

УДК 577.218

**Костюк С.В.<sup>1</sup>, Чвартацкая О.В.<sup>2</sup>, Севастьянова Г.А.<sup>2</sup>, Вейко Н.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр РАМН (г. Москва)

<sup>2</sup>Московский педагогический государственный университет

## **АКТИВАЦИЯ tlr9-, NF-kB-, JNK/p38- И IRF-СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

**S. Kostuyk<sup>1</sup>, O. Chvartatskaya<sup>2</sup>, G. Sevastyanova<sup>2</sup>, N. Veiko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics under the Russian Academy  
of Medical Sciences, Moscow

<sup>2</sup>Moscow State Pedagogical University

## **ACTIVATION OF TLR9-, NF-KB-, JNK/P38- И IRF-SIGNAL PATHWAYS IN MESENCHYMAL STEM CELLS**

*Аннотация.* Известно, что ГЦ-обогащенные фрагменты внеклеточной ДНК (ГЦ-вкДНК) накапливаются в плазме крови при патологии, и ранее нами было показано, что ГЦ-вкДНК активирует TLR9-зависимый сигнальный путь, увеличивая количество мРНК и белка TLR9 в клетках. В данной работе была смоделирована *in vitro* ситуация, когда эндогенные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), мигрирующие из ниши в очаги повреждения, или МСК, введенные в организм с целью терапии, «встречаются» с ГЦ-вкДНК, которая содержит сайты – лиганды TLR9. Было показано, что плаزمиды (п(рДНК)), содержащая в своем составе фрагменты ГЦ-вкДНК, активирует в МСК TLR9-сигнальный путь и связанные с ним NF-kB-, JNK/p38-, IRF-сигнальные пути.

*Ключевые слова:* МСК (мезенхимальные стволовые клетки), вкДНК (внеклеточная ДНК), TLR9-, NF-kB-, JNK/p38-, IRF-сигнальные пути.

*Abstract.* It is well known that GC-rich cell free DNA (GC-cfDNA) accumulates in the blood plasma at disease. We have previously shown that GC-cfDNA activates TLR9-dependent signal pathway, thereby increasing TLR9 and its signal pathway adapter MyD88 expression. We study in details the influence of the GC-DNA content on the activation of genes related to TLR9-dependent signal pathways. We have shown that GC-DNA increases the expression of TLR signal pathway and TLR9-dependent signal pathways such as NF-kB-, JNK/p38- and IRF-signal pathways. Thus, MSCs respond to changes in cfDNA GC-content by activating TLR-, NF-kB-, JNK/p38- and IRF-signal pathways.

*Key words:* mesenchymal stem cells (MSCs), cell free DNA (cfDNA), TLR9-, NF-kB-, JNK/p38-, IRF-signal pathways.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются предшественниками клеток мезенхимальной линии и способны дифференцироваться в костную, хрящевую, жировую, мышечную и т.д. ткани, в зависимости от стимулов и условий культивирования [10]. Первоначально предполагалось использование мезенхимальных стволовых клеток при лечении дегенеративных заболеваний, однако, в настоящее время, учитывая их способность к иммуносупрессии, все чаще рассматривают как объект иммунотерапии при трансплантации тканей, регуляции иммунного ответа, при аутоиммунных нарушениях, таких, как рассеянный склероз, системная красная волчанка, болезнь Крона и другие [10].

Однако и сами мезенхимальные стволовые клетки подвергаются воздействию окружающей их среды. Стволовые клетки локализованы и функционируют в определенном микроокружении, называемом «нишей». Ниша защищает стволовые клетки от внешних воздействий, обеспечивает самоподдержание, самовоспроизведение и дифференцировку дочерних транзиторных клеток [7]. Покидая ниши и попадая в очаг повреждения, мезенхимальные

стволовые клетки контактируют, в том числе, с фрагментами внеклеточной ДНК (вкДНК). Процессы, происходящие со стволовыми клетками в организме реципиента при контакте с фрагментами вкДНК, практически не изучены. Фрагменты вкДНК, как известно, присутствуют в плазме крови человека в норме. При патологических состояниях их концентрация значительно повышается. Ранее мы показали, что происходит накопление вкДНК в плазме крови пациентов с различными заболеваниями, такими, как инфаркт миокарда, атеросклероз, коронарная сердечная недостаточность (рис. 1) [4; 13].

Возможная схема их накопления выглядит следующим образом: из здоровых или поврежденных клеток организма при апоптозе и некрозе или в составе фракции метаболической ДНК высвобождаются фрагменты ДНК и поступают в кровоток. Там они подвергаются гидролизу до моно- и олигонуклеосомных фрагментов под действием ДНКазы. Элиминация этих фрагментов осуществляется в основном с помощью двух механизмов: почечной фильтрации и захвата клетками. Известно, что ГЦ-богатые последовательности более устойчивы к ДНКазному гидро-

лизу, чем АТ-богатые. По этой причине ГЦ-богатые последовательности остаются более длинными и хуже выводятся почками, и, следовательно, накапливаются в кровотоке. Основную часть этой ГЦ-богатой ДНК составляют повторы рибосомного гена.

Несмотря на широкое применение вкДНК в диагностике [3; 9], ее биологическая функция изучена недостаточно. Показано, что вкДНК обогащена CG-последовательностями [11]. Содержание во вкДНК ГЦ пар достигает 55% по сравнению с 38% в ДНК ядер клеток [8; 11]. Например, содержание во вкДНК ГЦ-богатой (ГЦ-вкДНК) умеренно повторяющейся последовательности генома – транскрибируемой области рибосомного повтора (рДНК) в несколько раз превышает ее содержание в геномной ДНК [5]. Известно, что рДНК содержит метилированные участки, включающие последовательности – лиганды TLR9 (Toll-like receptor 9) [2; 13; 14]. Цель исследования – моделирование *in vitro* ситуации, когда эндогенные МСК, мигрирующие из ниши в очаги повреждения, или МСК, введенные в организм с целью терапии, «встречаются» с CG-богатой вкДНК, которая содержит сайты – лиганды TLR9. Мы исследовали

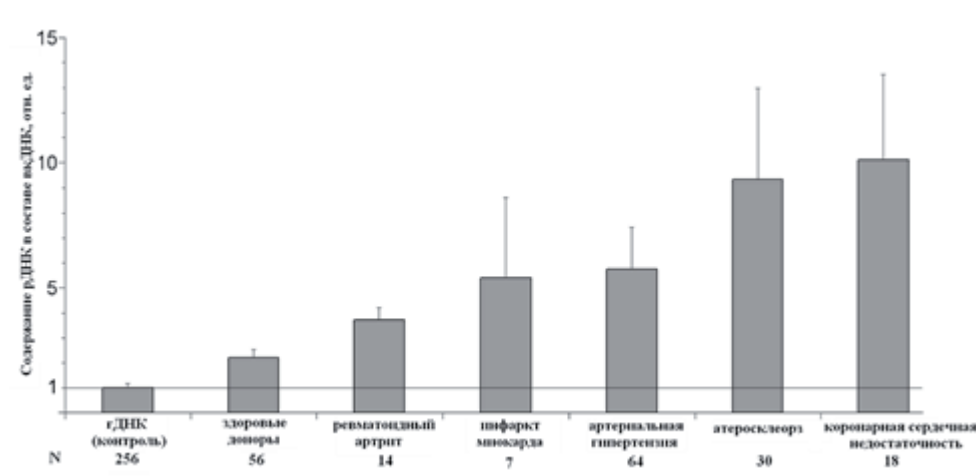


Рис. 1. Содержание генов рибосомных повторов (рДНК) во вкДНК по сравнению с содержанием рДНК в геномной ДНК здоровых людей и при различных заболеваниях

Примечание: измерение количества рДНК во вкДНК проводилось методом нерадиоактивной количественной дот-гибридизации, относительные единицы – содержание рДНК в гДНК ( $1,8 \pm 0,2$  пг / нг), N – количество исследованных образцов крови; по критерию Манна-Уитни различия между содержанием рДНК во всех образцах вкДНК и гДНК статистически достоверны ( $p < 0,05$ ).

активацию сигнального пути TLR9 и связанных с ним NF- $\kappa$ B-, JNK/p38-, IRF- сигнальных путей в МСК при взаимодействии с ГЦ-богатой ДНК.

### Материалы и методы

**Культуры клеток.** Мезенхимальные стволовые клетки были получены из жировой ткани операционного материала [2]. Образец ткани был механически измельчен в среде, содержащей 250 мкг/мл гентамицина, 60 Ед/мл пенициллина и 60 Ед/мл стрептомицина («ПанЭко»). Ферментативную диссоциацию проводили, инкубируя препарат в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки («РАА», Австрия), 0.04% коллагеназы («Sigma») и тех же антибиотиков в течение 16 часов при 37°C. Затем клетки центрифугировали (10 мин, 200g), переносили в слайд-флаконы и культивировали при 37°C в среде AmnioMax C-100 Basal Medium («Gibco»), содержащей AmnioMax Supplement C-100, 20 мкмоль/л NEPES («Пан/Эко») и антибиотики.

Исследование экспрессии клетками поверхностных белков проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием антител, меченных флуоресцеин-изоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE) («Becton Dickinson», США). Было показано, что на поверхности МСК присутствуют молекулы ГКГ (главного комплекса гистосовместимости, HLA): HLA-ABC+, молекулы адгезии: CD44+, CD54 (low), CD90+, CD106+, интегрины CD29+, CD49b (low), ростовые факторы: CD105+, но отсутствуют маркеры гемопоэтических клеток CD34-, CD45-, HLA-DR- и маркер к CD117-. Полученный профиль характерен для МСК. Кроме того, клетки в присутствии соответствующего индуктора дифференцировались в адипоциты.

**Пробы ДНК.** В качестве модельных фрагментов CpG-ДНК генома человека использовали CpG-богатый фрагмент транскрибируемой области рибосомного повтора ДНК (pДНК), встроенный в вектор pBR322 (п(рДНК)). В качестве AT-обогащенной ДНК использовали фрагмент 1,77 сателлита III (SatIII) – участок

Iq12, хромосомы 1, также встроенный в вектор pBR322 (п(SatIII)). ДНК E. Coli, геномную ДНК (гДНК) и внеклеточную ДНК (вкДНК) выделяли из штамма MG 1655 методом фенольной экстракции. Все образцы ДНК подвергали одинаковой дополнительной очистке от липополисахаридов [6]: последовательно проводили обработку тритоном X-114 и гель-фильтрацию на носителе HW-85. Клинические и диагностические параметры пациентов с хроническими заболеваниями и здоровых доноров были описаны ранее [13].

**Измерение уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени.** Выделение РНК из культивируемых лимфоцитов проводили с помощью стандартной методики с использованием наборов YellowSolve («Клоноген», Санкт-Петербург). Выделенную РНК хранили при температуре -70°C. Для дополнительной очистки выделенной РНК проводили ДНКазный гидролиз с помощью реагентов фирмы «Силекс» (Россия). Концентрацию РНК измеряли с использованием РНК-связывающегося красителя QuantiTMM RiboGreen RNA reagent («MoBiTec»), на люминесцентном спектрометре «LS 55» («PerkinElmer», Англия). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора реактивов фирмы («Силекс», Россия) с использованием фермента MuLV-RT обратной транскриптазы согласно стандартной методике. Для измерения уровня экспрессии генов использовали метод ПЦР в реальном времени, SYBRGreen PCRMasterMix («Applied Biosystems»), прибор StepOnePlus instrument («Applied Biosystems»). Количество мРНК анализировали в нескольких независимых опытах с помощью программного обеспечения прибора; ошибка метода составляла 2%. В качестве гена внутреннего стандарта использовали TBP (TATAA-box binding protein) и GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Для первичного скрининга TLR-сигнального пути использовали наборы «Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array» (SA Biosciences, PAHS-018). В последующих экспериментах использовали праймеры «IDT» (США), «Синтол» (Россия).

**Статистическая обработка результатов.** Полученные результаты были подтверждены в трех независимых экспериментах на трех культурах клеток. На рисунках показаны усредненные значения и стандартное отклонение (SD). Достоверность различий анализировали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

**вкДНК, модельная п(рДНК) и ДНК *e.coli* равнозначно стимулируют увеличение мРНК *tlr9* в МСК.** Мы исследовали влияние образцов вкДНК (50-100 нг/мл, 3 часа), полученной из плазмы крови больных и здоровых доноров, на активацию *tlr9*-сигнального пути МСК (рис. 2). ВкДНК больных инфарктом миокарда, ревматоидным артритом и раком молочной железы повышает экспрессию TLR9 в 2-3 раза ( $p < 0.05$ ). ВкДНК первичных раковых клеток – в 3,8 раза ( $p < 0.05$ ), вкДНК здоровых доноров статистически значимо не влияла на экспрессию TLR9. Активация TLR9 обусловлена наличием в составе вкДНК лигандов TLR9 – ГЦ-богатых неметилированных последовательностей, накапливающихся во вкДНК в норме и при па-

тологии. Одна из таких последовательностей – транскрибируемая область рибосомного повтора (вк-рДНК).

В дальнейшем нами было исследовано действие на МСК ГЦ-обогащенной ДНК, которая моделирует вк-рДНК (50нг/мл, 3 часа). Плаزمиды п(рДНК), содержит ГЦ-богатый фрагмент транскрибируемой области рибосомного повтора ДНК в векторе рBR322. Используемая концентрация превышает содержание этого повтора в крови здоровых доноров и характерна для патологии. РДНК содержит сайты связывания с рецепторами TLR9 [13] и последовательности – супрессоры TLR9 ((G)n), которые могут конкурентно ингибировать действие лигандов. Для сравнения использовали плазмиду п(CatIII) [20]. Вставка п(CatIII) обогащена АТ-ДНК (область 1q12 1-й хромосомы человека), которая не содержит ни лигандов, ни супрессоров TLR9. В п(CatIII) использовался вектор рBR322, чтобы исключить его влияние на МСК в составе п(рДНК). В качестве положительного контроля использовали ДНК *E.coli* в концентрации 50 нг/мл, которая является известным лигандом, взаимодействующим с рецепторами TLR9. При действии фрагментов п(рДНК) и ДНК *E.coli* на МСК наблюда-

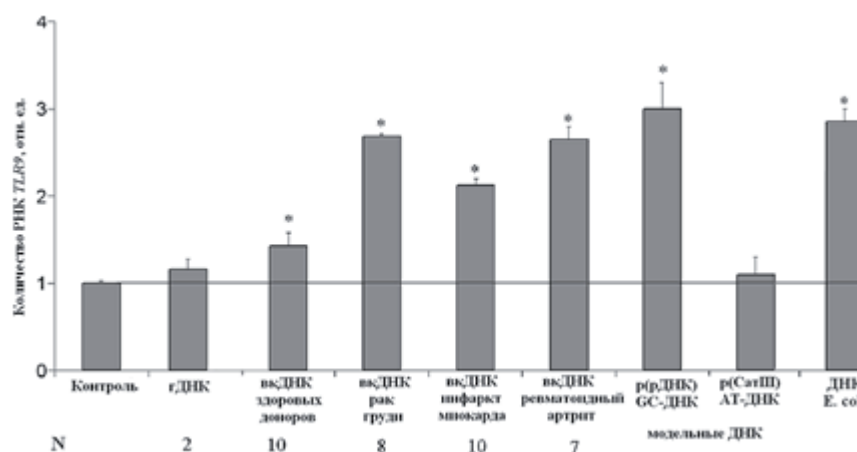


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *TLR9* при культивировании МСК в присутствии гДНК, вкДНК больных и здоровых доноров, модельных фрагментов (п(рДНК) и п(CatIII)) и ДНК *E. coli*.

Примечание: концентрации добавляемых фрагментов 50 нг/мл, время воздействия 3 часа. (\*) – Различия между указанными значениями и контролем статистически значимы ( $p < 0,05$ )

ется увеличение количества мРНК *TLR9* соответственно в 3,0 и в 2,9 раза по отношению к контролю ( $p < 0.05$ ), *p(CatIII)* не оказывает влияния на экспрессию гена *TLR9* (см. рис. 2). Таким образом, влияние вектора *pBR322* в составе *p(рДНК)* на активацию *TLR9* минимально.

**Кинетика изменения количества мрнк *tlr9* и адаптера *tlr*-сигнального пути – *myd88* в ответ на стимуляцию мск фрагментами *p(рДНК)*.** Мы исследовали кинетику изменения количества мРНК *TLR9* и адаптера *TLR*-сигнального пути – *MyD88* в ответ на стимуляцию МСК фрагментами *p(рДНК)*. Экспрессия *TLR9* возрастает через 20 мин после добавления в среду *p(рДНК)*, достигает максимума через 1 час (4,2 раза) а к 3 суткам падает до контрольных значений (рис. 3). Экспрессия адаптера *MyD88* в МСК при действии *p(рДНК)* повторяет динамику роста экспрессии *TLR9*, однако, смещена во времени. Количество мРНК *MyD88* повышается и достигает максимума к 3 часам (4,6 раза), сохраняется на максимальном уровне в течение 24 часов и снижается через 3 дня.

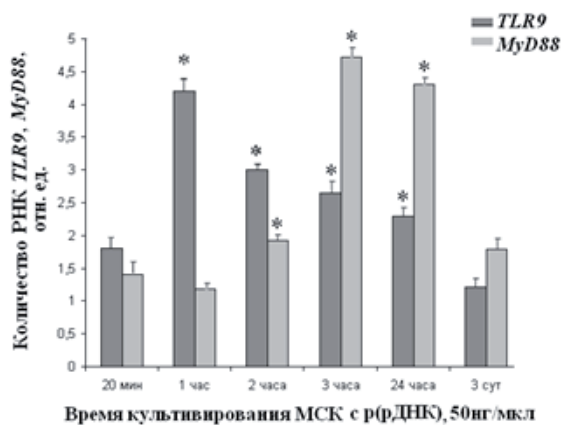


Рис. 3. Динамика накопления мРНК *TLR9* и *MyD88* во времени при инкубации МСК в присутствии ГЦ-богатых фрагментов – *p(рДНК)* в концентрации 50 нг/мл.

(\*) – Различия между указанными значениями и контролем статистически значимы ( $p < 0,05$ )

Таким образом, ГЦ-обогащенная *вкДНК* больных людей и модельный фрагмент –

*p(рДНК)* стимулируют увеличение экспрессии *TLR9* в той же степени, что и природный лиганд ДНК *E.coli*. Поскольку экспрессия адаптера *MyD88* повышается позже, чем *TLR9*, 24 часа посчитали оптимальным временем воздействия *p(рДНК)* на МСК для изучения молекул *TLR*-сигнального пути и путей, активирующихся как следствие активации *TLR9*. Использовали наборы «SABiosciences' Pathway-Focused Arrays» для первичного скрининга экспрессии генов *TLR*-пути, активирующихся в МСК в ответ на добавление *p(рДНК)*. Были выявлены гены, отвечающие повышением количества мРНК в МСК при действии *p(рДНК)*, экспрессию этих генов исследовали в серии отдельных экспериментов на трех культурах МСК с одинаковыми поверхностными маркерами.

**Активация *NF-kB*-, *JNK/p38*-, *IRF*-сигнального пути в ответ на стимуляцию МСК фрагментами *p(рДНК)* (24 часа, 50 нг/мл).** После связывания лиганда *TLR* образуют гомо- и гетеродимеры и передают сигнал внутрь клетки посредством гомотопического связывания *TIR-TIR* с одним из *TIR*-содержащих адапторных белков (*MyD88*, *TRIF/TICAM-1*, *TIRAP/MAL* и *TRAM/TICAM-2/TIRP*) или с комбинацией этих белков. Все *TLR*, за исключением *TLR3*, который передает сигнал через *TRIF*, используют один и тот же сигнальный путь и *MyD88* в качестве адаптера [1]. Передача сигнала через *TLR* осуществляется посредством ряда процессов, главный из которых – обратимая ковалентная модификация путем фосфорилирования и убиквитинирования. Для всех *TLR* сигнальный путь начинается с *IRAK* и белков семейства *TRAF*. Далее сигнал передается на киназы промежуточного уровня, такие, как *TAK-1* и *ТБК-1/IKK $\alpha$* , что приводит к активации сигнальных путей через *MAP*-киназы (*JNK*, *p38* и *ERK*), *IRF* (а именно *IRF-3*, *IRF-5*, и *IRF-7*) и *NF-kB* [1; 12], что сопровождается повышением экспрессии генов и синтезом цитокинов и хемокинов.

Мы обнаружили изменение экспрессии генов адаптеров *TLR*-пути в ответ на добав-

ление п(рДНК). Количество мРНК *MYD88*, *TIRAP*, *HSPD1*, *MAP2K3* возрастает в 5-9 раз, количество мРНК *TICAM2*, *SARM1*, *TOLLIP*, *HRAS*, *HSPA1A* и *MAPK8IP3* повышается в 2-3,5 раза, незначительно, в 1,4 раза увеличивается экспрессия генов *PELI1* и *RIPK2* (табл. 1). Повышается также экспрессия генов эффекторов TLR-сигнального пути. Мы обнаружили, что п(рДНК) вызывает в МСК увеличение количества мРНК генов *EIF2AK2*, *PPARA* в 3,5-5 раз. Экспрессия генов *TRAF6*, *UBE2N* повышается в 2 раза. В 1,5-2 раза возросло количество мРНК *FADD*, *IRAK1*, *MAP3K7IP1*, *IRAK2* и *IRAK1* (см. табл. 1). При действии п(рДНК) на МСК мы наблюдали активацию генов NF-κB-сигнального пути. Количество мРНК *MAP3K1*, *MAP4K4*, *NF-κB1A*, *REL* возросло в 3,5-5,5 раз, мРНК *IKBKB*, *RelA (p65)*, *NFRKB* в 2-3 раза, мРНК *NF-κB1* и *NF-κB2* в 1,4 раза.

Таким образом, ГЦ-богатые последовательности ДНК, накапливающиеся в составе

вкДНК, повышают экспрессию большинства генов молекул, участвующих в проведении сигнала через TLR-сигнальный путь, что сопровождается транслокацией в ядро фактора транскрипции NF-κB, повышая экспрессию генов NF-κB-сигнального пути. Последовательное фосфорилирование киназ активировало в МСК JNK/p38-сигнальный путь. Количество мРНК *FOS*, *MAP2K3*, *MAPK8* возросло в 2,6-5 раз, мРНК *ELK1* и *MAP2K4* – в 1,4-1,9 раза (табл. 2).

ГЦ-богатые последовательности в составе вкДНК могут играть существенную роль в функционировании МСК, активируя TLR-зависимые сигнальные пути в клетке: NF-κB-путь, а также JNK/p38- и IRF-сигнальные пути. Существует временная регуляция активации этих сигнальных путей. Таким образом, ГЦ-фрагменты в составе внеклеточной ДНК существенно влияют на физиологию как эндогенных МСК, так и МСК, введенных в организм с целью терапии.

Таблица 1

**Стимуляция TLR9 п(рДНК) в концентрации 50 нг/мл индуцирует в МСК повышение экспрессии TLR-регулируемых генов и генов NF-κB-сигнального пути**

TLR-сигнальный путь (24 ч, 50 ng/ml п(рДНК))				NFκB-сигнальный путь (50 нг/мл п(рДНК))		
Адаптеры		Эффекторы			24ч	3ч
<i>MYD88</i>	5.20 ± 0.26	<i>TRAF6</i>	2.62 ± 0.13	<i>NFKBIA</i>	3.61 ± 0.18	5.73 ± 0.5
<i>TIRAP</i>	8.06 ± 0.40	<i>FADD</i>	1.90 ± 0.10	<i>NFRKB</i>	1.90 ± 0.10	–
<i>SARM1</i>	1.90 ± 0.10	<i>IRAK1</i>	1.90 ± 0.10	<i>REL</i>	4.98 ± 0.25	–
<i>TICAM2</i>	1.90 ± 0.10	<i>IRAK2</i>	1.38 ± 0.07	<i>RELA</i>	2.62 ± 0.13	–
<i>TOLLIP</i>	1.90 ± 0.10	<i>UBE2N</i>	2.62 ± 0.13	<i>MAP3K1</i>	3.61 ± 0.18	–
<i>HRAS</i>	3.61 ± 0.18	<i>UBE2V1</i>	1.90 ± 0.10	<i>MAP4K4</i>	5.47 ± 0.05	–
<i>HSPA1A</i>	2.62 ± 0.13	<i>EIF2AK2</i>	3.61 ± 0.18	<i>IKBKB</i>	1.90 ± 0.10	2.0 ± 0.2
<i>HSPD1</i>	9.06 ± 0.45	<i>NR2C2</i>	1.38 ± 0.07	<i>TNFα</i>	1.90 ± 0.06	3.90 ± 0.04
<i>MAPK8IP3</i>	1.90 ± 0.10	<i>PPARA</i>	4.98 ± 0.25	<i>TNFRSF1A</i>	2.62 ± 0.13	2.21 ± 0.2
<i>CD14</i>	1.90 ± 0.10	<i>MAP3K7</i>	1.38 ± 0.07	<i>IL1B</i>	1.90 ± 0.10	–
<i>HMGB1</i>	1.90 ± 0.10	<i>MAP3K7IP1</i>	1.90 ± 0.10	<i>IL8</i>	2.62 ± 0.13	3,3 ± 0.3
<i>PELI1</i>	1.38 ± 0.07	–	–	<i>IL10</i>	9.06 ± 0.05	1.70 ± 0.04
<i>RIPK2</i>	1.38 ± 0.07	–	–	–	–	–

**Стимуляция JNK/p38- и IRF-сигнальных путей в МСК при добавлении в среду культивирования р(рДНК) в концентрации 50 нг/мл**

JNK/p38-сигнальный путь (24 ч, 50 нг/мл р(рДНК))		IRF-сигнальный путь (24 ч., 50 нг/мл р(рДНК))	
<i>MAP2K3</i>	4.98 ± 0.25	<i>IRF1</i>	1,38 ± 0.07
<i>MAP2K4</i>	1.68 ± 0.08	<i>IRF3</i>	2,62 ± 0.13
<i>MAPK8</i>	3.57 ± 0.10	<i>IFNA1</i>	4.98 ± 0.25
<i>ELK1</i>	1.91 ± 0.09	<i>IFNB1</i>	1.90 ± 0.10
<i>FOS</i>	2.62 ± 0.13	<i>IFNG</i>	4.98 ± 0.05

**ЛИТЕРАТУРА:**

1. Akira S., Sato S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms // *Scandinavian J. of Infectious Diseases*. – 2003. – V. 35 (№ 9). – P. 555–562.
2. Ermakov A.V. Bystander effect development in human mesenchymal stem cells after exposure to adaptive dose of X-radiation / A.V. Ermakov, V.S. Kon'kova, S.V. Kostyuk et al. // *Radiats. Biol. Radioecol.* (Радиационная биология. Радиэкология). – 2010. – V. 50, № 1. – P. 42–51.
3. Hahn S. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia / S. Hahn, C. Rusterholz, I. Hösl, O. Lapaire et al. // *Placenta*. – 2011. – V. 32 (Suppl.1). – P. 17–20.
4. Konorova I.L., Veiko N.N., Novikov V.E. Influence of plasma DNA on acid-base balance, blood gas measurement, and oxygen transport in health and stroke // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2008. – V. 1137. – P. 278–282.
5. Kostyuk S.V. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endotheliocytes / S.V. Kostyuk, A.V. Ermakov, A.Y. Alekseeva et al. // *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2012. – V. 729 (№ 1-2). – P. 52–60.
6. Kostyuk S.V. The changing of cell-free DNA properties of peripheral blood and TCR-mutant cell frequency in individuals exposed to ionizing radiation / S.V. Kostyuk, I.A. Zamulaeva, R.K. Agapova et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2007. – V. 144 (№ 3). – P. 304–308.
7. Morrison S.J., Spradling A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life // *Cell*. – 2008. – V. 132 (№ 4). – P. 598–611.
8. Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA – a new paradigm in genetic behaviour // *Clinica Chimica Acta*. – 2011. – V. 412 (№ 12). – P. 806–811.
9. Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients // *Nature Reviews Cancer*. – 2011. – V. 11 (№ 6). – P. 426–437.
10. Singer N.G., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation // *Annual Review of Pathology-mechanisms of disease*. – 2011. – V. 6. – P. 457–478.
11. Suzuki N. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma / N. Suzuki, A. Kamataki, J. Yamaki et al. // *Clinica Chimica Acta*. – 2008. – V. 387. – P. 55–58.
12. Takagi M. Toll-like receptor – a potent driving force behind rheumatoid arthritis // *J. of Clinical and Experimental Hematopathology*. – 2011. – V. 51 (№ 2). – P. 77–92.
13. Veiko N.N. Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs / N.N. Veiko, N.O. Shubaeva, S.M. Ivanova et al. // *Bull Exp. Biol. Med.* (Бюллетень экспериментальной биологии и медицины). – 2006. – V. 142 (№ 3). – P. 313–316.
14. Veiko N.N., Spitkovskii D.M. The accumulation of single-stranded breaks does not lead to paired DNA damage – the characteristic of the transcribing fragment of the human ribosomal operon that allows its being detected in biological fluids at the death of different body cells // *Radiats. Biol. Radioecol.* – 2000. – V. 40 (№ 4). – P. 396–404.