

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В КАЧЕСТВЕ ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ

М. Л. Филипенко^{1,2} ✉

¹ Лаборатория фармакогеномики, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Внеклеточная ДНК (вкДНК) была обнаружена в плазме крови человека в середине прошлого века, однако ее диагностический потенциал стали по-настоящему активно изучать лишь в последние несколько десятилетий в связи с накоплением данных о геноме и эпигеноме клетки человека в норме и при различных патологиях и бурным развитием методов анализа ДНК и ее модификаций. Использование вкДНК для диагностики заболеваний принято называть жидкостной биопсией. В настоящем обзоре рассматриваются история открытия вкДНК, современные представления об источниках вкДНК в организме и перспективные направления применения анализа вкДНК в медицине. В частности, чаще всего жидкостную биопсию используют в онкологии, но метод актуален и для таких направлений, как пренатальная диагностика, прогноз отторжения имплантатов органов и прогноз сепсиса.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, вкДНК, циркулирующая ДНК, жидкостная биопсия, онкология, фетальная ДНК, пренатальная диагностика

Финансирование: статья подготовлена в рамках базового проекта Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2017–2020 гг. Тема № VI.62.2.2 «Развитие методов персонализированной медицины» (0309-2016-0007).

✉ **Для корреспонденции:** Филипенко Максим Леонидович
Пр-т Ак. Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090; max@niboch.nsc.ru

Статья получена: 25.08.2017 **Статья принята к печати:** 30.08.2017

DIAGNOSTIC POTENTIAL OF CELL-FREE DNA AS A LIQUID BIOPSY MARKER

Filipenko ML^{1,2} ✉

¹ Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Cell-free DNA (cfDNA) was discovered in human blood plasma as early as the middle of the 20th century, but it was not until a few decades ago that knowledge of human genome and epigenome in health and pathology became sufficient and methods of nucleic acid analysis became more advanced to encourage active research of the diagnostic potential of cfDNA. The use of cfDNA as a diagnostic biomarker is conventionally referred to as liquid biopsy. The following review tells a story of cfDNA discovery, summarizes contemporary views on cfDNA sources inside the body and touches upon possible prognostic and diagnostic applications of cfDNA analysis in medicine, specifically in cancer and prenatal screening, prediction of implant failure and sepsis development.

Keywords: cell-free DNA, cfDNA, circulating DNA, liquid biopsy, cancer screening, fetal DNA, prenatal screening

Funding: this review was supported by the state-funded project for basic research (2017-2020) *Development of methods of personalized medicine* (VI.62.2.2, 0309-2016-0007).

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim Filipenko
Prospekt Akademika Lavrentieva, d. 8, Novosibirsk, Russia, 630090; max@niboch.nsc.ru

Received: 25.08.2017 **Accepted:** 30.08.2017

Жидкостной биопсией можно назвать уже давно используемые в клинической практике методы исследования онкомаркеров в плазме крови, измерения активности ферментов, синтезируемых печенью, определения количества гормонов щитовидной железы и т. д. Однако термин «жидкостная биопсия» приобрел новый смысл в связи с предположением, что нуклеиновые кислоты специализированных клеток организма, в том числе опухолей и плода, могут попадать в биологические жидкости, могут быть из них выделены и использованы для получения диагностической информации о клетках, в которых они возникли.

Учитывая стремительное развитие методов анализа ДНК и ее модификаций, а также накопление значительных данных о структуре генома и эпигенома клетки человека в норме и при патологиях, анализ ДНК, попадающей в системную циркуляцию (внеклеточной ДНК, или вкДНК), может иметь огромный диагностический потенциал. Именно анализ вкДНК в настоящее время принято называть жидкостной биопсией.

Хотя авторам известно, что различные типы РНК также несут важную информацию и могут анализироваться наравне с ДНК, предметом обзора является вкДНК.

Исследование вкДНК: исторические вехи

Впервые внеклеточная ДНК была обнаружена в плазме периферической крови человека Mandel и Métais в 1948 г. [1], однако эта работа практически не была замечена научным сообществом. До 1970-х гг. большинство исследований, связанных с изучением вкДНК, были посвящены ее присутствию в сыворотке крови пациентов с системной красной волчанкой и ревматоидным артритом [2–4]. Были усовершенствованы методы измерения количества вкДНК за счет применения естественных аутоантител к разным формам ДНК от пациентов с системной красной волчанкой.

В 1977 г. Stroun и соавт. предложили ставшие классическими определения внеклеточной и циркулирующей ДНК [5]. В том же году Leon и соавт. предложили радиоиммуноанализ в качестве метода для количественного определения вкДНК: меченую ДНК использовали в качестве антигена, а источником антител являлась сыворотка крови пациентов с системной красной волчанкой [6]. Сыворотка крови 93 % условно здоровых людей, принявших участие в исследовании, содержала вкДНК на уровне 0–50 нг/мл, и это значение показателя было принято за норму (данные, полученные современными методами, подтверждают обоснованность такого подхода). Содержание вкДНК в сыворотке крови половины пациентов с онкологическими заболеваниями (экспериментальная группа) было значительно выше — 50–5000 нг/мл. После лучевой терапии содержание вкДНК снижалось у 66–90 % пациентов с лимфомой, раком легких, яичников, матки и цервикального канала и у 16–33 % пациентов с глиомами, опухолями молочной железы, толстой и прямой кишки. Если содержание вкДНК возрастало или оставалось неизменным, одновременно не наблюдали ответа на терапию. В дальнейшем присутствие опухолевой вкДНК в кровотоке было подтверждено детекцией опухоль-специфических мутаций, микросателлитной нестабильности и метилирования [7–9].

Конец XX в. ознаменовался появлением универсального и хорошо воспроизводимого метода для измерения количества вкДНК — количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в «реальном времени» [10, 11]. Этот метод позволил не только определять количество вкДНК, но и устанавливать соотношение ее фракций, различающихся по размеру фрагментов вкДНК [12]. Наконец, новая эра в области исследования вкДНК началась с использованием высокопроизводительного секвенирования, позволяющего проводить полногеномный анализ специфичности и количества вкДНК [13, 14].

Как нуклеиновые кислоты попадают в системную циркуляцию?

В своем пионерском исследовании Leon и соавт. пришли к выводу, что, так как только у половины пациентов с онкологическими заболеваниями было отмечено повышенное содержание вкДНК в плазме крови, а у другой половины показатель был в норме, источником вкДНК в крови является не только опухоль. Недавние данные свидетельствуют о том, что в первые часы и дни после цитотоксического лечения обнаруживается увеличение количества свободной ДНК в клетках, которая затем исчезает в течение недели. Кроме того, при патологиях, связанных с повышенной гибелью клеток или разрушением тканей, таких как гепатит, сепсис и травма, растет содержание вкДНК в плазме крови. Эти факты свидетельствуют в пользу того, что некроз, апоптоз и, возможно, другие типы клеточной смерти дей-

ствительно значимо влияют на содержание нуклеиновых кислот в плазме крови в том числе больных раком. Вероятно, механизмы высвобождения нуклеиновых кислот из клетки могут различаться для разных типов рака. Тем не менее в 1989 г. Stroun и соавт. предположили, что вкДНК у пациентов с онкологическими заболеваниями попадает в кровь в первую очередь из их опухолевых клеток [15], и обоснованность этого предположения была подтверждена обнаружением онкогенных мутаций в вкДНК, выделенной из плазмы крови пациентов с лейкемией [16] и раком поджелудочной железы [7].

Исследования фетальной вкДНК показали, что ее период полураспада составляет 16,3 мин [17]. Это значение было распространено на все типы вкДНК, и справедливость такого подхода была подтверждена в экспериментах на животных с инъекциями ДНК в кровотоки [18]. При электрофоретическом анализе также было обнаружено, что вкДНК фрагментирована и имеет профиль, сходный с профилем ДНК из апоптотических клеток, но, кроме того, представлена небольшим количеством высокомолекулярных фрагментов [19]. Их присутствие Jahr и соавт. связали с некрозом опухолевых клеток. Правда, последнее утверждение недавно было подвергнуто серьезным сомнениям: Diehl и соавт. при анализе вкДНК, полученной от пациентов с онкопатологиями, показали, что высокомолекулярные фрагменты ДНК не содержат опухолеспецифических мутаций, которые, напротив, часто обнаруживаются в коротких (менее 200 п. н.) фрагментах вкДНК [20]. Авторы предположили, что высокомолекулярная вкДНК, вероятно, является производной фагоцитированных некротических клеток.

Несмотря на общее мнение, что некроз обуславливает появление в крови высокомолекулярной вкДНК, этот тип клеточной гибели также приводит к продукции значительного количества ДНК в нуклеосомной упаковке с характерным размером [21, 22]. Обычно освобождение нуклеосом происходит через 24–48 ч после индукции апоптоза или 12 ч — после морфологических проявлений этого процесса [23]. Хотя в норме большая часть попадающих в циркуляцию нуклеосом эффективно удаляется клетками печени, некоторое их количество обнаруживается в крови и других биологических жидкостях. В частности, при повышенной гибели клеток в случае дегенеративных, аутоиммунных, воспалительных, ишемических, травматических и токсин-опосредованных заболеваний или при наличии злокачественных опухолей, когда системы элиминации перегружены или повреждены, количество нуклеосом в крови может повышаться. Таким образом, циркулирующие нуклеосомы могут быть продуктом клеток, погибших в результате апоптоза или некроза или при комбинации форм клеточной гибели — в зависимости от типа и интенсивности стимулов и энергетического состояния клеток.

Другим источником вкДНК в системной циркуляции является высокомолекулярная ДНК нейтрофилов. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs) образуются активированными нейтрофилами в процессе нетоза [24]: во внеклеточное пространство высвобождается ядерный материал, включающий молекулы ДНК, цитруллинизированные гистоны и ферменты гранул нейтрофилов, такие как эластаза. Эти компоненты формируют сети, которые способны не только физически захватывать бактерии, но и обеспечивать повышенную концентрацию бактерицидных компонентов. В последние годы стало ясно, что NETs также могут образовываться в стерильных условиях при различных провоспалительных

состояниях — тромбозе, раке, системной красной волчанке, атеросклерозе и диабете. Нетоз может также быть стимулирован хемокинами, например интерлейкином 8 (CXCL8) [25, 26], факторами роста, например гранулоцитарно-колониестимулирующим фактором (G-CSF) [27] и трансформирующим фактором роста-β. В зависимости от микроокружения в опухоли экспрессия вышеперечисленных факторов может быть повышена, тем самым обеспечивая связь между раком и нетозом. И наоборот, многие компоненты NETs могут стимулировать рост опухоли, способствовать ангиогенезу, метастазированию или усиливать образование опухоль-индуцированных тромбозомболий [28].

Потенциально вкДНК также может активно секретироваться в составе экзосом. Этот вероятный механизм подробно рассмотрен в работах Peters и Reclusa [29, 30].

Наконец, еще одним путем возникновения вкДНК является активная метаболическая секреция [31–33]. При этом процессе вкДНК образует комплекс с гликолипопротеинами и РНК. Аусатр и соавт. на модели клеточных линий в культуре *in vitro* показали, что существует статистически значимая корреляция между интенсивностью гликолиза и высвобождения вкДНК. Фрагменты вкДНК имели длину приблизительно 2 000 п. н., что исключало апоптотическое или некротическое происхождение. К настоящему времени механизмы и вклад активной секреции в общий пул вкДНК изучены недостаточно.

Использование вкДНК для диагностики патологий

Пrenатальная диагностика

После обнаружения вкДНК плода, циркулирующей в плазме крови матери [34], было предложено использовать ее для выявления анеуплоидий плода в рамках неинвазивно-

го пренатального тестирования (noninvasive prenatal testing, NIPT). Фетальная вкДНК появляется в материнской крови уже к 5–7 неделе беременности [35]. В первом триместре приблизительно 10 % от ее общего количества образуется из клеток трофобласта при их апоптозе. Было показано, что методы высокопроизводительного секвенирования достаточно точны для клинической диагностики [36]. В результате возник ряд компаний (Natera, Verinata, Sequenom и др.), предлагающих услугу NIPT. Анализ фетальной вкДНК в плазме крови матери также активно применяется для ранней диагностики моногенных заболеваний [37, 38]. Общая схема исследований с использованием ДНК плода представлена на рис. 1.

Внеклеточная ДНК может быть обнаружена и в фолликулярной жидкости. Ее количественная оценка может использоваться для прогностической оценки качества эмбриона и эффективности экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [39]. Shamonki и соавт. также показали присутствие ДНК эмбриона в культуральной среде в концентрации 2–642 нг/мкл (в исследовании было проанализировано 55 образцов) [40]. Авторы установили корреляцию между результатами преимплантационного генетического скрининга методом биопсии трофобласта и методом анализа вкДНК культуральной среды. При дополнительной валидации метод может упростить скрининг эмбрионов и повысить эффективность ЭКО.

Пересадка органов

Другой важной областью клинического применения анализа вкДНК является мониторинг эффективности трансплантации органов. В основе подхода лежит предположение о том, что клетки трансплантата при отторжении будут гибнуть, а их ДНК — появляться в составе вкДНК крови реципиента.

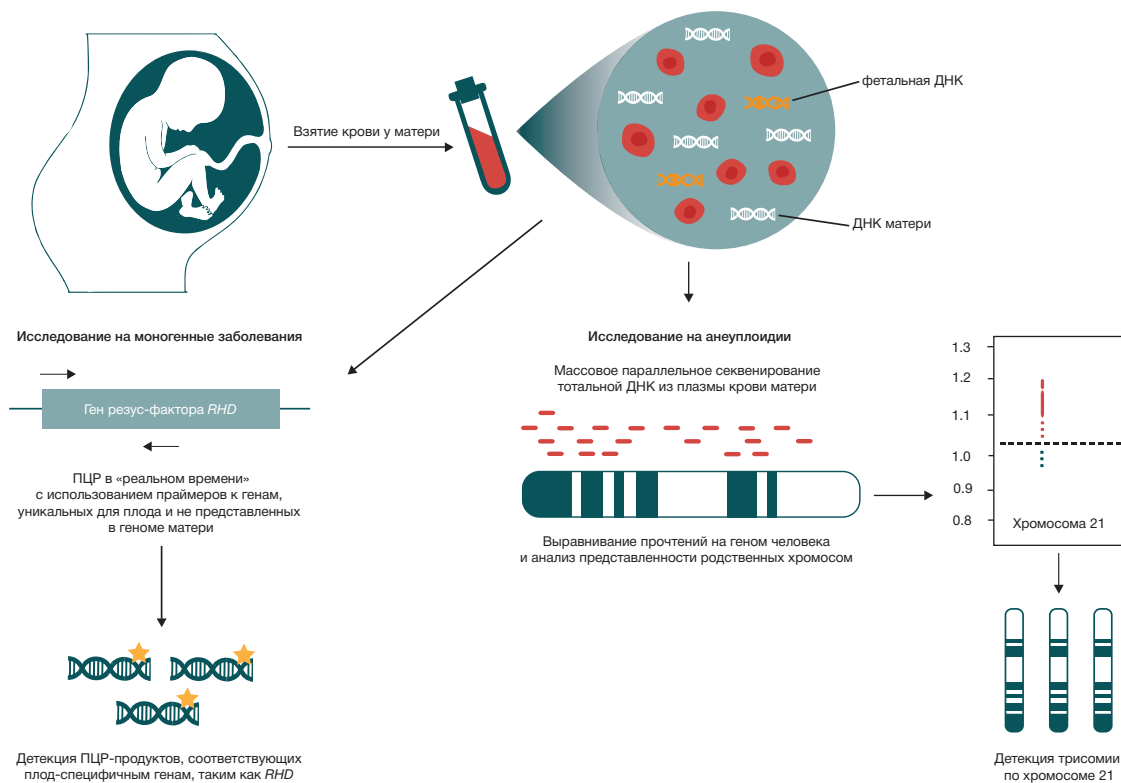


Рис. 1. В плазме крови беременной женщины содержится ДНК плода, которая может быть использована в неинвазивной пренатальной диагностике для выявления анеуплоидий или моногенных заболеваний у плода

Показатель выживаемости пациентов после пересадки легкого является одним из самых низких в сравнении с использованием трансплантатов других органов: существующие диагностические тесты часто не позволяют отличить инфекцию от отторжения. В работе De Vlamincx и соавт. показано, что уровень вкДНК донора в крови реципиента коррелирует с результатами инвазивных тестов на отторжение (AUC = 0,9). Более того, анализ вкДНК помогает выявлять такие инфекционные агенты, как цитомегаловирус, вирусы герпеса человека HHV6 и HHV7 и аденовирус, которые часто не удается обнаружить клинически, но которые присутствуют с высокой частотой в организме пациентов, перенесших пересадку легкого [41].

Vloom и соавт. при пересадке почки установили взаимосвязь между количеством вкДНК доноров в плазме крови реципиентов трансплантатов, определяемым методом таргетного высокопроизводительного секвенирования, и статусом отторжения, установленным морфологически [42]. Авторы установили диагностические интервалы содержания вкДНК донора: менее 1 % от общего количества вкДНК — отсутствие активного отторжения, более 1 % — вероятность активного отторжения. Компания CareDx Clinical Laboratory уже предлагает тест AlloSure dd-cfDNA для клинической диагностики острого отторжения трансплантата почки.

Прогноз сепсиса

Сепсис, системная воспалительная реакция на инфекцию, возникающую в результате распространения патогена по организму из первичного очага путем попадания в кровоток, — распространенная причина смерти. Прогноз развития данного состояния у больных с травмой или после хирургических вмешательств затруднен, поиск и введение в клиническую практику новых биомаркеров необходимы для снижения уровня летальности.

Одна из форм врожденного иммунитета — реакция организма на нарушение стерильности крови в виде выбрасывания нейтрофилами внеклеточных ловушек. Как уже было сказано, NETs состоят из высокомолекулярной вкДНК, ассоциированной с гистонами, протеазами и некоторыми другими белками. В проспективном пилотном исследовании с 45 пациентами с множественной травмой (впоследствии 8 пациентов были исключены из исследования) первоначальное высокое содержание в плазме крови вкДНК/NETs (> 800 нг/мл) с его возвратным повы-

шением на 5–9 день было ассоциировано с последующим сепсисом, множественной недостаточностью органов и смертью [43]. В отличие от этого изменения в содержании С-реактивного белка у пациентов с развитием сепсиса и пациентов без развития сепсиса значимо не различались. Дальнейшая клиническая валидация должна определить прогностическую ценность определения вкДНК/NETs.

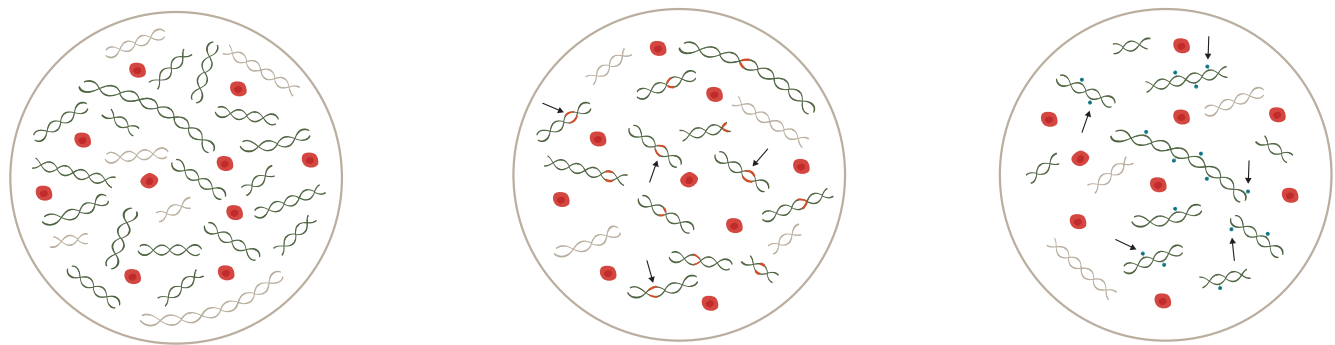
Недавнее исследование Hamaguchi и соавт. на мышах также показало, что содержание вкДНК повышается уже на ранней стадии септического состояния, что позволяет использовать вкДНК как биомаркер для раннего выявления сепсиса [44]. В отличие от коллег авторы выяснили, что вкДНК имела отличное от вкДНК нейтрофилов происхождение, и предположили, что основным ее источником могут являться некротические клетки. Эта гипотеза может изменить патофизиологическую концепцию образования вкДНК при сепсисе, но для ее подтверждения необходимы дальнейшие исследования.

Онкология

Возникновение и прогрессия опухоли связаны с накоплением соматических мутаций. Анализ соматических изменений генома опухолевых клеток все чаще используется в диагностических, прогностических и лечебных целях. Генетический профиль солидных опухолей в настоящее время определяют исследованием ДНК, получаемой из хирургических образцов или биоптатов, но такой анализ нельзя выполнять регулярно из-за его инвазивного характера. К тому же информация, получаемая из одного биоптата (ограниченный в пространственном и временном отношении срез опухоли), может не отражать гетерогенности и эволюции новообразования. В противоположность этому вкДНК опухоли, изолированная из плазмы крови или мочи, может содержать данные о генетических особенностях как первичной опухоли, так и метастазов, а также может помочь проследить геномную эволюцию опухоли. Только за последние три года опубликовано более тысячи работ, посвященных различным аспектам исследования вкДНК пациентов с разными типами рака. Возможности использования вкДНК для диагностики онкологических заболеваний развернуто описаны в работах [45–47].

Существует три направления диагностического использования вкДНК в онкологии (рис. 2).

Первое — измерение количества вкДНК или опухолевой вкДНК в крови пациента для диагностики или



Измерение количества вкДНК для определения и мониторинга опухолевой нагрузки на организм пациента

Поиск драйверных соматических мутаций в вкДНК для выбора терапии и диагностики онкопатологий

Анализ эпигенетических модификаций вкДНК для ранней неинвазивной диагностики онкопатологий

Рис. 2. Ключевые направления использования жидкостной биопсии с анализом внеклеточной ДНК в онкологии

мониторинга опухолевой нагрузки. Несмотря на большое число исследований, в которых было показано повышение содержания вкДНК в крови пациентов с онкологическими заболеваниями, этот подход до сих пор не используется в клинической практике в качестве рутинного. Возможно, это обусловлено отсутствием стандартизации методов выделения и определения количества вкДНК, с одной стороны, и невысокой специфичностью метода для онкопатологий в сравнении с другими заболеваниями, в том числе описанными выше, — с другой. Однако, как это еще в 1977 г. было показано Leon и соавт., вкДНК является перспективным маркером опухолевой нагрузки из-за короткого периода полувыведения из организма [6]. Многие белковые маркеры опухолей, используемые в настоящее время для оценки ответа на лечение в клинической практике (например, PSA, CA125, CEA, α FP), длительное время присутствуют в системной циркуляции — до нескольких дней [48], тогда как период полувыведения вкДНК составляет не более нескольких часов [49, 50]. При этом детекция соматических мутаций и эпигенетических модификаций при определении количества опухолевой вкДНК может увеличивать диагностическую ценность метода [51–53]. Применение таргетного высокопроизводительного секвенирования для определения опухолевой фракции в вкДНК после хирургической резекции колоректальных опухолей позволило с высокой точностью спрогнозировать рецидив заболевания (HR = 18; 95 % CI 7,9–40,0; $p < 0.001$) [54].

Работа Tie и соавт. [54] также показательна как пример второго направления диагностического использования вкДНК в онкологии — выявления драйверных соматических мутаций в вкДНК для выбора таргетной терапии, а также в качестве скрининга для обнаружения онкологических заболеваний. Недавнее исследование Bettgowda и соавт. показало, что у пациентов с локализованными опухолями опухолевая вкДНК обнаруживается у 73, 57, 48 и 50 % пациентов с колоректальным раком, гастроэзофагеальным раком, раком поджелудочной железы и аденокарциномой молочной железы соответственно [55]. Было также показано, что опухолевая вкДНК обнаруживается у более чем 75 % пациентов с метастатическими злокачественными новообразованиями поджелудочной железы, яичников, толстого кишечника, мочевого пузыря, молочной железы, кожи и печени. Дальнейшее совершенствование метода может повысить его точность, а приемлемая стоимость исследования — сделать привлекательным для использования в клинической практике.

Третьим направлением является анализ в вкДНК эпигенетических модификаций, специфичных для опухолей. В 2016 г. была опубликована работа Margolin и соавт. [56], в которой был описан высококонсервативный профиль гиперметилирования гена *ZNF154* в вкДНК, характерный для разных типов рака. Такой биомаркер пан-рака, если он будет в дальнейшем валидирован, может представлять собой значимый диагностический инструмент. В 2016 г. также была представлена пионерская работа Lehmann-Werman и соавт., в которой было показано, что суммарный профиль метилирования вкДНК плазмы крови человека, полученный с помощью высокопроизводительного секвенирования, может быть программно распределен по фракциям ДНК, соответствующим специализированным клеткам человека [57]. Таким образом, с помощью такого анализа и при наличии возрастных и других норм содержания ДНК специфических органов в суммарной вкДНК плазмы крови может быть определен орган (тип клеток человека), который подвержен патологическому процессу и продуцирует

большее количество специфичной вкДНК. Данный метод перспективен для проведения неинвазивной ранней диагностики рака и может быть учтен при разработке таргетных панелей для высокопроизводительного секвенирования с целью уменьшения стоимости исследования.

Еще одной эпигенетической модификацией может быть позиционирование нуклеосом, которое влияет на структуру образующихся при апоптозе фрагментов вкДНК. Специфика фрагментации вкДНК была показана в ряде работ. В 2016 г. Snyder и соавт. сообщили, что тотальное секвенирование вкДНК позволяет определить позиции нуклеосом и транскрипционных факторов, специфичные для типов клеток [58]. Авторы показали, что профиль вкДНК условно здоровых доноров наиболее близок лимфоидным и миелоидным клеткам. В то же время секвенирование вкДНК плазмы крови пациентов с различными типами рака позволило достаточно точно соотнести их с профилями 76 клеточных линий соответствующего происхождения. Исследователи предполагают, что их подход может применяться для выявления острого или же хронического патологического состояния органов/типов клеток организма человека.

Несмотря на исключительную важность неинвазивной диагностики для снижения смертности от онкологических заболеваний, только один тест был зарегистрирован в Food and Drug Administration в США в 2016 г. Это cobas EGFR Mutation Test v2 (Roche Molecular Systems, США) для диагностики соматических активирующих мутаций гена *EGFR* в плазме крови.

Анализ вкДНК в клинической практике также позволяет фиксировать интересные диагностические случаи. Например, в работе Smith и соавт. были получены дискордантные результаты между данными анализа вкДНК и последующего диагностического карiotипирования клеток плода [59]. В дальнейшем у пациентки была обнаружена колоректальная аденокарцинома. Авторы подчеркивают необходимость более тщательного рассмотрения аномальных результатов анализа вкДНК и использования мультидисциплинарного клинического подхода.

Другие применения

Повышенная концентрация вкДНК в плазме и сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями, в особенности пациентов с системной красной волчанкой, была показана неоднократно [4, 60, 61]. Несмотря на это, пока нет однозначных рекомендаций для использования определения количества вкДНК у таких пациентов в клинических целях.

Ershova и соавт. [62] исследовали концентрацию вкДНК и 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-oxodG) в вкДНК пациентов с острыми психическими расстройствами. Повышенный уровень содержания 8-oxodG был отмечен для вкДНК и лимфоцитов (индекс FL1-8-oxodG) пациентов. Учитывая, что отношение вкДНК/FL1-8-oxodG характеризует уровень апоптоза в поврежденных клетках, авторы делают вывод о том, что увеличение числа клеток с поврежденной ДНК в тканях организма пациента может влиять на этиологию острого психического расстройства.

Breitbach и соавт. предлагают использовать мониторинг за содержанием вкДНК в спортивной медицине [63]. Длительные упражнения на выносливость или регулярные тренировки с высокой интенсивностью могут вызывать хроническое воспаление, которое ведет к постоянному медленному высвобождению ДНК из клеток, что может

быть обусловлено апоптозом или некрозом. Таким образом, вкДНК может быть биомаркером перетренированности. Для валидации этой гипотезы требуются проспективные исследования, которые были бы проведены на максимально однородных группах спортсменов, получающих хорошо контролируемые физические нагрузки.

Хроническая обструктивная болезнь легких определяет заболеваемость и смертность пациентов с муковисцидозом, при котором в дыхательных путях отмечается непродуктивное нейтрофильное воспаление. После контакта с патогеном или после длительной активации нейтрофилы выделяют уже упомянутые внеклеточные нейтрофильные ловушки, содержащие большое количество ДНК. Считалось, что NETs участвуют в защите организма человека, обладая бактерицидными и фунгицидными свойствами. С другой стороны, чрезмерное их образование ассоциировано с патогенезом аутоиммунных заболеваний. Marcos и соавт. провели анализ вкДНК, представлявшей собой предположительно ДНК из NETs, и показали, что ее уровень положительно коррелирует с обструкцией дыхательных путей, колонизацией легких микроорганизмами и содержанием хемокинов у пациентов с муковисцидозом и у модельных мышей [64]. Таким образом, нейтрофильное воспаление в легких при муковисцидозе связано со значительным увеличением содержания вкДНК, характерным для нетоза, и может быть причиной дисфункции легких. Если данное предположение верно, то становятся возможными диагностика и лечение патологии с применением ДНКазы, антипротеазы и других ингибиторов нетоза.

Литература

- Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil. 1948 Feb; 142 (3-4): 241-3.
- Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. J Clin Invest. 1973 Jan; 52 (1): 198-204.
- Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. J Rheumatol. 1977 Summer; 4 (2): 139-43.
- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 1966 Nov; 45 (11): 1732-40.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB. Circulating nucleic acids in higher organisms. Int Rev Cytol. 1977; 51: 1-48.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 1977 Mar; 37 (3): 646-50.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1994 Jan-Feb; 3 (1): 67-71.
- Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. Clin Cancer Res. 2000 Mar; 6 (3): 1119-24.
- Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. Clin Cancer Res. 2005 Feb 1; 11 (3): 1219-25.
- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. Clin Chem. 1999 Feb; 45 (2): 184-8.
- Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. Obstet Gynecol. 2000 Dec; 96 (6): 991-6.
- Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. Cancer Res. 2003 Jul 15; 63 (14): 3966-8.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Huddings L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 21; 105 (42): 16266-71.
- Chu T, Bunce K, Hogge WA, Peters DG. Statistical model for whole genome sequencing and its application to minimally invasive diagnosis of fetal genetic disease. Bioinformatics. 2009 May 15; 25 (10): 1244-50.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. Oncology. 1989; 46 (5): 318-22.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. Br J Haematol. 1994 Apr; 86 (4): 774-9.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet. 1999 Jan; 64 (1): 218-24.
- Tsumita T, Iwanaga M. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. Nature. 1963 Jun 15; 198: 1088-9.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res. 2001 Feb 15; 61 (4): 1659-65.
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 8; 102 (45): 16368-73.
- Fairbairn DW, O'Neill KL. Necrotic DNA degradation mimics apoptotic nucleosomal fragmentation comet tail length. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1995 Mar; 31 (3): 171-3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес исследователей к внеклеточной ДНК растет во всем мире вследствие высокого потенциала жидкостной биопсии для использования в качестве метода неинвазивной диагностики и мониторинга таких заболеваний, как рак, инсульт, инфаркт миокарда, различные аутоиммунные нарушения, травмы и связанные с беременностью осложнения. Пока нет ясного понимания патофизиологических функций вкДНК: есть ли у нее постоянные биологические функции в клетке или организме? каковы молекулярные механизмы их реализации в норме и при патологии? Эти вопросы требуют ответов со стороны биологов, биоинформатиков, специалистов по эволюции человека и врачей-клиницистов. Кроме того, включение жидкостной биопсии в клиническую практику требует оптимизации технологий на всех этапах диагностического процесса.

22. Tran TT, Groben P, Pisetsky DS. The release of DNA into the plasma of mice following hepatic cell death by apoptosis and necrosis. *Biomarkers*. 2008 Mar; 13 (2): 184–200.
23. van Nieuwenhuijze AE, van Lopik T, Smeenk RJ, Aarden LA. Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2003 Jan; 62 (1): 10–4.
24. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5; 303 (5663): 1532–5.
25. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 2005 Nov; 66 (11): 1146–54.
26. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*. 2010 Jul 16; 584 (14): 3193–7.
27. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 7; 109 (32): 13076–81.
28. Erpenbeck L, Schön MP. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*. 2017 May 4; 36 (18): 2483–90.
29. Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — A new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta*. 2011 May 12; 412 (11–12): 806–11.
30. Reclusa P, Sireira R, Araujo A, Giallombardo M, Valentino A, Sorber L et al. Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora's box. *Transl Lung Cancer Res*. 2016 Oct; 5 (5): 483–91.
31. van der Vaart M, Pretorius PJ. The origin of circulating free DNA. *Clin Chem*. 2007 Dec; 53 (12): 2215.
32. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Aug; 1137: 7–17.
33. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Peters DL, Van Dyk HC, Van der Westhuizen FH, Pretorius PJ. Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Jul; 74 (14): 2689–707.
34. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997 Aug 16; 350 (9076): 485–7.
35. Rink BD, Norton ME. Screening for fetal aneuploidy. *Semin Perinatol*. 2016 Feb; 40 (1): 35–43.
36. Twiss P, Hill M, Daley R, Chitty LS. Non-invasive prenatal testing for Down syndrome. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014 Feb; 19 (1): 9–14.
37. Guissart C, Dubucs C, Raynal C, Girardet A, Tran Mau Them F et al. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) of cystic fibrosis: an optimized protocol using MEMO fluorescent PCR to detect the p.Phe508del mutation. *J Cyst Fibros*. 2017 Mar; 16 (2): 198–206.
38. De Franco E, Caswell R, Houghton JA, Iotova V, Hattersley AT, Ellard S. Analysis of cell-free fetal DNA for non-invasive prenatal diagnosis in a family with neonatal diabetes. *Diabet Med*. 2017 Apr; 34 (4): 582–5.
39. Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejou E et al. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod*. 2014 Dec; 29 (12): 2661–9.
40. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril*. 2016 Nov; 106 (6): 1312–8.
41. De Vlaminc I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Oct 27; 112 (43): 13336–41.
42. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Jul; 28 (7): 2221–32.
43. Margraf S, Lögters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock*. 2008 Oct; 30 (4): 352–8.
44. Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, Seki M, Yamamoto K, Oishi K et al. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 614518.
45. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker — a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov 11; 411 (21–22): 1611–24.
46. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Aug; 10 (8): 472–84.
47. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017 Apr; 17 (4): 223–38.
48. Bidart J-M, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N et al. Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem*. 1999 Oct; 45 (10): 1695–707.
49. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep; 14 (9): 985–90.
50. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res*. 2010 Oct; 38 (18): 6159–75.
51. Zhou J, Chang L, Guan Y, Yang L, Xia X, Cui L et al. Application of Circulating Tumor DNA as a Non-Invasive Tool for Monitoring the Progression of Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016 Jul 26; 11 (7): e0159708.
52. Takahashi H, Kagara N, Tanei T, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A et al. Correlation of Methylated Circulating Tumor DNA with Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer*. 2017 Feb; 17 (1): 61–69.
53. Visvanathan K, Fackler MS, Zhang Z, Lopez-Bujanda ZA, Jeter SC, Sokoll LJ et al. Monitoring of Serum DNA Methylation as an Early Independent Marker of Response and Survival in Metastatic Breast Cancer: TBCRC 005 Prospective Biomarker Study. *J Clin Oncol*. 2017 Mar; 35 (7): 751–8.
54. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016 Jul 6; 8 (346): 346ra92.
55. Bettgeowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19; 6 (224): 224ra24.
56. Margolin G, Petrykowska HM, Jameel N, Bell DW, Young AC, Elnitski L. Robust Detection of DNA Hypermethylation of ZNF154 as a Pan-Cancer Locus with in Silico Modeling for Blood-Based Diagnostic Development. *J Mol Diagn*. 2016 Mar; 18 (2): 283–98.
57. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 29; 113 (13): E1826–34.
58. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016 Jan 14; 164 (1–2): 57–68.
59. Smith J, Kean V, Bianchi DW, Feldman G, Petrucelli N, Simon M et al. Cell-free DNA results lead to unexpected diagnosis. *Clin Case Rep*. 2017 Jul 3; 5 (8): 1323–6.
60. Raptis L, Menard HA. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1980 Dec; 66 (6): 1391–9.
61. Truszevska A, Foronczewicz B, Pączek L. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Mar–Apr; 35 (2): 330–6.
62. Ershova ES, Jestkova EM, Chestkov IV, Porokhovnik LN, Izevskaya VL, Kutsev SI et al. Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients. *J Psychiatr Res*. 2017 Apr; 87: 15–22.

63. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an upcoming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med.* 2012 Jul; 42 (7): 565–86.
64. Marcos V, Zhou-Suckow Z, Önder Yildirim A, Bohla A, Hector A, Vitkov L et al. Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates

- with airflow obstruction. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 408935.
65. Hardy T, Zeybel M, Day CP, Dipper C, Masson S, McPherson S et al. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2017 Jul; 66 (7): 1321–8.

References

- Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Feb; 142 (3–4): 241–3.
- Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest.* 1973 Jan; 52 (1): 198–204.
- Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol.* 1977 Summer; 4 (2): 139–43.
- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1966 Nov; 45 (11): 1732–40.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB. Circulating nucleic acids in higher organisms. *Int Rev Cytol.* 1977; 51: 1–48.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar; 37 (3): 646–50.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994 Jan–Feb; 3 (1): 67–71.
- Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000 Mar; 6 (3): 1119–24.
- Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1; 11 (3): 1219–25.
- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem.* 1999 Feb; 45 (2): 184–8.
- Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. *Obstet Gynecol.* 2000 Dec; 96 (6): 991–6.
- Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003 Jul 15; 63 (14): 3966–8.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 21; 105 (42): 16266–71.
- Chu T, Bunce K, Hogge WA, Peters DG. Statistical model for whole genome sequencing and its application to minimally invasive diagnosis of fetal genetic disease. *Bioinformatics.* 2009 May 15; 25 (10): 1244–50.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989; 46 (5): 318–22.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994 Apr; 86 (4): 774–9.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999 Jan; 64 (1): 218–24.
- Tsumita T, Iwanaga M. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. *Nature.* 1963 Jun 15; 198: 1088–9.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65.
- Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8; 102 (45): 16368–73.
- Fairbairn DW, O'Neill KL. Necrotic DNA degradation mimics apoptotic nucleosomal fragmentation comet tail length. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995 Mar; 31 (3): 171–3.
- Tran TT, Groben P, Pisetsky DS. The release of DNA into the plasma of mice following hepatic cell death by apoptosis and necrosis. *Biomarkers.* 2008 Mar; 13 (2): 184–200.
- van Nieuwenhuijze AE, van Lopik T, Smeenk RJ, Aarden LA. Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2003 Jan; 62 (1): 10–4.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5; 303 (5663): 1532–5.
- Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 2005 Nov; 66 (11): 1146–54.
- Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010 Jul 16; 584 (14): 3193–7.
- Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Aug 7; 109 (32): 13076–81.
- Erpenbeck L, Schön MP. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene.* 2017 May 4; 36 (18): 2483–90.
- Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — A new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta.* 2011 May 12; 412 (11–12): 806–11.
- Reclusa P, Sirera R, Araujo A, Giallombardo M, Valentino A, Sorber L et al. Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora's box. *Transl Lung Cancer Res.* 2016 Oct; 5 (5): 483–91.
- van der Vaart M, Pretorius PJ. The origin of circulating free DNA. *Clin Chem.* 2007 Dec; 53 (12): 2215.
- Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug; 1137: 7–17.
- Aucamp J, Bronkhorst AJ, Peters DL, Van Dyk HC, Van der Westhuizen FH, Pretorius PJ. Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Jul; 74 (14): 2689–707.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997 Aug 16; 350 (9076): 485–7.
- Rink BD, Norton ME. Screening for fetal aneuploidy. *Semin Perinatol.* 2016 Feb; 40 (1): 35–43.
- Twiss P, Hill M, Daley R, Chitty LS. Non-invasive prenatal testing for Down syndrome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014 Feb; 19 (1): 9–14.
- Guissart C, Dubucs C, Raynal C, Girardet A, Tran Mau Them F et al. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) of cystic fibrosis: an optimized protocol using MEMO fluorescent PCR to detect the p.Phe508del mutation. *J Cyst Fibros.* 2017 Mar; 16 (2): 198–206.
- De Franco E, Caswell R, Houghton JA, Iotova V, Hattersley AT,

- Ellard S. Analysis of cell-free fetal DNA for non-invasive prenatal diagnosis in a family with neonatal diabetes. *Diabet Med.* 2017 Apr; 34 (4): 582–5.
39. Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejou E et al. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod.* 2014 Dec; 29 (12): 2661–9.
 40. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril.* 2016 Nov; 106 (6): 1312–8.
 41. De Vlaminc I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Oct 27; 112 (43): 13336–41.
 42. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Jul; 28 (7): 2221–32.
 43. Margraf S, Lögters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock.* 2008 Oct; 30 (4): 352–8.
 44. Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, Seki M, Yamamoto K, Oishi K et al. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 614518.
 45. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker — a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta.* 2010 Nov 11; 411 (21–22): 1611–24.
 46. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013 Aug; 10 (8): 472–84.
 47. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017 Apr; 17 (4): 223–38.
 48. Bidart J-M, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N et al. Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem.* 1999 Oct; 45 (10): 1695–707.
 49. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008 Sep; 14 (9): 985–90.
 50. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res.* 2010 Oct; 38 (18): 6159–75.
 51. Zhou J, Chang L, Guan Y, Yang L, Xia X, Cui L et al. Application of Circulating Tumor DNA as a Non-Invasive Tool for Monitoring the Progression of Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2016 Jul 26; 11 (7): e0159708.
 52. Takahashi H, Kagara N, Tanei T, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A et al. Correlation of Methylated Circulating Tumor DNA with Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer.* 2017 Feb; 17 (1): 61–69.
 53. Visvanathan K, Fackler MS, Zhang Z, Lopez-Bujanda ZA, Jeter SC, Sokoll LJ et al. Monitoring of Serum DNA Methylation as an Early Independent Marker of Response and Survival in Metastatic Breast Cancer: TBCRC 005 Prospective Biomarker Study. *J Clin Oncol.* 2017 Mar; 35 (7): 751–8.
 54. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med.* 2016 Jul 6; 8 (346): 346ra92.
 55. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014 Feb 19; 6 (224): 224ra24.
 56. Margolin G, Petrykowska HM, Jameel N, Bell DW, Young AC, Elnitski L. Robust Detection of DNA Hypermethylation of ZNF154 as a Pan-Cancer Locus with in Silico Modeling for Blood-Based Diagnostic Development. *J Mol Diagn.* 2016 Mar; 18 (2): 283–98.
 57. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Mar 29; 113 (13): E1826–34.
 58. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell.* 2016 Jan 14; 164 (1–2): 57–68.
 59. Smith J, Kean V, Bianchi DW, Feldman G, Petrucelli N, Simon M et al. Cell-free DNA results lead to unexpected diagnosis. *Clin Case Rep.* 2017 Jul 3; 5 (8): 1323–6.
 60. Raptis L, Menard HA. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1980 Dec; 66 (6): 1391–9.
 61. Truszcwska A, Foronczewicz B, Paćzek L. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2017 Mar–Apr; 35 (2): 330–6.
 62. Ershova ES, Jestkova EM, Chestkov IV, Porokhovnik LN, Lzevsckaya VL, Kutsev SI et al. Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients. *J Psychiatr Res.* 2017 Apr; 87: 15–22.
 63. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an upcoming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med.* 2012 Jul; 42 (7): 565–86.
 64. Marcos V, Zhou-Suckow Z, Önder Yildirim A, Bohla A, Hector A, Vitkov L et al. Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates with airflow obstruction. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 408935.
 65. Hardy T, Zeybel M, Day CP, Dipper C, Masson S, McPherson S et al. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2017 Jul; 66 (7): 1321–8.