

## Комбинация молекулярных биомаркеров ДНК в прогнозе исхода критических состояний

В. М. Писарев<sup>1</sup>, А.Г. Чумаченко<sup>1</sup>, А. Д. Филев<sup>1,2</sup>, Е. С. Ершова<sup>1,2</sup>, С. В. Костюк<sup>1,2</sup>,  
Н. Н. Вейко<sup>2</sup>, Е. К. Григорьев<sup>1,5,6</sup>, Е. В. Елисына<sup>1,5</sup>, Р. А. Черпаков<sup>7</sup>, А. В. Тутельян<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>2</sup> Медико-генетический научный центр,  
Россия, 115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

<sup>3</sup> Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,  
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Минздрава России,  
Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1

<sup>4</sup> Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора,  
Россия, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а

<sup>5</sup> Городская клиническая больница им. В. П. Демикова,  
Россия, 109263, г. Москва, ул. Шкулева, д. 4

<sup>6</sup> Городская клиническая больница №15 им. О. М. Филатова,  
Россия, 111539, г. Москва, ул. Вешняковская, д. 23

<sup>7</sup> Городская клиническая больница им. В. М. Буянова,  
Россия, 115516, Москва, ул. Бакинская, д. 26

## Combination of DNA Molecular Biomarkers in the Prediction of Critical Illness Outcome

Vladimir M. Pisarev<sup>1</sup>, Anastasiya G. Chumachenko<sup>1</sup>, Anton D. Filev<sup>1,2</sup>, Elisaveta S. Ershova<sup>1,2</sup>,  
Svetlana V. Kostyuk<sup>1,2</sup>, Natalia N. Veiko<sup>2</sup>, Evgeny K. Grigoriev<sup>1,6,7</sup>, Elisaveta V. Elygina<sup>1,5</sup>,  
Rostislav A. Cherpakov<sup>7</sup>, Alexei V. Tutelyan<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,  
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Medical Genetics Research Center  
1 Moscowrech'e Str., 115478 Moscow, Russia

<sup>3</sup> D. Rogachev Federal Scientific Clinical Centre of Pediatric Hematology,  
Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia,  
1 Samora Mashela Str., GSP-7, 117997 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor,  
3a Novogireevskaya Str., 111123 Moscow, Russia

<sup>5</sup> V. P. Demikhov City Clinical Hospital,  
4 Shkulev Str., 109263 Moscow, Russia

<sup>6</sup> O. M. Filatov City Clinical Hospital  
23 Veshnyakovskaya Str., 111539 Moscow, Russia

<sup>7</sup> V. M. Buyanov City Clinical Hospital, Moscow Department of Health,  
26 Bakinskaya Str., 115516 Moscow, Russia

**Цель исследования:** определить информативность предикции летальности пациентов с сепсисом с помощью комбинации кандидатных маркеров — количественного содержания циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК) в плазме и аллельных вариантов гена TLR9, кодирующего ДНК-распознающий клеточный рецептор TLR9.

**Материалы и методы.** В исследование вошли пациенты из пяти ОРИТ четырех больниц ( $n=156$ ). Пациентов разделили на 2 группы: (1) с сепсисом (по критериям СЕПСИС-3, 2016), ( $n=81$ ) и с ОНМК ( $n=75$ ). ВкДНК выделяли из плазмы пациентов органическими растворителями и определяли ее концентрацию на спектрофотометре, используя флуоресцентный интеркалирующий агент SYBR Green, связывающийся с ДНК с высокой аффинностью. Генотипирование аллельных вариантов гена TLR9 rs352162 проводили с помощью полимеразной цепной реакции с использованием тетрапраймеров с последующим электрофоретическим разделением продуктов и их визуализацией. Значения концентраций вкДНК сопоставляли с результатами генотипирования по TLR9 rs352162 и исходом в течение 30 дней после госпитализации.

**Результаты.** По содержанию вкДНК пациенты с сепсисом (подгруппы с абдоминальным или неабдоминальным сепсисом) из двух разных больниц значимо не отличались, а концентрации вкДНК

### Адрес для корреспонденции:

Владимир Митрофанович Писарев  
E-mail: vpisarev@gmail.com

### Correspondence to:

Vladimir M. Pisarev  
E-mail: vpisarev@gmail.com

в группах пациентов не зависела от источника первичной инфекции, что позволило увеличить размеры групп, суммировав данные. При использовании объединенных данных показали, что чувствительность и специфичность прогнозирования летального исхода по определению содержания вкДНК зависит от генотипа: у гомозиготных пациентов генотипа TLR9 rs352162 CC величина AUC была значимо выше, чем в группе пациентов генотипов TLR9 CT и TT (rs352162).

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют об информативности определения генетического полиморфизма TLR9 и обосновывают целесообразность подбора пациентов для исследований действия таргетных препаратов, ингибирующих взаимодействие вкДНК с рецептором TLR9 с учетом генотипа TLR9 пациента.

**Ключевые слова:** внеклеточная ДНК; полиморфизм TLR9; комбинация биомаркеров; сепсис; критические состояния

**Purpose:** to determine the informative value of the prediction of mortality of patients with sepsis using a combination of candidate markers — the quantitative content of circulating cell-free DNA (cfDNA) in plasma and allelic variants of TLR9 gene encoding-cellular recognition receptor TLR9 for DNA fragments.

**Materials and methods.** The study included patients from five ICU of 4 four hospitals ( $n=156$ ). The patients were divided into 2 groups: (1) with sepsis (based on SEPSIS-3, 2016, criteria), ( $n=81$ ) and with acute cerebrovascular event ( $n=75$ ). CfDNA was isolated from patient's blood plasma using organic solvents and its concentration was established by a spectrophotometer using fluorescent intercalating agent SYBR Green binding DNA with high affinity. Genotyping of rs352162 allele variants of TLR9 gene was carried out with the help of polymerase chain reaction using tetraprimers followed by separation of products via electrophoresis and their visualization. The cfDNA concentrations were compared in patients differ in TLR9 rs352162 genotypes and outcome was predicted in 30 days after hospitalization using the ROC analysis.

**Results.** As regards the cfDNA content, there was no significant difference between patients with sepsis (subgroups with abdominal or non-abdominal sepsis) from two different hospitals, and cfDNA concentration in groups of patients was not associated with the source of primary infection, which allowed increasing group size by pooling up the data. Pooled data have shown that the sensitivity and specificity of the lethal outcome prediction based on the cfDNA content depends on the genotype: in homozygotic patients with TLR9 rs352162 CC genotype, the AUC was significantly higher than in the alternative group of patients with TLR9 rs352162 CT and TT genotypes.

**Conclusion.** The data we obtained suggest high informative value of establishing the genetic polymorphism of TLR9 as complimentary to determining the cfDNA concentration and may demonstrate potential usefulness of selecting patients according to their TLR9 genotype for investigations of the clinical effect of targeted drugs inhibiting interaction of cfDNA with receptor TLR9.

**Keywords:** extracellular DNA; cell-free DNA; TLR9 polymorphism; combination of biomarkers; sepsis; critical conditions

DOI:10.15360/1813-9779-2019-3-31-47

## Введение

Инфекционные осложнения критических состояний (КС) — сепсис, в том числе -септический шок (СЕПСИС-3, 2016) остаются ведущей причиной смертности в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [1]. Предотвращение летального исхода сепсиса требует разработки новых стратегий персонализации лечения, нуждающихся в (1) надежных и высокоинформативных прогностических биомаркерах и (2) расширении наших представлений об их связи с фенотипическим разнообразием патологического процесса при сепсисе, обусловленном разнообразием патогенетических звеньев. Раннее использование таких биомаркеров в медицине КС позволило бы своевременно стратифицировать пациентов по группам риска неблагоприятного течения и летального исхода. Последнее способствовало бы принятию оптимального решения о лечении пациента, в том числе — о целесообразности

## Introduction

Infectious complications of critical conditions (CC) — sepsis, including septic shock (SEPSIS-3, 2016), remain the prevalent reason of mortality in intensive care units (ICU) [1]. Prevention of the mortal outcome of sepsis requires novel strategies of management personalization that need for (1) reliable prognostic biomarkers of high informational value, and (2) extension of our understanding of their relation to phenotypic diversity of the pathological process during sepsis due to the versatility of the pathogenic elements. Early use of such biomarkers in CC medicine would allow timely stratification of patients by groups of the risk of adverse course and lethal outcome. The latter would assist making the best decision with regard to patient management including usage of high-tech approaches and individualization of drug doses [2].

There are two main groups of molecular biomarkers, which are promising candidate markers of

использования высокотехнологичных методов и индивидуализации доз препаратов [2].

К перспективным кандидатным маркерам прогноза течения и предикции исхода заболеваний и патологических состояний, в том числе — КС относят две основные группы молекулярных биомаркеров — циркулирующие в крови молекулы и полиморфные гены, характеризующиеся однонуклеотидной заменой, следствием которой может явиться изменение функциональной активности гена с последующим количественным изменением экспрессии его продуктов — мРНК и соответствующего белка [2, 3].

Одним из биомаркеров с подтвержденными высокими значениями специфичности и чувствительности теста при прогнозировании исхода разных КС является вкДНК [4-8]. В организме человека ежедневно образуются и погибают 1011 клеток, что приводит к попаданию в циркуляцию около 1 грамма ДНК [9]. В результате макрофагальной активности и действия нуклеаз крови ДНК погибших клеток расщепляется и выделяется из организма [10-11]. Таким образом поддерживается приблизительно постоянная концентрация вкДНК в плазме на уровне 200 нг/мл или несколько более, в зависимости от метода ее обнаружения [12]. У здорового человека содержание вкДНК может варьировать в зависимости от физической или эмоциональной нагрузки [13]. Однако, это повышение кратковременное, и концентрация вкДНК быстро возвращается к нормальным показателям [13]. Показано, что вкДНК у здорового человека в крови преимущественно (93%) находятся в составе нановезикул — экзосом, что облегчает их проникновение в клетки [14].

В клетке или на ее поверхности фрагменты вкДНК, обогащенные участками, содержащими цитозин-фосфат-гуаниновые (CpG) последовательности, способны связываться с toll-подобным рецептором TLR9 [15]. Источниками CpG-богатых фрагментов могут быть бактериальная ДНК и некоторые участки ДНК эукариот, включая человека (зоны промоторов, рибосомные гены) [12, 16]. Фрагменты ДНК, содержащие CpG последовательности, обладают большей устойчивостью связи гуанозин-цитозин (Г-Ц) к фрагментации, поскольку энергия связи в паре Г-Ц в составе фрагментов ДНК, содержащих однонитевые разрывы, существенно больше по сравнению с парой аденозин — тимин [12]. Поэтому именно CpG-содержащие фрагменты ДНК преимущественно накапливаются в кровотоке обладая потенциалом пролонгированной активности в отношении TLR9 рецептора. TLR9 обнаружен у большинства клеток, с наибольшей плотностью он

prognosis of the course and prediction of the outcome of diseases and pathological conditions including critical conditions, namely: molecules circulating in blood, and polymorphous genes characterized by single nucleotide substitution that might result in a change of gene's functionality followed by a quantitative change in the expression of its products — mRNA and the corresponding protein [2, 3].

One of biomarkers with confirmed high specificity and sensitivity in a test of predicting the outcome of different critical states is cfDNA [4–8]. In the human body, 1011 cells form and die every day, which leads to inclusion in circulation of 1 gram of DNA approximately [9]. As a result of macrophagal activity and blood nuclease action, DNA of dead cells breaks down and is eliminated from the body [10, 11]. In this way, an approximately constant concentration of cfDNA in plasma is maintained at a level of 200 ng/ml or slightly higher, depending on the detection method [12]. In a healthy person, the content of cfDNA might vary depending on physical or emotional stress [13]. However, such rise is short-term and cfDNA concentration fast recovers to normal figures [13]. It has been shown that in the healthy human blood, cfDNA is found mostly (93%) in nanovesicles — exosomes, which facilitates their penetration into cells [14].

Inside or on the surface of a cell, cfDNA fragments enriched with sites containing cytosine-phosphate-guanine (CpG) sequences are capable of binding with toll-like receptor TLR9 [15]. The sources of CpG-rich fragments might be bacterial DNA and some eukaryote DNA regions including human (promoter sites, ribosomal genes) [12, 16]. DNA fragments containing CpG sequences and DNA nicks are more resistant to DNA fragmentation due to increased binding energy for guanosine-cytosine bond compared to thymine-adenosine bond [12]. That is why this is the CpG-rich fragments that preferably accumulate in the blood flow, featuring potential for prolonged activity in respect of TLR9 receptor. TLR9 was found in most cells, its highest densities were detected both on membrane surface and inside antigen-presenting cells [15]. TLR9 activation launches the Myd88-dependent anti-inflammatory response [17, 18]. Blocking of TLR9 activation leads to reduced expression of anti-inflammatory genes (NFkB, IL1, IL6) and production of anti-inflammatory cytokines, better elimination of bacteria, increased content of granulocytes and peritoneal dendritic cells [17]. High content of DNA fragments in plasma is associated with a negative prognosis. In the experimental sepsis model, the quantity of circulating bacterial DNA was drastically increased, resulting in excessive activation of TLR9 and higher mortality [17]. During such critical conditions as acute cerebrovascular events in the brain and myocardium, a severe trauma, operative interventions,



выявляется как на поверхности мембраны, так и внутри антигенпредставляющих клеток [15]. Активация TLR9 приводит к запуску Myd88-зависимого провоспалительного ответа [17, 18]. При этом блокирование активации TLR9 приводит к снижению экспрессии провоспалительных генов (NFκB, IL1, IL6) и продукции провоспалительных цитокинов, лучшей элиминации бактерий, увеличению содержания гранулоцитов и перитонеальных дендритных клеток [17]. Высокое содержания фрагментов ДНК в плазме ассоциировано с негативным прогнозом. В экспериментальной модели сепсиса количество циркулирующей бактериальной ДНК резко повышено, что приводит к чрезмерной активации TLR9 и к большей летальности [17]. При таких критических состояниях, как острые нарушения кровообращения в головном мозге и миокарде, тяжелая травма, оперативные вмешательства, сепсис, сопровождающихся воспалительными реакциями, концентрация вкДНКкратно повышается [4–8]. Однако гетерогенность нозологических форм и сопутствующая коморбидность могут быть источником вариабельности по содержанию вкДНК, что ограничивает информативную ценность вкДНК как предиктора исхода КС, и, в частности, сепсиса. Другой причиной, сдерживающей широкое использование теста в клинической практике, является генетическое разнообразие пациентов — полиморфизм генов, контролирующих передачу сигналов с вкДНК в клетках, предположительно, мог бы тоже вносить вклад в специфичность и чувствительность теста при КС. В отношении генетического полиморфизма гена, кодирующего рецептор фрагментов ДНК, богатых CpG, известны лишь ассоциации варианта TLR9 rs352162 C/C в гомозиготном состоянии с высокой смертностью и развитием полиорганной недостаточности (ПОН) при сепсисе, а также с усилением продукции раннего и мощного провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли (ФНО) [19]. Эффекты предположительно являются следствием усиления сигналинга через рецептор у носителей варианта C/C в гомозиготном состоянии [19]. В литературе мы не обнаружили данных по изучению прогностической ценности комбинации содержания вкДНК в крови и наличия того или иного функционально значимого генетического варианта TLR9.

Цель исследования — определение информативности предикции летальности пациентов с сепсисом с помощью комбинации кандидатных маркеров — количественного содержания циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК) в плазме и аллельных вариантов гена TLR9, кодирующего ДНК-распознающий клеточный рецептор TLR9.

sepsis, which are accompanied by inflammatory responses, cfDNA concentration rises many-fold [4–8]. However, heterogeneity of medical conditions and comorbidity might be a source of cfDNA content variability, which limits the informative value of cfDNA as a predictor of the outcome of a critical state, including but not limited to sepsis. Another reason impeding wide application of the test in clinical practice is the genetic diversity of patients: polymorphism of genes controlling signal transduction from cfDNA to the cell might also contribute to the test specificity and sensitivity in critical conditions. Regarding genetic polymorphism of the gene coding for the receptor of CpG-rich DNA fragments, the only associations that are known are the associations of homozygotic TLR9 rs352162 C/C with higher mortality and risk of multiple organ failure (MOF) during sepsis, and intensified production of an early and potent anti-inflammatory cytokine — tumor necrosis factor (TNF) [19]. The effects are supposedly a consequence of amplified signaling via the variant receptor in the carriers of homozygotic C/C [19]. We have not found any published reports in the literature concerning investigations of the prognostic value of the combination of cfDNA content in the blood and presence of some or other functionally significant genetic variant of TLR9 rs352162.

The aim of the study was to determine the informational value of the prediction of sepsis patient's mortality using a combination of candidate markers — the quantitative content of circulating extracellular DNA (cfDNA) in plasma and allelic variants of TLR9 gene coding DNA-cell recognition receptor TLR9.

## Materials and Methods

**Patients.** All patients with critical conditions ( $n=156$ ), which were included in the study, were divided into two groups of ICU patients: (1) patients from V.P. Demikhov Municipal Clinical Hospital (ICU 2), V.M. Buyanov Municipal Clinical Hospital (ICU 1), and O.M. Filatov Municipal Clinical Hospital (ICU 3), who had a clinically established infection and presence of organ failure (i.e. sepsis according to SEPSIS-3, 2016, classification),  $n=81$  (table 1); (2) neurology ICU patients from V.P. Demikhov Municipal Clinical Hospital (ICU 4) and S.P. Botkin Municipal Clinical Hospital (ICU 5) with an acute cerebrovascular event (ACVE) as a result of an ischemic stroke or hemorrhagic stroke ( $n=75$ ) (table 2). Ischemic stroke patients did not receive brain recanalization due to presence of one or more counter-indications: patients beyond the therapeutic window (up to 3.5 hrs. thrombolysis, up to 6 hrs. thromboextraction), convulsions at the stroke onset, hypertensive crisis, NIHSS < 3 points, operative interventions during the last 3 months, age of more than 80 years). The control group consisted of clinically healthy donors ( $n=30$ ).

According to the classification suggested by consensus conference SEPSIS-3 (2016), sepsis was regarded a condition characterized by presence of a focus of infec-

**Таблица 1. Характеристика нозологической структуры пациентов с сепсисом (ОРИТ 1 – ОРИТ 3).**  
**Table 1. Characterization of sepsis patient's nosology (ICU 1 – ICU 3).**

Indexes	Value of indexes in groups		
	Non-Abdominal Sepsis, <i>n</i> =44	Abdominal Sepsis, <i>n</i> =37	Sepsis, <i>n</i> =81
Mean age	57.9±13.9	53.7±14.7	55.9±14.3
Men	23	29	52
Women	21	8	29
Pneumonia	7	0	7
Severe trauma	2	0	2
Oncological diseases*	1	0	1
Cardiovascular diseases	18	0	18
Pyelonephritis, nephropathy	6	0	6
Diabetes mellitus	9	0	9
Intestine perforation	0	2	2
Cholecystitis, cholangitis	0	5	5
Appendicitis	0	8	8
Peritonitis	0	7	7
Pancreatitis, pancreonecrosis	0	10	10
Mesenteric thrombosis	0	3	3
Intestine perforation	0	2	2
Other**	1	0	1

**Note.** \* – adrenal gland mass; \*\* – Itsenko–Cushing syndrome.

**Примечание.** \* – образование надпочечника; \*\* – Синдром Иценко–Кушинга. Для табл. 1, 2: indexes – показатели; value of ... in groups – значения ... в группах; mean age – средний возраст; men – мужчины; women – женщины; pneumonia – пневмония; severe trauma – тяжелая травма; oncological diseases – онкологические заболевания; cardiovascular diseases – сердечно-сосудистые заболевания; pyelonephritis, nephropathy – пиелонефрит, нефропатия; diabetes mellitus – сахарный диабет; intestine perforation – перфорация кишки; cholecystitis, cholangitis – холецистит, холангит; appendicitis – аппендицит; peritonitis – перитонит; pancreatitis, pancreonecrosis – панкреатит, панкреонекроз; mesenteric thrombosis – мезентеральный тромбоз; intestine perforation – перфорация кишки; other – другое; sepsis – сепсис; non-Abdominal/Abdominal – не-абдоминальный / абдоминальный.

## Материал и методы

**Пациенты.** Пациентов в КС (*n*=156), вошедших в исследование, разделили на две группы пациентов ОРИТ: (1) ГКБ им. В. П. Демидова (ОРИТ 2), ГКБ им. В. М. Буянова (ОРИТ 1) и ГКБ имени О. М. Филатова (ОРИТ 3) с клинически выявленной инфекцией и наличием органной недостаточности (т. е. сепсис, согласно классификации СЕПСИС-3, 2016), *n*=81 (табл. 1); (2) пациенты нейрореанимации ГКБ им. В. П. Демидова (ОРИТ 4) и ГКБ им. С. П. Боткина (ОРИТ 5) с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК) в результате ишемического инсульта или геморрагического инсульта (*n*=75) (табл. 2). Пациентам с ишемическим инсультом восстановление проходности сосудов головного мозга не проводили в связи с наличием одного или более противопоказаний: пациенты вне терапевтического окна (тромболизис до 3,5 часов, тромбоэкстракция до 6 часов), судороги в дебюте инсульта, гипертонический криз, NIHSS<3 баллов, оперативные вмешательства за последние 3 месяца, возраст более 80 лет). Контрольную группу составили клинически здоровые доноры (*n*=30).

Под сепсисом, в соответствии с классификацией, предложенной консенсусной конференцией СЕПСИС-3 (2016), понимали состояние, характеризующее наличием инфекционного очага и полиорганной недостаточности, оцениваемой по баллам SOFA не менее чем на 2 единицы [20]. Пациентов с септическим шоком клинически выявляли по необходимости вазопрессорной поддержки до уровня среднего артериального давления 65 мм рт. ст. или более, сочетающейся с уровнем сывороточного лактата выше 2 ммоль/л (>18 мг/дл) при отсутствии гиповolemии [20].

tion and multiple organ failure estimated at least as SOFA score 2 [20]. The septic shock was understood as a condition whereby substantially severe circulatory cellular and metabolic disorders are associated with a higher risk of mortality than during sepsis not complicated with septic shock. Patients with septic shock were clinically identified based on the necessity of vasopressor support to the level of mean arterial pressure of 65 mm Hg or higher combined with serum lactate over 2 mmol/l (> 18 mg/dl) in the absence of hypovolemia [20].

**Isolation of DNA from blood samples.** Venous blood was sampled within 24 hours after sepsis manifestation (according to sepsis-3 criteria [20]) in group 1 and at admission to ICU (group 2) into tubes VACUETTE® TUBE K3EDTA, Greiner bio one, Austria). To obtain plasma from whole blood, blood samples were centrifuged at 22°C, 1600 g, for 10 minutes. The supernatant was collected without touching the bottom layer and transferred into a clean tube, then centrifuged again at 22°C, 16000g, to remove cellular debris. For the purpose of quantitative assay of plasma DNA, the latter was isolated by means of extraction with organic solvents. To 800 µl of plasma, 90 µm of lysis buffer (10% sodium lauryl sarcosinate, 0.5M EDTA), RNase A (Sigma-Aldrich, USA), were added to the concentration of 75 µg/ml. Then, after 45-minute incubation at 37°C, 25 µl of proteinase K solution (20 mg/ml) was added and incubated for 16 hrs. at 37°C. DNA was extracted twice using phenol solution (pH=8.0); to the supernatant, saturated ammonium acetate solution (8M) was added to the final concentration of 2M, and DNA was precipitated using the 2.5-fold volume of ethanol during 16 hours at –20°C. The DNA sediment was centrifuged, washed with 75-percent ethanol, dried, and dissolved in 40 µl of deionized water. Plasma samples were kept

**Таблица 2. Характеристика структуры группы пациентов нейро-реанимационного профиля, госпитализированных в ОРИТ 4 и ОРИТ 5.****Table 2. Characterization of the structure of the group of neuro-resuscitation patients hospitalized to ICU 4 and ICU5.**

Indexes	Value of indexes in groups		
	Ischemic Stroke, n=57	Hemorrhagic Stroke, n=18	Total, n=75
Mean age	71.3±11.1	63.2±14.1	69±12.4
Men	28	8	36
Women	29	10	39
Pneumonia	15	3	18

**Примечание.** Stroke – инсульт; Ischemic/hemorrhagic – ишемический/геморрагический; total – всего.

**Получение ДНК из образцов крови.** Забор венозной крови производили в течение суток после манифестации сепсиса (согласно критериям sepsis-3 [20]) в группе 1 и при поступлении в ОРИТ (группа 2) в пробирки VACUETTE® TUBE K3EDTA, Greiner bio one, Austria). Для получения плазмы из цельной крови образцы с кровью центрифугировали при 22°C, 1600 g, в течение 10 минут. Супернатант отбирали, не затрагивая нижнего слоя, и перемещали в чистую пробирку. Затем повторно центрифугировали при 22°C, 16000 g для удаления клеточного дебриса. С целью определения количественного содержания в плазме ДНК выделяли методом экстракции органическими растворителями. К 800 мкл плазмы добавляли 90 мкл лизис-буфера (10% лаурилсаркозилат натрия, 0,5М ЭДТА), РНКазу А (Sigma-Aldrich, США), до концентрации 75 мкг/мл. Затем, после 45 минутной инкубации при 37°C, добавляли 25 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировали 16 ч при 37°C. ДНК экстрагировали двукратно раствором фенола (рН=8,0), к супернатанту добавляли насыщенный раствор ацетата аммония (8М) до конечной концентрации 2М и осаждали ДНК 2,5-кратным объемом этанола в течении 16 часов при -20°C. Осадок ДНК осаждали центрифугированием, промывали 75-процентным этанолом, подсушивали и растворяли в 40 мкл деионизированной воды. Образцы плазмы сохраняли в течение 1–3 месяцев при температуре -28°C. Концентрацию внеклеточной ДНК в плазме измеряли методом флуоресценции с интеркалирующим красителем PicoGreen (Invitrogen, США) с использованием планшетного спектрофлуориметра EnSpire (Perkin Elmer, Финляндия) при длине волны возбуждения 480 и длине волны эмиссии 520 нм.

**Генотипирование ДНК.** Для целей генотипирования аллельных вариантов С и Т TLR9 rs352162 ДНК пациентов и выделяли из свежеполученных или предварительно замороженных образцов цельной крови с помощью наборов Diatom DNA Prep 200, согласно прилагаемой инструкции (ООО «Лаборатория Изоген»). Определение аллелей проводили с помощью тетрапраймерной ПЦР. Метод позволяет в одной пробирке амплифицировать фрагменты ДНК, соответствующие альтернативным аллелям. Тетрапраймерный набор для ПЦР включает пару внешних праймеров: прямой и обратный, и пару внутренних аллель-специфических праймеров, тоже прямой и обратный праймеры. Амплификацию проводили в программируемом термостате Geneamp 9700 (Applied Biosystems, США). Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1-процентном агарозном геле с использованием источника тока

during 1–3 months at -28°C. The concentration of extracellular DNA in plasma was measured by means of fluorescence with intercalating agent PicoGreen (Invitrogen, USA) using benchtop spectrofluorometer EnSpire (Perkin Elmer, Finland) at excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength 520 nm.

**DNA genotyping.** For genotyping allelic variants C and T of TLR9 rs352162, patient's DNA was isolated from fresh or preliminarily frozen samples of whole blood using Diatom DNA Prep 200 kit following the enclosed instruction (Isogen Laboratory LLC). Alleles were determined by means of tetraprimer PCR. The method allows amplifying DNA fragments matching the alternative alleles in one tube. The PCR tetraprimer kit includes a pair of outer primers: forward and reverse, and a pair of inner allele-specific primers, which are also forward and reverse primers. Amplification was carried out in programmable thermostat Geneamp 9700 (Applied Biosystems, USA). The amplification products were separated by means of electrophoresis in 1-percent agarose gel using current source Elf-4 (DNA-Technology, Russia). The following DNA fragments were used as primers:

1. Forward outer (F<sub>1</sub>) —  
5' – CTGAGATAGTGGTGC GCGGCT-3',
2. Reverse outer (R<sub>1</sub>) —  
5' — CCACTGTTGAGTGGCTCTGA-3',
3. Forward inner (F<sub>2</sub>) —  
5' — GAAGGTCCACCAGGAAC TGCT-3',
4. Reverse inner (R<sub>2</sub>) —  
5' — ATTGCCAGGCCACCCTCCG-3'

**Statistical analysis.** Statistical processing of the results was carried out with the help of research statistical software packages — GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and SigmaStat 12.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, California, USA); for binary indices, Fisher's exact test (FET) was used, for quantitative indices — Mann-Whitney test; multiple parameters were assessed using One-Way ANOVA on Ranks, and Dunn's test if the distribution of variables was inconsistent with normal distribution. The nature of distribution of values under analysis was established using the Kolmogorov-Smirnov's test with the help of GraphPad InStat software package (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The same package was also used to determine the odds ratio (OR). Differences between groups were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results and Discussion

To assess the informative value of the prediction of mortality of patients with sepsis using a combination of DNA markers, cfDNA concentration and variants of TLR9 gene encoding DNA re-



«Эльф-4» (ДНК-Технология, Россия). В качестве праймеров использовали следующие фрагменты ДНК:

1. Прямой внешний (F<sub>1</sub>) —  
5`-CTGAGATAGTGGTGC GCGGCT-3` ,
2. Обратный внешний (R<sub>1</sub>) —  
5`-CCACTGTTGAGTGGCTCTGA-3` ,
3. Прямой внутренний (F<sub>2</sub>) —  
5`-GAAGGTCCACCAGGAACTGCT-3` ,
4. Обратный внутренний (R<sub>2</sub>) —  
5`-ATTGCCAGGCCACCCCTCCG-3`

**Статистический анализ.** Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакетов статистических программ для научных исследований GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, США) и SigmaStat 12.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, California, USA); при этом для бинарных показателей применяли точный метод Фишера (ТМФ), для количественных показателей — критерий Манна-Уитни, множественные параметры оценивали с помощью One-Way ANOVA on Ranks, метод Dunn, в случае несоответствия характера распределения переменных значений нормальному распределению. Характер распределения анализируемых значений определяли с помощью метода Колмогорова-Смирнова, используя программный пакет GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Этот же пакет использовали и для определения соотношения шансов (odds ratio, OR). Значимыми считали различия между группами при значении  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Чтобы оценить информативную ценность прогноза смертности пациентов с сепсисом с использованием комбинации маркеров ДНК — концентрации cfDNA и вариантов гена TLR9, кодирующего рецептор ДНК TLR9 — было целесообразно увеличить выборку генотипированных пациентов. Чтобы оценить, можно ли использовать данные пациентов, поступивших в разные ОРИТ (разные больницы), сравнивали содержание cfDNA у пациентов разных ОРИТ. Было предположено, что отсутствие различий по данному показателю даст возможность объединить данные из разных больниц/ разных ОРИТ для увеличения когорты пациентов с целью поиска ассоциации полиморфизма TLR9 и исхода критического состояния.

**Содержание вкДНК в плазме добровольцев контрольной группы и пациентов с сепсисом (СЕПСИС-3, 2016).** Концентрация вкДНК в образцах плазмы контрольной группы (клинически здоровые добровольцы — доноры крови) составила 278,5 (96,28; 457,0) нг/мл (значения медианы и 25–75 процентиля),  $n=30$ . Пациентов с диагностированным сепсисом в зависимости от локализации первичного очага разделили на 2 группы: пациенты с абдоминальным сепсисом — источник первичной инфекции в брюшной полости ( $n=37$ ) и сепси-

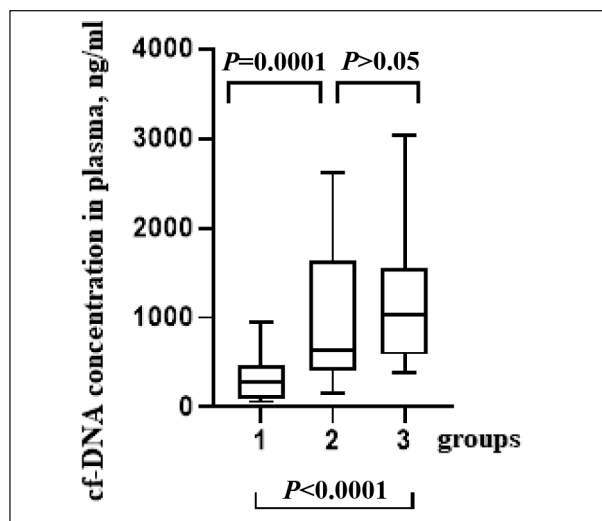


Рис. 1. Содержание вкДНК в плазме пациентов из разных ОРИТ с абдоминальным сепсисом.

**Fig. 1. The cf-DNA concentration in plasma of patients with abdominal sepsis from different ICUs.**

**Note.** For fig. 1, 2: Group 1 – healthy volunteers; Group 2 – ICU 1 patients; Group 3 – patients from ICU 2 + ICU 3 (combined group);  $P$  – significance of difference between groups of patients from different ICU and the control group and between groups of ICU patients.

**Примечание.** Для рис. 1–5: groups – группы; Cf-DNA concentration in plasma, ng/ml – концентрация вкДНК в плазме, нг/мл. Для рис. 1, 2: 1 – клинически здоровые доноры; 2 – пациенты ОРИТ 1; 3 – пациенты ОРИТ 2 + ОРИТ 3 (комбинированная группа);  $p$  – значимость различий между группами пациентов разных ОРИТ и контрольной группой и между группами пациентов ОРИТ.

ceptor TLR9, more genotyped patients should be acquired. To evaluate whether it is possible to use data from patients admitted to different ICUs the difference in the content of cfDNA between groups of ICU patients in critical illness from different hospitals was compared. We hypothesized that if no differences found it would be possible to combine data from different hospitals/ICUs to increase the cohort for TLR9 polymorphism association study.

**The content of cfDNA in the plasma of control group volunteers and sepsis patients (SEPSIS-3, 2016).** The concentration of cfDNA in plasma samples of the control group (clinically healthy volunteers — blood donors) was equal to 278.5 (96.28; 457/0) ng/ml (the median and 25–75 percentiles),  $n=30$ . The patients with diagnosed sepsis were split into 2 groups depending on the primary focus location: patients with abdominal sepsis — the source of primary infection was located in the peritoneal cavity ( $n=37$ ) and sepsis, and the source of infection located elsewhere ( $n=44$ ).

Determination of plasma cfDNA in abdominal sepsis patients within each unit (ICU 1) or in aggregate in two units (ICU 2+ICU 3) of three medical institutions (ICU 1-3) revealed statistically significant difference between the control group (clinically

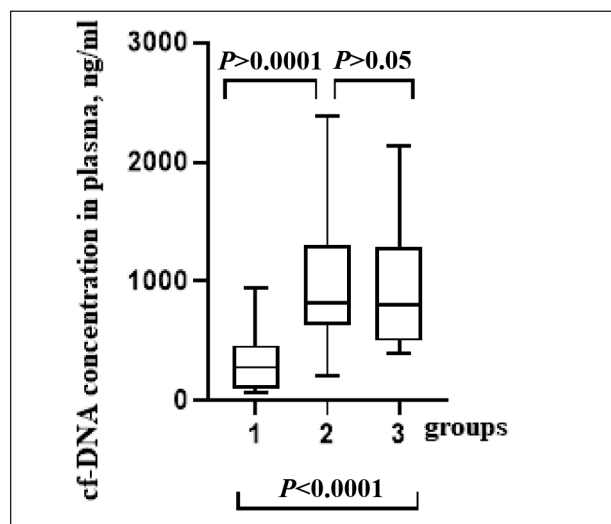


Рис. 2. Сравнение концентрации вкДНК в плазме септических пациентов без абдоминального сепсиса  
Fig. 2. Comparison of the cf-DNA concentration in plasma of sepsis patients (no abdominal sepsis)

сом и источником инфекции иной первичной локализации ( $n=44$ ).

Определение уровня вкДНК в плазме пациентов с абдоминальным сепсисом внутри каждого отделения (ОРИТ 1) или суммарно двух отделений (ОРИТ 2+ОРИТ 3) выявили статистически значимые различия между группой контроля (клинически здоровые доноры) и любой из двух групп пациентов с абдоминальным сепсисом (рис. 1,  $p \leq 0,0001$ ).

Между группами пациентов из разных ОРИТ значимых различий по содержанию вкДНК в плазме не обнаружили (рис. 1,  $p > 0,05$ ).

Концентрации вкДНК пациентов обоих ОРИТ с сепсисом, при котором источник инфекции не находился в брюшной полости, между собой не различались, однако, различались по сравнению с контрольной группой (рис. 2,  $p < 0,0001$ ).

Как и в предыдущих группах пациентов с абдоминальным сепсисом, значимых различий между пациентами разных ОРИТ обнаружено не было ( $p > 0,05$ ).

Дополнительно проанализировали содержание вкДНК у пациентов двух других лечебных учреждений с диагнозом ОНМК (ОРИТ 4 и ОРИТ 5). При этом отбор образцов крови проводили в течение первых 2–3 суток после поступления пациентов в ОРИТ, и диагноз сепсиса пациентам не ставили. Такая группа служила группой сравнения для данного исследования. Результаты исследования представлены на рис. 3. Как видно из рисунка, уровень содержания вкДНК в плазме пациентов с ОНМК (значения медиан 239,3 нг/мл и 411,6 нг/мл в ОРИТ4 и ОРИТ5, соответственно) практически не отличался от такового в контроль-

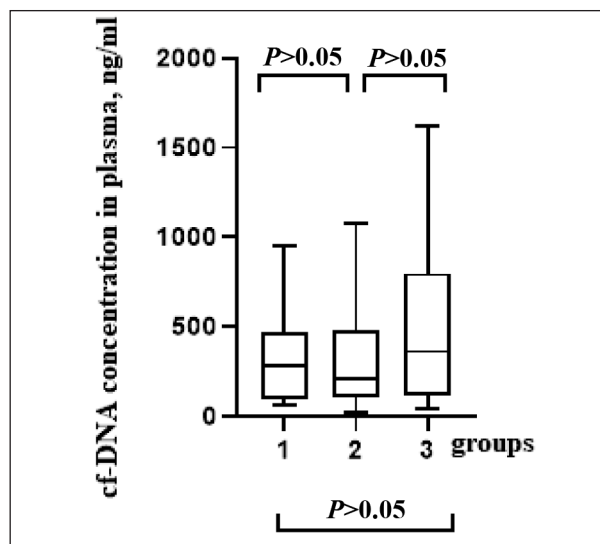


Рис. 3. Сравнение концентрации вкДНК в плазме пациентов с инсультом.

Fig. 3. Comparison of the cf-DNA concentration in plasma of the patients with stroke

Note. Group 1 – ICU 4; Group 2 – ICU 5; Group 3 – healthy volunteers;  $P$  – significance of differences between the patients from different hospitals or patients group vs. control group.

Примечание. 1 – ОРИТ 4; 2 – ОРИТ 5; 3 – клинически здоровые доноры;  $p$  – значимость различий между пациентами из разных лечебных учреждений и между пациентами и клинически здоровыми донорами.

healthy donors) and the group of abdominal sepsis patients ( $P \leq 0,0001$ , fig. 1).

No significant difference in the plasma cfDNA content was found between groups of patients from different ICU (fig. 1,  $P > 0,05$ ).

Concentrations of cfDNA in sepsis patients from both ICU, wherein the source of infection was located other than in the abdominal cavity, did not differ from the control group (fig. 2,  $P < 0,0001$ ).

Same as in previous groups of patients with abdominal sepsis, there was no significant difference between patients from different ICU ( $P > 0,05$ ).

Additionally, the content of cfDNA in ACVE patients from two other medical institutions (ICU 4 and ICU 5) was analyzed. Blood samples were taken within the first 2–3 from patients' admission to ICU, and sepsis was not diagnosed in those patients. That group served as a comparison group for this study. The study results are shown on fig. 3. As one can see from the figure, the content of plasma cfDNA in ACVE patients (the median values were 239.3 ng/ml and 411.6 ng/ml in ICU4 and ICU5, respectively) almost did not differ from that in the control group (clinically healthy volunteers, the median was equal to 278.5 ng/ml). Comparison of the results between the patients from ICU 4 ( $n=59$ ) and ICU 5 ( $n=16$ ) did not establish any significant difference in the plasma cfDNA content of patients admitted to different hospitals ( $P > 0,05$ , fig. 3).



ной группе (клинически здоровые добровольцы, значение медианы 278,5 нг/мл). При этом сравнение результатов между пациентами ОРИТ 4 ( $n=59$ ) и ОРИТ 5 ( $n=16$ ) не выявило значимых различий по содержанию вкДНК в плазме пациентов, госпитализированных в разные клиники (рис. 3,  $p>0,05$ ).

Отсутствие значимых различий между группами пациентов из разных лечебных учреждений, но со сходным источником первичной инфекции (или нескольких источников, как при сепсисе, не связанном с очагом инфекции в брюшной полости (см. группы 3 на рис. 1 и рис. 2), или пациентов без явных признаков инфекции (пациенты с инсультом) позволили укрупнить группы, объединив их по источнику инфекции или при ее отсутствии — по нозологической форме.

На рис. 4 представлены данные по сравнению концентраций вкДНК у пациентов ОРИТ при объединении близких по источнику групп пациентов из разных лечебных учреждений.

Результаты, представленные на рис. 4, указывают на сохранение выраженного, значимого повышения уровня вкДНК у пациентов с сепсисом по сравнению с контрольной группой ( $p<0,0001$ ). При этом пациенты с сепсисом отличались по данному показателю и от группы сравнения (пациенты с ОНМК),  $p<0,0001$  (см. рис. 4). Контрольная группа и группа сравнения по показателю содержания вкДНК в плазме значимо не отличались (рис. 4,  $p>0,05$ ).

### 30-дневная выживаемость при сепсисе.

Принимая во внимание, что летальность при сепсисе (в том числе септическом шоке) высока — более 40%, [21] мы проанализировали связь между 30 дневной выживаемостью и уровнем вкДНК в плазме пациентов с сепсисом (по классификации СЕПСИС-3, 2016). Выявили, что повышение концентрации вкДНК более 1215 нг/мл ассоциировано с 30 дневной летальностью ( $p<0,0007$ , OR=49 (3,8–638,2), чувствительность 0,7778, специфичность 0,9333 CI 95%). Среди выживших концентрация вкДНК была значимо ниже (значения медиана 592,5 нг/мл vs. 2064,167 нг/мл,  $p<0,001$ ). Таким образом, подтвердили, что высокий уровень вкДНК ассоциирован с 30-дневной летальностью при сепсисе (СЕПСИС-3). Данные соответствуют результатам, ранее полученным Avriel A. et al., 2014, показавшим, что увеличение концентрации вкДНК в крови являлось высокоинформативным маркером летального исхода сепсиса в течение 28 дней после поступления в ОРИТ [22]. Определение вкДНК в данном исследовании обладало даже большей предиктивной мощностью, чем определение прокальцитонина. В данной работе, однако, в отличие от настоящего исследования, при формировании групп

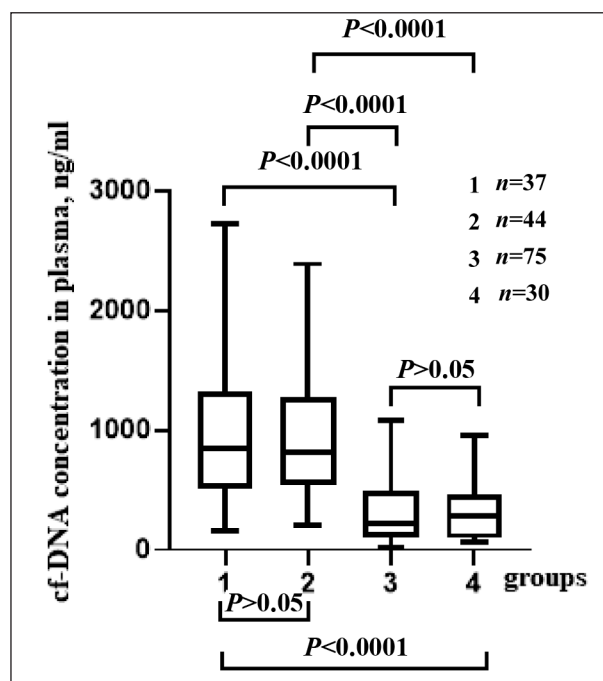


Рис. 4. Сравнение концентрации вкДНК в плазме пациентов с абдоминальным сепсисом, без абдоминального сепсиса и ОНМК (объединенная выборка пациентов из разных клинических источников).

Fig. 4. Comparison of the cf-DNA concentration in plasma of the patients with abdominal sepsis, without abdominal sepsis and with stroke (combined cohort).

Note. Group 1 – patients with abdominal sepsis from ICU 1, ICU 2 and ICU 3; Group 2 – patients without abdominal sepsis from ICU 1, ICU 2 and ICU 3; Group 3 – patients with stroke from ICU 4 and ICU 5; Group 4 – healthy volunteers.  $P$  – significance of differences between the patients from different hospitals or patients' group and control group.

Примечание. 1 – пациенты с абдоминальным сепсисом из ОРИТ 1, ОРИТ 2 и ОРИТ 3; 2 – пациенты без абдоминального сепсиса из ОРИТ 1, ОРИТ 2 и ОРИТ 3; 3 – пациенты с ОНМК из ОРИТ 4 и ОРИТ 5; 4 – клинически здоровые доноры;  $p$  – значимость различий между пациентами из разных лечебных учреждений и между пациентами и клинически здоровыми донорами.

Absence of significant difference between groups of patients from different medical institutions but with a similar source of primary infection (or several sources like during sepsis not related to a focus of infection in the abdominal cavity (see groups 3 on fig. 1 and fig. 2), or patients without obvious symptoms of infection (stroke patients) allowed consolidating groups by pooling them up based on the source of infection or, in the absence thereof, by nosology.

The results shown on fig. 4 indicate persistence of a prominent significant increase of the cfDNA level in sepsis patients versus the control group ( $P<0,0001$ ). Sepsis patients different in this index from the comparison group (ACVE patients), too,  $P<0,0001$  (see fig. 4). There was no significant difference between the control group and the comparison group by plasma cfDNA content (fig. 4,  $P>0,05$ ).

пациентов использовали более раннее определение сепсиса, в соответствии с которым в выборку были включены и пациенты с системной воспалительной реакцией без полиорганных нарушений.

**Полиморфные варианты гена TLR9 у пациентов ОРИТ и летальность в ОРИТ.** ВкДНК обладает свойствами сигнальной молекулы, являясь лигандом рецептора одного из toll-подобных рецепторов системы врожденного иммунитета TLR9 [15]. Генетическая вариабельность toll-подобных рецепторов, в том числе — однонуклеотидный полиморфизм TLR9, относится к существенным факторам, контролирующим клиническое разнообразие КС, частоту, особенности течения и предрасположенность к неблагоприятным исходам КС, включая сепсис [23–25]. Известно, что один из генетических вариантов TLR9, аллель С однонуклеотидного полиморфизма rs352162, ассоциировался с развитием полиорганной недостаточности и повышенной продукцией провоспалительного цитокина — TNF-альфа после стимуляции бактериальной ДНК лейкоцитов крови пост-критических пациентов [19].

Исходя из этих данных, предположили, что и при КС, не связанных с травмой, данный генетический вариант С TLR9 (rs352162) будет ассоциироваться с плохим прогнозом. Было также предположено, что именно у пациентов-носителей аллеля С TLR9 (rs352162) в наибольшей степени будут выражены патогенетические эффекты, связанные с повышенной концентрацией вкДНК — естественного лиганда TLR9. Параллельное генотипирование пациентов по вариантам однонуклеотидного полиморфизма TLR9 СС, СТ, ТТ (rs352162) и определение концентрации вкДНК в плазме тех же пациентов выявило наибольшее содержание вкДНК у пациентов генотипа TLR9 СС (значения медиан 1373 нг/мл versus 805 нг/мл, соответственно,  $p=0,030$ ), что можно объяснить более выраженным пост-рецепторным сигналом после рецепции вкДНК клетками, несущими вариант гена рецептора, обеспечивающего лучший сигналинг, по-видимому, лежащий в основе большей продукции воспалительных цитокинов ответ на стимуляцию лигандом — фрагментом ДНК [19].

Большая продукция провоспалительных цитокинов клетками предрасполагает к клеточной гибели, приводящей к высвобождению более значительного количества молекул ДНК и их фрагментов. Поэтому предположили, что именно пациенты генотипа TLR9 С, содержащие в циркуляции большие концентрации вкДНК и генетически предрасположенные к лучшей реакции рецепторов на лиганд вкДНК, будут иметь худший прогноз в ОРИТ, по сравне-

**30-day survival during sepsis.** Taking into account that mortality from sepsis (including septic shock) is high — more than 40% [21], we analyzed the relation between 30-day survival and the level of cfDNA in plasma of patients with sepsis (according to SEPSIS-3 classification, 2016). It was found out that increase of cfDNA concentration over 1215 ng/ml is associated with 30-day mortality ( $P<0.0007$ , OR=49 (3.8–638.2), sensitivity 0.7778, specificity 0.9333, CI 95%). Among the survived, the cfDNA concentration was significantly lower (the median was 592.5 ng/ml vs. 2064.167 ng/ml,  $P<0.001$ ). Thus, it has been confirmed that high cfDNA content is associated with 30-day mortality during sepsis (SEPSIS-3). The data are consistent with the findings received earlier by Avriel A. et al., 2014, which showed that increase of cfDNA concentration in blood was a highly informative marker of the lethal outcome of sepsis within 28 days from admission to ICU [22]. In that study, determination of cfDNA possessed even a higher predictive power than determination of procalcitonin. However, in that study, in contrast to the present investigation, earlier diagnosis of sepsis was used in forming patients' groups, according to which the sample included also patients with systemic inflammatory response without multiple organ disturbances.

**Polymorphic variants of gene TLR9 in ICU patients and mortality in ICU.** CfDNA is a signal molecule being a ligand for one of toll-like receptors of the congenital immunity system — TLR9 [15]. Genetic variability of toll-like receptors, including single nucleotide polymorphism of TLR9, is one of essential factors controlling the clinical diversity of critical conditions, incidence, peculiarities of the course, and predisposition to adverse outcomes of critical conditions including sepsis [23–25]. It is known that one of genetic variants of TLR9 — allele C of single nucleotide polymorphism of rs352162 — was associated with development of multiple organ failure and increased production of anti-inflammatory cytokine TNF-alpha after stimulation of post-critical patient's blood leukocytes with bacterial DNA [19].

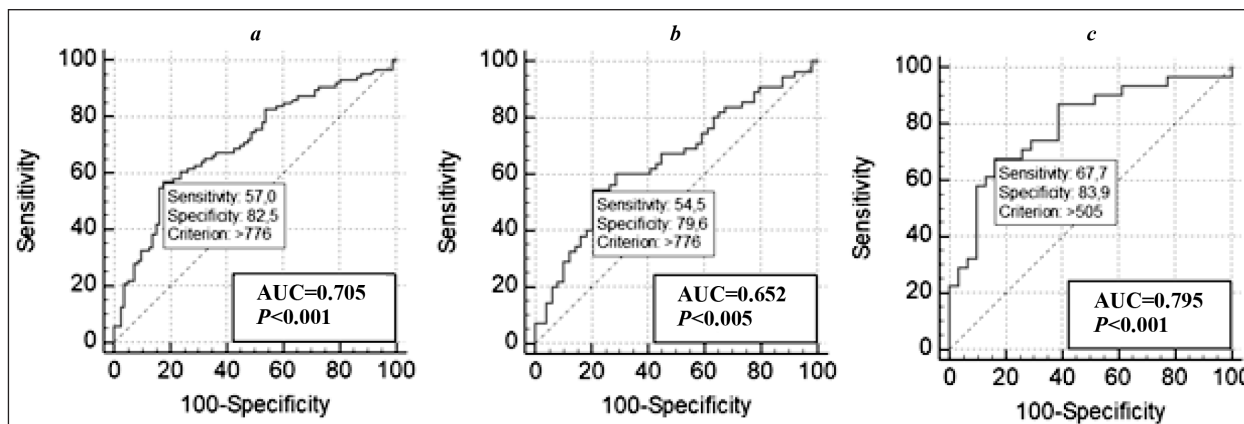
Proceeding from those data we supposed that during critical conditions not related to a trauma, this genetic variant C of TLR9 (rs352162) would also be associated with a poor prognosis. It was also supposed that in the patients who are carriers of allele C of TLR9 (rs352162), the pathogenic effects related to increased concentration of cfDNA — a natural ligand of TLR9, would manifest most prominently. Parallel genotyping of patients by variants of single nucleotide polymorphism: TLR9 СС, СТ, ТТ (rs352162), and determination of plasma cfDNA in the patients revealed the highest content of cfDNA in patients whose genotype was TLR9 СС (the median values were 1373 ng/ml versus 805 ng/ml, re-

**Таблица 3. Значения AUC и соответствующие им точки отсечения концентраций вкДНК в плазме при определении чувствительности и специфичности в группах пациентов ОРИТ разных генотипов TLR9.**  
**Table 3. AUC and corresponding cut-off values for plasma cfDNA concentrations in ICU patients of different genotypes TLR9.**

Patients with a TLR9 genotype	n	cfDNA	AUC	P
		Cut-off value	M (95% CI)	
1 CC+CT+TT	166	516.0	0.705 (0.629–0.773)	<0,0001
2 CT+TT	104	554.0	0.652 (0.552–0.743)	0,005
3 CC	62	413.6	0.795 (0.673–0.887)	<0,0001

**Note.** Group 1 – ICU 2–5 patients of any genotype; Group 2 – patients with TLR9 CT or TT genotype; Group 3 – patients with TLR9 CC genotype. AUC – area under the ROC curve.

**Примечание.** 1 – пациенты ОРИТ любого генотипа; 2 – пациенты генотипа TLR9 CT, TT; 3 – пациенты генотипа TLR9 CC; cfDNA cut-off value – точка отсечения вкДНК; AUC – площадь под ROC-кривой.



**Рис. 5. Сравнение прогноза у пациентов ОРИТ 2–5 на основе концентрации вкДНК и полиморфизмов гена TLR9.**

**Fig. 5. Comparison of the ICU 2–5 patients outcomes based on cf-DNA concentration in plasma and TLR9 polymorphisms.**

**Note.** a – ICU 2–5 patients; b – patients with genotypes TLR9 CT, TT; c – patients with genotype TLR9 CC.

**Примечание.** a – пациенты ОРИТ 2–5; b – пациенты генотипов TLR9 CT, TT; c – пациенты генотипа TLR9 CC. Sensitivity – чувствительность; specificity – специфичность; AUC – площадь под ROC-кривой; criterion – точка отсечения.

нию с пациентами альтернативных генотипов TLR9 CT, TT (rs352162).

Действительно, определение концентрации вкДНК, полиморфизма гена TLR9 rs352162 и 30-дневной выживаемости при анализе всего массива данных ( $n=166$ ) выявил значимые различия между группами пациентов по значению ROC, характеризующие прогностическую ценность в терминах чувствительности и специфичности исхода (летальность) пациентов ОРИТ в течение 30-дневного срока наблюдения (рис. 5). Вся группа пациентов характеризовалась относительно небольшим значением ROC кривых (0,705), при значениях чувствительности 57,0% и специфичности 82,5% (рис. 5, a), однако в группах разных генотипов (TLR9 CT, TT versus TLR9 CC) были выявлены значительно отличающиеся оппозитные значения, удаленные от значения AUC для всей выборки пациентов ОРИТ ( $n=166$ ). Так, чувствительность теста у пациентов генотипов TLR9 CT, TT была ниже, чем у пациентов генотипа TLR9 CC (рис. 5, b и рис. 5, c, соответственно).

В табл. 3 представлены значения площадей под ROC-кривой (AUC) при расчетах значе-

spectively,  $P=0.030$ ), which can be explained by a stronger post-receptor signal after reception of cfDNA by cells carrying the receptor variant providing better signaling that probably underlies higher production of inflammatory cytokines in response to stimulation with the ligand [19].

Higher production of anti-inflammatory cytokines by cells predisposes to cell death leading to release of a greater quantity of DNA molecules and their fragments. Therefore, it was suggested that these are the patients of genotype TLR9 C, containing higher concentrations of cfDNA in their circulation and genetically predisposed to a better response of receptors to the ligand to cfDNA, who would have a worse prognosis in ICU compared to patients of alternative genotypes TLR9 CT, TT (rs352162).

In fact, determination of cfDNA content, polymorphism of gene TLR9 rs352162, and 30-day survival rate revealed, during pooled data analysis ( $n=166$ ), significant differences between groups of patients in ROC figures, which characterized the prognostic value in terms of sensitivity and specificity of the outcome (mortality) of ICU patients during the 30-day follow-up period (fig. 5). The



ний чувствительности и специфичности и 95-процентные доверительные интервалы значений AUC (95% CI), а также соответствующие каждому значению AUC и оптимальные для каждого генотипа точки отсечения значений содержания вкДНК.

Значение AUC для пациентов генотипа TLR9 CC достоверно выше, чем у пациентов генотипов TLR9 CT, TT при сниженном значении точки отсечения (cut-off value) по концентрации вкДНК.

Сепсис характеризуется полиорганной недостаточностью, возникшей вследствие инфекционного процесса [20]. Воспалительные реакции, индуцированные возбудителем инфекции, способствуют усилению клеточной гибели [26–27]. Следствием является повышение выхода вкДНК в циркуляторное русло. Известно, что количество вкДНК бактериального происхождения при развившемся сепсисе резко повышено [17], однако ее значительно меньше, чем циркулирующей ДНК хозяина [4]. Возможно, что именно с циркулирующей вкДНК организма, а не бактериальной ДНК связано ее действие на организм, опосредованное клеточными рецепторами ДНК — TLR9, STING, NLRP3 [4, 28–29]. Другими словами, при вероятной молекулярной идентичности CpG-содержащих лигандов этих рецепторов разного происхождения — прокариотических (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, или PAMP) и эукариотических (молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением, или DAMP) — при инфекционном КС доминирующими лигандами являются последние. Это подтверждается имеющимися экспериментальными и клиническими данными о том, что вкДНК при КС, в том числе и при сепсисе, накапливается в циркуляции в результате апоптоза, некроза и нетоза клеток [30]. Нельзя исключить, впрочем, и активную секрецию митохондриальной ДНК в составе экзосом в результате незавершенных процессов митофагии в клетках, подверженных значительному цитоплазматическому и окислительному стрессу, характерному для КС.

Исследования с использованием в качестве лигандов молекул ДНК с разным содержанием CpG различного бактериального происхождения выявили положительные корреляции между концентрацией CpG-участков в молекуле ДНК молекуле и выраженности провоспалительного потенциала последней [16]. В других исследованиях (модель экспериментального абдоминального сепсиса у грызунов) установили, что у нокаутных Tlr9<sup>-/-</sup> мышей выживаемость при полибактериальном сепсисе значительно выше, чем у мышей генотипа Tlr9<sup>+/+</sup> [17]. Блокада Tlr9 с помощью модифицированных полинук-

merged group of patients was characterized by a relatively small AUC value (0.705), sensitivity being 57.0% and specificity being 82.5% (fig. 5, a); however, in groups of different genotypes (TLR9 CT, TT versus TLR9 CC), significantly different opposite values remote from the AUC value for the pooled sample of ICU patients ( $n=166$ ) were discovered. For instance, test sensitivity in patients of genotypes TLR9 CT, TT was lower than in patients of genotype TLR9 CC (fig. 5, b and fig. 5, c, respectively).

Table 4 shows the values of areas under the ROC curve (AUC) in sensitivity and specificity calculations and 95-percent confidence intervals of AUC values (95% CI), also cfDNA content cut-off values corresponding to each AUC value and optimal for each genotype.

Sepsis is characterized by multiple organ failure caused by an infection process [20]. Inflammatory responses induced by an infectious agent promote intensified cell death [26–27], the consequence being increased release of cfDNA into the circulation stream. It is known that the quantity of cfDNA of bacterial origin is drastically increased during established sepsis [17], nevertheless, it is much smaller than the quantity of circulating host DNA [4]. Its action on the body mediated by cellular receptors of DNA — TLR9, STING, NLRP3 — might be possible related particularly to circulating cfDNA of the body rather than bacterial DNA [4, 28–29]. In other words, in the context of probable molecular identity of CpG-containing ligands of these receptors of different origin — procaryotic (pathogen-associated molecular patterns or PAMP) and eucaryotic (damage-associated molecular patterns or DAMP) — during an infectious critical condition, the latter are the predominant ligands. This is supported by the available experimental and clinical data showing that during a critical condition including sepsis, cfDNA accumulates in circulation as a result of apoptosis, necrosis, and NETosis of cells [30]. Though active secretion of mitochondrial DNA as part of exosomes as a result of incomplete mitophagy in cells exposed to considerable cytoplasmic and oxidative stress typical for critical conditions is not inconceivable.

Investigations wherein DNA molecules with different CpG content of various bacterial origin were used as ligands revealed positive correlations between the concentration of CpG-segments in a DNA molecule and manifestation of the anti-inflammatory potential of the latter [16]. Other investigations (the model of experimental abdominal sepsis in rodents) established that in knockout Tlr9<sup>-/-</sup> mice, survivability during polybacterial sepsis was significantly higher than survivability of mice of genotype Tlr9<sup>+/+</sup> [17]. Tlr9 blocking with the help of modified polynucleotides assisted better survivability of sepsis mice. Recent clinical studies in a group of patients

леотидов способствовала лучшей выживаемости мышей с сепсисом. Недавние клинические исследования в группе пациентов с сепсисом выявили значение повышенного содержания циркулирующей вкДНК на момент поступления больных в ОРИТ как высокоинформативного маркера 28-дневной летальности [22]. Интересно, что ассоциация летальности при сепсисе и повышения концентрации вкДНК (в частности митохондриальной) исчезала при низкой плотности рецепторов TLR9 в клетках [28].

Данные нашего исследования показывают, что содержание вкДНК при абдоминальном и неабдоминальном сепсисе, а также ОНМК в группах пациентов из разных больниц значимо не отличаются. Это позволило увеличить выборку, суммировав данные разных больниц. Исследование на большем клиническом материале выявило, что наличие у пациентов с сепсисом не только повышенного содержания вкДНК, но и — одновременно — генетического варианта рецептора ДНК TLR9 с мутацией (замена тимина на цитозин) в гомозиготном состоянии (CC) приводила к наибольшей информативности предсказания летального исхода, значимо отличающейся от таковой у пациентов альтернативных генотипов (CT и TT). Полученные результаты, по нашим сведениям, являются первыми данными, свидетельствующими о наибольшей прогностической информативности комбинации сопряженных ДНК-зависимых маркеров при сепсисе-лиганда — молекулы ДНК и вариантного гена его рецептора TLR9.

Ранее было показано, что генотип TLR9 CC определяет повышенную чувствительность к передаче сигнала при взаимодействии TLR9 с лигандом ДНК. Можно полагать, что именно это лежит в основе механизма обнаруженного эффекта — комбинация двух патогенетически связанных, сопряженных молекулярных биомаркеров — генетического маркера рецептора и циркулирующего маркера-лиганда обладает наиболее значимым прогнозом летального исхода.

Дополнительным механизмом, определяющим патогенетическое значение TLR9-ДНК взаимодействия для развития жизнеугрожающего КС в ходе септического процесса, может явиться одновременная гиперстимуляция клеток вкДНК и бактериальными продуктами — эндотоксинами, из которых наиболее изучены липополисахариды (ЛПС). Последние взаимодействуют с другим рецептором — TLR4 [31], при этом передача сигнала с клеточной поверхности опосредуется через внутриклеточный белок MyD88, общий для передачи сигналов с TLR9 и TLR4. По данным Karin M et al (2018), при действии PAMPs *in vitro* на мыш-

with sepsis have discovered increased content of circulating cfDNA at the time of patient admission to ICU as a highly informative marker of 28-day mortality [22]. Interestingly, the association of mortality during sepsis and increased concentration of cfDNA (in particular, mitochondrial) disappeared at low density of TLR9 receptors in cells [28].

Our data show that there is no significant difference in the content of cfDNA during abdominal and non-abdominal sepsis also during ACVE in the groups of patients from different hospitals. That allowed enlarging the sample by summing up data from different hospitals. The investigation on the large clinical material revealed that when sepsis patients had not only an increased content of cfDNA, but simultaneously the genetic mutation (substitution of adenosine with cytosine) of DNA TLR9 receptor in the homozygotic state (CC), the informative value of lethal outcome prediction was the highest and significantly differed from that in patients of alternative genotypes (CA and AA). As far as we know, the results obtained are the first data evidencing the highest prognostic informative value of the combination of related DNA-dependent markers during sepsis — the ligand — DNA molecule and the variant gene of its receptor — TLR9.

It was shown earlier that genotype TLR9 162 CC determined an increased sensitivity to signal transduction during TLR9 interaction with the DNA ligand. It can be assumed that this is what underlies the mechanism of the effect discovered — the combination of two pathogenically related, complementary molecular biomarkers — the genetic marker of receptor and the circulating marker — the ligand, which gives the most significant prognosis of the lethal outcome.

An additional mechanism determining the pathogenic value of TLR9-DNA interaction for the development of a life-threatening critical condition in the course of septic process might be the simultaneous hyperstimulation of cells by cfDNA and bacterial products — endotoxins, of which lipopolysaccharides (LPS) being the most thoroughly studied. The latter interact with a different receptor — TLR4 [31], wherein signal transduction from the cell surface is mediated via intracellular protein MyD88, which is common for transmitting signals from TLR9 and TLR4. According to Karin M et al. (2018), when PAMPs act *in vitro* on mice macrophages, mitochondria start active production of DNA fragments (mtDNA), which, when they enter cytoplasm, activate inflammasome NLRP3 that subsequently activates caspase-1 facilitating transition of inactive molecules of cytokines IL-1b and IL18 into active state [28]. Interestingly, activation of inflammasome NLRP3 might also be caused by other DNA sequences including nuclear DNA. In sepsis patients, a parallel action of LPS and cfDNA on receptors TLR4 and TLR9, correspondingly, might possibly take

ные макрофаги митохондрии начинают активно продуцировать фрагменты ДНК (мтДНК), которые, выйдя в цитоплазму, активируют инфламмасому NLRP3 с последующей активацией каспазы-1, способствующей переходу неактивных молекул цитокинов IL-1b и IL18 в активное состояние [28]. Интересно, что активация инфламмасы NLRP3 может быть вызвана и другими последовательностями ДНК, в том числе — ядерной ДНК. Возможно, что у пациентов с сепсисом имеет место параллельное действие ЛПС и вкДНК на рецепторы TLR4 и TLR9, соответственно, что приводит к чрезмерной активации провоспалительного ответа, масштабированием клеточной гибели с повторным высвобождением фрагментов ДНК, нарушающих функционирование эндотелия сосудов. Считается, что именно последнее способствует нарушению перфузии тканей с последующим усугублением полиорганной недостаточности, непосредственно угрожающей жизни [32].

В группе пациентов с ОНМК повышения концентрации вкДНК в плазме не обнаружили, что может быть связано с несколькими причинами. Первая — это раннее время забора крови. Известно, что в острой фазе инсульта только формируется очаг некроза и, благодаря местному отеку тканей и относительной целостности гематоэнцефалического барьера, попадание вкДНК из зоны инсульта в циркуляцию в первые часы минимально [33]. В дальнейшем некротические массы лизируются, одновременно формируется зона пенумбры, где клетки головного мозга также постепенно погибают, повышается проницаемость ГЭБ, в результате чего циркулирующая вкДНК может увеличиваться [33–34]. Имеются единичные данные о повышении концентрации ДНК до 1000 нг/мл в первые сутки после инсульта [12], однако, остается неясным, велся ли отсчет времени от поступления пациентов в стационар или же от момента возникновения сосудистой катастрофы. Учитывая необходимость следования протоколам ведения пациентов с ишемическим инсультом, по которым показана (при отсутствии противопоказаний) реканализация в первые 3 часа после прекращения кровообращения [35], уровень вкДНК целесообразно определять неоднократно, например, до и после удаления тромба. К недостаткам данного исследования относится, помимо относительно небольшого объема выборки с учетом групп пациентов, однократность забора образцов крови для исследований содержания вкДНК. С учетом уже имеющихся данных о значении не нативной, а окисленной формы ДНК в активации инфламмасы

place leading to excessive activation of anti-inflammatory response, scaling up of cell death with repeated release of DNA fragments disturbing functioning of vascular endothelium. The latter is considered as assisting compromised perfusion of tissues followed by aggravation of multiple organ failure immediately threatening the life [32].

In the group of ACVE patients, no increase of plasma cfDNA concentration was found, which can be connected with several reasons. The first one is the early time of blood sampling. It is known that during the most acute phase of a stroke, the necrosis site is just being formed and, thanks to the local edema of tissue and relative intactness of blood-brain barrier, ingress of cfDNA from the stroke area into circulation is minimal during the first few hours [33]. Later, necrotic masses undergo lysis and at the same time a penumbra area is formed where brain cells die gradually too, permeability of the blood-brain barrier rises, as a result of which circulating cfDNA might increase [33–34]. There are sporadic data about increase of DNA concentration to 1000 ng/ml during the first 24 hrs. after stroke [12]; however, it remains unclear whether the time was counted from admission to hospital or from occurrence of the vascular catastrophe. Given the necessity to follow the management protocols for ischemic stroke patients, which prescribe (if there are no counter-indications) recanalization within the first 3 hours after stagnation of circulation [35], it would be useful to determine the cfDNA level more than once, for example, before and after thrombus removal. The drawbacks of this study, in addition to a relatively small sample considering groups of patients, is that blood for the analysis of cfDNA content was sampled only once. Taking into account already available data concerning the value of oxidized rather than native DNA in the activation of inflammasome NLRP3 [36], it is necessary to modify the study protocol to optimize the strategy of sepsis outcome prediction based on determination of cfDNA/oxidized cfDNA concentration.

## Conclusion

The findings have shown that the increased plasma cfDNA in patients with abdominal and non-abdominal sepsis is a meaningful marker of patient's mortality prediction. It has been demonstrated for the first time that the combination of two complementary, pathogenically significant for the development of life-threatening conditions during infection complications of critical conditions, biomarkers — genetic marker TLR9 (TLR9 CC) and increased plasma cfDNA — most fully inform about the risk of 30-day mortality of ICU patients. The data obtained can be used to optimize selection of patients during clinical studies of the effects of innovative targeted drugs — inhibitors of



NLRP3 [36], необходима модификация протокола исследования для оптимизации стратегии прогноза исхода сепсиса на основании определения концентрации вкДНК/окисленной вкДНК.

### Заключение

Результаты исследования показали, что повышенное содержание вкДНК в плазме пациентов с абдоминальным и неабдоминальным сепсисом является значимым маркером предикции летальности пациентов. Впервые показано, что сочетание двух сопряженных, патогенетически значимых для развития угрожающих жизни состояний при инфекционных осложнениях КС биомаркеров — генетического маркера TLR9 (TLR9 CC) и повышенного содержания вкДНК в плазме — наиболее полно информирует о риске 30-дневной летальности пациентов ОРИТ. Полученные данные могут быть использованы для оптимизации подбора пациентов при клинических исследованиях действия инновационных таргетных препаратов — ингибиторов рецепторов ДНК — TLR9 как части стратегии персонализации лечения пациентов с сепсисом.

### Литература

1. Jabaley C.S., Blum J.M., Groff R.F., O'Reilly-Shah V.N. Global trends in the awareness of sepsis: insights from search engine data between 2012 and 2017. *Crit Care*. 2018; 22: 7. PMID: 29343292. DOI: 10.1186/s13054-017-1914-8.
2. Sandquist M., Wong H.R. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Oct; 10(10): 1349-56. PMID: 25142036. PMID: PMC4654927. DOI: 10.1586/1744666X.2014.949675.
3. Nakada T.A., Takahashi W., Nakada E., Shimada T., Russell J.A., Walley K.R. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Cardiovascular Disease: Do Similar Risk Genes Suggest Similar Drug Targets? *Chest*. 2019 Jan 17. pii: S0012-3692(19)30013-3. PMID: 30660782. DOI: 10.1016/j.chest.2019.01.003.
4. Dwiwedi D.J., Tolt L.J., Swystun L.L., Pogue J., Liaw K.L., Weitz J.I., Cook DJ, Fox-Robichaud AE, Liaw PC. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2012; 16(4): R151. PMID: 22889177. PMID: PMC3580740. DOI: 10.1186/cc11466.
5. Vajpeyee A., Wijatmiko T., Vajpeyee M., Taywade O. Cell free DNA: A Novel Predictor of Neurological Outcome after Intravenous Thrombolysis and/or Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke Patients. *Neurointervention* 2018 Mar;13(1): 13-19. PMID: 29535894. DOI: 10.5469/neuroint.2018.13.1.13.
6. Sanchis J., García-Blas S., Ortega-Paz L., Dantas A.P., Rodríguez E., Abellán L., Brugaletta S., Valero E., Miñana G., Garabito M., Corchón Á., Núñez J., Carratalá A., Sabaté M. Cell-free DNA and Microvascular Damage in ST-segment Elevation Myocardial Infarction Treated With Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2018 Apr 11. PMID: 29655768. DOI: 10.1016/j.rec.2018.03.005.
7. Хубутия М.Ш., Шабанов А.К., Скулачев М.В., Булава Г.В., Савченко И.М., Гребенчиков О.А., Сергеев А.А., Зоров Д.Б., Зиновкин Р.А. Митохондриальная и ядерная ДНК у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2013. (6): 24-35. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-6-24.
8. Likhvantsev V.V., Landoni G., Grebenchikov O.A., Skripkin Y.V., Zabelina T.S., Zinovkina L.A., Prikhodko A.S., Lomivorotov V.V., Zinovkin R.A. Nuclear DNA as Predictor of Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft: A Pilot Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2017 Dec; 31(6): 2080-2085. PMID: 28967626. DOI: 10.1053/j.jvca.2017.04.051.
9. Gilbert S. F., Barresi M.J.B. Chapter 15 Neural Crest Cells and Axonal Specificity. *Developmental biology*. Sunderland, MA, USA: Oxford University Press; 2016: 509-510.
10. Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V., Rykova E.Y., Pysnyy D.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Circulating DNA and DNase

DNA receptors TLR9, as part of the strategy of personalization of sepsis patient management.

**Acknowledgment.** The authors express their sincere gratitude to Dr. Med. Sci N. A. Karpun (V. P. Demikhov Municipal Clinical Hospital, Moscow Health Department), Dr. Med. Sci A. V. Vlasenko (S. P. Botkin Municipal Clinical Hospital), and PhD Medicine I. N. Tyurin (V. M. Buyanov Municipal Clinical Hospital, Moscow Health Department) for continuous administrative support in collecting clinical material, doctor D. G. Moiseenko (S. P. Botkin Municipal Clinical Hospital) for collection of patients' biological specimens.

**Благодарность.** Авторы выражают искреннюю признательность д. м. н. Н. А. Карпуну (ГКБ им. В. П. Демикова ДЗМ), д. м. н. А. В. Власенко (ГКБ им. С. П. Боткина) и к. м. н. И. Н. Тюрину (ГКБ им. В. М. Буянова ДЗМ) за постоянную административную поддержку при осуществлении сбора клинического материала, врачу Д. Г. Моисеенко (ГКБ им. С. П. Боткина) за сбор биобразцов пациентов.

### References

1. Jabaley C.S., Blum J.M., Groff R.F., O'Reilly-Shah V.N. Global trends in the awareness of sepsis: insights from search engine data between 2012 and 2017. *Crit Care*. 2018; 22: 7. PMID: 29343292. DOI: 10.1186/s13054-017-1914-8.
2. Sandquist M., Wong H.R. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Oct; 10(10): 1349-56. PMID: 25142036. PMID: PMC4654927. DOI: 10.1586/1744666X.2014.949675.
3. Nakada T.A., Takahashi W., Nakada E., Shimada T., Russell J.A., Walley K.R. Genetic Polymorphisms in Sepsis and Cardiovascular Disease: Do Similar Risk Genes Suggest Similar Drug Targets? *Chest*. 2019 Jan 17. pii: S0012-3692(19)30013-3. PMID: 30660782. DOI: 10.1016/j.chest.2019.01.003.
4. Dwiwedi D.J., Tolt L.J., Swystun L.L., Pogue J., Liaw K.L., Weitz J.I., Cook DJ, Fox-Robichaud AE, Liaw PC. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2012; 16(4): R151. PMID: 22889177. PMID: PMC3580740. DOI: 10.1186/cc11466.
5. Vajpeyee A., Wijatmiko T., Vajpeyee M., Taywade O. Cell free DNA: A Novel Predictor of Neurological Outcome after Intravenous Thrombolysis and/or Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke Patients. *Neurointervention* 2018 Mar;13(1): 13-19. PMID: 29535894. DOI: 10.5469/neuroint.2018.13.1.13.
6. Sanchis J., García-Blas S., Ortega-Paz L., Dantas A.P., Rodríguez E., Abellán L., Brugaletta S., Valero E., Miñana G., Garabito M., Corchón Á., Núñez J., Carratalá A., Sabaté M. Cell-free DNA and Microvascular Damage in ST-segment Elevation Myocardial Infarction Treated With Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2018 Apr 11. PMID: 29655768. DOI: 10.1016/j.rec.2018.03.005.
7. Khubutia M.S., Shabanov A.K., Skulachev M.V., Bulava G.V., Savchenko I.M., Grebenchikov O.A., Sergeev A.A., Zorov D.B., Zinovkin R.A. Mitochondrial and Nuclear DNA in Patients with Severe Polytrauma. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*. 2013;9(6): 24 [In Russ]. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-6-24.
8. Likhvantsev V.V., Landoni G., Grebenchikov O.A., Skripkin Y.V., Zabelina T.S., Zinovkina L.A., Prikhodko A.S., Lomivorotov V.V., Zinovkin R.A. Nuclear DNA as Predictor of Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft: A Pilot Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2017 Dec; 31(6): 2080-2085. PMID: 28967626. DOI: 10.1053/j.jvca.2017.04.051.
9. Gilbert S. F., Barresi M.J.B. Chapter 15 Neural Crest Cells and Axonal Specificity. *Developmental biology*. Sunderland, MA, USA: Oxford University Press; 2016: 509-510.
10. Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V., Rykova E.Y., Pysnyy D.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Circulating DNA and DNase

- activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:191-6. PMID: 17108211. DOI: 10.1196/annals.1368.026
11. Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine.* Nov 1995, 182 (5) 1597-1601; PMID: 7595231. DOI:10.1084/jem.182.5.1597
  12. van der Vaar M., Pretorius P.J. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci.* 2008, 1137, P. 18-26. PMID:18837919. DOI:10.1196/annals.1448.022
  13. Hummel E.M., Hessas E., Müller S., Beiter T., Fisch M., Eibl A., Wolf O.T., Giebel B., Platen P., Kumsta R., Moser D.A. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Transl Psychiatry.* 2018 Oct 29;8(1): 236. PMID: 30374018. DOI: 10.1038/s41398-018-0264-x.
  14. Fernando M.R., Jiang C., Krzyzanowski G.D., Ryan W.L. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS One.* 2017; 12(8): PMID: 28850588. DOI: 10.1371/journal.pone.0183915.
  15. Du X., Poltorak A., Wei Y., Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw.* 2000 Sep;11(3): 362-71. PMID:11022119.
  16. Sabatel C., Radermecker C., Fievez L., Paulissen G., Chakarov S., Fernandes C., Olivier S., Toussaint M., Pirotin D., Xiao X., Quatresooz P., Sirard J.C., Cataldo D., Gillet L., Bouabe H., Desmet C.J., Ginhoux F., Marichal T., Bureau F. Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity.* 2017 Mar 21;46(3): 457-473. PMID: 28329706. DOI:10.1016/j.immuni.2017.02.016.
  17. Pliatas G., Burt B.M., Nguyen H.M., Bamboat Z.M., DeMatteo R.P. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med.* 2008 Jun 9;205(6): 1277-83. PMID:18474631. DOI: 10.1084/jem.20080162.
  18. Weighardt H., Kaiser-Moore S., Vabulas R.M., Kirschning C.J., Wagner H., Holzmann B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J Immunol.* 2002 Sep 15;169(6): 2823-7. PMID: 12218091. DOI: 10.4049/jimmunol.169.6.2823
  19. Chen K.H., Zeng L., Gu W., Zhou J., Du D.Y., Jiang J.X. Polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene associated with sepsis and multiple organ dysfunction after major blunt trauma. PMID: 21633947. *Br J Surg.* 2011 Sep;98(9): 1252-9. DOI: 10.1002/bjs.7532.
  20. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll, Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8): 801-810. PMID: 26903338. DOI:10.1001/jama.2016.0287.
  21. Napolitano L.M. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect (Larchmt).* 2018 Feb/Mar;19(2): 117-125. PMID: 29447109 DOI: 10.1089/sur.2017.278.
  22. Avriel A., Wiessman M. P., Almog Y., Perly Y., Novack V., Galante O., Klein M., Pencina M. J., Douvdevani A. Admission Cell Free DNA Levels Predict 28-Day Mortality in Patients with Severe Sepsis in Intensive Care. *PLoS One.* 2014; 9(6): e100514. PMID: 24955978. DOI:10.1371/journal.pone.0100514
  23. Bronkhorst M.W., Boyé N.D., Lomax M.A., Vossen R.H., Bakker J., Patka P., Van Lieshout EM. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor pathway increase susceptibility to infections in severely injured trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013 Mar;74(3): 862-70. PMID: 23425749. DOI: 10.1097/TA.0b013e31827e1534.
  24. Smelaya T.V., Belopolskaya O.B., Smirnova S.V., Kuzovlev A.N., Moroz V.V., Golubev A.M., Pabalan N.A., Salmikova L.E. Genetic dissection of host immune response in pneumonia development and progression. *Sci Rep.* 2016 Oct 11;6:35021. PMID: 27725770. DOI: 10.1038/srep35021.
  25. Чулаченко А.Г., Мязин А.Е., Кузовлев А.Н., Гапонов А.М., Тютельян А.В., Пороховник Л.Н., Голубев А.М., Писарев В.М. Аллельные варианты генов NRF2 и TLR9 при критических состояниях. *Общая реаниматология*, 2016, том 12, №4, с.8-23. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-4-8-23.
  26. Ayala A., Herdon C.D., Lehman D.L., Ayala C.A., Chaudry I.H. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood.* 1996 May 15;87(10): 4261-75. PMID: 8639785.
  27. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Almèri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi E., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., DeBerardinis R.J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., García-Sáez A.J., Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O,
- activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:191-6. PMID: 17108211. DOI: 10.1196/annals.1368.026
11. Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine.* Nov 1995, 182 (5) 1597-1601; PMID: 7595231. DOI:10.1084/jem.182.5.1597
  12. van der Vaar M., Pretorius P.J. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci.* 2008, 1137, P. 18-26. PMID:18837919. DOI:10.1196/annals.1448.022
  13. Hummel E.M., Hessas E., Müller S., Beiter T., Fisch M., Eibl A., Wolf O.T., Giebel B., Platen P., Kumsta R., Moser D.A. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Transl Psychiatry.* 2018 Oct 29;8(1): 236. PMID: 30374018. DOI: 10.1038/s41398-018-0264-x.
  14. Fernando M.R., Jiang C., Krzyzanowski G.D., Ryan W.L. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS One.* 2017; 12(8): PMID: 28850588. DOI: 10.1371/journal.pone.0183915.
  15. Du X., Poltorak A., Wei Y., Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw.* 2000 Sep;11(3): 362-71. PMID:11022119.
  16. Sabatel C., Radermecker C., Fievez L., Paulissen G., Chakarov S., Fernandes C., Olivier S., Toussaint M., Pirotin D., Xiao X., Quatresooz P., Sirard J.C., Cataldo D., Gillet L., Bouabe H., Desmet C.J., Ginhoux F., Marichal T., Bureau F. Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity.* 2017 Mar 21;46(3): 457-473. PMID: 28329706. DOI:10.1016/j.immuni.2017.02.016.
  17. Pliatas G., Burt B.M., Nguyen H.M., Bamboat Z.M., DeMatteo R.P. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med.* 2008 Jun 9;205(6): 1277-83. PMID:18474631. DOI: 10.1084/jem.20080162.
  18. Weighardt H., Kaiser-Moore S., Vabulas R.M., Kirschning C.J., Wagner H., Holzmann B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J Immunol.* 2002 Sep 15;169(6): 2823-7. PMID: 12218091. DOI: 10.4049/jimmunol.169.6.2823
  19. Chen K.H., Zeng L., Gu W., Zhou J., Du D.Y., Jiang J.X. Polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene associated with sepsis and multiple organ dysfunction after major blunt trauma. PMID: 21633947. *Br J Surg.* 2011 Sep;98(9): 1252-9. DOI: 10.1002/bjs.7532.
  20. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll, Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8): 801-810. PMID: 26903338. DOI:10.1001/jama.2016.0287.
  21. Napolitano L.M. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect (Larchmt).* 2018 Feb/Mar;19(2): 117-125. PMID: 29447109 DOI: 10.1089/sur.2017.278.
  22. Avriel A., Wiessman M. P., Almog Y., Perly Y., Novack V., Galante O., Klein M., Pencina M. J., Douvdevani A. Admission Cell Free DNA Levels Predict 28-Day Mortality in Patients with Severe Sepsis in Intensive Care. *PLoS One.* 2014; 9(6): e100514. PMID: 24955978. DOI:10.1371/journal.pone.0100514
  23. Bronkhorst M.W., Boyé N.D., Lomax M.A., Vossen R.H., Bakker J., Patka P., Van Lieshout EM. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor pathway increase susceptibility to infections in severely injured trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013 Mar;74(3): 862-70. PMID: 23425749. DOI: 10.1097/TA.0b013e31827e1534.
  24. Smelaya T.V., Belopolskaya O.B., Smirnova S.V., Kuzovlev A.N., Moroz V.V., Golubev A.M., Pabalan N.A., Salmikova L.E. Genetic dissection of host immune response in pneumonia development and progression. *Sci Rep.* 2016 Oct 11;6:35021. PMID: 27725770. DOI: 10.1038/srep35021.
  25. Chumachenko A.G., Myazin A.E., Kuzovlev A.N., Gaponov A.M., Tutehyan A.V., Porokhovnik L.N., Golubev A.M., Pisarev V.M. Allelic Variants of NRF2 and TLR9 Genes in Critical Illness. *Obschchaya reanimatologiya—General Reanimatology.* 2016;12(4): 8-23. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-4-8-23. [In Russ, In Engl].
  26. Ayala A., Herdon C.D., Lehman D.L., Ayala C.A., Chaudry I.H. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood.* 1996 May 15;87(10): 4261-75. PMID: 8639785.
  27. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Almèri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi E., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., DeBerardinis R.J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., García-Sáez A.J., Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O,

- Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema J.P., Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkenin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren , Overholtzer M, Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P, Prehn J.H.M., Put-halakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R, Rodrigues C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T, Ryan K.M., Sayan E. Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B. Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden M.G., Vil-lunger A. Virgin H.W, Vousden K.H., Vucic D, Wagner E.F, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar; 25(3): 486–541.PMID: 29362479, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
28. Krychtiuk K.A., Ruhittel S., Hohensinner P.J., Koller L., Kaun C., Lenz M., Bauer B., Wutzlhofer L., Draxler D.F, Maurer G., Huber K., Wojta J., Heinz G., Niessner A., Speidl W.S. Mitochondrial DNA and Toll-Like Receptor-9 Are Associated With Mortality in Critically Ill Patients. *Crit Care Med.* 2015 Dec;43(12): 2633-41. PMID: 26448617 doi:10.1097/CCM.0000000000001311.
29. Surpris G., Poltorak A. The expanding regulatory network of STING-mediated signaling. *Curr Opin Microbiol.* 2016 Aug;32:144-150. PMID: 27414485; PubMed Central DOI: 10.1016/j.mib.2016.05.014.
30. Hamaguchi S., Akeda Y., Yamamoto N., Seki M., Yamamoto K., Oishi K., Tomono K. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm.*, 015: 614518. PMID: 26273139. DOI: 10.1155/2015/614518.
31. Seeley J.J. Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol.* 2017 Jan;101(1): 107-119. PMID: 27780875 DOI: 10.1189/jlb.3MR0316-118RR.
32. Johansson P.I., Stensballe J., Ostrowski S.R. Shock induced endotheliopathy (SHINE) in acute critical illness - a unifying pathophysiologic mechanism. *Crit Care.* 2017 Feb 9;21(1): 25. PMID: 28179016. DOI: 10.1186/s13054-017-1605-5.
33. Xing C., Arai K., Lo E.H., Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke.* 2012 Jul; 7(5): 378–385, PMID: 22712739. DOI: 10.1111/j.1747-4949.2012.00839.x
34. Khatri R., McKinney AM, Swenson B., Janardhan V. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and haemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology.* 2012 Sep 25;79(13 Suppl 1): S52-7. PMID: 23008413 DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182697e70.
35. Powers WJ., Rabinstein A.A., Ackerson T., Adeoye O.M., Bambakidis N.C., Becker K., Biller J., Brown M., Demaerschalk B.M., Hoh B., Jauch E.C., Kidwell C.S., Leslie-Mazwi T.M, Ovbiagele B., Scott P.A., Sheth K.N., Southerland A.M., Summers D.V, Tirschwell D.L American Heart Association Stroke Council. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2018 Mar;49(3): e46-e110. PMID:29367334. DOI: 10.1161/STR.0000000000000158.
36. Krychtiuk K.A., Ruhittel S., Hohensinner P.J., Koller L., Kaun C., Lenz M., Bauer B., Wutzlhofer L., Draxler D.F, Maurer G., Huber K., Wojta J., Heinz G., Niessner A., Speidl W.S. Mitochondrial DNA and Toll-Like Receptor-9 Are Associated With Mortality in Critically Ill Patients. *Crit Care Med.* 2015 Dec; 43(12): 2633-41. PMID: 26448617 DOI: 10.1097/CCM.0000000000001311.
37. Zhong Z., Liang S., Sanchez-Lopez E., He F, Shalpour S., Lin X.J., Wong J., Ding S., Seki E., Schnabl B., Hevener A.L, Greenberg H.B, Kisseleva T., Karin M. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2018 Aug;560(7717): 198-203. PMID: 30046112, DOI: 10.1038/s41586-018-0372-z
- Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema J.P., Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkenin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren , Overholtzer M, Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P, Prehn J.H.M., Put-halakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R, Rodrigues C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T, Ryan K.M., Sayan E. Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B. Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden M.G., Vil-lunger A. Virgin H.W, Vousden K.H., Vucic D, Wagner E.F, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar; 25(3): 486–541.PMID: 29362479, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
28. Krychtiuk K.A., Ruhittel S., Hohensinner P.J., Koller L., Kaun C., Lenz M., Bauer B., Wutzlhofer L., Draxler D.F, Maurer G., Huber K., Wojta J., Heinz G., Niessner A., Speidl W.S. Mitochondrial DNA and Toll-Like Receptor-9 Are Associated With Mortality in Critically Ill Patients. *Crit Care Med.* 2015 Dec;43(12): 2633-41. PMID: 26448617 doi:10.1097/CCM.0000000000001311.
29. Surpris G., Poltorak A. The expanding regulatory network of STING-mediated signaling. *Curr Opin Microbiol.* 2016 Aug;32:144-150. PMID: 27414485; PubMed Central DOI: 10.1016/j.mib.2016.05.014.
30. Hamaguchi S., Akeda Y., Yamamoto N., Seki M., Yamamoto K., Oishi K., Tomono K. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm.*, 015: 614518. PMID: 26273139. DOI: 10.1155/2015/614518.
31. Seeley J.J. Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol.* 2017 Jan;101(1): 107-119. PMID: 27780875 DOI: 10.1189/jlb.3MR0316-118RR.
32. Johansson P.I., Stensballe J., Ostrowski S.R. Shock induced endotheliopathy (SHINE) in acute critical illness - a unifying pathophysiologic mechanism. *Crit Care.* 2017 Feb 9;21(1): 25. PMID: 28179016. DOI: 10.1186/s13054-017-1605-5.
33. Xing C., Arai K., Lo E.H., Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke.* 2012 Jul; 7(5): 378–385, PMID: 22712739. DOI: 10.1111/j.1747-4949.2012.00839.x
34. Khatri R., McKinney AM, Swenson B., Janardhan V. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and haemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology.* 2012 Sep 25;79(13 Suppl 1): S52-7. PMID: 23008413 DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182697e70.
35. Powers WJ., Rabinstein A.A., Ackerson T., Adeoye O.M., Bambakidis N.C., Becker K., Biller J., Brown M., Demaerschalk B.M., Hoh B., Jauch E.C., Kidwell C.S., Leslie-Mazwi T.M, Ovbiagele B., Scott P.A., Sheth K.N., Southerland A.M., Summers D.V, Tirschwell D.L American Heart Association Stroke Council. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2018 Mar;49(3): e46-e110. PMID:29367334. DOI: 10.1161/STR.0000000000000158.
36. Krychtiuk K.A., Ruhittel S., Hohensinner P.J., Koller L., Kaun C., Lenz M., Bauer B., Wutzlhofer L., Draxler D.F, Maurer G., Huber K., Wojta J., Heinz G., Niessner A., Speidl W.S. Mitochondrial DNA and Toll-Like Receptor-9 Are Associated With Mortality in Critically Ill Patients. *Crit Care Med.* 2015 Dec; 43(12): 2633-41. PMID: 26448617 DOI: 10.1097/CCM.0000000000001311.
37. Zhong Z., Liang S., Sanchez-Lopez E., He F, Shalpour S., Lin X.J., Wong J., Ding S., Seki E., Schnabl B., Hevener A.L, Greenberg H.B, Kisseleva T., Karin M. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2018 Aug;560(7717): 198-203. PMID: 30046112, DOI: 10.1038/s41586-018-0372-z

Поступила 14.04.19

Received 14.04.19