

УДК 616.24-006.6-07:575

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЛЕГКОГО

© 2011 г. А. А. Пономарева¹, Е. Ю. Рыкова^{2*}, Н. В. Чердынцева¹, Е. Л. Чойнзонов¹,
П. П. Лактионов², В. В. Власов²

¹Научно-исследовательский институт онкологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук,
Томск, 634001

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630117

Поступила в редакцию 19.05.2010 г.

Принята к печати 31.05.2010 г.

В обзоре рассмотрены современные подходы (генетические, эпигенетические, белковые, транскриптомные, протеомные, метаболомные, с участием микроРНК) к выявлению опухолевых маркеров рака легкого (РЛ) различной природы. Основное внимание уделяется, как наиболее перспективным, эпигенетическим маркерам, поскольку эпигенетическая модификация является одним из наиболее ранних событий опухолевой трансформации. Особое место в обзоре занимают сведения об онкомаркерах, циркулирующих в биологических средах организма. Эти маркеры могут быть использованы для малоинвазивной диагностики заболевания до его клинического проявления, для скрининга групп риска, мониторинга ремиссии опухоли после терапии, а также для уточнения диагноза при использовании клиничко-инструментальных методов обследования. Обсуждается возможность разработки на основе внеклеточных ДНК, циркулирующих в крови, диагностических маркеров для раннего выявления РЛ, для предсказания эффективности противоопухолевых препаратов, а также для мониторинга состояния после специфического клинического лечения.

Ключевые слова: рак легкого, диагностика, онкомаркеры, циркулирующие ДНК.

MOLECULAR-GENETIC MARKERS IN LUNG CANCER DIAGNOSTICS, by A. A. Ponomaryova¹, E. Y. Rykova^{2*}, N. V. Cherdyntseva¹, E. L. Choinzonov¹, P. P. Laktionov², V. V. Vlassov² (¹Cancer Research Institute, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634001 Russia; ²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 6330117 Russia; *e-mail: rykova@niboch.nsc.ru). The major approaches to different lung cancer marker development are outlined in the review, including genetic, epigenetic, protein, transcriptomic, proteomic, metabolic, and miRNA markers. As far as epigenetic changes are among the earliest events in malignant transformation, methylated markers are thoroughly discussed. Special attention is given to minimally invasive tumor markers, which could be detected in easily accessible biological fluids, because they can be useful for screening and early diagnostics of cancer (before its clinical manifestation) as well as for verification of standard methods of diagnostics. Extracellular nucleic acids, circulating in blood (cirNA), are highlighted as the potential source of material for the early lung cancer diagnostics, prediction of antitumor treatment efficiency, post-treatment monitoring and disease prognosis.

Keywords: lung cancer, diagnostics, tumor markers, circulating DNA.

Рак легкого (РЛ) — наиболее распространенная форма злокачественных новообразований (12.8% в структуре онкологической заболеваемости населения мира), занимающая первое место по общей летальности от онкологических заболеваний у мужчин (1.18 млн. в год) [1].

В России ежегодно вновь регистрируется свыше 63 тыс. больных раком легкого. Соотношение заболевших мужчин и женщин составляет 10 : 1.1, смертность у мужчин составляет 30.1%, у женщин — 6.7%

* Эл. почта: rykova@niboch.nsc.ru.

[2]. Реалии современного социума, связанные со старением населения, курением, загрязнением воздуха, вносят свой вклад в повышение заболеваемости РЛ [3]. Прогноз эффективности терапии РЛ в ближайшем будущем неутешителен. Высокая смертность связана преимущественно не с трудностью терапии, а с отсутствием эффективных подходов к выявлению этой опухоли на ранних стадиях. Обнаружение РЛ на поздних стадиях существенно понижает вероятность успешного лечения, в то время как при раннем его выявлении показатели выживаемости возрастают в несколько раз (рис. 1).

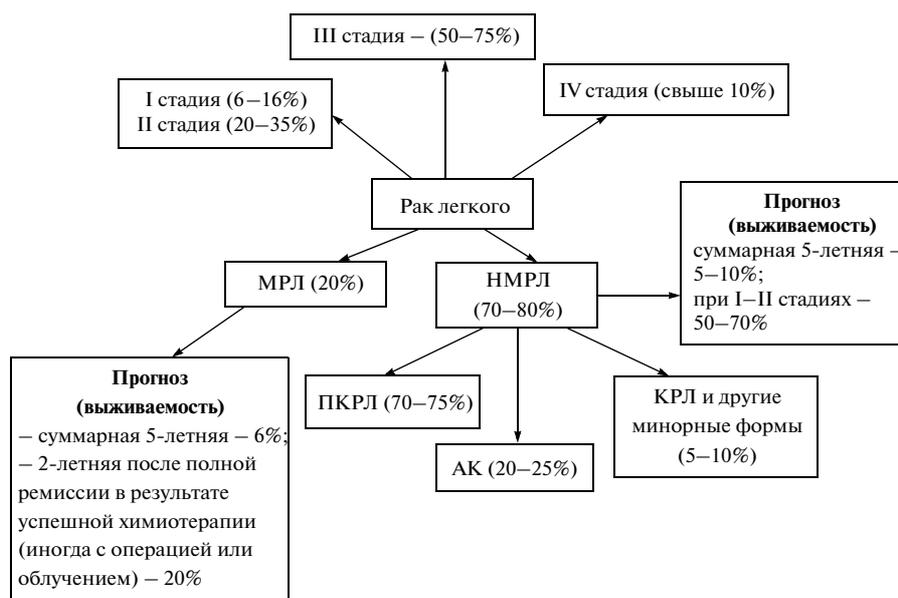


Рис. 1. Клинико-морфологические характеристики рака легкого и прогноз заболевания [4, 5]. НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; МРЛ – мелкоклеточный рак легкого; ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого; КРЛ – крупноклеточный рак легкого; АК – аденокарцинома.

В клиническую практику недавно внедрены новейшие чувствительные методы компьютерной, позитронно-эмиссионной томографии, аутофлуоресцентной бронхоскопии. Однако использование этих методов для диагностики РЛ не привело к снижению смертности [6] – из-за низкой эффективности именно ранней диагностики методами инструментального анализа. Используемые же в настоящее время патоморфологические критерии неэффективны как для диагностики ранних стадий, так и для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных процессов [3]. Необходимо искать и разрабатывать чувствительные и специфичные методы диагностики, которые бы были основаны на изучении молекулярных опухолевых маркеров, вовлеченных в формирование и прогрессию РЛ [7, 8].

Опухолевые маркеры – это такие биологические характеристики, которые могут сами влиять на клиническое течение и предсказывать исход онкологического заболевания, а также позволяют проследить ответ на терапевтическое вмешательство [9]. Этапы трансформации клеток в раковые и опухолевой прогрессии определяются накоплением в геноме изменений, возникающих в результате нарушения нормального его функционирования под действием наследуемых мутаций и канцерогенных факторов [10]. Трансформированные клетки обладают способностью выживать в организме за счет изменения сигнальных путей, которые потенциально онкогенны. Это: (1) независимые или автономные сигналы к росту; (2) нечувствительность к сигналам, ингибирующим рост; (3) невосприимчивость к сигналам апоптоза; (4) неограниченный потенциал к пролиферации; (5) способность поддерживать ангиогенез;

(6) способность к инвазии и метастазированию [11]. Молекулярные изменения, ответственные за приобретение указанных свойств, могут использоваться в качестве онкомаркеров.

Онкомаркеры по их природе и по методам выявления можно разделить на несколько типов: генетические (мутации, изменение копийности генов, экспрессии мРНК), эпигенетические (изменение профиля метилирования ДНК), протеомные (изменение уровня и профиля белковой экспрессии), метаболические (изменение уровня и спектра низкомолекулярных метаболитов), профиль синтеза и уровень микроРНК (миРНК) [11–16]. Ведутся поиски оптимальных онкомаркеров не только в опухолевых тканях, поскольку практически все типы ассоциированных со злокачественной трансформацией нарушений синтеза биополимеров обнаруживаются в биологических жидкостях организма. Это позволяет разрабатывать малоинвазивные методы диагностики рака, основанные на использовании легкодоступного биологического материала (кровь, мокрота, лаваж и др.) [7, 17–24].

БЕЛКОВЫЕ МАРКЕРЫ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

В табл. 1 приведены данные о белковых онкомаркерах, которые используются в клинической практике в качестве дополнительных критериев при диагностике и мониторинге РЛ [5].

Увеличение концентрации белковых онкомаркеров в сыворотке крови и ткани опухоли детектируется при помощи специфичных иммунохимических и иммуногистохимических методов. Однако чувствительность используемых в настоящее время сероло-

Таблица 1. Характеристика белковых маркеров рака легкого (РЛ), используемых в клинической практике

Ген	Маркер	Характер нарушений при РЛ	Метод детекции
	*СЕА (раково-эмбриональный антиген) *NSE (нейрон-специфическая енолаза, гликолитический фермент) *CYFRA 21-1 (фрагмент цитокератина 19) *ТРА (тканевой полипептидный антиген) *ProGRP (предшественник гастрин-релизинг пептида)	Увеличение концентрации То же » » »	ИФА То же » » »
<i>C-MYC, N-MYC</i> **	c-мус, N-мус (участие в процессах роста, дифференцировки и апоптоза клеток)	Гиперэкспрессия Амплификация	ИГХ
<i>Ki-67</i> **	Ki-67 (контроль пролиферации клеток)	Гиперэкспрессия	То же
<i>Bcl-2</i> **	Bcl-2 (регуляция апоптоза)	То же	»
<i>ERBB1 (HER1)</i> **	EGFR [ErbB1, HER1] (рецептор эпидермального фактора роста, контроль пролиферации эпителиальных клеток)	»	»
<i>ERBB2 (HER-2/neu)</i> **	HER-2/neu [c-erbB-2] (тирозинкиназный рецептор)	Гиперэкспрессия Амплификация	»
<i>VEGF</i> **	VEGF (фактор роста эндотелия сосудов, индуктор неоангиогенеза)	Гиперэкспрессия	»
	Цитокератины AE1/AE3 и цитокератин 7 [СК7] (эпителиальный маркерный белок) Хромогранин В и С (нейроэндокринный маркерный белок) Синаптофизин (нейрональный маркерный белок)	То же » »	» » »
<i>TTF-1</i> **	TTF-1 (тиреоидный транскрипционный фактор-1)	»	»
<i>COX-2</i> **	COX-2 (циклооксигеназа) (контроль клеточного цикла)	»	»
<i>MMP9</i> **	MMP9 (матриксная металлопротеиназа)	»	»
β -катенин (<i>CTNNB1</i>)**	β -катенин (участие в клеточной адгезии)	»	»
<i>PRAD1</i> **	Циклин D1 (регуляция клеточного деления)	Гиперэкспрессия Амплификация	»

* Широко используются в клинической практике.

** Потенциальные онкомаркеры.

ИФА – иммуноферментный анализ; ИГХ – иммуногистохимический анализ.

гических маркеров РЛ невысока. Например, при мелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) чувствительность первичной диагностики по маркерам СЕА, NSE, CYFRA 21-1 составляет 55, 38 и 65%, а специфичность – 70, 97 и 87% соответственно. При мелкоклеточном раке легкого (МРЛ) чувствительность по тем же маркерам составляет 43, 49 и 36%, а специфичность 76, 95 и 96% соответственно [25–27]. Поэтому их использование для ранней диагностики РЛ ограничено и, в основном, они применяются для оценки эффективности лечения, мониторинга течения заболевания и для раннего выявления рецидива опухоли. Иммуногистохимический метод оценки белковых маркеров в ткани опухоли используют для уточнения диагноза и прогноза клинического тече-

ния. В табл. 1 представлены маркеры, эффективность которых в настоящее время интенсивно изучается [5].

В связи с низкой диагностической информативностью онкомаркеров актуальна проблема поиска более эффективных белковых маркеров на основе совершенствования технологий экспрессионного и протеомного анализа. В качестве перспективных могут рассматриваться вовлеченные в канцерогенез белки, синтез которых многократно более интенсивен в опухолевых клетках по сравнению с нормальными [12, 15]. Выявить такие белки можно, сравнивая уровни генной экспрессии в нормальной и опухолевой ткани с использованием метода обратной транскрипции и ПЦР (ОТ-ПЦР). Использование

микрочиповых технологий позволяет одновременно тестировать уровень экспрессии многих генов по количеству мРНК [14]. Профили экспрессии генов отражают биологические различия опухолей, что позволяет дискриминировать гистотипы и даже подтипы заболевания в рамках одного гистотипа РЛ. Оказалось, что МРЛ возникает из легочного эпителия, а не из нейроэндокринных предшественников, как считалось ранее; найден комплекс генов, экспрессия которых позволяет отличать первичный РЛ от метастазов в легкие из первичной опухоли другой локализации. Кластерный анализ генной экспрессии позволяет получать экспрессионные профили, ассоциированные с выживаемостью пациентов, гистотипом РЛ, с опухолевой прогрессией, и чувствительность прогноза достигает 90% [14]. Однако надо отметить, что данные различных авторов не всегда согласуются между собой. Это может быть обусловлено недостаточной репрезентативностью выборок, нечеткой их дискриминацией по гистологическим признакам, использованием образцов опухолевой ткани, где присутствуют элементы стромы и инфильтрирующие опухоль клетки иммунной системы, либо полученных при микродиссекции только опухолевых клеток. Тем не менее, имеется положительный опыт использования панелей генной экспрессии для прогноза рака молочной железы [28], что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения профилей экспрессии генов при прогнозе РЛ.

Несмотря на высокую информативность продукта экспрессии — мРНК генов, вовлеченных в патогенез опухолей, — нет однозначной корреляции этого показателя с концентрацией кодируемых белков вследствие дополнительной регуляции их экспрессии на уровне трансляции. Их свойства могут изменяться в результате посттрансляционной модификации, при которой увеличивается число изоформ, ассоциированных с разными стадиями опухолевой прогрессии, что, в свою очередь, может повышать специфичность белковых маркеров [12, 15]. В последние 10 лет интенсивно разрабатываются протеомные подходы, основанные на анализе дифференциальной экспрессии белков, их посттрансляционных изменений, взаимодействий и участия в патогенезе злокачественных опухолей. При этом можно выделить два основных подхода: один характеризует глобальный профиль белковой экспрессии в опухоли и в нормальной ткани с использованием методов масс-спектрометрии, другой направлен на выявление целевых белков — потенциальных онкомаркеров [12, 15, 16]. Масс-спектрометрические методы имеют важное значение в изучении механизмов канцерогенеза, для совершенствования классификации гистотипов и подтипов РЛ, а также дискриминации опухолей различного типа. Однако эти методы пока далеки от практического использования из-за высокой стоимости и невозможности широко использовать аналитические приборы.

Один из основных методов целевого поиска — двумерный гель-электрофорез, который позволяет получать белковые профили опухолевой и нормальной ткани (или крови), изучать их различия с последующей идентификацией белков. Учитывая, что концентрации различных белков в тканях и крови могут различаться между собой в миллионы раз, необходимо предварительно подразделять белки по их физико-химическим характеристикам. Для этого предварительно удаляют структурные клеточные белки соевым буфером [29, 30], используют технику капиллярного изоэлектрического фокусирования, методы осаждения мечеными антителами, двумерный капиллярный электрофорез и многомерное фракционирование [12, 15].

Бюренс (Buhrens) и соавт. [16] проанализировали результаты двенадцати опубликованных до 2009 г. протеомных исследований НМРЛ с использованием двумерного электрофореза и серологического протеомного анализа для определения аутоантител к опухоли-ассоциированным антигенам (SERPA) [16]. В целом, при обследовании 306 пациентов найдено 261 дифференциально экспрессирующихся белков, причем 76% из них не дублировались в разных исследованиях, и лишь два были найдены в пяти исследованиях. В литературе пока мало сравнительных исследований гликозилированных, фосфорилированных и других модифицированных форм белков (как продуктов посттрансляционных изменений) при РЛ и других видах рака, однако их перспективность очевидна в изучении механизмов онкогенеза и для повышения эффективности поиска онкомаркеров. Современные данные протеомных исследований по поиску маркеров ранней диагностики и прогноза РЛ протеомными методами рассмотрены в ряде обзоров [12, 15, 16].

Таким образом, протеомные методы позволили идентифицировать многие белковые молекулы в качестве потенциальных биомаркеров РЛ. Внедрение таких маркеров в практику сдерживают такие технические проблемы, как, например, отсутствие специфичных и чувствительных (коммерчески доступных) антител для оценки маркеров методами ELISA или иммуноблоттинга. Для повышения эффективности диагностики необходима разработка новых высокочувствительных технологий анализа информативных белковых маркеров в тканях и биологических средах организма.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

К генетическим изменениям относят точечные мутации и хромосомные перестройки, такие как анеуплоидия, хромосомные aberrации, потеря гетерозиготности и нестабильность микросателлитной ДНК [31]. В большинстве случаев мутации возникают в результате инсерции/делеции и замещения нуклеотидов. В табл. 2 представлены характеристика и частота встречаемости основных нарушений ге-

Таблица 2. Частота выявления мутаций патогенетически значимых генов в ДНК опухолевой ткани и циркулирующей ДНК (ДНКцирк) больных раком легкого

Ген	Метод детекции	Опухолевая ткань	ДНКцирк	Ссылка
<i>p53</i>	ПЦР и рестрикционный анализ	13/38 (34%) – НМРЛ	12/80 (15%) – НМРЛ	[18]
		45/60 (75%) – МРЛ	–	[32]
		–	12/40 (29%) – БАЛ – НМРЛ	[33]
		–	17/56 (30%) – мокрота – НМРЛ	[34]
<i>p53</i> 5–8 экзон	Рестрикционный анализ, аллель-специфичная ПЦР (MASA)	26/64 (41%) – НМРЛ	19/64 (40%) – НМРЛ	[35]
<i>p53</i> 5–8 экзон	“Гнездовая” ПЦР и секвенирование	33/58 (60%) – НМРЛ, 32/40(79%) – дисплазия, карцинома <i>in situ</i> , 2/35 (5%) – альвеолярно-клеточная гиперплазия	–	[36]
<i>K-ras</i>	ПЦР, DHPLC [#] анализ	–	15/36 (42%) – НМРЛ 12/40 (30%) – контроль	[37]
<i>K-ras</i>	ПЦР и секвенирование	102/418 (24%) – экзон 2 – НМРЛ 18/45(39%) – атипичная аденоматозная гиперплазия	–	[38]
<i>EGFR</i>	ПЦР и секвенирование	–	26/54 (48%) – мокрота – НМРЛ	[33, 39]
<i>EGFR</i>	ПЦР и секвенирование	44/58 (76%) – экзон 18–22 – НМРЛ и МРЛ	–	[36]
<i>EGFR</i>	SARMS [#] анализ, секвенирование	23/46 (50%) – НМРЛ	17/18 (94%) – циркулирующие клетки – НМРЛ 7/18 (39%) – плазма – НМРЛ	[40]
<i>EGFR</i>	Микрофлюидная ПЦР	16/35 (46%) – экзон 19 или мутации L858R – НМРЛ	6/35 (17%) – делеции по экзону 19 9/35 (26%) – мутации L858R – НМРЛ	[41]
<i>HER-2</i>	ПЦР, секвенирование	4/53 (7%) экзон 19–20 – НМРЛ	–	[42]
<i>RB1</i>	Мультиплексная ПЦР	40/125 (32%) – МРЛ и 3/125 (2%) – НМРЛ	–	[43]
<i>p16</i>	Мультиплексная ПЦР	24/125 (19%) – НМРЛ и 7/125 (5%) – МРЛ	–	[43]

Примечание. DHPLC[#]-анализ – денатурирование методом жидкостной хроматографии с высоким разрешением; SARMS[#]-анализ – анализ с применением идентификации мутаций “скорпион”.

нов, которые выявляются в ткани и биологических жидкостях при РЛ различных гистотипов и в предраковых состояниях; все они являются потенциальными маркерами для использования в клинической практике. Наиболее подробно охарактеризованы мутации, ведущие к активации онкогенов (*K-ras*, *EGFR*, *HER-2*), либо к инактивации генов опухолевой супрессии (*p53*, *p16^{INK4A}*, *Rb*).

Гены *K-ras* и *p53* наиболее исследованы, поскольку частота выявления нарушений в них достаточно высока, и возможно раннее обнаружение в опухолевых тканях. Для создания специфичных маркеров также важно, что большинство мутаций гена *K-ras* приходится на определенные его участки (“горячие точки”). До 85% всех мутаций гена *K-ras* происходит в 12-м кодоне, остальные находятся в 13-м и 61-м кодонах [18]. Мутации гена *p53* выявляются в опухолях легких с частотой 50–90% и обнаруживаются в более чем 200 кодонах, включая “горячие точки”. Эти мутации обусловлены действием генотоксических продуктов курения и представлены, в основ-

ном, нуклеотидными заменами G → T, в отличие от других опухолей, где чаще встречаются замены G → A [18]. Мутации гена *EGFR* включают в себя делеции “внутри рамки считывания” и миссенс-мутации [41].

Мутации генов *K-ras* и *p53* выявляются с высокой частотой также в образцах мокроты, бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и в сыворотке крови пациентов, что указывает на их перспективность для малоинвазивной диагностики (см. далее). Опухоль-ассоциированные изменения в ДНК мокроты обнаруживаются еще до проявления клинических симптомов заболевания, что позволяет анализировать мокроту на мутации генов при создании методов ранней диагностики [44].

Значительная часть опухолей характеризуется хромосомной нестабильностью, что приводит к характерным нарушениям количества копий фрагментов ДНК. При злокачественной трансформации клеток наиболее часто происходит потеря фрагментов хромосом (делеция). Такой механизм повреждений

типичен для супрессорных генов *Rb*, *APC*, *p16*. Увеличение копийности (амплификация) генов, приводящее к увеличению синтеза белковых продуктов, характерен для онкогенов *HER2*, *N-MYC*, *cyclin D1*. Увеличение числа tandemно-повторенных копий ДНК за счет амплификации в различных областях хромосом наблюдается в 70% опухолей легкого [45].

Микросателлитные маркеры представляют собой многократно повторяющиеся последовательности (мотивы из 1–6 п.н.), распространенные по всему геному, для которых характерно два типа нарушений: нестабильность (MI, Microsatellite Instability) и потеря гетерозиготности (LOH, Loss of Heterozygosity). Микросателлитная нестабильность проявляется в виде aberrантного аллеля этого маркера в результате делеции или амплификации одного или нескольких составляющих его повторов. При заболевании НМРЛ MI выявляется с частотой от 50 до 80% [46]. В 87% случаев у больных РЛ прекращается экспрессия хотя бы одного из генов системы репарации ДНК вследствие аллельных делеций в генах *hMLH1* и *hMSH2* [47].

Потеря гетерозиготности — это исчезновение аллеля в результате его делеции. Механизмы LOH, так же как и биологический смысл данного явления, изучены пока недостаточно. Предполагается, что происходит инактивация генов опухолевой супрессии в результате того, что утрата одного аллеля дает возможность проявиться рецессивным мутациям в оставшемся аллеле (теория Кнадсена, 1970). Частота LOH, превышающая 60%, с высокой вероятностью свидетельствует о присутствии в данном регионе генов опухолевой супрессии, специфичных для данного типа опухолей. Анализ LOH позволил выявить целый ряд классических генов опухолевой супрессии, таких как *p16^{INK4A}* (9p21), *Rb* (13q12) и *p53* (17p13) [48].

Делеции локусов хромосом 3p, 5q21, 9p21 и 17p13 (частота LOH составляет 30–80%) — наиболее частое и раннее событие при НМРЛ [46, 49]. Делеции короткого плеча 3-й хромосомы (3p) наблюдаются в 100% случаев МРЛ и 60–65% случаев НМРЛ [50]. Имеются данные об аномалиях 3p при пренеопластических поражениях легких, таких как гиперплазия и дисплазия, а также в карциномах *in situ* [51, 52]. Пан (Pan) и соавт. [49] выявили LOH трех микросателлитных маркеров, локализованных в локусах 3p14, 9p21 и 17p13 хромосом бронхиального эпителия курильщиков без опухолевых патологий (75, 57 и 18% соответственно). Эти данные указывают на важную роль LOH как раннего маркера и фактора риска РЛ.

Таким образом, данные о различных генетических изменениях при РЛ уже нашли применение в клинической практике, а поиск новых более специфичных ДНК-маркеров опухолей легкого с использованием таких высокотехнологичных методов, как гибридизация ДНК на олигонуклеотидных чипах и полное геномное секвенирование, является актуальной задачей [53].

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

В основе большинства эпигенетических изменений при онкологических заболеваниях лежит метилирование цитозина в последовательностях цитозин-гуанин (CpG). Метилирование CpG в промоторных областях генов ассоциировано с прекращением генной экспрессии и образования белкового продукта [54, 55]. Большое значение для развития исследований в этой области имела разработка метода ПЦР, специфичной к метилированию (мет-ПЦР), после бисульфитной конверсии ДНК, что позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять метилированные области ДНК [54].

Использование aberrантно метилированных форм генов в качестве онкомаркеров представляется особенно перспективным, поскольку они имеют ряд преимуществ. Показано, что гиперметилирование нескольких десятков генов опухолевой супрессии — одно из наиболее частых и ранних событий, приводящих к опухолевой трансформации клетки [8, 54, 56]. При исследовании ДНК на различных стадиях развития опухоли увеличивается частота появления метилированных форм нескольких генов (*p16*, *TIMP3*, *DAPK*, *MGMT*, *RARβ2*, *RASSF1A* и *hTERT*) в ряду от атипической аденоматозной гиперплазии до аденокарциномы (АК) легких [57]. Кроме того, чувствительность при определении метилированного аллеля, в присутствии избытка неметилированного, выше, чем при анализе мутаций, что важно, так как этот избыток характерен как для циркулирующей ДНК (ДНКцирк), так и для ДНК, выделенной из опухолевых тканей.

Поиски метилированных генов-онкомаркеров обычно проводят, используя метод анализа целевых генов, метилирование которых предположительно играет роль в онкотрансформации. При РЛ с высокой частотой наблюдается метилирование тех генов опухолевой супрессии, которые регулируют рост опухоли за счет участия в сигнальной трансдукции, регуляции клеточного цикла и апоптоза (*RASSF1A*, *p16*, *RARβ2*, *FHIT*, *DAPK*, *APC*, *ASC/TMS1*, *DAL-1*, *FHIT*), а также генов, участвующих в клеточной дифференцировке, адгезии и сигнальной трансдукции (*GATA*, *H-E-cadherin*, *HOXA*), и генов ферментов репарации ДНК (*MGMT*, *hMLH1* и *hMSH2*). При помощи количественной ПЦР в реальном времени из 28 потенциально значимых локусов выбраны четыре (*CDKN2A EX2*, *CDX2*, *HOXA1* и *OPCML*), степень метилирования которых позволяет различать нормальные ткани и опухоли легкого, начиная от стадии IA с чувствительностью 94% и специфичностью 90% [58].

Ниже дана краткая функциональная характеристика генов, поиски метилированных форм которых представляются перспективными для ранней диагностики, для прогноза клинического течения РЛ и ответа на терапию. Сведения о частоте выявления эпигенетических изменений в ДНК клеток опухоли

представлены в табл. 3. Метилированные формы этих генов обнаружены в ДНК из мокроты, БАЛ и сыворотки крови, что свидетельствует о возможности их использования для малоинвазивного скрининга. Значение этих маркеров как факторов риска РЛ показано на примерах генов *RARβ2* и *p16*, метилированные формы которых найдены в бронхиальных биоптатах курящих людей без опухоли и в сыворотке крови пациентов с повышенным риском РЛ [59], а также в сыворотке больных с плоскоклеточным (ПК) РЛ за 3 года до проявления клинических симптомов [60].

Ген опухолевой супрессии *RARβ2*, расположенный в локусе 3p24, — один из ядерных рецепторов для активного метаболита витамина А (ретиноевой кислоты) [61], которая необходима для нормального развития и дифференцировки клеток. Метилирование *RARβ2* вызывает устойчивость опухоли к действию ретиноевой кислоты.

Ген опухолевой супрессии *p16* (*CDKN2A*, *MTS1*, *INK4A*), расположенный в локусе 9p21, кодирует ингибитор циклин-зависимой киназы, который играет ключевую роль в контроле клеточного цикла через активацию пути, зависящего от белка ретинобластомы Rb.

Ген опухолевой супрессии *RASSF1A*, расположенный в локусе 3p21.3, принадлежит к семейству белков RAS-ассоциированных доменов. Продукт этого гена участвует в регуляции клеточного цикла и апоптоза, его экзогенная экспрессия в культуре трансформированных клеток сокращает число колоний *in vitro* и образование опухоли *in vivo*.

Ген *FHIT*, расположенный в локусе 3p14.2, — потенциальный ген опухолевой супрессии; его продукт контролирует пролиферацию клеток и апоптоз.

Ген опухолевой супрессии *APC* кодирует белок, который участвует в клеточной адгезии, сигнальной трансдукции, стабилизации цитоскелета, регуляции клеточного цикла и апоптоза. Жанг (Zhang) и соавт. [62] показали, что снижение экспрессии белка в опухолевой ткани легкого связано с метилированием промотора гена *APC*.

Ген *MGMT* (O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза) кодирует фермент, который участвует в репарации ДНК, защищая клетки от канцерогенного действия алкилирующих агентов.

Гены *hMLH1* и *hMSH2* кодируют белки, которые участвуют в репарации неспаренных оснований ДНК. У больных НМРЛ III-ей стадии низкий уровень экспрессии *hMSH2* ассоциирован с уменьшением срока жизни и неадекватным ответом на лечение [63].

Гены семейства кадхеринов кодируют гликопротеины клеточной поверхности, которые участвуют в клеточном распознавании, адгезии, подавляют инвазию и метастазирование. *CDH1* (Е-кадгерин) и *CDH13* (Н-кадгерин) расположены на длинном плече 16-й хромосомы, в котором происходят частые аллельные потери при раке легкого.

В последние годы ведутся интенсивные поиски новых метилированных маркеров при помощи современных технологий, позволяющих анализировать метилирование в масштабах всего генома. Первый из подходов к полногеномному анализу CpG-островков — рестрикционно-маркерное сканирование генома (Restriction Landmark Genomic Scanning — RGLS); позднее появились возможности анализа на микрочипах экспрессии генов до и после обработки клеток ингибиторами DNMT ± HDAC (“фармакологическая реактивация”); затем был разработан BeadArray-анализ метилирования панели генов, ассоциированных с раком (Illumina GoldenGate™-анализ), и анализ на микрочипах в сочетании с иммунопреципитацией метилированной ДНК (5-метилцитидин-антитело; MeDIP-chip) [78].

Первый метод основан на том, что обработка клеток ингибиторами метилазы, DNMT (Aza-dC), и деацетилазы гистонов, HDAC (TSA), индуцируют повторную экспрессию генов, инактивированных метилированием [78]. Выявлено 132 гена, экспрессия которых снижается в клетках НМРЛ и возвращается к нормальному уровню при обработке ингибитором DNMT (Aza-dC) [79]. Авторы отобрали семь генов, клинически значимых (*ALDH1A3*, *BNC1*, *CCNA1*, *CTSZ*, *LOX*, *MSX1* и *NRCAM*). С помощью метода RGLS получена панель из 47 метилированных генов при ПКРЛ и АК легких, которая может служить дополнительным критерием при разделении на гистологические подтипы [80].

Используя технологию полногеномного секвенирования с помощью платформы Illumina после бисульфитной конверсии ДНК (Illumina GoldenGate™ methylation analysis), Бибикова (Bibikova) и соавт. [81] определили профиль метилирования в 1536 CpG-сайтах из 371-го гена, участвующих в процессах канцерогенеза, на образцах АК и нормальной ткани легких. Обнаружено семь генов (*ASCL2*, *CDH13*, *HOXA5*, *HOXA11*, *NPY*, *RUNX3*, *TERT*, *TP73*), метилирование которых позволяет достоверно дифференцировать АК легких и нормальную ткань. Применяя технологию Illumina GoldenGate™ Кристенсен (Christensen) и соавт. [82] выявили различия в профилях метилирования опухолевой и нормальной ткани легких, а также АК легких и мезотелиомы.

Метод иммунопреципитации (MeDIP) с использованием антител к 5-метилцитидину в комбинации с микрочиповой технологией (MeDIP-chip) применили для избирательного выделения фрагментов ДНК, содержащих метилированные CpG-сайты [83]. Авторы нашли 200 генов, уровень метилирования которых различается в клетках карциномы SW48 и нормальной слизистой кишечника. Раух (Rauch) и соавт. использовали рекомбинантные белки MBD2b/MBD3L, избирательно связывающие метилированный цитозин [84]. При изучении метилирования 27800 CG-островков в опухолях ПКРЛ I стадии и нормальной ткани легких определены во-

Таблица 3. Частота выявления эпигенетических изменений в опухолевой и циркулирующей ДНК при раке легкого

Ген	Метод детекции	Опухолевая ткань	Циркулирующие ДНК	Ссылка
<i>P16</i> (<i>CDKN2A</i> , <i>INK4A</i>)	МС-ПЦР [#]	6/37 (17%) – базальная клеточная гиперплазия, 9/37 (24%) – плоскоклеточная метаплазия, 19/37 (50%) – карцинома <i>in situ</i>	–	[64]
<i>p16</i>	МС-ПЦР	–	19/54 (35%) – сыворотка крови, 12/54 (22%) – бронхиальные смывы, 9/54 (16%) – бронхиальные соскобы	[65]
<i>p16</i>	“Гнездовая” (<i>nested</i>) МС-ПЦР	34/72 (47%) – НМРЛ	29/72 (40%) – мокрота – НМРЛ 15/72 (21%) – сыворотка крови – НМРЛ	[59]
<i>p16</i>	МС-ПЦР	12/30 (40%) – НМРЛ	14/91 (15%) – сыворотка крови – НМРЛ	[61]
<i>p16</i>	Количественная МС-ПЦР	–	Бронхиальные аспираты 18/75 (24%) – НМРЛ; 14/25 (56%) – ПКРЛ; 0/64 (0%) – доброкачественные опухоли легких	[66]
<i>p16</i>	Количественная МС-ПЦР	33/63 (53%) – НМРЛ	9/67 (13%) – НМРЛ, 1/17 (6%) – МРЛ	[67]
<i>p16</i>	Количественная МС-ПЦР	–	24/63 (38%) – плазма крови – НМРЛ	[68]
<i>APC</i>	Количественная МС-ПЦР	–	Бронхиальные аспираты 14/67 (21%) – НМРЛ, 0/17 (0%) – МРЛ	[67]
<i>APC</i>	МС-ПЦР	95/99 (96%) – НМРЛ	42/89 (47%) – сыворотка крови – НМРЛ	[61]
<i>RASSF1A</i>	“Гнездовая” МС-ПЦР	30/63 (48%) – НМРЛ	25/63 (39%) – НМРЛ	[68]
<i>RASSF1A</i>	МС-ПЦР	9/30 (30%) – НМРЛ 44/114 (39%) – НМРЛ	11/91 (12%) – НМРЛ	[61, 69]
<i>RASSF1A</i>	Количественная МС-ПЦР	–	Бронхиальные аспираты 35/40 (88%) – МРЛ, 31/111 (28%) – НМРЛ	[70]
<i>RARβ2</i>	Количественная МС-ПЦР	–	Бронхиальные аспираты 20/67 (30%) – НМРЛ, 14/17 (82%) – МРЛ	[67]
<i>RARβ2</i>	Количественная МС-ПЦР	–	Бронхиальные аспираты 42/75 (56%) – НМРЛ и МРЛ; 8/64 (13%) – доброкачественные опухоли легких	[66]
<i>RARβ2</i>	“Гнездовая” МС-ПЦР	34/63 (54%) – НМРЛ	Бронхиальные аспираты 28/66 (42%) – НМРЛ, 12/16 (75%) – МРЛ 23/63 (37%) – НМРЛ	[67]
<i>RARβ2</i>	МС-ПЦР	63/87 (72%) – МРЛ, 52/127 (41%) – НМРЛ	–	[68]
<i>MGMT</i>	МС-ПЦР	37/122 (30%) – НМРЛ	–	[64]
<i>MGMT</i>	МС-ПЦР	–	19/53 (36%) – мокрота, 5/44 (11%) – плазма крови – НМРЛ; 17/100 (17%) – сыворотка крови – НМРЛ	[71]
<i>hMHL1</i>	МС-ПЦР	18/33 (55%) – НМРЛ	–	[61, 72]
<i>hMHL1</i>	МС-ПЦР	37/60 (62%) – НМРЛ	–	[73]
Е-кадгерин (<i>CDH1</i>)	МС-ПЦР	20/53 (37%) – опухоль, 17/46 (37%) – браш-биопсия – НМРЛ	–	[74]
Н-кадгерин (<i>CDH13</i>)	Количественная МС-ПЦР	21/49 (42%) – НМРЛ	–	[75]
<i>FHIT</i>	МС-ПЦР	65/176 (37%) – НМРЛ	–	[76]
<i>FHIT</i>	Количественная МС-ПЦР	49/155 (32%) – НМРЛ	–	[77]

МС-ПЦР[#] – метил-специфичная ПЦР.

семь клинически значимых генов (*OTX1*, *BARHL2*, *MEIS1*, *OC2*, *PAX6*, *IRX2*, *TFAP2A* и *EVX2*).

Использование новых технологий привело к обнаружению примерно сотни генов, aberrантно метилированных в опухолях [78]. Важно отметить, что не все гены, метилирование которых при РЛ выявляется с высокой частотой при анализе целевых генов, можно определить при использовании новых подходов. Например, упомянутые выше авторы [81] показали, что метилирование генов *RASSF1A* и *ASC/TMS1* в клеточных линиях РЛ не определяется в первичных АК легких. В то же время, метилирование таких генов, как *CDH1* и *TIMP3* [79], *FHIT* [82], *p16* [84], *SLIT2* [82, 84] и *CDH13* [81], выявляется при использовании разных методов. Очевидна необходимость анализа более широкого спектра генов в ДНК различных биологических образцов.

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ миРНК

В последнюю декаду интенсивно изучается новая группа потенциальных онкомаркеров — микроРНК (миРНК, miRNA), профиль экспрессии которых высоко специфичен для некоторых патологий, в том числе опухолей. МиРНК — это семейство коротких РНК (около 22 п.н.), которые регулируют экспрессию генов, влияя на трансляцию и деградацию мРНК [85]. Обнаружены миРНК с функциями онкогенов или опухолевых супрессоров, что позволяет использовать их в качестве онкомаркеров и мишеней для терапии. Поиски видов миРНК, синтез которых изменен при раке, а также регулируемых ими мРНК-мишеней с последующей идентификацией кодируемых белков — один из наиболее перспективных подходов для поиска онкомаркеров.

Тканевая концентрация специфичных миРНК может быть связана с характеристиками агрессивности опухоли и, следовательно, с прогнозом болезни. В частности, потеря гетерозиготности локуса миРНК-128b, которая регулирует экспрессию EGF-рецептора в клетках НМРЛ, тесно коррелирует с показателями, характеризующими выживаемость пациентов после лечения gefитинибом (таргетный препарат — ингибитор EGFR), в то время как экспрессия этого рецептора или его мутации не ассоциированы с исходом. Мутации в гене *EGFR* часто выявляются у некурящих больных НМРЛ. У таких пациентов найдена эктопическая экспрессия шести миРНК: 21b, 126, 145, 182, 183, 210; при этом обнаружен ингибирующий эффект миРНК-145 на пролиферацию опухоли [13]. Профиль экспрессии 32 миРНК при РЛ изменяется, для семи из них характерна корреляция с опухолевой прогрессией; показана прогностическая значимость миРНК-21 при НМРЛ [13]. Информативность профиля миРНК для гистологической классификации опухолей и оценки прогноза достаточно высока [86, 87]. Особая ценность миРНК как потенциальных онкомаркеров при РЛ обусловлена тем, что количество этих стабильных молекул в биологических жидкостях организма ве-

лико. Необходимы независимые (когортные) исследования для дальнейшей оценки значимости миРНК как онкомаркеров и как терапевтических мишеней для профилактики и лечения рака.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В КРОВИ

Наиболее перспективными для медицинской практики представляются малоинвазивные методы анализа биологических жидкостей [22, 88], а именно: анализ ДНКцирк и РНКцирк в плазме или сыворотке крови, в моче, слюне и других биологических жидкостях, концентрация и состав которых существенно изменяются при онкологических заболеваниях [22, 88].

ДНКцирк крови представляют собой популяцию гетерогенных молекул как высокомолекулярных (21000–80000 п.н.), так и низкомолекулярных (100–500 п.н.) [89]. Фрагментация ДНК менее выражена в плазме крови пациентов с онкологическими заболеваниями. Например, при амплификации фрагментов гена β -актина и гена лептина показано, что у больных с опухолями различной локализации обнаруживаются более длинные фрагменты, чем у клинически здоровых людей [90, 91]. Это может быть обусловлено рядом причин, в том числе снижением активности ДНК-гидролизующих ферментов в плазме онкологических больных [92].

В норме плазма крови характеризуется высокой ДНК-гидролизующей активностью, которая обеспечивает быструю деградацию (в течение нескольких минут) незащищенных олигонуклеотидов, попадающих в кровь. В отличие от экзогенных олигонуклеотидов, концентрация ДНКцирк плазмы и сыворотки крови не изменяется в течение нескольких часов после забора крови, поскольку они находятся в составе нуклеосом, комплексов с белками и апоптических телец. РНКцирк входят в состав РНК-содержащих апоптических телец, липопротеиновых комплексов и экзосом [24].

Одним из источников циркулирующих нуклеиновых кислот крови считают апоптоз клеток организма, разрушающихся в процессе гомеостатической регуляции [93]. В результате, в плазме крови появляются фрагменты ДНКцирк, соответствующие по размеру нуклеосомным фрагментам. Рост опухоли сопровождается некрозом клеток и приводит к образованию высокомолекулярных фрагментов ДНКцирк [94], которые могут появляться также в результате процесса активной секреции живыми клетками [24]. Клетки тканей человека, например, эндотелиоциты пупочной вены и периферические лимфоциты, при культивировании секретируют ДНК, причем ее концентрация в среде возрастает во время их активной пролиферации, когда разрушенные клетки практически отсутствуют [95].

При развитии ряда онкологических заболеваний в плазме и сыворотке крови больных увеличивается

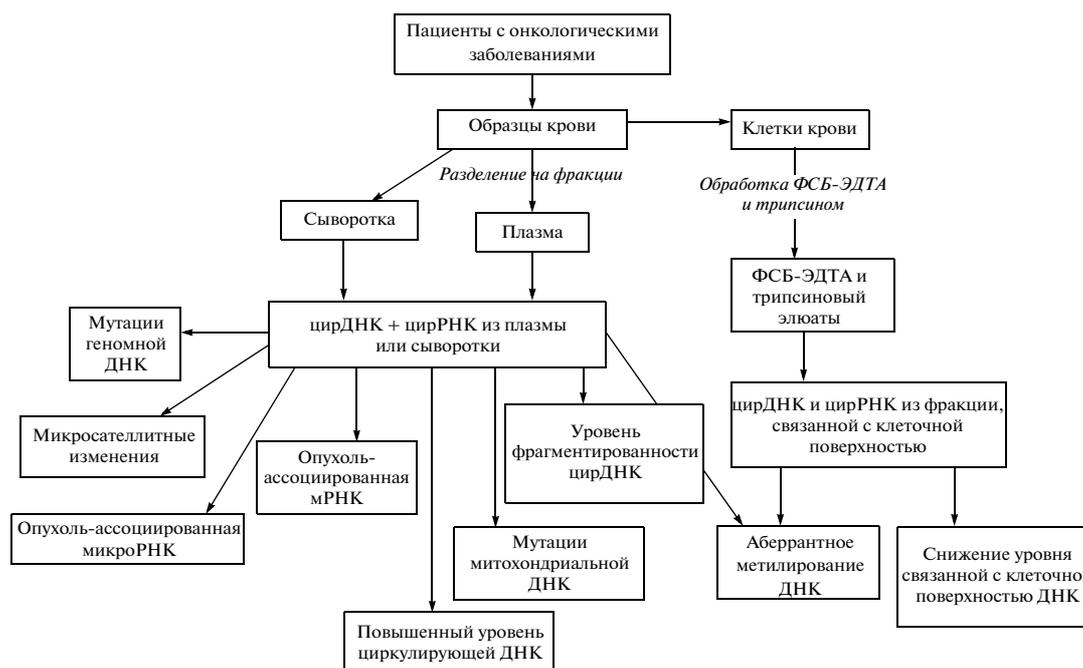


Рис. 2. Общая схема выделения внеклеточных ДНК и РНК, циркулирующих в крови, и их использование для анализа молекулярных онкомаркеров. ДНКцирк и РНКцирк выделяют из плазмы (или сыворотки) крови и из фракции, связанной с поверхностью клеток крови, которую получают последовательной обработкой клеток крови фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 5 мМ EDTA (ФСБ-EDTA) и 0.125%-ным раствором трипсина [115].

концентрация ДНКцирк (рис. 2) [22, 88], так же как и при РЛ [96]. Нами обнаружены достоверные отличия от нормы во фракции ДНКцирк, связанной с поверхностью клеток крови, в зависимости от тяжести заболевания и неблагоприятного прогноза [96, 97]. Другие авторы, используя метод иммунохимической детекции нуклеосом, показали, что концентрация нуклеосом в плазме крови онкологических больных существенно повышается, в том числе, и при РЛ [26, 98]. Наблюдается строгая корреляция между снижением уровня концентрации ДНКцирк и нуклеосом и степенью радикальности резекции опухоли, при этом концентрация увеличивалась при рецидивах болезни.

Возможность разработки специфических методов диагностики обусловлена тем, что в ДНКцирк крови больных с опухолями выявляются те генетические и эпигенетические изменения, которые образуются в ДНК клеток опухоли (рис. 2) [22, 23]. Результаты определения частот встречаемости одних и тех же генетических и эпигенетических нарушений в ДНК опухолевых клеток и в ДНКцирк при РЛ у разных авторов различаются. Это может быть связано с использованием разных методов анализа и с низким уровнем опухолевых ДНК во фракции ДНКцирк, что понижает чувствительность (табл. 2, 3).

Много работ посвящено изучению характера мутаций генов *K-ras* и *p53*, которые обнаруживаются в ДНКцирк при РЛ с частотой 20–24% [99] и 40% [35] соответственно (табл. 2). Мутации гена *p53* в ДНКцирк выявлены у интенсивно курящих людей без

опухолевой патологии, что свидетельствует об их ассоциации с повышенным риском развития РЛ [18]. Мутация Т790М гена *EGFR* встречается с частотой 33% в плазме крови больных и ассоциирована с неблагоприятным исходом [40]. Недавно в митохондриальной ДНК (мтДНК) опухолей найдены мутации, располагающиеся преимущественно в области некодирующей D-петли. С использованием микрочипов найдены мутации мтДНК (с частотой 36%) в образцах биологических жидкостей при РЛ, в том числе, – в БАЛ [100].

В исследованиях Бо-Фаллер (Beau-Faller) и соавт. [19] чувствительность и специфичность определения 12 микросателлитных маркеров РЛ в ДНКцирк плазмы крови составляет 88 и 100% соответственно. Микросателлиты ДНКцирк нестабильны уже на ранних стадиях РЛ (I стадия) и при хронических неопухолевых заболеваниях легких (ХОБЛ и астма), что указывает на перспективность анализа этих маркеров для ранней диагностики РЛ на доклинической стадии и раннего выявления рецидивов [101].

Поиск метилированных маркеров, пригодных для определения в крови, продолжается в двух основных направлениях. Во-первых, определяются целевые гены – участники патогенеза опухолей [102]; во-вторых, проводится масштабный геномный скрининг новых генов-кандидатов, которые затем исследуют в образцах плазмы и сыворотки крови [6]. Первое направление используется исследователями давно и позволило выявить несколько перспективных метилированных маркеров при РЛ.

Так, при анализе целевых генов показано, что наличие двух или более метилированных генов из шести (*BLU*, *CDH13*, *FHIT*, *p16*, *RARβ2* и *RASSF1A*) в плазме крови позволяет рассматривать их как фактор риска развития РЛ с чувствительностью 73% и специфичностью 72% [68]. Два гена *p16* и *ESR1* в ДНКцирк метилированы на I-ой стадии РЛ, причем чувствительность определения больше, чем чувствительность детекции РЭА у этих же пациентов [103]. Обнаружение метилированных маркеров в плазме крови курящих пациентов с ХОБЛ, относящихся к группе с высоким риском РЛ, позволило прогнозировать это заболевание за 3–18 мес. до клинического диагноза [59]. Поиски новых маркерных генов-кандидатов в масштабах генома начаты сравнительно недавно, и результаты скрининга на ДНК из опухолей РЛ должны быть подтверждены на ДНКцирк [6].

Частота метилирования индивидуальных маркеров и общий индекс метилирования коррелирует с увеличением риска развития РЛ. Результаты многих работ свидетельствуют о возможности использования метилированных генов в ДНКцирк в качестве ранних онкомаркеров при РЛ. Для использования этих тестов в практике необходимы дальнейшие системные исследования статуса метилирования генов у пациентов разного возраста, а также при развитии неопухолевых заболеваний и доброкачественных опухолей.

Анализ мРНК генов, специфично экспрессирующихся в опухолях, — одно из направлений поиска тканеспецифических онкомаркеров в крови [22, 88, 104]. РНКцирк плазмы более фрагментирована, чем РНК клеток, однако можно амплифицировать фрагменты длиной в 310 н. [105]. Один из наиболее часто исследуемых РНК-онкомаркеров в крови — мРНК гена *hTERT*, которая первой была обнаружена в плазме больных меланомой [106]. При РЛ в плазме и сыворотке крови мРНК гена *hTERT* выявляется с частотой до 89% [107]. Определение в сыворотке крови мРНК генов *hTERT* и *EGFR* позволяет диагностировать РЛ с высокой чувствительностью и специфичностью (89 и 73% — для *hTERT*; 71 и 80% — для *EGFR*) [107]. Кроме того, чем выше концентрация мРНК *hTERT* в сыворотке, тем очевиднее связь с курением и с тяжестью заболевания (размером опухоли, метастазами и рецидивами).

Продолжается поиск новых мРНК онкомаркеров в сыворотке и плазме крови при помощи анализа целевых генов, а также путем сравнения уровня экспрессии множества генов на микрочипах [108]. Новый маркер при РЛ — мРНК гена *hnRNP B1* в плазме [109], частота выявления которого варьирует от 45 до 100%. Количество мРНК гена *hnRNP B1* выше при плоскоклеточном РЛ, чем при заболевании АК [109].

Как уже отмечалось выше, при раке часто наблюдается тканеспецифическое изменение уровня миРНК, которые характеризуются устойчивостью в плазме и сыворотке крови. Концентрация ее не изменяется при комнатной температуре в течение 4 ч и

при двукратном замораживании—оттаивании [20]. При использовании метода массового секвенирования миРНК на платформе Solexa обнаружено снижение концентрации 28 их видов и увеличение концентрации 63 других видов в сыворотке больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами [20]. Некоторые миРНК-маркеры одинаково характерны для больных РЛ и раком прямой кишки (miR-134, miR-146a, miR-221, miR-222, miR-23a), а также для больных диабетом [20]. Анализ профиля экспрессии миРНК в сыворотке крови больных РЛ, прямой кишки, яичников, молочной железы и предстательной железы позволил построить панель из 28 миРНК-биомаркеров, которые позволили различать онкологических больных и здоровых доноров [110]. При АК легких уровень как отдельных миРНК, так и общего их количества в плазме по сравнению с нормой увеличивается (159 нг/мл и 68 нг/мл) [111]. При помощи полногеномного анализа на платформе Solexa найдено четыре (miR-486, miR-30d, miR-1 and miR-499) миРНК, которые перспективны как прогностические маркеры для РЛ [112].

В большинстве случаев частота обнаружения молекулярно-генетических маркеров в плазме крови больных раком значительно ниже, чем в самой опухолевой ткани. Это понятно, так как концентрация и фрагментированность ДНКцирк высока, так же как и содержание опухолевой ДНК в составе ДНКцирк. Одной из причин, кроме невысокой концентрации и фрагментированности ДНКцирк, является низкий уровень содержания опухолевой ДНК в общем количестве ДНКцирк. Так, например, количество мутантных последовательностей, в среднем, составляет 0.18% от общего количества ДНКцирк при раке прямой кишки [21].

ДНКцирк не только присутствуют в плазме, но также связаны с поверхностью клеток крови, вероятно, за счет образования комплексов с поверхностными белками, а также с фосфолипидами клеточной мембраны через двухвалентные катионы [113]. Эти ДНК составляют основную часть ДНКцирк крови здоровых доноров (более 90%). При опухолях различной локализации изменяются концентрация и состав как ДНКцирк плазмы, так и связанных с клеточной поверхностью [97, 114]. Определение суммарной фракции ДНКцирк (из плазмы и с поверхности клеток крови) повышает чувствительность анализа метилированных форм генов [114, 115]. Такой подход можно использовать для увеличения чувствительности анализа любых потенциальных ДНК- и РНК-онкомаркеров в крови, как это, например, показано при изучении мРНК генов *ki-67* и *RASSF8* в РНКцирк крови больных с опухолями молочной железы [115].

Еще одно направление — разработка чувствительных и специфичных анализов для первичной диагностики рака и мониторинга заболевания после терапии — связано с использованием новейших технологий, таких как массовое параллельное секвенирование, амплификация индивидуальных молекул

(дискретная ПЦР) и другие. Повысить чувствительность методов анализа можно, предварительно увеличив количество ДНК путем мультиплексной или полногеномной амплификации, либо путем селективного выделения фракции опухолевых ДНК за счет использования сайт-специфической рестрикции или высокоаффинных ДНК-связывающих белков, например, метил-связывающих белков.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-01334), интеграционного проекта Президиума СО РАН № 12, проекта № 21.2 в рамках Программы фундаментальных исследований РАН “Фундаментальные науки – медицине”, а также ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 (Госконтракт П256 от 29.04.2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Parkin D.M., Freddie B., Ferlay J., Pisani P. 2005. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **55**, 74–108.
- Аксель Е.М. 2003. Заболеваемость и смертность от рака легкого в России. Перспективные подходы лекарственной терапии немелкоклеточного рака легкого. В кн.: “Новое в терапии рака легкого (терапия рака легкого начала XXI века)”. Под ред. Переводчиковой Н.И. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 8–16.
- Mutti A. 2008. Molecular diagnosis of lung cancer: an overview of recent developments. *Acta Biomed.* **79**, 11–23.
- Переводчикова Н.И., Бычков М.Б. 2003. *Новое в терапии рака легкого (терапия рака легкого начала XXI века)*. Под ред. Переводчиковой Н.И. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 54–69.
- Travis W.D., Brambilla E., Müller-Hermelink H.K., Harris C. C. 2004. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. *World Health Organization Classification of Tumors*. 1–344.
- Anglim P.P., Alonzo T.A., Laird-Offringa I.A. 2008. DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Mol. Cancer.* **81**, 1–13.
- Лихтенштейн А.В., Потапова Г.И. 2003. Генетические дефекты как маркеры опухолевого роста. *Молекуляр. биология.* **37**, 181–193.
- Залетаев Д.В. 2005. Системы молекулярных маркеров в ДНК-диагностике онкозаболеваний. *Молекуляр. медицина.* **1**, 10–17.
- Тюляндин С.А. 2003. Перспективные подходы лекарственной терапии немелкоклеточного рака легкого. В кн.: “Новое в терапии рака легкого (терапия рака легкого начала XXI века)”. Под ред. Переводчиковой Н.И. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 118–128.
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* **429**, 457–463.
- Zhu C.-Q., Shih W., Ling C.-H., Tsao M.-S. 2006. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J. Clin. Pathol.* **59**, 790–800.
- Sung H.J., Cho J.Y. 2008. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB Rep.* **41**, 615–625.
- Cho W. C. 2009. Role of miRNAs in lung cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9**, 773–776.
- Granville C.A., Dennis P.A. 2005. An overview of lung cancer genomics and proteomics. *Am. J. Respir. Cell Mo. Biol.* **32**, 169–176.
- Sinchaikul S., Hongsachart P., Sriyam S., Tantipaiboonwong P., Phutrakul S., Chen S. T. 2008. Current proteomic analysis and post-translational modifications of biomarkers in human lung cancer materials. *Chang. Gung. Med. J.* **31**, 417–430.
- Bührens R.I., Amelung J.T., Reymond M.A., Beshay M. 2009. Protein expression in human non-small cell lung cancer: a systematic database. *Pathobiol.* **76**, 277–285.
- Belinsky S.A., Liechty K.C., Gentry F.D., et al. 2006. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res.* **66**, 3338–3344.
- Hagiwara N., Mechanic L.E., Trivers G.E., et al. 2006. Quantitative detection of p53 mutations in plasma DNA from tobacco smokers. *Cancer Res.* **66**, 8309–8317.
- Beau-Faller M., Gaub M.P., Schneider A., et al. 2003. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients. *Int. J. Cancer.* **105**, 361–370.
- Chen X., Ba Y., Ma L., et al. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* **18**, 997–1006.
- Diehl F., Schmidt K., Choti M.A., et al. 2008. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Med.* **14**, 985–990.
- Fleischhacker M., Schmidt B. 2007. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta.* **1775**, 181–232.
- Anker P., Mulcahy H., Stroun M. 2003. Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies? *Int. J. Cancer.* **103**, 149–152.
- Stroun M., Anker P. 2005. Circulating DNA in higher organisms cancer detection brings back to life an ignored phenomenon. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **51**, 767–774.
- Molina R., Auge J.M., Filella X., Vinolas N., Alicarte J., Domingo J.M., Ballesta A.M. 2005. Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) in patients with benign and malignant diseases: comparison with CEA, SCC, CYFRA 21-1 and NSE in patients with lung cancer. *Anticancer Res.* **25**, 1773–1778.
- Holdenrieder S., von Pawel J., Dankelmann E., et al. 2008. Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 7813–7821.
- Nisman B., Biran H., Ramu N., Heching N., Barak V., Peretz T. 2009. The diagnostic and prognostic value of ProGRP in lung cancer. *Anticancer Res.* **29**, 4827–4832.
- Wittner B.S., Sgroi D.C., Ryan P.D., Bruinsma T.J., Glas A.M., Male A., Dahiya S., Habin K., Bernards R., Haber D. C. 2008. Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2988–2993.

29. Краснов Г.С., Ханкин С.Л., Букурова Ю.А., Зацепина О.Г., Опарина Н.Ю., Гарбуз Д.Г., Ершова А.Н., Машкова Т.Д., Карпов В.Л., Берестень С.Л. 2009. Протеом злокачественных опухолей толстой кишки человека: идентификация растворимых белков с повышенным содержанием в опухоли. *Молекуляр. биология.* **43**, 610–615.
30. Букурова Ю.А., Ханкин С.Л., Краснов Г.С., Григорьева Е.С., Машкова Т.Д., Лисицын Н.А., Карпов В.Л., Берестень С.Ф. 2010. Оценка эффективности идентификации белковых маркеров опухолей толстой кишки методами 2D-анализа и биоинформатического поиска. *Молекуляр. биология.* **44**, 375–381.
31. Michor F. 2005. Chromosomal instability and human cancer. *Philos. Trans. R Soc. Lond B Biol. Sci.* **360**, 631–635.
32. Meuwissen R., Berns A. 2005. Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev.* **19**, 643–664.
33. Haussmann H.J. 2007. Smoking and lung cancer: future research directions. *Int. J. Toxicol.* **26**, 353–364.
34. Baryshnikova E., Destro A., Infante M.V., et al. 2008. Molecular alterations in spontaneous sputum of cancer-free heavy smokers: results from a large screening program. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1913–1919.
35. Andriani F., Conte D., Mastrangeto T., Leon M., Rattliffe C., Roz L., Pelosi G., Goldsraw P., Sozzi G., Pastorino U. 2004. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int. J. Cancer.* **108**, 91–96.
36. Chang Y.-L., Wu C.-T., Lin S.-C., Hsiao C.-F., Jou Y.-S., Lee Y.-C. 2007. Clonality and prognostic implications of p53 and epidermal growth factor receptor somatic aberrations in multiple primary lung cancers. *Clin. Cancer Res.* **13**, 52–58.
37. Trombino S., Neri M., Puntoni R., Angelini C., Loprevite M., Cesario P., Imperatori A., Dominionioni L., Ardizzone A., Filiberi R., Russo P. 2005. Mutations in K-ras codon 12 detected in plasma DNA are not an indicator of disease in patients with non-small cell lung cancer. *Clin. Chem.* **51**, 1313–1314.
38. Sartori G., Cavazza A., Sgambato A., et al. 2009. EGFR and K-ras mutations along the spectrum of pulmonary epithelial tumors of the lung and elaboration of a combined clinicopathologic and molecular scoring system to predict clinical responsiveness to EGFR inhibitors. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 478–489.
39. Keohavong P., Lan Q., Gao W.M., Zheng K.C., Mady H.H., Melhem M.F., Mumford J.L. 2005. Detection of p53 and K-ras mutations in sputum of individuals exposed to smoky coal emissions in Xuan Wei County, China. *Carcinogenesis.* **26**, 303–308.
40. Maheswaran S., Sequist L.V., Nagrath S., et al. 2008. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N. Engl. J. Med.* **359**, 366–377.
41. Yung T.K., Chan K.C., Mok T.S., Tong J., To K.F., Lo Y.M. 2009. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2076–2084.
42. Han S.-W., Kim T.-Y., Jeon Y.K., et al. 2006. Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2538–2544.
43. Ye Y., Wang D., Su C., Rong T., Guo A. 2009. Combined detection of p53, p16, Rb, and EGFR mutations in lung cancer by suspension microarray. *Genet. Mol. Res.* **8**, 1509–1518.
44. Steiling K., Ryan J., Brody J.S., Spira A. 2008. The field of tissue injury in the lung and airway. *Cancer Prev. Res. (Phila Pa).* **1**, 396–403.
45. Park M.S., Ma C., Aziz M.U., Rao S., Gold K., Samanta M., Guttman M., Grant G.R., Vachani A., Brose M.S. 2007. Genomic copy number alterations in non-small cell lung cancers identified using CBS and MSA. *J. Clin. Oncology.* **25**, 7695–7700.
46. Woenckhaus M., Grepmeier U., Wild P.J., Merk J., Pfeifer M., Woenckhaus U., Stoelcker B., Blaszyk H., Hofstaedter F., Dietmaier W., Hartmann A. 2005. Multitarget FISH and LOH analyses at chromosome 3p in non-small cell lung cancer and adjacent bronchial epithelium. *Am. J. Clin. Pathol.* **123**, 752–761.
47. Hsu H.S., Wen C.K., Tang Y.A., Lin R.K., Li W.Y., Hsu W.H., Wang Y.C. 2005. Promoter hypermethylation is the predominant mechanism in hMLH1 and hMSH2 deregulation and is a poor prognostic factor in nonsmoking lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5410–5416.
48. Zochbauer-Muller S., Fong M.K., Maitra A., Lam S., Geradts Joseph. 2001. 5 CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res.* **61**, 3581–3585.
49. Pan H., Califano J., Ponte J.F., Russo A.L., Cheng K.-H., Thiagalangam A., Nemani P., Sidransky D., Thiagalangam S. 2005. Loss of heterozygosity patterns provide fingerprints for genetic heterogeneity in multistep cancer progression of tobacco smoke-induced non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **65**, 1664–1669.
50. Minna J.D., Roth J.A., Gazdar A.F. 2002. Focus on lung cancer. *Cancer Cell.* **1**, 49–52.
51. Angeloni D. 2007. Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease. *Brief. Func. Genomics Proteomics.* **6**, 19–39.
52. Salaün M., Sesboué R., Moreno-Swirc S., Metayer J., Bota S., Bourguignon J., Thiberville L. 2008. Molecular predictive factors for progression of high-grade preinvasive bronchial lesions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 880–886.
53. Greenman C., Stephens P., Smith R., et al. 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature.* **446**, 153–158.
54. Esteller M. 2008. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148–1159.
55. Duffy M.J., Napieralski R., Martens J.W., Span P.N., Spyrtos F., Sweep F.C., Brunner N., Foekens J.A., Schmitt M., EORTC PathoBiology Group. 2009. Methylated genes as new cancer biomarkers. *Eur. J. Cancer.* **45**, 335–346.
56. Sulewska A., Niklinska W., Kozłowski M., Minarowski Lukasz., Naumnik W., Niklinski J., Dabrowska K., Chyczewski L. 2007. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histoche. Cytobiol.* **45**, 149–158.
57. Licchesi J.D., Westra W.H., Hooker C.M., Herman J.G. 2008. Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2570–2578.
58. Tsou J.A., Galler J.S., Siegmund K.D., Laird P.W., Turla S., Cozen W., Hagen J.A., Koss M.N., Laird-Of-

- fringa I.A.. 2007. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol. Cancer*. **6**, 70–75.
59. Belinsky S.A., Grimes M.J., Casas E., Stidley C.A., Franklin W.A., Bocklage T.J., Johnson D.H., Schiller J.H. 2007. Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum. *Brit. J. Cancer*. **96**, 1278–1283.
60. Palmisano W.A., Crume K.P., Grimes M.J., Winters S.A., Toyota M., Esteller M., Joste N., Baylin S.B., Belinsky S.A. 2003. Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers. *Cancer Res*. **63**, 4620–4625.
61. Fujiwara K., Fujimoto N., Tabata M., Nishii K., Matsuo K., Hotta K., Kozuki T., Aoe M., Kiura K., Ueoka H., Tanimoto M. 2005. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in i serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin. Cancer Res*. **11**, 1219–1225.
62. Zhang L.X., Pan S.Y., Chen D., Xie E.F., Gao L., Shu Y.Q., Lu Z.H., Cheng L., Yang D., Zhang J.N. 2007. Effect of adenomatous polyposis coli(APC) promoter methylation on gene transcription in lung cancer cell lines. *Ai Zheng*. **26**, 576–580.
63. Brooks K.R., To K., Joshi M.-B.M., Conlon D.H., Herndon J.E., Thomas A. D'Amico T.A., Harpole D.H. 2003. Measurement of chemoresistance markers in patients with stage iii non-small cell lung cancer: a novel approach for patient selection. *Ann. Thorac. Surg*. **76**, 187–193.
64. Kim J.S., Kim J.W., Han J., Shim Y.M., Park J., Kim D.-H. 2006. Cohypermethylation of *p16* and *FHIT* promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. **66**, 4049–4054.
65. De Jong W.K., Verpooten G.F., Kramer H., Louwagie J., Groen H.J.M. 2009. Promoter methylation primarily occurs in tumor cells of patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. **29**, 363–370.
66. Grote H.J., Schmiemann V., Geddert H., Rohr U.P., Kappes R., Gabbert H.E., Bocking A. 2005. Aberrant promoter methylation of p16 (INK4a), RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int. J. Cancer*. **116**, 720–725.
67. Schmiemann V., Bocking A., Kazimirek M., Onofre A.S., Gabbert H.E., Kappes R., Gerharz C.D., Grote H.J. 2005. Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clin. Cancer Res*. **11**, 7728–7734.
68. Hsu H.-S., Chen T.-P., Hung C.-H., Wen C.-K., Lin R.-K., Lee H.-C., Wang Y.-C. 2007. Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma. *Cancer*. **110**, 2019–2026.
69. Chen H., Suzuki M., Nakamura Y., Ohira M., Ando S., Iida T., Nakajima T., Nakagawara A., Kimura H. 2006. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep*. **15**, 1281–1285.
70. Grote H.J. 2006. Aberrant promoter methylation as biomarker for molecular cytological diagnosis of lung cancer. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol*. **90**, 216–226.
71. Liu E.T., Kuznetsov V.A., Miller L.D. 2006. In the pursuit of complexity: systems medicine in cancer biology. *Cancer Cell*. **9**, 245–247.
72. Belinsky S.A., Klinge D.M., Dekker J.D., Smith M.W., Bocklage T.J., Gilliland F.D., Crowell R.E., Karp D.D., Stidley C.A., Picchi M.A. 2005. Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clin. Cancer Res*. **15**, 6505–6511.
73. Russo A.L., Thiagalingam A., Pan H., et al. 2005. Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin. Cancer Res*. **11**, 2466–2470.
74. Tzao C., Hsu H.-S., Sun G.-H., Lai H.-L., Wang Y.-C., Tung H.-J., Yu C.-P., Cheng Y.-L., Lee S.-C. 2005. Promoter methylation of the hMLH1 gene and protein expression of human mutL homolog 1 and human mutS homolog 2 in resected esophageal squamous cell carcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. **130**, 1371–1376.
75. Gu J., Berman D., Lu C., Wistuba I.I., Roth J.A., Frazier M., Spitz M.R., Wu X. 2006. Aberrant promoter methylation profile and association with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res*. **12**, 7329–7338.
76. Feng Q., Hawes S.E., Stern J.E., Wiens L., Lu H., Dong Z.M., Jordan C.D., Kiviat N.B., Vesselle H. 2008. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. **17**, 645–654.
77. Verri C., Roz L., Conte D., et al. 2009. Fragile histidine triad gene inactivation in lung cancer the European Early Lung Cancer Project. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. **179**, 396–401.
78. Heller G., Zielinski C.C., Zochbauer-Muller S. 2010. Lung cancer: From single-gene methylation to methylome profiling. *Cancer Metastasis Rev*. **29**, 95–107.
79. Shames D.S., Gao M., Lewis C.M., et al. 2006. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PloS. Med*. **3**, e486.
80. Brena R.M., Morrison C., Liyanarachchi S., Jarjoura D., Davuluri R.V., Otterson G.A., Reisman D., Glaros S., Rush L.J., Plass C. 2007. Aberrant DNA methylation of OLIG1, a novel prognostic factor in non-small cell lung cancer. *PloS Med*. **4**, e108.
81. Bibikova M., Lin Z., Zhou L., Chudin E., et al. 2006. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res*. **16**, 383–393.
82. Christensen B.C., Marsit C.J., Houseman E.A., et al. 2009. Differentiation of lung adenocarcinoma, pleural mesothelioma, and nonmalignant pulmonary tissues using DNA methylation profiles. *Cancer Res*. **69**, 6315–6321.
83. Weber K.S., Donermeyer D.L., Allen P.M., Kranz D.M. 2005. Class II-restricted T cell receptor engineered *in vitro* for higher affinity retains peptide specificity and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 19033–19038.
84. Rauch T.A., Zhong X., Wu X., Wang M., Kernstine K.H., Wang Z., Riggo A.D., Pfeifer G. P. 2008. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 252–257.
85. Bartels C.L., Tsongalis G.J. 2009. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin. Chem*. **55**, 623–631.
86. Landi M.T., Zhao Y., Rotunno M., et al. 2010. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin. Cancer Res*. **16**, 430–441.
87. Bishop J.A., Benjamin H., Cholakh H., Chajut A., Clark D.P., Westra W.H. 2010. Accurate classification of

- non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clin. Cancer Res.* **16**, 610–619.
88. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. 2010. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers. *Curr. Mol. Med.* **10**, 142–165.
 89. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. 2007. Extracellular nucleic acids. *BioEssays.* **29**, 654–667.
 90. Tomita H., Ichikawa D., Sai S., et al. 2007. Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal and gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* **34**, 1908–1910.
 91. Chan K.C., Leung S.F., Yeung S.W., Chan A.T., Lo Y.M. 2008. Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4141–4145.
 92. Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Vlassov V.V., Laktionov P. P. 2008. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1137**, 218–221.
 93. Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. 2001. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann. NY. Acad. Sci.* **945**, 239–249.
 94. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayr F.O., Hesch R.D., Knippers R. 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* **61**, 1659–1665.
 95. Морозкин Е.С., Сильников В.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В.В., Лактионов П.П. 2009. Внеклеточная ДНК в культуре первичных и трансформированных клеток, инфицированных и неинфицированных микоплазмой. *Бюлл. экпер. мед.* **147**, 67–70.
 96. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., et al. 2010. Concentration and distribution of single-copy β -actin gene and LINE-1 repetitive elements in blood of lung cancer patients. *CNAPS VI*.
 97. Tamkovich S.N., Litvjakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyntseva N.V., Laktionov P. P. 2008. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1137**, 214–218.
 98. Holdenrieder S., von Pawel J., Dankelmann E., et al. 2009. Nucleosomes and CYFRA 21-1 indicate tumor response after one cycle of chemotherapy in recurrent non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* **63**, 128–135.
 99. Pathak A.K., Bhutani M., Kumar S., Mohan A., Guleria R. 2006. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin. Chem.* **52**, 1833–1842.
 100. Jakupciak J.P., Maragh S., Markowitz M.E., et al. 2008. Performance of mitochondrial DNA mutations detecting early stage cancer. *BMC Cancer.* **8**, 285.
 101. Samara K., Zervou M., Siafakas N.M., Tzortzaki E.G. 2006. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases. *Respir. Med.* **100**, 202–211.
 102. Barton C.A., Hacker N.F., Clark S.J., O'Brien P.M. 2008. DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol. Oncol.* **109**, 129–139.
 103. Suga Y., Miyajima K., Oikawa T., et al. 2008. Quantitative p16 and ESR1 methylation in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **20**, 1137–1142.
 104. Chan K.C., Lo Y.M. 2007. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. *Br. J. Cancer.* **96**, 681–685.
 105. Cerkovnik P., Perhavec A., Zgajnar J., Novakovic S. 2007. Optimization of an RNA isolation procedure from plasma samples. *Int. J. Mol. Med.* **20**, 293–300.
 106. Kopreski M.S., Benko F.A., Kwak L.W., Gocke C.D. 1999. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1961–1965.
 107. Miura N., Nakamura H., Sato R., et al. 2006. 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.* **97**, 1366–1373.
 108. O'Driscoll L., Kenny E., Mehta J.P., Doolan P., Joyce H., Gammell P., Hill A., O'Daly B., O'Gorman D., Clynes M. 2008. 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 Genom. Proteom.* **5**, 94–104.
 109. Sato A., Sueoka-Aragane N., Saitoh J., Komiya K., Hisatomi T., Tomimasu R., Hayashi S., Sueoka E. 2008. Establishment of a new method, transcription-reverse transcription concerted reaction, for detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a biomarker of lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 1191–1197.
 110. Lodes M.J., Caraballo M., Suci D., Munro S., Kumar A., Anderson B. 2009. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One.* **4**, e6229.
 111. Rabinowits G., Gercel-Taylor C., Day J.M., Taylor D.D., Kloecker G.H. 2009. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung. Cancer.* **10**, 42–46.
 112. Hu Z., Chen X., Zhao Y., Tian T., Jin G., Shu Y., Chen Y., Xu L., Zen K., Zhang C., Shen H. 2010. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1721–1726.
 113. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P. P. 2006. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br. J. Cancer.* **94**, 1492–1495.
 114. Kolesnikova E.V., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Shelestyuk P.I., Permyakova V.I., Vlassov V.V., Tuzikov S.A., Laktionov P.P., Rykova E.Y. 2008. Circulating DNA in the blood of gastric cancer patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1137**, 226–231.
 115. Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Э., Хоффман А.Л., Тамкович С.Н., Стариков А.В., Брызгунова О.Е., Пермякова В.И., Варнеке Е., Шакиель Г., Власов В.В., Лактионов П.П. 2008. Циркулирующие внеклеточные ДНК и РНК крови в диагностике опухолей молочной железы. *Биомед. химия.* **54**, 94–103.