

УДК: 616.24-006.6+577.21

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ И БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

**А.А. Пономарева¹, Е.Ю. Рыкова², Н.В. Чердынцева¹, Т.Э. Скворцова²,
А.Ю. Добродеев¹, Н. В. Литвяков¹, А.А. Завьялов^{1,3}, С.А. Тузиков^{1,3},
В.В. Власов², П.П. Лактионов²**

НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск¹

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск²
ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Росздрава, г. Томск³
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5; e-mail: anastasia-ponomaryova@rambler.ru¹*

Определены концентрации метилированных и неметилированных форм генов опухолевой супрессии RAR β 2 и RASSF1A в свободно циркулирующих ДНК плазмы крови (цирДНК) и в циркулирующих ДНК, связанных с поверхностью клеток крови, и концентрации белковых маркеров (РЭА, CYFRA 21.1) в крови больных немелкоклеточным раком легкого до лечения. Показано, что индекс метилирования генов RASSF1A и RAR β 2, определенный как отношение концентрации метилированных копий гена к сумме концентраций метилированных и неметилированных копий в крови, позволяет дискриминировать больных НМРЛ от здоровых лиц с чувствительностью 90 % и специфичностью 82 %. Иммунохимическая детекция белковых онкомаркеров РЭА и CYFRA 21.1 позволяет дискриминировать больных НМРЛ от здоровых доноров с чувствительностью 43 % и 56 %, специфичностью 88 % и 97 %. Показана ассоциация между концентрацией эпигенетических (RAR β 2, RASSF1A, RAR β 2 + RASSF1A) и белковых онкомаркеров (РЭА, РЭА + CYFRA 21.1) в крови больных НМРЛ, отдельно для белкового маркера CYFRA 21.1 ассоциация не выявлена. Полученные данные свидетельствуют о том, что анализ индекса метилирования генов RASSF1A, RAR β 2 в сочетании с определением концентрации белковых маркеров РЭА и CYFRA 21.1 может быть более эффективен, чем детекция отдельных маркеров, при диагностике немелкоклеточного рака легкого.

Ключевые слова: циркулирующие ДНК, метилирование, гены опухолевой супрессии, белковые онкомаркеры, рак легкого.

COMPARATIVE ANALYSIS OF EPIGENETIC AND PROTEIN MARKERS IN BLOOD OF NON- SMALL-CELL LUNG CANCER PATIENTS

A.A. Ponomaryova¹, E.Yu. Rykova², N.V. Cherdyntseva¹, T.E. Skvortsova²,
A.Yu. Dobrodeev¹, N.V. Litvjakov¹, A.A. Zavyalov^{1,3}, S.A. Tuzikov^{1,3}, V.V. Vlassov², P.P. Laktionov²
Cancer Research Institute, Siberian Division of the RAMS, Tomsk¹

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division of the RAS, Novosibirsk²
Siberian State Medical University, Tomsk, Tomsk³*

5, Kooperativny Str., Tomsk-634050, Russia; e-mail: anastasia-ponomaryova@rambler.ru¹

RAR β 2 and RASSF1A methylation index has been measured in extracellular DNA circulating in blood plasma and being bound with surface of blood cells of non-small-lung cancer (NSCLC) patients before treatment. Concentration of protein markers (CEA and CYFRA 21.1) has been quantified in the blood plasma of the same lung cancer patients. The RASSF1A and RAR β 2 methylation index which calculated as the ratio of concentration of methylated gene copies by sum of the concentrations of methylated and unmethylated gene copies in blood provides the discrimination of NSCLC patients from healthy subjects with sensitivity and specificity of 90 % and 82 %. Immunochemical detection of CEA and CYFRA 21.1 protein markers provides the discrimination of NSCLC patients from healthy subjects with sensitivity of 43 % and 56 % and specificity of 88 % and 97 %. The association between concentration of

epigenetic (RAR β 2, RASSF1A, RAR β 2 + RASSF1A) and protein markers (CEA, CEA + CYFRA 21.1) has been shown in blood of NSCLC patients, but not for the CYFRA 21.1 separately. The data obtained demonstrate that the analysis of RAR β 2 and RASSF1A methylation index in combination with the protein markers concentration CEA and CYFRA 21.1 measuring is thought to be more effective than the detection of individual markers for lung cancer diagnostics.

Key words: circulating DNA, methylation, tumor suppressor genes, protein markers, lung cancer.

Рак легких (РЛ) занимает одно из ведущих мест в структуре общей летальности от онкологических заболеваний у мужчин, поскольку зачастую диагностируется на поздних стадиях. Известно, что своевременное выявление РЛ существенно повышает эффективность лечения. Так, 5-летняя выживаемость радикально пролеченных больных РЛ I стадии достигает 70 %, III стадии – 15 % [20]. Используемые в настоящее время методы диагностики РЛ малоэффективны для обнаружения опухоли до ее клинической манифестации. Белковые онкомаркеры (РЭА, CYFRA 21.1 и др.), детектируемые в сыворотке/плазме крови при помощи иммуноферментного анализа, несмотря на относительно высокую специфичность (до 97 %), не обладают достаточной чувствительностью – не более 60 % [8], что ограничивает их использование для ранней диагностики РЛ. Эти маркеры используются в основном для оценки эффективности лечения, мониторинга течения заболевания и для раннего выявления рецидива опухоли у больных, у которых отмечалось повышение уровня маркеров до лечения: до 70–87 % – для CYFRA 21.1 и до 58–65 % – для РЭА. Таким образом, поиск новых маркеров, пригодных для ранней диагностики РЛ, которые бы позволяли выявлять заболевание с более высокой чувствительностью, является актуальной задачей. В качестве таких маркеров наиболее перспективным представляется использование патогенетически значимых молекулярно-генетических маркеров, которые могут быть обнаружены в циркулирующей крови. Действительно, ДНК трансформированных (опухолевых) клеток обнаруживаются во внеклеточных ДНК, циркулирующих в плазме крови (цирДНК плазмы) [1], и могут быть использованы для малоинвазивной диагностики опухолей. В последние годы наблюдается экспоненциальный рост количества исследований, посвященных поиску онкомаркеров в составе свободно циркулирующих ДНК крови, которые могут быть использованы для диагностики злокачественных новообразований на ранних стадиях [12, 14, 21, 22].

Известно, что цирДНК не только свободно циркулируют в плазме крови, но и могут быть адсорбированы на поверхности форменных элементов крови [17, 22], при этом в составе цирДНК, связанных с клеточной поверхностью (скп-цирДНК), так же как и в ДНК плазмы, присутствуют ДНК-маркеры, характерные для клеток опухолей [2, 10, 15, 16]. Важную роль в возникновении и прогрессии злокачественных опухолей, наряду с генетическими повреждениями, играют эпигенетические изменения, которые возникают вследствие нарушения процессов метилирования ДНК и приводят к изменению экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию ключевых биологических процессов в клетке [1]. Использование aberrантно метилированных форм генов в качестве онкомаркеров представляется особенно перспективным, поскольку метилирование генов опухолевой супрессии характерно практически для всех типов опухолей, наблюдается уже на ранних стадиях злокачественной трансформации клеток, а aberrантно метилированная ДНК может быть легко выявлена в присутствии большого избытка неметилированной формы [1, 4, 18]. Показано, что метилированные формы генов RAR β 2, RASSF1A, p16, FHIT, APC могут рассматриваться в качестве потенциальных онкомаркеров РЛ [20].

Целью исследования явились сравнительный анализ эпигенетических маркеров (метилированные формы RAR β 2 и RASSF1A) в составе цирДНК крови и белковых онкомаркеров плазмы крови (РЭА и CYFRA 21.1) у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) и оценка чувствительности и специфичности диагностики опухолевого процесса, основанного на измерении концентрации этих маркеров.

Материал и методы

В исследование включено 55 больных НМРЛ T₁₋₃N₀₋₃M₀, с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 40–70 лет, находившихся на лечении в клинике НИИ онкологии СО РАМН с 2006 по 2009 г. Все больные получали комбинированное лечение, включавшее 2 курса

неoadъювантной химиотерапии по схеме паклитаксел + карбоплатин с последующим хирургическим вмешательством с интраоперационной лучевой терапией. Материалом для исследования служила венозная кровь, которую забирали до лечения. В качестве контроля была сформирована выборка из 32 практически здоровых мужчин (возрастной интервал – 35–60 лет, без онкологических заболеваний в анамнезе), проживающих на территории Западно-Сибирского региона. Все исследования проведены в соответствии с международными этическими правилами, получено разрешение этического комитета НИИ онкологии СО РАМН.

Венозную кровь собирали в 0,05 М раствор ЭДТА в фосфатно-солевом буфере (соотношение крови и ЭДТА 1:5). Образцы крови разделяли на плазму и клетки крови, фракцию цирДНК, связанных с клеточной поверхностью, получали последовательной обработкой клеток 5мМ фосфатным буфером и 0,125 % раствором трипсина, как описано ранее [19].

ДНК выделяли из 1 мл плазмы, 6 мл ФБ-ЭДТА и 2 мл трипсиновой фракции с помощью наборов «Blood DNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.» (Новосибирск, Россия). Образцы ДНК модифицировали бисульфитом натрия, очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «Bisulfite ssDNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.». Концентрацию метилированных и неметилированных форм генов опухолевой супрессии RASSF1A и RARβ2 в циркулирующих ДНК крови определяли с использованием количественной метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) [5, 16]. Индекс метилирования вычисляли по формуле $M (\%) = 100 \times (\text{число метилированных копий гена} / (\text{число метилированных копий} + \text{число неметилированных копий}))$ для цирДНК плазмы и скп-цирДНК. Концентрацию белковых маркеров в плазме крови исследовали иммуноферментным анализом при помощи коммерческих наборов: РЭА (Вектор-Бест, Россия), CYFRA 21.1. (DRG Enzyme Immunoassay Kit, Германия) – согласно инструкциям от производителя. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое,

среднее квадратичное отклонение и среднюю квадратичную ошибку. Статистическую значимость различий определяли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Чувствительность и специфичность маркеров оценивались с помощью ROC-анализа (MedCalc software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium).

Результаты и обсуждение

Гиперметилирование генов RASSF1A и RARβ2 выявляется с высокой чувствительностью – 45–60 % и 39–50 % соответственно в клетках НМПЛ [3, 7, 9, 11]. При этом чувствительность, с которой метилированные последовательности этих генов детектируются в составе циркДНК плазмы крови больных раком, ниже по сравнению с образцами опухолевой ткани и варьирует в зависимости от используемого метода детекции (37–54 % – для гена RARβ2 и 12–39 % – для гена RASSF1A) [6, 9].

Для того чтобы повысить чувствительность детекции метилированных форм генов опухолевой супрессии генов RASSF1A и RARβ2 при ПЛ, при помощи количественной МС-ПЦР были определены концентрации метилированных и неметилированных форм исследуемых генов в циркДНК плазмы крови и в скп-цирДНК. На основании полученных данных был рассчитан индекс метилирования каждого гена. Выявлено статистически значимое повышение индекса метилирования генов RASSF1A, RARβ2 в циркДНК плазмы и в скп-цирДНК у больных НМПЛ по сравнению со здоровыми донорами (табл. 1).

По данным ROC-анализа чувствительность и специфичность выявления рака легкого при определении метилирования гена RARβ2 в суммарных циркДНК (цирДНК плазмы и скп-цирДНК) составила 79 % и 70 % (для выбранного оптимального порогового значения индекса метилирования – 33 %), а гена RASSF1A – 83 % и 74 % (при пороговом значении индекса метилирования – 31 %). Полученные данные демонстрируют, что определение маркеров в суммарных циркДНК, чувствительность выявления метилированных форм исследуемых генов сопоставимо с чувствительностью детекции этих маркеров в образцах опухолевой ткани. Одновременная оценка индекса метили-

Таблица 1

Индекс метилирования генов RASSF1A и RARβ2 в цирДНК крови у больных НМРЛ с разными гистологическими формами и стадиями заболевания

Сравниваемые группы	RASSF1A		RARβ2	
	Скп-цирДНК	ЦирДНК плазмы крови	Скп-цирДНК	ЦирДНК плазмы крови
Здоровые доноры (n=32)	20 ± 4 %	25 ± 4 %	16 ± 3 %	17 ± 2 %
НМРЛ, общая группа (n=55)	39 ± 4 %*	45 ± 7 %*	36 ± 4 %*	51 ± 4 %*
НМРЛ I–II стадии (n=26)	39 ± 5 %	41 ± 5 %	26 ± 4 %	50 ± 5 %
НМРЛ III стадии (n=29)	37 ± 5 %	47 ± 6 %	43 ± 6 %*	51 ± 6 %
ПКРЛ (n=36)	38 ± 5 %	44 ± 5 %	37 ± 5 %	50 ± 5 %
Аденокарцинома (n=19)	39 ± 7 %	46 ± 7 %	38 ± 7 %	55 ± 6 %

Примечания: ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого; * – различия статистически значимы (критерий Манна–Уитни, p<0,05).

Таблица 2

Превышение порогового уровня белковых маркеров в крови больных с разными гистологическими формами и стадиями заболевания

Сравниваемые группы	РЭА		CYFRA 21.1	
	+	-	+	-
Здоровые доноры	2/32 (6 %)	30/32 (94 %)	1/32 (3 %)	31/32 (97 %)
НМРЛ, общая группа	15/55 (27 %)	40/55 (73 %)	33/55 (60 %)	22/55 (40 %)
НМРЛ I–II стадии	6/26 (23 %)	20/26 (77 %)	14/26 (54 %)	12/26 (46 %)
НМРЛ III стадии	9/29 (31 %)	20/29 (69 %)	19/29 (66 %)	10/29 (34 %)
ПКРЛ	6/37 (16 %)	31/37 (84 %)	21/37 (57 %)	16/37 (43 %)
Аденокарцинома	9/18 (50 %)	9/18 (50 %)	12/18 (67 %)	16/18 (33 %)

рования обоих генов позволяет повысить как чувствительность, так и специфичность анализа. Действительно, превышение порогового уровня индекса метилирования хотя бы одного из генов (RASSF1A или RARβ2) в цирДНК плазмы и скп-цирДНК позволяет дискриминировать заболевших НМРЛ от здоровых лиц с чувствительностью 90 % и специфичностью 82 %.

Индекс метилирования гена RARβ2 в цирДНК ассоциирован со стадией заболевания. У больных НМРЛ III стадии индекс метилирования гена RARβ2 в цирДНК плазмы и фракций крови, связанных с клеточной поверхностью, статистически значимо выше, чем у больных НМРЛ I–II стадии и в контрольной группе. Взаимосвязи между индексом метилирования гена RASSF1A в суммарных цирДНК (скп-цирДНК и цирДНК плазмы) и стадией заболевания не выявлено (табл. 1).

Для сравнения аналитических характеристик методов, основанных на анализе эпигенетических и белковых маркеров, в тех же образцах

крови, которые были использованы для детекции эпигенетических маркеров, был определен уровень белковых маркеров РЭА, CYFRA 21.1. Показано, что анализы, основанные на иммунохимической детекции белковых онкомаркеров характеризуются чувствительностью 43 % и специфичностью 88 % для РЭА, 56 % и 97 % – для CYFRA 21.1 соответственно. Одновременный анализ уровней РЭА и CYFRA 21.1 практически не приводит к повышению чувствительности – 57 %, но при этом отмечается некоторое снижение специфичности – до 92 %. Повышенный уровень РЭА наблюдался значительно чаще в группе больных с аденокарциномой по сравнению с группой больных с ПКРЛ (критерий Фишера, p=0,008) (табл. 2). Статистически значимых корреляций между повышенным уровнем белковых маркеров и стадией заболевания не выявлено.

В крови всех больных НМРЛ с повышенным уровнем белковых онкомаркеров обнаружено изменение индекса метилирования хотя бы

Таблица 3

Корреляция повышенного уровня эпигенетических онкомаркеров с белковыми маркерами в крови больных НМРЛ

Маркер	РЭА	СУFRA 21.1	РЭА + СУFRA 21.1
RARβ2	+	-	+
RASSF1A	+	-	+
RARβ2+RASSF1A	+	-	+

Таблица 4

Аналитические характеристики одновременного анализа двух белковых онкомаркеров (РЭА + СУFRA 21.1), двух эпигенетических онкомаркеров (RARβ2 + RASSF1A) и белковых и эпигенетических маркеров

Характеристика анализа	RARβ2 + RASSF1A	РЭА + СУFRA 21.1
Чувствительность	90 %	57 %
Специфичность	82 %	92 %

одного из генов опухолевой супрессии. Среди здоровых лиц одновременное повышение уровня белковых маркеров в крови (СУFRA 21.1) и индекса метилирования наблюдалось в 1 случае. Выявлена взаимосвязь между концентрациями эпигенетических и белковых маркеров в крови больных НМРЛ. Показано, что повышение индекса метилирования 1 (RARβ2 или RASSF1A) или 2 генов (RARβ2 и RASSF1A) ассоциировано с увеличением концентрации белкового маркера РЭА и 2 маркеров в комбинации РЭА + СУFRA 21.1. Статистически значимой взаимосвязи между индексом метилирования исследуемых генов и концентрацией белкового маркера СУFRA 21.1 не выявлено (критерий Фишера, $p > 0,05$) (табл. 3).

Отсутствие значимой корреляции между индексом метилирования одного гена (RARβ2 или RASSF1A) либо двух генов (RARβ2 и/или RASSF1A) и концентрацией белкового маркера СУFRA 21.1 позволяет сделать вывод о том, что эти показатели могут быть использованы в качестве независимых, дополняющих друг друга маркеров, отражающих разные механизмы патогенеза рака легкого.

Сравнительный анализ аналитических характеристик методов основанных на определении белковых маркеров, и статуса метилирования генов опухолевой супрессии, показал, что чувствительность анализа белковых онкомаркеров существенно ниже по сравнению с анализом ДНК-маркеров в крови (табл. 4). Вероятно, это

связано с тем, что aberrантное метилирование ДНК является ранним событием, а чувствительность количественной ПЦР, используемой для детекции эпигенетических маркеров значительно превышает чувствительность иммуноаналитических систем [5]. Повышенный уровень синтеза белковых маркеров является признаком уже трансформированной клетки и выявляется на более поздних этапах [13] и с меньшей чувствительностью. В связи с этим сочетание использования исследуемых показателей (метилированные формы генов RASSF1A, RARβ2 и повышение уровня РЭА и СУFRA 21.1), отражающих разные этапы патогенеза, может повысить эффективность диагностики рака легкого.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о связи индекса метилирования генов опухолевой супрессии RARβ2 и RASSF1A в пуле цирДНК (цирДНК плазмы и цирДНК, связанных с клеточной поверхностью) как с развитием, так и прогрессией рака легкого. Одновременная детекция концентрации метилированных/неметилированных форм двух генов (RARβ2, RASSF1A) как в цирДНК плазмы, так и в скп-цирДНК позволяет повысить и чувствительность, и специфичность выявления рака легкого. Анализ индекса метилирования генов опухолевой супрессии RASSF1A, RARβ2 в сочетании с определением концентрации белковых маркеров (РЭА, СУFRA 21.1) может быть более эффективен, чем детекция отдельных маркеров, при диагностике рака легкого.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 09–04–01334–а, частичным финансированием в рамках интеграционного проекта Президиума СО РАН № 12, проекта № 21.2 Программы 21 фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки – медицине», ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», Госконтракт № П256.

ЛИТЕРАТУРА

1. Залетаев Д.В. Системы молекулярных маркеров в ДНК-диагностике онкозаболеваний // Молекулярная медицина. 2005. № 1. С. 10–17.
2. Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В. и др. Анализ уровень метилирования гена RAR β 2 в циркулирующих ДНК крови у больных раком легкого как потенциального прогностического маркера // Вопросы онкологии. 2011. Т. 57, № 3. С. 302–307.
3. De Jong W.K., Verpooten G.F., Kramer H. et al. Promoter methylation primarily occurs in tumor cells of patients with non-small cell lung cancer // Anticancer Res. 2009. Vol. 29 (1). P. 363–369.
4. Esteller M. Epigenetics in cancer // N. Engl. J. Med. 2008. Vol. 358 (11). P. 1148–1159.
5. Fackler M.J., McVeigh M., Mehrotra J. et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer // Cancer Res. 2004. Vol. 64 (13). P. 4442–4452.
6. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1775 (1). P. 181–232.
7. Fujiwara K., Fujimoto N., Tabata M. et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer // Clin. Cancer Res. 2005. Vol. 11 (3). P. 1219–1225.
8. Holdenrieder S., von Pawel J., Dankelmann E. et al. Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer // Clin. Cancer Res. 2008. Vol. 14 (23). P. 7813–7821.
9. Hsu H.S., Chen T.P., Hung C.H. et al. Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma // Cancer. 2007. Vol. 110 (9). P. 2019–2026.
10. Jahr S., Hentze H., Englisch S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells // Cancer Res. 2001. Vol. 61 (4). P. 1659–1665.
11. Kim J.S., Kim J.W., Han J. et al. Cohypermethylation of p16 and FHIT promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer // Cancer Res. 2006. Vol. 66 (8). P. 4049–4054.
12. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y. et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004. Vol. 23 (6–7). P. 879–883.
13. Ocak S., Sos M.L., Thomas R.K., Massion P.P. High-throughput molecular analysis in lung cancer: insights into biology and potential clinical applications // Eur. Respir. J. 2009. Vol. 34 (2). P. 489–506.
14. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V. et al. // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. Ed. P.B. Gahan. UK: Springer, 2011. P. 41–45.
15. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V. et al. RAR β 2 gene methylation level in the circulating DNA from blood of patients with lung cancer // Eur. J. Cancer Prev. 2011. Jul. 26. [Epub ahead of print]. doi: 10.1097/CEJ.0b013e3283498eb4.
16. Skvortsova T.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Binding and penetration of methylated DNA into primary and transformed human cells // Ann. NY Acad. Sci. 2008. Vol. 1137. P. 36–40.
17. Skvortsova T.E., Bryzgunova O.E., Lebedeva A.O. et al. // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. Ed. P.B. Gahan. UK: Springer, 2011. P. 185–194.
18. Sulewska A., Niklinska W., Kozlowski M. et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology // Folia Histochem. Cytobiol. 2007. Vol. 45 (3). P. 149–158.
19. Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Rykova E.Y. et al. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors // Clin. Chem. 2005. Vol. 51 (7). P. 1317–1319.
20. Travis W.D., Brambilla E., Muller Hermelink H.K., Harris C.C. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization Classification of Tumors, 2004. P. 1–344.
21. van der Drift M.A., Hol B.E., Klaassen C.H. et al. Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer // Lung Cancer. 2010. Vol. 68 (2). P. 283–287.
22. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers // Curr. Mol. Med. 2010. Vol. 10 (2). P. 142–165.

Поступила 6.09.11