2011. — Vol. 1, № 4. — doi:10.1186/1471-2407-11-4.
- Prognostic Power of Pathogen Cell-Free DNA in Staphylococcus aureus Bacteremia* / A.O. Guimaraes, J. Gutierrez, S.A. Maskarinec [et al.] // *Open Forum Infect Dis.* — 2019. — Vol. 6, № 4. — ofz126. — doi: 10.1093/ofid/ofz126.
- Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content* / E.Y. Rykova, E.S. Morozkin, A.A. Ponomaryova [et al.] // *Expert Opin Biol Ther.* — 2012. — Vol. 12, № 1. — P. 141–53.
- New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes* / M.R. Fernando, C. Jiang, G.D. Krzyzanowski [et al.] // *PLoS.* — 2017. — doi: 10.1371/journal.pone.0183915.
- Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology* / A.R. Thierry, S. El Messaoudi, P.B. Gahan [et al.] // *Cancer Metastasis Rev.* — 2016. — Vol. 3, № 5. — P. 347–76.
- Jylhävä J. *Cell-free DNA as a Novel Biomarker of Aging* // *Dissertation, University of Tampere, School of Medicine Tampere Graduate Program in Biomedicine and Biotechnology, Finland.* — 2013. — P. 132.
- Keerthivasan G., Wickrema A., Crispino J.D. *Erythroblast Eucleation* // *Stem Cells International.* — 2011. — Vol. 2011, Article ID 139851, P. 1–9. — doi: 10.4061/2011/139851.
- Neutrophil extracellular traps kill bacteria* / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann [et al.] // *Science.* — 2004. — Vol. 303, № 5663. — P. 1532–35.
- NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis* / R. Khandpur, C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri [et al.] // *Science Translational Medicine.* — 2013. — Vol. 5, № 178. — P. 178ra40. — doi: 10.1126/scitranslmed.3005580.
- Neutrophil Extracellular Traps That Are Not Degraded in Systemic Lupus Erythematosus Activate Complement Exacerbating the Disease* / J. Leffler, M. Martin, B. Gull-

- strand [et al.] // *J Immunol.* — 2012. — Vol. 188, № 7. — P. 3522–31.
21. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via $Fc\gamma RIIIB$ and $Mac-1$ / M. Behnen, C. Leschczyk, S. Möller [et al.] // *J Immunol.* — 2014. — Vol. 193, № 4. — P. 1954–65.
 22. Yipp B. G., Kubes P. NETosis: how vital is it? // *Blood.* — 2013. — Vol. 122, № 16. — P. 2784–94.
 23. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation / A. Hakkim, T.A. Fuchs, N. Martinez [et al.] // *Nat Chem Biol.* — 2011. — Vol. 7, № 2. — P. 75–77.
 24. ROS and glutathionylation balance cytoskeletal dynamics in neutrophil extracellular trap formation / D. Stojkov, P. Amini, K. Oberson [et al.] // *J Cell Biol.* — 2017. — Vol. 216, № 12. — P. 4073–90.
 25. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps / P. Li, M. Li, M.R. Lindberg [et al.] // *J. Exp. Med.* — 2010. — Vol. 207. — P. 1853–62.
 26. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection / S. Hemmers, J.R. Teijaro, S. Arandjelovic [et al.] // *PLoS One.* — 2011. Vol. 6, № 7. — e22043. doi: 10.1371/journal.pone.0022043.
 27. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation / H. Yang, M.H. Biermann, J.M. Brauner [et al.] // *Front Immunol.* — 2016. — Vol. 7, № 302. — doi: 10.3389/fimmu.2016.00302.
 28. Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease / S. Mayeur, S. Spahis, Y. Pouliot [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* — 2016. — Vol. 24, № 14. — P. 813–36.
 29. Korabecna M., Tesar V. NETosis provides the link between activation of neutrophils on hemodialysis membrane and comorbidities in dialyzed patients // *Inflamm Res.* — 2017. — Vol. 66, № 5. — P. 369–78.
 30. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line / E.V. Dolgova, E.A. Potter, A.S. Proskurina [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* — 2016. — Vol. 7, № 76. — doi: 10.1186/s13287-016-0338-8.
 31. Integrin-dependent cell adhesion to neutrophil extracellular traps through engagement of fibronectin in neutrophil-like cells / M. Monti, F. Iommelli, V. De Rosa [et al.] // *PLoS One.* — 2017. — Vol. 12, № 2. — e0171362. — doi: 10.1371/journal.pone.0171362.
 32. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells / C. Schorn, C. Janko, M. Latzko [et al.] // *Front. Immunol.* — 2012. — doi: 10.3389/fimmu.2012.00277.
 33. Gahan P.B., Stroun M. The virtosome — a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger // *Cell Biochem. Funct.* — 2010. — Vol. 28. — P. 529–38.
 34. Cataldia S., Viola-Magni M. Components of the cytosolic and released virtosomes from stimulated and non-stimulated human lymphocytes // *Biochem Biophys Rep.* — 2016. — Vol. 6. — P. 236–41.
 35. DNA-reactive B cells in lupus / J. Suurmond, J. Calise, S. Malkiel [et al.] // *Curr Opin Immunol.* — 2016. — Vol. 43. — P. 1–7.
 36. Larsen B.D., Sørensen C.S. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond // *FEBS J.* — 2017. — Vol. 284, № 8. — P. 1160–70.
 37. Muhsin-Sharafaldine M.-R., McLellan A.D. Tumor-Derived Apoptotic Vesicles: With Death They Do Part // *Front. Immunol.* — 2018. — doi: 10.3389/fimmu.2018.00957.
 38. Mitra I., Mishra P.K. Nucleic acids in circulation: Are they harmful to the host? // *J. Biosci.* — 2012. — Vol 37. — P. 301–12.
 39. Programmed Cell Death / T.D. Pollard, W.C. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz [et al.] // *Cell Biology (Third Edition).* — 2017. — Chapter 46. — P. 797–815. — doi: 10.1016/B978-0-323-34126-4.00046-3.
 40. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantities and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells / Jahr, H. Hentze, S. Englisch [et al.] // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61, № 4. — P. 1659–65.
 41. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells / A. J. Bronkhorsta J. F. Wentzel, J. Aucamp [et al.] // *Molecular Cell Research.* — 2016. — Vol. 1863, № 1. — P. 157–65.
 42. Harrington J.S., Choi A.M.K., Nakahira K. Mitochondrial DNA in Sepsis // *Curr Opin Crit Care.* — 2017. — Vol. 23, № 4. — P. 284–90.
 43. Single-stranded DNA library preparation uncovers the origin and diversity of ultrashort cell-free DNA in plasma / P. Burnham, M.S. Kim, S. Agbor-Enoh [et al.] // *Sci Rep.* — 2016. — Vol. 6. — 27859. — doi: 10.1038/srep27859.
 44. Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma / R. Zhang, K. Nakahira, X. Guo [et al.] // *Sci Rep.* — 2016. — Vol. 6. — 36097. — doi: 10.1038/srep36097.
 45. Henikoff S., Church G.M. Simultaneous Discovery of Cell-Free DNA and the Nucleosome Ladder // *Genetics.* — 2018. — Vol. 209. — P. 27–29.
 46. Chandrananda D., Thorne N.P., Bahlo M. High-resolution characterization of sequence signatures due to non-random cleavage of cell-free DNA // *BMC Med Genomics.* — 2015. — Vol. 8, № 29. — doi: 10.1186/s12920-015-0107-z.
 47. Keyel P.A. Dnases in health and disease // *Developmental Biology.* — 2017. — Vol. 429, № 1. — P. 1–11.
 48. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing / S.C. Yu, S.W. Lee, P. Jiang [et al.] // *Clin Chem.* — 2013. — Vol. 59, № 8. — P. 1228–37.
 49. Circulating cell-free DNA concentration and DNase I activity of peripheral blood plasma change in case of pregnancy with intrauterine growth restriction compared to normal pregnancy / E. Ershova, V. Sergeeva, M. Klimenko [et al.] // *Biomed Rep.* — 2017. — Vol. 7, № 4. — P. 319–24.
 50. Circulating, cell-free DNA as a marker for exercise load in intermittent sports / N. Haller, S. Helmig, P. Taenny [et al.] // *PLoS One.* — 201. — Vol. 13, № 1. — e0191915. — doi: 10.1371/journal.pone.0191915.
 51. Ciupe S.M., Ribeiro R.M., Perelson A.S. Antibody Responses during Hepatitis B Viral Infection // *PLoS Computational Biology.* — 2014. — Vol. 10, № 7. — e1003730. — doi: 10.1371/journal.pcbi.1003730.
 52. Prognostic efficacy of combining tumor volume with Epstein-Barr virus DNA in patients treated with intensity-modulated radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma / L. Lu, J. Li, C. Zhao [et al.] // *Oral Oncology.* — 2016. — Vol. 60. — P. 18–24.
 53. Emerging Utility of Urinary Cell-free Nucleic Acid Biomarkers for Prostate, Bladder, and Renal Cancers / S.Y. Lina, J.A. Linehan, T.G. Wilson [et al.] // *European Urology Focus.* — 2017. — Vol. 3, № 2–3. — P. 265–72.
 54. Microbial Recognition and Danger Signals in Sepsis and Trauma / S.L. Raymond, D.C. Holden, J.C. Mira [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* — 2017. — Vol. 1863. — P. 2564–73.
 55. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9 / M.P. Chan, M. Onji, R. Fukui [et al.] // *Nat Commun.* — 2015. — Vol. 6. — 5853. — doi: 10.1038/ncomms6853.

56. Hartmann G. *Nucleic Acid Immunity // Advances in Immunology* — 2017. — Vol. 133, Chapter 4. — P. 121–69. — doi: 10.1016/bs.ai.2016.11.001.
57. *cfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner / A. Paunel-Görgülü, M. Wacker, M. El Aita [et al.] // Scientific Reports.* — 2017. — Vol. 7 — 17421. — doi:10.1038/s41598-017-17561-1
58. *Correlation of Surface Toll-Like Receptor 9 Expression with IL-17 Production in Neutrophils during Septic Peritonitis in Mice Induced by E. coli / Y. Ren, L. Hua, X. Meng [et al.] // Mediators of Inflammation.* — 2016. — Vol. 2016. — P. 1–17. — doi: 10.1155/2016/3296307.
59. *The myocardial infarct-exacerbating effect of cell-free DNA is mediated by the high-mobility group box 1 receptor for advanced glycation end product Toll-like receptor 9 pathway / Y. Tian, E. J. Charles, Z. Yan [et al.] // J of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* — 2019. — Vol. 157, № 6. — P. 2256–69.
60. *Systemic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans / A.J. Van der Meer, A. Kroeze, A. Hoogendijk [et al.] // Blood Adv.* — 2019. — Vol. 3, № 5. — P. 724–28. — doi: 10.1182/bloodadvances.2018018895.
61. *Structural requirements for the procoagulant activity of nucleic acids / J. Gansler, M. Jaax, S. Leiting [et al.] // PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, № 11. — e50399. — doi: 10.1371/journal.pone.0050399.
62. *Coagulation Factor XI and Factor XII in DNA-Induced Thrombin Generation / A. Matafonov, I.S. Ivanov, M. Sun [et al.] // Blood.* — 2014. — Vol. 124, № 21. — P. 581.
63. *Fuchs T.A., Bhandari A.A., Wagner D.D. Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice // Blood.* — 2011. — Vol. 118. — P. 3708–14.
64. *Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms / T.J. Gould, T.T. Vu, L.L. Swystun [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol.* — 2014. — Vol. 34, № 9. — P. 1977–84.
65. *Activated protein C inhibits neutrophil extracellular trap formation in vitro and activation in vivo / L.D. Healy, C. Puy, J.A. Fernández [et al.] // J Biol Chem.* — 2017. — Vol. 292, № 21. — P. 8616–29.
66. *Colocalization of neutrophils, extracellular DNA and coagulation factors during NETosis: Development and utility of an immunofluorescence-based microscopy platform / L.D. Healy, C. Puy, A. Itakura [et al.] // J Immunol Methods.* — 2016. — Vol. 435. — P. 77–84.
67. *Komissarov A. A., Florova G., Idell S. Effects of extracellular DNA on plasminogen activation and fibrinolysis // J Biolumin Chemilumin.* — 2011. — Vol. 286. — P. 41949–62.
68. *In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps / D.F. Noubououssie, M.F. Whelihan, Y.B. Yu [et al.] // Blood.* — 2017. — Vol. 129, № 8. — P. 1021–29.
69. *Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve / C.J. Jung, C.Y. Yeh, C.T. Shun [et al.] // J Infect Dis.* — 2012. — Vol. 205. — P. 1066–75.
70. *Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Capture Bacteria from the Bloodstream during Sepsis / B. McDonald, R. Urrutia, B.G. Yipp [et al.] // Cell Host Microbe.* — 2012. — Vol. 12. — P. 324–33.
71. *Effect of cell-free DNA of patients with cardiomyopathy and rDNA on the frequency of contraction of electrically paced neonatal rat ventricular myocytes in culture / N. Bulicheva, O. Fidelina, N. Mkrtumova [et al.] // Ann N Y Acad Sci.* — 2008. — Vol. 1137. — P. 273–7.
72. *Gahan P. Circulating Nucleic Acids in Early Diagnosis, Prognosis and Treatment Monitoring // Netherlands: Springer, eBook, 2015. — Chapter 2. — P. 30.*
73. *The Time Course of Markers of Neutrophil Extracellular Traps in Patients Undergoing Revascularisation for Acute Myocardial Infarction or Stable Angina Pectoris / R. Helseth, S. Solheim, H. Arnesen [et al.] // Mediators of Inflammation.* — Vol. 2016. — P. 1–8. — doi: 10.1155/2016/2182358.
74. *Monitoring liver damage using hepatocyte-specific methylation markers in cell-free circulating DNA R.L. Werman, J. Magenheimer, J. Moss [et al.] // JCI Insight.* — 2018. — Vol. 3, № 1. — e120687. — doi: 10.1172/jci.insight.120687.
75. *Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study / E. Schütz, A. Fischer, J. Beck [et al.] // PLoS Med.* — 2017. — Vol. 14, № 4. — e1002286. — doi:10.1371/journal.pmed.1002286.
76. *Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: a transplantation model / Y.W. Zheng, K.C. Chan, H. Sun [et al.] // Clin Chem.* — 2012. — Vol. 58, № 3. — P. 549–58.
77. *Circulating cell-free DNA is a predictor of short-term neurological outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis / A. Bustamante, F. Mancha, H. C. Macher [et al.] // J of Circulating Biomarkers.* — 2016. — Vol. 5. — P. 1–6. — doi: 10.1177/1849454416668791.
78. *Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients / E.S. Ershova, E.M. Jestkova, I.V. Chestkov, [et al.] // Journal of Psychiatric Research.* — 2017. — Vol. 87. — P. 15–22.
79. *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy / S.A. Leon, B. Shapiro, D.M. Sklaroff [et al.] // Cancer Res.* — 1977. — Vol. 37, № 3. — P. 646–50.
80. *Cell-free DNA as a biomarker of breast cancer / R.H. El Edal, A.S. El Gamaal, H.H. El Said [et al.] // Menoufia Med J.* — 2018. — Vol. 31, № 2. — P. 569–74.
81. *Duffy M. J., McDermott E. W., Crown J. From proteins to circulating tumor cells to circulating tumor DNA // Tumor Biology.* — 2018. — Vol. 40, № 5. — doi: 10.1177/1010428318776169.
82. *Gedvilaitė V., Schweigert D., Cicėnas S. Cell-free DNA in non-small cell lung cancer // Acta Med Litu.* — 2017. — Vol. 24, № 2. — P. 138–44.
83. *Plasma cell-free DNA and survival in non-small-cell lung cancer: A meta-analysis / Z. Yi, B. Liu, X. Guan [et al.] // Mol Clin Oncol.* — 2017. — Vol. 7, № 2. — P. 167–72.
84. *Huynh K., Hoon D.S.B. Liquid Biopsies for Assessing Metastatic Melanoma Progression // Crit Rev Oncog.* — 2016. — Vol. 21, № 1-2. — P. 141–54.
85. *Sensitivity of plasma BRAF mutant and NRAS mutant cell-free DNA assays to detect metastatic melanoma in patients with low RECIST scores and non-RECIST disease progression / G.A. Chang, J.S. Tadepalli, Y. Shao [et al.] // Mol Oncol.* — 2016. — Vol. 10, № 1. — P. 157–65.
86. *The characteristics of ctDNA reveal the high complexity in matching the corresponding tumor tissues / Y. Nong, L. Yi, L. Zhidong [et al.] // BMC Cancer.* — 2018. — Vol. 18. — 319. — doi: 10.1186/s12885-018-4199-7.
87. *Methylation of the RASSF1A and RAR α genes as a candidate biomarker for lung cancer / W. Li, J. Deng, P. Jiang [et al.] // Exp. Ther. Med.* — 2012. — Vol. 3. — P. 1067–71.
88. *Novel Methylation Biomarker Panel for the Early Detection of Pancreatic Cancer / J.M. Yi, A.A. Guzzetta, V.J. Bailey [et al.] // Clin Cancer Res.* — 2013. — Vol. 19, № 23. — P. 6544–55.

89. *Serum DNA Hypermethylation in Patients with Bladder Cancer: Results of a Prospective Multicenter Study / S. Hauser, M. Kogej, G. Fechner [et al.] // Anticancer Research March. — 2013. — Vol. 33, № 3. — P. 779–84.*
90. *Serum DNA Hypermethylation in Patients with Kidney Cancer: Results of a Prospective Study / S. Hauser, T. Zahalka, G. Fechner [et al.] // Anticancer Research. — 2013. — Vol. 33, № 10. — P. 4651–56.*
91. *Epigenetic markers in circulating cell-free DNA as prognostic markers for survival of castration-resistant prostate cancer patients / R.J. Hendriks, S. Dijkstra, F.P. Smit [et al.] // The Prostate. — 2018. — Vol. 78, № 5. — P. 336–42.*
92. *Emerging Utility of Urinary Cell-free Nucleic Acid Biomarkers for Prostate, Bladder, and Renal Cancers / S.Y. Lina, J.A. Linehan, T.G. Wilson [et al.] // European Urology Focus. — 2017. — Vol. 3, № 2-3. — P. 265–72.*
93. *Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes / I. Mittra, N.K. Khare, G.V. Raghuram [et al.] // J Biosci. — 2015. — Vol. 40. — P. 91–111.*
94. *Transfer of malignant trait to immortalized human cells following exposure to human cancer serum / M. Abdouh, S. Zhou, V. Arena [et al.] // J Exp Clin Cancer Res. — 2014. — Vol. 33, № 86. — doi:10.1186/s13046-014-0086-5.*
95. *Mader S., Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives // Oncol Res Treat. — 2017. — doi: 10.1159/000478018.*
96. *Nucleic acid scavenging microfiber mesh inhibits trauma-induced inflammation and thrombosis / J. Lee, J.G. Jackman, J. Kwun [et al.] // Biomaterials. — 2017. — Vol. 120. — P. 94–102.*
97. *Role of the acidic tail of high mobility group protein B1 (HMGB1) in protein stability and DNA bending / F.S. Belgrano, I.C. de Abreu da Silva, F.M. Bastos de Oliveira [et al.] // R PLoS One. — 2013. — Vol. 8, № 11. — e79572. — doi: 10.1371/journal.pone.0079572.*

СВОБОДНАЯ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Ю.А. Гордиенко, А.И. Шевцова

ГУ «Днепропетровская медицинская академия
МЗ Украины», г. Днепр

Кафедра биохимии и медицинской химии

В статье представлен обзор современных данных о происхождении, источниках, метаболизме и биологической роли внеклеточной, или свободной ДНК (свДНК), в плазме крови человека в условиях физиологической нормы и при патологических состояниях. Особое внимание уделено обсуждению диагностической значимости этого показателя в прогнозировании и мониторинге воспалительных процессов, нарушений гемостаза, онкологических, сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний, а также рассмотрены перспективы разработки новых фармакологических препаратов, направленных на коррекцию уровня свДНК в крови.

Ключевые слова: свободная ДНК, гемопоэз, нетоз, апоптоз, свертывание крови, патологические состояния.

CELL FREE DNA IN BLOOD PLASMA IN NORM AND PATHOLOGY

Y.A. Hordiienko, A.I. Shevtsova

SI «Dnipropetrovsk Medical Academy
of the Ministry of Health of Ukraine», Dnipro
Department of Biochemistry and Medical Chemistry

The article presents an overview of current data on the origin, sources, metabolism and biological role of extracel-

lular or cell free DNA (cfDNA) in human blood plasma under physiological conditions and in pathology. Special attention has been paid to the discussion according its diagnostic significance in the prediction and monitoring of inflammatory processes, hemostasis disorders, cancer, cardiovascular and neurological diseases, as well as perspective of the development of new pharmacological drugs aimed at correcting the cfDNA level.

Key words: cell free DNA, hematopoiesis, netosis, apoptosis, blood coagulation, pathology.

УДК 615.015.2:615.256.3:616-005.6-07-036.8

А.А. Мельник

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННЫХ ОРАЛЬНЫХ КОНТРАЦЕПТИВОВ И РИСК ТРОМБОЗОВ

Специализированный медицинский центр
«Оптима-фарм»

Более 150 миллионов женщин в мире применяют гормональную контрацепцию [23]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), одним из самых распространенных способов контроля рождаемости является прием комбинированных оральных контрацептивов (КОК). Использование КОК составляет значительную их долю, особенно в высокоразвитых странах. В некоторых странах более 80% женщин используют гормональные контрацептивы в течение репродуктивной жизни. На сегодняшний день препараты, содержащие синтетические аналоги половых стероидов, во всем мире считаются самыми эффективными и популярными методами предохранения от нежелательной беременности [3]. Кроме того, они оказывают существенное положительное влияние как на репродуктивное здоровье женщины, так и на здоровье общества в целом [11]. Крупнейшие и авторитетные мировые историки сошлись во мнении, что ни теория относительности, ни ядерная бомба, ни даже Интернет не оказали на общество XX века такого влияния как контрацептивная таблетка.

Существуют две группы женских половых гормонов, отличающихся как по своей химической структуре, так и по биологической функции: эстрогены (главный представитель — эстрадиол) и прогестины (главный представитель — прогестерон). Секретция эстрогенов и прогестерона