

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006.04-07:577.113

*В.Н. Кондратова, И.В. Ботезату, В.П. Шелепов, А.В. Лихтенштейн***ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА***ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация:***Анатолий Владимирович Лихтенштейн, заведующий лабораторией биохимии опухолей НИИ канцерогенеза***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(499)324-17-79**e-mail:** alicht@crc.umos.ru

Статья поступила 18.03.2013; принята к печати 09.07.2013.

Резюме

Присутствие в крови и других биологических жидкостях организма нуклеиновых кислот (ДНК, мРНК, микроРНК) обусловлено как распадом клеток (апоптозом, некрозом), так и продукцией ими специфических, содержащих нуклеиновые кислоты, органелл (экзосом, микровезикул, апоптотических пузырьков). Гуморальная среда служит средством утилизации клеточных отходов в первом случае, межклеточной кооперации – во втором. Циркулирующие в кровотоке нуклеиновые кислоты, происходящие из раковых клеток, могут служить маркерами опухолевого роста. В обзоре представлены данные о диагностическом потенциале циркулирующих нуклеиновых кислот, о достижениях и проблемах этого направления исследований.

Ключевые слова: диагностика опухолей, плазма крови, ДНК, мРНК, микроРНК.*V.N. Kondratova, I.V. Botezatu, V.P. Shelepov, A.V. Lichtenstein***CELL-FREE NUCLEIC ACIDS AS MARKERS OF TUMOR GROWTH***FBSI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

The presence in blood and other body fluids of nucleic acids (DNA, mRNA, miRNA) is due to both cell death (apoptosis, necrosis) and cell production of specific nucleic acid-containing organelles (exosomes, shedding microvesicles, apoptotic blebs). Humoral medium serves as a means of waste disposal, in the first case, and a means of cell communication, in the second. Circulating nucleic acids derived from cancer cells may serve as markers of tumor growth. Diagnostic potential of circulating nucleic acids, the achievements, and problems of this field of research are considered.

Key words: cancer diagnostics, blood plasma, DNA, mRNA, microRNA.**Введение**

В серологии, предметом которой до последнего времени были почти исключительно иммунологические реакции между антигенами и антителами, появилась новая глава: циркулирующие в крови внеклеточные (свободные) нуклеиновые кислоты (ДНК, мРНК, микроРНК). Новые методические возможности (в частности, высокопроизводительное полногеномное секвенирование) значительно расширили и во многом изменили наши представления о природе, возможных функциях и диагностическом потенциале этих молекул. Если еще недавно их рассматривали исключительно как следствия клеточного распада, в последнее время приходит понимание того, что некоторая часть циркулирующих нуклеиновых кислот участвует в особом виде гуморальной регуляции (горизонтальном переносе генетической информации). В свободном состоянии или, скорее, в составе специализированных органелл (экзосом) они играют важную роль в межклеточной кооперации, а в организме онкологического больного – во взаимодействии и взаимовлиянии опухолевых и нормальных клеток [38; 66].

Поскольку в кровотоке собирается ДНК и РНК всех тканей организма (они постоянно обновляются, вследствие чего ежедневно в организме

взрослого человека распадается $\sim 10^{11}$ клеток [75]), появляется принципиальная возможность обнаружения в крови чужеродных (отличающихся от клеток “дикого” типа) генетических элементов: вирусных ДНК [77; 78], ДНК клеток плода (в кровотоке беременной женщины) [81], ДНК и РНК злокачественно трансформированных клеток [109].

Последний аспект наиболее важен. Тестирование плазмы (или сыворотки) крови онкологических больных на предмет присутствия в ней «опухолевых» нуклеиновых кислот служит нескольким целям.

Во-первых, такая «жидкостная биопсия» (*liquid biopsy* [33]) крайне желательна в тех нередких, особенно на ранней стадии процесса, случаях, когда присутствующий в опухоли и ответственный за ее лекарственную устойчивость клон количественно незначителен [33; 86].

Во-вторых, обычная биопсия, позволяющая получить одиночные фрагменты, зачастую не дает полного представления о клональной гетерогенности и мутационном «профиле» всей опухоли [48].

В-третьих, «жидкостная биопсия», будучи малоинвазивным подходом, может выполняться многократно, до и после удаления опухолевого очага, что позволяет следить за ходом заболевания и оценивать эффективность лечения. Преимущество ДНК-маркеров (в сравнении с давно известными

маркерами-белками) – онкоспецифичность (т.е. непосредственная, причинно-следственная, а не косвенная связь с канцерогенезом) и универсальность (нет опухолевой клетки без того или иного генетического или эпигенетического дефекта). К числу не преодоленных пока проблем этого нового подхода можно отнести множественность маркеров, отсутствие (у некоторых из них) тканевой специфичности, недостаточная стандартизация методов.

В данном обзоре рассматриваются диагностические аспекты анализа циркулирующих нуклеиновых кислот: его возможности, перспективы и существующие проблемы.

Циркулирующие нуклеиновые кислоты: происхождение

Циркулирующие в кровотоке ДНК, обнаруженные свыше 60 лет назад [83], стали в последнее время объектом внимания экспериментаторов и клиницистов в качестве перспективных опухолевых маркеров [103]. Известно, что в крови человека содержится свободных (внеклеточных) нуклеиновых кислот при некоторых патологических процессах (онкологическое заболевание, воспаление, травма и т.п.) повышено. Так, в крови онкологических больных обнаружены происходящие из опухолевых клеток фрагменты ДНК с характерными абберациями (мутантный *K-RAS*, измененные микросателлитные последовательности, метилированные CpG-островки в промоторах генов-супрессоров) [4; 21; 39; 90; 112; 135], а также «опухолевые» мРНК [46; 88] и микроРНК [72; 87].

Присутствие в крови здоровых лиц и онкологических больных циркулирующих ДНК и РНК (цДНК и цРНК) обусловлено, по-видимому, двумя процессами: клеточным распадом (апоптозом и некрозом) и клеточной секрецией [45; 115]. Апоптоз и некроз (последний характерен для опухолевой ткани из-за присущей ей гипоксии) ведут к высвобождению клеточного содержимого, фрагментации молекул и их фагоцитозу [26; 60]. Циркулирующие в кровотоке опухолевые клетки также могут вносить вклад в пул внеклеточных молекул [101; 102]. Несмотря на высокую эффективность фагоцитоза, часть нуклеиновых кислот, не включенных в апоптотические тельца, оказывается в кровотоке [75]. В зависимости от механизма клеточной гибели и молекулярной структуры, они в разной степени подвержены воздействию агрессивной по отношению к ним (богатой нуклеазами) внеклеточной среды: двунитевые и находящиеся в комплексе с нуклеосомами ДНК защищены лучше, чем однонитевые мРНК, а наиболее устойчивы микроРНК – в силу своих малых (22–24 оснований) размеров. Отмечена имеющая практическое значение закономерность: нормальные клетки претерпевают, как правило, упорядоченный процесс апоптоза с образованием и поступлением в кровоток дискретных фрагментов преимущественно мононуклеосомного размера (~150 пар оснований), тогда как для опухолевых клеток более характерен некроз (образующиеся при этом ДНК гетерогенны и имеют размер в интервале 200–400 пар оснований) [26; 60; 62; 115]. В зависимости от стадии процесса и, соответственно, от размера опухоли доля «опухолевых» ДНК варьирует в широких пределах (от 3 до 93 % общей массы цДНК) [61]. Уровень ДНК определяется динамическим равновесием противоположных процессов: ее поступления в кровоток (в результате клеточного распада и секреции) и выведения из него (из-за гидролиза нуклеазами, поглощения

клетками печени, экскреции почками). Клиренс цДНК весьма эффективен [10]: время ее полужизни в крови составляет ~15 мин, хотя в некоторых случаях, при снижении функциональных способностей организма, может составлять несколько часов [44].

Циркулирующие нуклеиновые кислоты могут существовать, по-видимому, в свободном состоянии или в ассоциации с клеточной поверхностью (эти альтернативные формы характерны, соответственно, для опухолевых и нормальных клеток [22; 71; 98; 111], что представляет большой интерес как с фундаментальной, так и практической точек зрения). Вероятно, определенную роль в утилизации продуктов клеточного распада играет белок плазмы крови SAP, который связывается с хроматином, солюбилизирует его (вытесняя гистон H1) и предохраняет от действия ДНКаз. SAP связывается с апоптотическими тельцами и с продуктами некротического клеточного распада [7]. Фракционирование ДНК и РНК плазмы крови методами центрифугирования и фильтрации выявляет «нефильтруемую» фракцию, ассоциированную, видимо, с крупными структурами [25; 92]. В составе последних (ими являются, вероятно всего, апоптотические тельца и/или экзосомы) внеклеточные ДНК и РНК могут участвовать в «горизонтальном» переносе генетической информации и межклеточной кооперации [38; 55; 56; 58; 66; 96; 122].

Циркулирующие нуклеиновые кислоты: маркеры опухолевого роста

Движущей силой канцерогенеза является накопление в соматических клетках дефектов протоонкогенов, супрессоров и ряда других функционально значимых генов [36; 50]. Наиболее часто обнаруживаемые мутации (*driver mutations*), определяющие канцерогенез, подвергаются углубленному (верифицирующему) экспериментальному анализу и становятся, в ряде случаев, объектом клинических тестов. В отличие от широкомасштабных экспериментов полногеномного секвенирования, направленных на выявление всех присутствующих в опухоли мутаций (их тысячи), верифицирующие и диагностические исследования имеют дело с ограниченным набором уже отобранных на первом этапе наиболее значимых «мишеней» (последние рассматривают как возможные опухолевые маркеры). Действительно, обнаружение специфически измененных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях организма (кровь, лимфа, естественные выделения) может сигнализировать о появлении опухоли. При этом значимость генетического дефекта как маркера опухолевого роста определяется такими факторами, как степень ассоциации с онкологической патологией (насколько часто встречается при разных опухолях), простота и надежность выявления.

Соответственно генетическим и эпигенетическим нарушениям, лежащим в основе канцерогенеза, обнаруживаемые в крови маркеры подразделяют на несколько типов:

- а) мутации онкогенов и генов-супрессоров (кластерные, сосредоточенные в пределах 1–3 кодонов, как в случае онкогена *RAS*, или рассеянные по длине гена, как в случае генов-супрессоров *TP53* и *APC*);
- б) феномен потери гетерозиготности (LOH, loss of heterozygosity – исчезновение одной аллели какого-либо гетерозиготного локуса), что обычно служит указанием на делецию гена-супрессора;

- в) аберрантное метилирование так называемых CpG-островков в промоторах генов-супрессоров.

Кроме того, показателями онкологической патологии могут служить:

- а) увеличение концентрации и степени полимерности цДНК;
б) появление в крови специфических вирусных последовательностей;
в) накопление специфических мРНК и микроРНК.

Концентрация ДНК

Есть свидетельства диагностической значимости повышенного уровня цДНК, который, возможно, отражает растущую массу опухоли [65; 89; 113; 124]. Это, возможно, является следствием пониженной у онкологических больных ДНКазной активности плазмы крови [23; 24; 125]. Показано, что интервал значений цДНК в крови онкологических больных составляет 0–1000 нг/мл (в среднем 180 нг/мл) [3; 105; 120], тогда как у здоровых лиц этот показатель значительно ниже (0–100 нг/мл, в среднем – 30 нг/мл) [44]. Отмечено также снижение уровня цДНК в крови больного после удаления опухолевого очага [15]. Хотя связь повышенного уровня ДНК с онкологическим процессом была обнаружена и в ряде других работ [64; 133], большая вариабельность этого показателя внутри каждой из исследованных групп, и, кроме того, значительное межгрупповое перекрытие интервалов значений, снижают до некоторой степени его диагностическую значимость. С учетом этих обстоятельств кажется оправданным оценивать уровень цДНК как вспомогательный показатель и использовать его в комплексе с другими маркерами.

Степень полимерности ДНК

Результаты, опубликованные в 2012 г. консорциумом ENCODE, существенно изменили наши представления о структуре генома человека и о функции не кодирующих белки последовательностей [126]. Последние в значительной степени состоят из многократно повторяющихся транспозонов и ретротранспозонов [42]. Множественность семейства *ALU* (в геноме человека присутствуют сотни тысяч копий этого транспозона, принадлежащего к классу SINE) делает эти последовательности удобным объектом генетического анализа, поскольку многократно повышает шансы их обнаружения в биологических жидкостях организма.

Как отмечено выше, нормальные клетки распадаются обычно с образованием дискретных мононуклеосомных фрагментов, тогда как для распада некротизированных опухолевых масс более характерны крупные и гетерогенные фрагменты [26; 60; 62; 115]. Возможность дискриминировать таким относительно простым способом (по размеру) фрагменты ДНК, происходящие из нормальных и опухолевых клеток, была использована с целью диагностики [131; 132]. Методом количественного ПЦР в реальном времени оценивали соотношение ампликонов разного размера (247 и 115 пар оснований), синтезированных на матрице циркулирующих в крови последовательностей *ALU* (многокопийность последних обеспечивает высокую чувствительность теста). Действительно, степень полимерности циркулирующей ДНК (о которой судили по соотношению масс ампликонов) у онкологических больных оказалась достоверно выше, чем у здоровых доноров [17; 40; 99; 131; 132]. Этот показатель оказался полезным средством мониторинга патологического процесса.

Потеря гетерозиготности (ЛОН)

Возможность обнаружения этого феномена, заключающегося в исчезновении в «опухолевой» ДНК одной из двух аллелей гетерозиготного локуса, кажется *a priori* невероятной в условиях избытка цДНК дикого типа (обладающей обеими аллелями). Тем не менее, ЛОН во многих случаях выявлена [9; 11; 101; 104; 110; 114; 119; 123], что свидетельствует об ощутимой доле «опухолевой» фракции в тотальной цДНК. Подтверждающие это предположение данные получены при ее («опухолевой» ДНК) определении по степени метилирования промотора гена-супрессора *CDKN2A* (этот эпигенетический показатель специфичен для раковых клеток; см. ниже). Оказалось, что доля «опухолевой» цДНК в тотальной цДНК варьирует в широких пределах (от 3 до 93 %) [60]. Расхождения в результатах, полученных разными исследователями (ЛОН иногда не удается выявить) [44], обусловлены, видимо, рядом технических трудностей: относительно низкой концентрацией цДНК в плазме крови, ее фрагментацией, значительным иногда избытком ДНК дикого типа [30; 34; 53; 70].

Мутации опухоль-специфических генов

«Драйвер»-мутации, наиболее часто обнаруживаемые во многих опухолях, затрагивают относительно небольшое число функционально важных генов: *K-RAS*, *TP53*, *APC*, *BRAF*, *EGFR*, *PTEN*, *RB*, *MYC*. Эти дефекты могут быть ограничено специфичны для опухоли определенного типа (например, *APC* – для рака толстой кишки [34], *K-RAS* – для опухолей толстой кишки и поджелудочной железы [47; 129], *BRAF* – для меланомы [107], *EGFR* – для рака легких [68]). Их тестирование в составе цДНК используют для раннего выявления опухолевого очага, мониторинга уже возникшей опухоли, оценки эффективности лечения [32]. Анализ цДНК крови (жидкостная биопсия) – малоинвазивная процедура, обеспечивающая мониторинг процесса в условиях, когда обычная биопсия невозможна (например, после удаления опухоли) [103].

Реализацию этих возможностей в ряде случаев затрудняет, помимо известных проблем (низкая концентрация мутантных последовательностей, избыток аллелей дикого типа, фрагментация ДНК), множественность мутаций: так, в противоположность онкогену *K-RAS*, мутации которого сконцентрированы на небольшом пространстве (чаще всего кодоны 12–13), у гена-супрессора *TP53* – десятки функционально значимых мутаций, рассеянных на пространстве нескольких экзонов. Это обстоятельство усложняет анализ и требует применения методов массового параллельного секвенирования [84].

Аберрантное метилирование

Метилирование ДНК приводит к стабильному подавлению транскрипции (*silencing*) соответствующего локуса [41]. В норме оно затрагивает, в основном, повторяющиеся последовательности: многие повторы, накапливавшиеся в геноме человека на протяжении эволюции, по-видимому, функционально бесполезны, другие (транспозоны и ретротранспозоны) – потенциально опасны. Основной мишенью метилирования ДНК является динуклеотид CpG, распределение которого в геноме человека может быть рассеянным (~80 % общего числа) или кластерным в виде так называемых «CpG-островков» (~20 %). Последние локализованы преимущественно в промоторах структурных генов [100].

Опухолевые клетки характеризуются крупномасштабными изменениями системы метилирования ДНК: общим деметилированием генома и локаль-

ным его гиперметилированием (первое затрагивает, в основном, «рассеянные» CpG, тогда как последнее – CpG-островки [6; 74]). Локальное гиперметилирование промотора инактивирует прилежащий ген: стерическое препятствие, создаваемое метильной группой цитозина и связывающимися с ним белками, исключает возможность ассоциации транскрипционных факторов [51]. Аберрантное метилирование гена-супрессора («эпимутация») фенотипически равносильна его мутации [63].

Имеется множество свидетельств определяющей роли аберрантного метилирования ДНК в возникновении и прогрессии опухолей человека. Гены-супрессоры *p16^{ink4a}* [121; 127; 128], *p15^{ink4b}*, *HIC* (hypermethylated in cancer), *WAF*, *VHL*, *E-cad* [6], *Rb1* (и родственные ему гены) [35], *hMLH1* [52] инактивированы во многих опухолях именно таким образом.

Для анализа метилирования последовательностей ДНК обычно используют пары рестрикционных эндонуклеаз (чувствительных и не чувствительных к метилированию цитозина): например, *HpaII* и *MspI*; *TaqI* и *Sau 3A*; *SmaI* и *XmaI*. Широкое применение нашел также метод бисульфитной обработки ДНК, приводящий к дезаминированию цитозина с образованием урацила (метилированные остатки цитозина остаются интактными). Этот прием позволяет либо подобрать праймеры, избирательно амплифицирующие специфические метилированные CpG-островки, либо посредством полногеномного секвенирования определить «паттерн» метилирования *in toto* [8].

Аберрантно метилированные промоторы генов-супрессоров – наиболее частый и диагностически значимый объект при анализе цДНК. Их постоянно находят и используют для мониторинга роста опухоли у больных наиболее распространенными формами онкологических заболеваний (опухоль простаты, толстой кишки, яичников, легких, яичников, поджелудочной железы) [103].

Вирусные последовательности

Значительная часть (15–20 %) онкологических заболеваний имеет вирусную этиологию: вирусы папилломы и гепатита В человека (HPV и HBV, соответственно) вносят значительный вклад в заболеваемость раком шейки матки и печени. Присутствие специфических вирусных последовательностей в составе циркулирующих ДНК может служить важным диагностическим показателем. Так, нарастание числа копий ДНК HBV в крови после хирургического удаления опухоли печени свидетельствует с высокой вероятностью о рецидиве заболевания [67].

Рак носоглотки – одна из наиболее распространенных форм злокачественных новообразований, ассоциированных с вирусной инфекцией [54]. Этиологическим фактором является вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), эндемичным районом – Китай, Тайвань, Гонконг [43]. В крови больных раком носоглотки методом ПЦР постоянно находят последовательности вирусной ДНК, что позволяет создать на этой основе надежный скрининг-тест [17; 73; 77; 78; 80]; динамика изменений числа копий вирусной ДНК позволяет вести мониторинг заболевания и оценить эффективность лечения [79; 108]. В эндемичном районе (Россия) отмечены некоторые особенности динамики изменений числа копий вирусной ДНК у больных опухолями головы и шеи [37].

Циркулирующие мРНК

Учитывая чрезвычайную чувствительность одноклеточных нуклеиновых кислот к нуклеазам,

трудно было рассчитывать на возможность их выявления в обладающих высокой нуклеазной активностью биологических жидкостях организма [94; 134]. Тем не менее, в плазме и сыворотке крови онкологических больных обнаруживают мРНК различных генов, что согласуется с представлением об их включении в некие защитные комплексы (предположительно, экзосомы) [27; 95].

Как и при исследовании ДНК, были приняты попытки оценить степень полимерности циркулирующих мРНК. При этом исходили из того факта, что в плазме крови онкологических больных активность РНКаз значительно повышена. Действительно, определение методом ПЦР в реальном времени соотношения числа копий концевых и начальных участков модельной мРНК (гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) обнаружило существенное (и коррелирующее со стадией заболевания) снижение этого показателя у больных раком носоглотки [134].

Для выявления циркулирующих мРНК используют обычно гибридизацию с последовательностями микрочипов или количественную ОТ-ПЦР [93]. Таким способом показана высокая диагностическая значимость уровня мРНК hTERT (обратной транскриптазы теломеразы) и EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) в сыворотке крови больных раком легких [88]. Присутствие в плазме крови мРНК циклина D1 и тимидилатсинтазы оказалось неблагоприятным прогностическим признаком нечувствительности к гормонотерапии у больных раком молочной железы [46].

Хотя присутствие специфических мРНК в крови онкологических больных может иметь большое диагностическое и прогностическое значение, очевидно также, что этот подход требует дальнейшей верификации на больших контингентах больных.

Циркулирующие микроРНК

Открытие механизма регуляции внутриклеточных процессов посредством микроРНК, отмеченное Нобелевской премией 2006 г., – одно из главных событий молекулярной биологии последних лет [49]. Зрелые микроРНК (22–24 нуклеотида) являются продуктом сложного процессинга РНК-предшественников, синтезирующихся на ядерных генах (в клетках человека их число в пределах 1000). Несомненно важная роль этих молекул в канцерогенезе: в пролиферации клеток, апоптозе, эпителиально-мезенхимальном переходе, взаимодействии опухоли и микроокружения, метастазировании [1; 5; 13; 31; 130].

Эти факты предопределяют большой интерес к исследованию циркулирующих микроРНК. С методической точки зрения их анализ сопряжен с рядом особенностей: с одной стороны, они оказались чрезвычайно стабильными (в значительной степени благодаря малым размерам), но, с другой стороны, по той же причине – крайне неудобными для амплификации. Последнее обстоятельство обусловило необходимость разработать особый дизайн праймеров для ОТ-ПЦР [19]. Кроме того, оказалась весьма трудной проблема нахождения адекватных внутренних контролей для нормализации получаемых количественных результатов [103].

Тем не менее, за короткое время, прошедшее с момента обнаружения повышенного уровня микроРНК в крови больного лимфомой в 2008 г. [72], исследование их «профиля» у онкологических больных стало одним из наиболее перспективных направлений молекулярной диагностики рака [20; 28; 29; 85; 87; 130]. Так, оказалось, что уровень

циркулирующей miR-34a у больных раком молочной железы повышается по мере развития первичной опухоли и при возникновении метастазов [97]; характерное сочетание («сигнатура») четырех микроРНК (miR-486, miR-30d, miR-1 и miR-499) может служить надежным прогностическим показателем у больных немелкоклеточным раком легких [57]; уровень miR-92 позволяет дифференцировать опухоли толстой кишки и желудка [91]. Учитывая быстрый прогресс в этой области, можно прогнозировать расширение этих исследований и внедрение их результатов в клиническую практику.

Трансренальные ДНК

Существование «трансрентальной» (т.е., преодолевшей почечный барьер) ДНК, способной быть объектом генетического анализа, впервые показано в 2000 г. [10]. Позднее в составе цДНК, выделенной из мочи беременных женщин, были обнаружены также короткие фрагменты ДНК плода, т.е., преодолевшие в дополнение к почечному еще и плацентарный барьер [2; 59; 69; 76; 82; 106; 116]. При исследовании трансрентальных фрагментов больных легочным туберкулезом выявлены фрагменты ДНК туберкулезной палочки [14], больных раком носоглотки – вирусная ДНК ВЭБ [18], больных опухолями поджелудочной железы и толстой кишки – происходящие из опухолевых клеток мутантные

последовательности K-RAS [16; 76; 116–118]. Тем самым продемонстрирована принципиальная пригодность данного способа (неинвазивного и не ограниченного количеством исходного клинического материала) для пренатальной диагностики плода, выявления присутствующих в организме инфекционных агентов и опухолевых клеток.

Выводы

Генодиагностика рака, основанная на анализе циркулирующих в биологических жидкостях нуклеиновых кислот и использующая последние достижения фундаментальной онкологии, находится на пороге широкого внедрения в клиническую практику. На современном этапе ее развития становится необходимой стандартизация всех этапов сложной «технологической цепи»: условий получения и хранения биологического материала; методов выделения и количественной оценки полученных образцов (ДНК, РНК, микроРНК); условий применения аналитических процедур: секвенирования, микрочипов, ПЦР, плавления ДНК.

Необходим свод правил, подобных тем, что были установлены ранее в отношении количественной ОТ-ПЦР [12].

Литература

1. *Рязанский С.С., Гвоздев В.А.* Короткие РНК и канцерогенез // Биохимия – 2008. – 73. – P. 640–55.
2. *Al Yatama M.K., Mustafa A.S., Ali S. et al.* Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction // Prenat. Diagn. – 2001. – 21. – P. 399–402.
3. *Allen D., Butt A., Cahill D. et al.* Role of cell-free plasma DNA as a diagnostic marker for prostate cancer // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2004. – 1022. – P. 76–80.
4. *An Q., Liu Y., Gao Y. et al.* Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients // Cancer Lett. – 2002. – 188. – P. 109–14.
5. *Bartel D.P.* MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // Cell – 2009. – 136. – P. 215–33.
6. *Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R. et al.* Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia // Adv. Cancer Res – 1998. – 72. – P. 141–96.
7. *Bickerstaff M.C., Botto M., Hutchinson W.L. et al.* Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity // Nat Med – 1999. – 5. – P. 694–7.
8. *Bock C.* Analysing and interpreting DNA methylation data // Nat Rev Genet – 2012. – 13. – P. 705–19.
9. *Boddy J.L., Gal S., Malone P.R. et al.* Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease // Clin. Cancer Res. – 2005. – 11. – P. 1394–9.
10. *Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G. et al.* Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism // Clin. Chem. – 2000. – 46. – P. 1078–84.
11. *Bruhn N., Beinert T., Oehm C. et al.* Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2000. – 906. – P. 72–82.
12. *Bustin S.A., Benes V., Garson J.A. et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // Clin. Chem. – 2009. – 55. – P. 611–22.
13. *Calin G.A., Croce C.M.* MicroRNA signatures in human cancers // Nat Rev Cancer – 2006. – 6. – P. 857–66.
14. *Cannas A., Goletti D., Girardi E. et al.* Mycobacterium tuberculosis DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2008. – 12. – P. 146–51.
15. *Catarino R., Ferreira M.M., Rodrigues H. et al.* Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer // DNA Cell Biol. – 2008. – 27. – P. 415–21.
16. *Chan A.K., Chiu R.W., Lo Y.M.* Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis // Ann. Clin. Biochem. – 2003. – 40. – P. 122–30.
17. *Chan K.C., Leung S.F., Yeung S.W. et al.* Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients // Clin. Cancer Res. – 2008. – 14. – P. 4141–5.
18. *Chan K.C., Leung S.F., Yeung S.W. et al.* Quantitative Analysis of the Transrenal Excretion of Circulating EBV DNA in Nasopharyngeal Carcinoma Patients // Clin Cancer Res – 2008. – Vol. 14. – P. 4809–4813.
19. *Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J. et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucleic Acids Res – 2005. – 33. – P. e179.
20. *Chen X., Ba Y., Ma L. et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // Cell Res – 2008. – 18. – P. 997–1006.
21. *Chen X.Q., Stroun M., Magnenat J.L. et al.* Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients // Nat. Med. – 1996. – 2. – P. 1033–5.
22. *Cherepanova A.V., Bushuev A.V., Duzhak T.G. et al.* Ku protein as the main cellular target of cell-surface-bound circulating DNA // Expert. Opin. Biol. Ther. – 2012. – 12(Suppl 1). – P. S35–S41.
23. *Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E. et al.* Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of

- patients with prostate tumors // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 218–21.
24. Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Vlasov V.V., Laktionov P.P. Blood deoxyribonuclease activity in health and diseases // *Biomed. Khim.* – 2007. – 53. – P. 488–96.
 25. Chiu R.W., Poon L.L., Lau T.K. et al. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma // *Clin. Chem.* – 2001. – 47. – P. 1607–13.
 26. Choi J.J., Reich C.F., III, Pisetsky D.S. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells // *Immunology* – 2005. – 115. – P. 55–62.
 27. Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more // *Trends Cell Biol.* – 2009. – 19. – P. 43–51.
 28. Cortez M.A., Bueso-Ramos C., Ferdin J. et al. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2011. – 8. – P. 467–77.
 29. Cortez M.A., Calin G.A. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2009. – 9. – P. 703–11.
 30. Coulet F., Blons H., Cabelguenne A. et al. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P. 707–11.
 31. Croce C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – 10. – P. 704–14.
 32. De Roock W., Biesmans B., De Schutter J., Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer // *Mol. Diagn. Ther.* – 2009. – 13. – P. 103–14.
 33. Diaz Jr L.A., Williams R.T., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers // *Nature* – 2012. – 486. – P. 537–40.
 34. Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 2005. – 102. – P. 16368–73.
 35. Du Y., Carling T., Fang W. et al. Hypermethylation in human cancers of the RIZ1 tumor suppressor gene, a member of a histone/protein methyltransferase superfamily // *Cancer Res.* – 2001. – 61. – P. 8094–9.
 36. Eifert C., Powers R.S. From cancer genomes to oncogenic drivers, tumour dependencies and therapeutic targets // *Nat Rev Cancer* – 2012. – 12. – P. 572–8.
 37. Кондратова В.Н., Пирогова Н.А., Степина В.Н. и др. Маркеры вируса Эпштейна-Барр при раке носоглотки // *ВЕСТНИК РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* – 2012. – Т. 23. – С. 33–9.
 38. Eldh M., Ekstrom K., Valadi H. et al. Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA // *PLoS ONE* – 2010. – 5. – P. e15353.
 39. Ellinger J., Haan K., Heukamp L.C. et al. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer // *Prostate* – 2008. – 68. – P. 42–9.
 40. Ellinger J., Wittkamp V., Albers P. et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer // *J. Urol.* – 2009. – 181. – P. 363–71.
 41. Esteller M., Herman J.G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours // *J. Pathol.* – 2002. – 196. – P. 1–7.
 42. Fedoroff N.V. Transposable Elements, Epigenetics, and Genome Evolution // *Science* – 2012. – 338. – P. 758–67.
 43. Feng B.J., Huang W., Shugart Y.Y. et al. Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4 // *Nat Genet* – 2002. – 31. – P. 395–9.
 44. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey // *Biochim. Biophys. Acta* – 2007. – 1775. – P. 181–232.
 45. Gahan P.B., Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 1–6.
 46. Garcia V., Garcia J.M., Pena C. et al. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome // *Cancer Lett.* – 2008. – 263. – P. 312–20.
 47. Gautschi O., Huegli B., Ziegler A. et al. Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients // *Cancer Lett.* – 2007. – 254. – P. 265–73.
 48. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing // *N. Engl. J. Med* – 2012. – 366. – P. 883–92.
 49. Ghildiyal M., Zamore P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe // *Nat Rev Genet* – 2009. – 10. – P. 94–108.
 50. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer // *Nature* – 2012. – 481. – P. 306–13.
 51. Hendrich B., Tweedie S. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals // *Trends Genet.* – 2003. – 19. – P. 269–77.
 52. Herman J.G., Umar A., Polyak K. et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 1998. – 95. – P. 6870–5.
 53. Hibi K., Robinson C.R., Booker S. et al. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients // *Cancer Res.* – 1998. – 58. – P. 1405–7.
 54. Hildesheim A., Levine P.H. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review // *Epidemiol. Rev* – 1993. – 15. – P. 466–85.
 55. Holcik M. Deadly revenge: uptake of oncogenes from apoptotic bodies // *Trends Genet.* – 2001. – 17. – P. 491.
 56. Holmgren L., Szeles A., Rajnavolgyi E. et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies // *Blood* – 1999. – 93. – P. 3956–63.
 57. Hu Z., Chen X., Zhao Y. et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – 28. – P. 1721–6.
 58. Huan J., Hornick N.I., Shurtleff M.J. et al. RNA Trafficking by Acute Myelogenous Leukemia Exosomes // *Cancer Research* – 2013. – 73. – P. 918–29.
 59. Illanes S., Denbow M.L., Smith R.P. et al. Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine // *Prenat. Diagn.* – 2006. – 26. – P. 1216–8.
 60. 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. – 61. – P. 1659–65.
 61. Jian G., Songwen Z., Ling Z. et al. Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2010. – 136. – P. 1341–6.
 62. Jiang N., Reich C.F., Pisetsky D.S. The role of macrophages in generation of circulation blood nucleosomes from dead and dying cells // *Blood* – 2003. – P. 2002–2010.
 63. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond // *Nat Rev Genet* – 2012. – 13. – P. 484–92.
 64. Kamat A.A., Baldwin M., Urbauer D. et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker // *Cancer* – 2010. –

116. – P. 1918–25.
65. *Kamat A.A., Sood A.K., Dang D. et al.* Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – 1075. – P. 230–4.
66. *Kharaziha P., Ceder S., Li Q., Panaretakis T.* Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle // *Biochim. Biophys. Acta* – 2012. – 1826. – P. 103–11.
67. *Kim B.K., Park J.Y., Kim d.Y. et al.* Persistent hepatitis B viral replication affects recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection // *Liver Int.* – 2008. – 28. – P. 393–401.
68. *Kimura H., Fujiwara Y., Sone T. et al.* EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib // *Br. J. Cancer* – 2006. – 95. – P. 1390–5.
69. *Koide K., Sekizawa A., Iwasaki M. et al.* Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women // *Prenat. Diagn.* – 2005. – 25. – P. 604–7.
70. *Kopreski M.S., Benko F.A., Kwee C. et al.* Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer // *Br. J. Cancer* – 1997. – 76. – P. 1293–9.
71. *Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y. et al.* Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – 1022. – P. 221–7.
72. *Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M. et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma // *Br. J. Haematol.* – 2008. – 141. – P. 672–5.
73. *Leung S.F., Zee B., Ma B.B. et al.* Plasma Epstein-Barr viral deoxyribonucleic acid quantitation complements tumor-node-metastasis staging prognostication in nasopharyngeal carcinoma // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – 24. – P. 5414–8.
74. *Lichtenstein A.V., Kissel'jova N.P.* DNA methylation and carcinogenesis // *Biochemistry (Mosc.)* – 2001. – 66. – P. 235–55.
75. *Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R.* Circulating nucleic acids and apoptosis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. – 945. – P. 239–49.
76. *Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R.* Novel applications of polymerase chain reaction to urinary nucleic acid analysis // *Methods Mol. Biol.* – 2006. – 336. – P. 145–54.
77. *Lo Y.M., Chan A.T., Chan L.Y. et al.* Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P. 6878–81.
78. *Lo Y.M., Chan L.Y., Lo K.W. et al.* Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Res.* – 1999. – 59. – P. 1188–91.
79. *Lo Y.M., Leung S.F., Chan L.Y. et al.* Kinetics of Plasma Epstein-Barr Virus DNA during Radiation Therapy for Nasopharyngeal Carcinoma // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P. 2351–5.
80. *Lo Y.M., Leung S.F., Chan L.Y. et al.* Plasma cell-free Epstein-Barr virus DNA quantitation in patients with nasopharyngeal carcinoma. Correlation with clinical staging // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – 906. – P. 99–101.
81. *Lo Y.M.D., Chan K.C.A., Sun H. et al.* Maternal Plasma DNA Sequencing Reveals the Genome-Wide Genetic and Mutational Profile of the Fetus // *Science Translational Medicine* – 2010. – 2. – P. 61ra9.1
82. *Majer S., Bauer M., Magnet E. et al.* Maternal urine for prenatal diagnosis--an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester // *Prenat. Diagn.* – 2007. – 27. – P. 1219–23.
83. *Mandel P., Metais P.* Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. // *C. R. Acad. Sci. Paris* – 1948. – 142. – P. 241–3.
84. *Margulies M., Egholm M., Altman W.E. et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // *Nature* – 2005. – 437. – P. 376–80.
85. *Melkonyan H.S., Feaver W.J., Meyer E. et al.* Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 73–81.
86. *Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer // *Nature* – 2012. – 486. – P. 532–6.
87. *Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 2008. – 105. – P. 10513–8.
88. *Miura N., Nakamura H., Sato R. et al.* Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer // *Cancer Sci.* – 2006. – 97. – P. 1366–73.
89. *Mouliere F., Robert B., Arnau Peyrotte E. et al.* High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA // *PLoS ONE* – 2011. – 6. – P. e23418.
90. *Nawroz H., Koch W., Anker P. et al.* Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients // *Nat. Med.* – 1996. – 2. – P. 1035–7.
91. *Ng E.K., Chong W.W., Jin H. et al.* Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening // *Gut* – 2009. – 58. – P. 1375–81.
92. *Ng E.K., Tsui N.B., Lam N.Y. et al.* Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals // *Clin Chem.* – 2002. – 48. – P. 1212–17.
93. *O'Driscoll L., Kenny E., Mehta J.P. et al.* Feasibility and relevance of global expression profiling of gene transcripts in serum from breast cancer patients using whole genome microarrays and quantitative RT-PCR // *Cancer Genomics Proteomics.* – 2008. – 5. – P. 94–104.
94. *Шаном В.С.* Нуклеазы. – Издательство «Медицина», 1967. – 20. – P. 22–6.
95. *Orozco A.F., Lewis D.E.* Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma // *Cytometry A* – 2010. – 77. – P. 502–14.
96. *Peinado H., Aleckovic M., Lavotshkin S. et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET // *Nat Med* – 2012. – 18. – P. 883–91.
97. *Roth C., Rack B., Muller V. et al.* Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2010. – 12. – P. R90.
98. *Rykova E.Y., Laktionov P.P., Skvortsova T.E. et al.* Extracellular DNA in breast cancer: Cell-surface-bound, tumor-derived extracellular DNA in blood of patients with breast cancer and nonmalignant tumors // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – 1022. – P. 217–20.
99. *Salani R., Davidson B., Fiegl M. et al.* Measurement of cyclin E genomic copy number and strand length in cell-free DNA distinguish malignant versus benign effusions // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 5805–9.
100. *Schubeler D.* Epigenetic Islands in a Genetic Ocean // *Science* – 2012. – 338. – P. 756–7.
101. *Schwarzenbach H., Alix-Panabieres C., Muller I. et al.* Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – 15. – P. 1032–8.
102. *Schwarzenbach H., Chun F.K., Lange I. et al.* Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate

- cancer // *Int. J. Cancer* – 2007. – 120. – P. 1465–71.
103. *Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K.* Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients // *Nat Rev Cancer* – 2011. – 11. – P. 426–37.
104. *Schwarzenbach H., Pantel K., Kemper B. et al.* Comparative evaluation of cell-free tumor DNA in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2009. – 11. – P. R71.
105. *Schwarzenbach H., Stoehlmacher J., Pantel K., Goekkurt E.* Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 190–6.
106. *Shekhtman E.M., Anne K., Melkonyan H.S. et al.* Optimization of transrenal DNA analysis: detection of fetal DNA in maternal urine // *Clin. Chem.* – 2009. – 55. – P. 723–9.
107. *Shinozaki M., O'Day S.J., Kitago M. et al.* Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 2068–74.
108. *Shotelersuk K., Khorprasert C., Sakdikul S. et al.* Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – 6. – P. 1046–51.
109. *Sidransky D.* Emerging molecular markers of cancer // *Nat. Rev. Cancer* – 2002. – 2. – P. 210–9.
110. *Silva J.M., Silva J., Sanchez A. et al.* Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – 8. – P. 3761–6.
111. *Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N. et al.* Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation // *Br. J. Cancer* – 2006. – 94. – P. 1492–5.
112. *Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H. et al.* Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 1994. – 3. – P. 67–71.
113. *Sozzi G., Conte D., Leon M. et al.* Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – 21. – P. 3902–8.
114. *Sozzi G., Conte D., Mariani L. et al.* Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients // *Cancer Res.* – 2001. – 61. – P. 4675–8.
115. *Stroun M., Maurice P., Vasioukhin V. et al.* The origin and mechanism of circulating DNA // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – 906. – P. 161–8.
116. *Su Y.H., Wang M.E., Block T.M. et al.* Transrenal DNA as a Diagnostic Tool: Important Technical Notes // *Ann NY Acad Sci* – 2004. – 1022. – P. 81–9.
117. *Su Y.H., Wang M., Aiamkitsumrit B. et al.* Detection of a K-RAS mutation in urine of patients with colorectal cancer // *Cancer Biomarkers* – 2005. – 1. – P. 177–82.
118. *Su Y.H., Wang M., Brenner D.E. et al.* Human Urine Contains Small, 150 to 250 Nucleotide-Sized, Soluble DNA Derived from the Circulation and May Be Useful in the Detection of Colorectal Cancer // *J Mol Diagn* – 2004. – 6. – P. 101–7.
119. *Sunami E., Shinozaki M., Higano C.S. et al.* Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients // *Clin. Chem.* – 2009. – 55. – P. 559–67.
120. *Sunami E., Vu A.T., Nguyen S.L. et al.* Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1137. – P. 171–4.
121. *Suzuki H., Itoh F., Toyota M. et al.* Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer // *Int. J. Cancer* – 1999. – 83. – P. 309–13.
122. *Swami M.* Cancer: Exosomes from the stroma // *Nat Med* – 2013. – 19. – P. 142.
123. *Taback B., Giuliano A.E., Hansen N.M. et al.* Detection of tumor-specific genetic alterations in bone marrow from early-stage breast cancer patients // *Cancer Res.* – 2003. – 63. – P. 1884–7.
124. *Taback B., O'Day S.J., Hoon D.S.* Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – 1022. – P. 17–24.
125. *Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V. et al.* Circulating DNA and DNase activity in human blood // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2006. – 1075. – P. 191–6.
126. *The ENCODE Project Consortium.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome // *Nature* – 2012. – 489. – P. 57–74.
127. *Toyota M., Ahuja N., Ohe-Toyota M. et al.* CpG island methylator phenotype in colorectal cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* – 1999. – 96. – P. 8681–6.
128. *Toyota M., Ho C., Ahuja N. et al.* Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification // *Cancer Res.* – 1999. – 59. – P. 2307–12.
129. *Trevisiol C., Di F.F., Nascimbeni R. et al.* Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutations in colorectal cancer with distant metastases // *Int. J. Biol. Markers* – 2006. – 21. – P. 223–8.
130. *Tricoli J.V., Jacobson J.W.* MicroRNA: Potential for Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis // *Cancer Research* – 2007. – 67. – P. 4553–5.
131. *Umetani N., Giuliano A.E., Hiramatsu S.H. et al.* Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – 24. – P. 4270–6.
132. *Umetani N., Kim J., Hiramatsu S. et al.* Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats // *Clin. Chem.* – 2006. – 52. – P. 1062–9.
133. *Wimberger P., Roth C., Pantel K. et al.* Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients // *Int. J. Cancer* – 2011. – 128. – P. 2572–80.
134. *Wong B.C., Chan K.C., Chan A.T. et al.* Reduced plasma RNA integrity in nasopharyngeal carcinoma patients // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – 12. – P. 2512–6.
135. *Wong I.H., Lo Y.M., Yeo W. et al.* Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – 6. – P. 3516–21

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ENCODE	– Encyclopedia of DNA Elements,
SAP	– serum amyloid P (components),
SINE	– short interspersed elements),
LOH	– loss-of-heterozygosity.