Внеклеточная ДНК при онкологических и других заболеваниях, связанных с нарушением апоптоза

И. Н. Васильева, к.б.н., с.н.с. лаборатории¹
В. Г. Беспалов, д.м.н., зав. научной лабораторией^{1,2}
А. Л. Семенов, к.м.н., н.с. лаборатории¹
Г. В. Точильников, к.м.н., н.с. лаборатории¹

¹ Научная лаборатория химиопрофилактики рака и онкофармакологии
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н. Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург
² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО»,
г. Санкт-Петербург

Extracellular DNA in oncological and other diseases related to apoptosis disorder

I. N. Vasilyeva, V. G. Bespalov, A. L. Semyonov, G. V. Tochilnikov

National Medical Research Centre of Oncology n.a. N. N. Petrov, ITMO University; Saint Petersburg, Russia

Резюме

Представлены результаты собственных исследований внеклеточной ДНК (вкДНК) в экспериментах у животных с перенесенным раком яичника, после воздействия ионизирующей радиации, с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, а также клинических исследований у больных хронической обструктивной болезнью легких и при острых нарушениях мозгового кровообращения. Рассматриваются возможности определения вкДНК в доклинических исследованиях лекарственных средств, в минимально инвазивной диагностике рака, для формирования групп риска, мониторинга заболеваний, изучения механизмов действия и индивидуальной чувствительности к лекарственной терапии.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, нуклеосомы, апоптоз, предраковые заболевания, патологии.

Summary

Results are presented of own studies of extracellular DNA (exDNA) in experiment of animals with transplanted ovarian cancer, after exposure to ionizing radiation, with benign prostatic hyperplasia, clinical studies in patients with chronic obstructive pulmonary disease and with acute disorders of cerebral circulation. The possibilities of exDNA determination for minimally invasive diagnostics in oncological diseases, formation of risk groups, monitoring of diseases, studying mechanisms of action and individual sensitivity to drug therapy are considered.

Key words: extracellular DNA, nucleosomes, apoptosis, precancerous diseases, pathologies.

И. Н. Васильева

В. Г. Беспалов

А. Л. Семенов

Г. В. Точильников

Нарушения в системе апоптоза вовлечены в патогенез многих заболеваний. Так, с ингибированием апоптоза ассоциируют онкологические, аутоиммунные и прочие заболевания, а с усилением апоптоза — нейродегенеративные заболевания, ишемические повреждения и некоторые другие [1]. Способность избегать апоптоз считается характерной чертой злокачественных и предопухолевых клеток [2]. Апоптоз является механизмом супрессии опухоли и способствует удалению клеток, несущих генетические aberrации, в том числе с онкогенным потенциалом. Индукция апоптоза в опухолевых клетках служит распространенным способом действия как фармацевтической, так и радиационной противораковой терапии [3], а также считается клю-

чевым механизмом профилактики рака практически на всех стадиях канцерогенеза. Несмотря на способность раковой клетки усиливать выживаемость и пролиферацию за счет сверхэкспрессии антиапоптотических и инактивации проапоптотических белков, потеря клеток является существенным компонентом агрессивных злокачественных опухолей. Высокие индексы пролиферации обычно сопровождаются высокими индексами апоптоза в агрессивных опухолях различных типов [3]. Это связано не только с конкуренцией за ограниченные питательные вещества, но также и с регуляторной активностью протоонкогенных компонентов, в частности с-Мус [3]. Полагают, что апоптоз — это не просто запрограммированное удаление

клеток, а процесс, двухсторонне влияющий на регенерацию тканей, поскольку, в зависимости от потребности, происходит замена удаленных клеток или дальнейшая индукция апоптоза в соседних клетках [3].

Выделяются два основных пути передачи сигнала апоптоза: рецептор-зависимый (внешний) сигнальный путь с участием рецепторов гибели клетки и митохондриальный (внутренний) путь. В обоих случаях происходит активация каскада каспаз, организующих клеточную гибель. В результате клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной, вне зависимости от пути передачи сигнала [4]. Последствием апоптоза ядродержащих клеток является фрагмента-

ция ДНК. Изначально образуются крупные, 30–700 т. п. н. фрагменты, которые расщепляются в межнуклеосомной области на фрагменты из 160–180 п. н. или кратные этим величинам [4]. Поскольку апоптотические тела трудноопределимы и апоптоз определяют по остаткам тел мертвых клеток или везикулам, которые высвобождаются из умирающей клетки [3], в качестве интегрального маркера протекания процессов апоптоза предложена внеклеточная ДНК (вкДНК), которая циркулирует в плазме крови и других биологических жидкостях в виде фрагментов нуклеосом [5].

Исследование фракционного состава внеклеточной ДНК

Первые сведения о фракционном составе вкДНК онкологических пациентов свидетельствуют о наличии двух фракций — высокомолекулярной (21 т. п. н.) и низкомолекулярной (менее 0,5 т. п. н.) [6]. Изучению вкДНК крови в процессе опухолевого роста посвящены ряд экспериментальных и клинических работ А. С. Белохвостова [5]. Расширение объектов исследования, в частности изучение крыс с гепатомой Зайделла, мышей с опухолью Эрлиха, пациентов с опухолями яичников, и развитие методологии позволили провести фракционный анализ вкДНК с применением горизонтального электрофореза в 1 %-ном агарозе и вертикального электрофореза в 2–16 %-ном градиенте полиакриламида. Было обнаружено, что длина молекул высокомолекулярной фракции лежит в интервале 3,5–6 т. п. н., а низкомолекулярная фракция представляет собой пятно, состоящее из молекул около 160–180 п. н. соответствующей ДНК нуклеосомы.

Исследование содержания вкДНК в плазме крови экспериментальных животных после воздействия ионизирующей радиации [7] показало, что после облучения в дозах от 2 до 100 Гр концентрация вкДНК в плазме крови возрастала с увеличением дозы, и это наблюдалось для временного интервала от 1 часа до 3 дней. Концентрации вкДНК были наибольшими через 5 часов после облучения

в дозах от 8 до 100 Гр. Содержание низкомолекулярной фракции вкДНК также значимо возрастало с увеличением дозы облучения: до 20 Гр зависимость была прямо пропорциональная, от 20 до 100 Гр — логарифмическая [8, 9]. Получены уравнения линейной и логарифмической регрессии, позволяющие достоверно рассчитать дозу облучения по содержанию низкомолекулярной вкДНК [8, 9]. Известно, что лучевая патология вызывает p53-зависимый апоптоз — так, белок P53 блокирует клеточный цикл в фазе G1, стимулирует репарационные процессы, а если активность репарационных систем недостаточна, то модулирует апоптоз, защищая организм от появления мутантных клеток [9].

Низкомолекулярная ДНК находилась в комплексе с РНК и белками. Химиотерапия в ряде случаев приводила к снижению содержания вкДНК в асцитной жидкости больных с опухолями яичников. Кроме того, было показано, что радиопротекторный эффект может быть вызван апоптотическим действием [10].

Секвенирование внеклеточной ДНК

Современные исследования на ксенографных моделях мультиформной глиобластомы, а также у пациентов с меланомой или раком легкого методом секвенирования случайной массивированной выборки фрагментов вкДНК (shotgun libraries), показали, что в среднем длина низкомолекулярных фрагментов вкДНК из опухоли составляет 134–144 п. н., а из нормальных тканей — 167 п. н. [11]. Так, в составе нуклеосомы ДНК длиной 147 п. н. закручена вокруг гистонового октамера, а линкерная ДНК длиной 20–90 п. н. стабилизирована гистоном H1, и появление фрагментов с длиной менее 145 п. н., по-видимому, связано с ее выделением в результате онкоза [12]. Полагают, что целостность вкДНК является отличительным признаком для доброкачественных или злокачественных заболеваний. Солидные опухолевые клетки выделяют фрагменты вкДНК, переменные по длине, в то время как из неопуховых тканей

вкДНК выделяется в результате апоптоза, когда преимущественно образуются фрагменты нуклеосомной величины [13]. Полагают, что в случае доброкачественных новообразований вкДНК выделяется в результате сопровождаемых апоптозом воспалительных процессов [13].

Нами была секвенирована вкДНК крови крыс после воздействия ионизирующего облучения в дозах 8 и 100 Гр, приводящих к возникновению различных форм лучевой болезни — костномозговой и церебральной соответственно. Анализ 80 полученных рекомбинантных клонов показал, что после облучения в дозе 8 Гр длина вставки вкДНК составляла 123–180 п. н., а после облучения 100 Гр — 80–400 п. н. [4, 14]. Увеличение разброса свидетельствует о более значительном повреждении ДНК (двухнитевые разрывы) после воздействия дозы 100 Гр. Значимые различия обнаружены в распределении динуклеотидов [8, 14]. Наши данные свидетельствуют о выделении вкДНК после облучения в дозах 8 или 100 Гр из различных типов тканей, современные исследования с применением метода глубокого секвенирования и определения позиционирования нуклеосом позволяют определять тканевую принадлежность на основании особенностей позиционирования нуклеосом [12].

К настоящему времени исследованы сиквенсы вкДНК здоровых доноров, беременных, больных раком простаты и культуральной среды HUVeC [4]. Обнаружено, что вкДНК представлена ДНК генома, позиционирует нуклеосомы, обогащена G/C-парами и элементами повторов. Полагают, что эти особенности обусловлены свойствами ДНК в кровотоке или механизмом апоптоза.

Работы по исследованию вкДНК при радиационных воздействиях проводятся некоторыми исследователями и, наряду с использованием в дозиметрии, нашли теоретическое продолжение. Так, обнаружено, что выделяемая гибнущими клетками вкДНК содержит значительную часть окисленных нуклеотидов, и эта окисленная ДНК опосредует эффект свидетеля и адаптивный эффект [15].

Таблица
Количество внеклеточной ДНК в плазме крови в норме и при различных патологиях

Вид	Норма / патология	Способ определения	Количество вкДНК в плазме крови	Источник
Крыса	Норма	Выделение фенолом, спектрофлуорометрия с дигидрохлоридом диаминобензойной кислоты	26,3 ± 1,8 нг/мл	7
Крыса	Облучение 2–100 Гр, 5 часов	Тот же	34,8–396,0 нг/мл	7
Крыса	Норма	Выделение фенолом, электрофорез в градиенте полиакриламида	5,5–11,0 нг/мл	9
Крыса	Облучение 8–100 Гр, 5 часов	Тот же	53,2–338,5 нг/мл	9
Крыса-самец	Норма у молодых	ИФА, Cell Death Detection ELISA Plus	1,02 ± 0,30 нг/мкл	18
Крыса-самец	Норма у старых	Тот же	2,00 ± 0,14 нг/мкл	18
Крыса-самец	ДГПЖ у молодых	Тот же	0,80 ± 0,14 нг/мкл	18
Крыса-самец	ДГПЖ у старых	Тот же	3,14 ± 0,76 нг/мкл	18
Крыса-самка	Норма	Тот же	1,76 ± 0,33 нг/мкл	
Крыса-самка	Рак яичника	Тот же	9,84 ± 3,96 нг/мкл	
Человек	Норма	Выделение фенолом, электрофорез в градиенте полиакриламида	30–32 нг/мл	21
Человек	ХОБЛ в ремиссии	Тот же	7,8 ± 2,0 нг/мл	21
Человек	ОНМК, ишемия, 24 часа	Тот же	77,8 нг/мл	24
Человек	ОНМК, геморрагия, 3 часа	Тот же	81,5 нг/мл	24

Примечание: ДГПЖ — доброкачественная гиперплазия предстательной железы, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения.

Показано, что хроматин, выделяемый из умирающих клеток, способен встраиваться в хромосомы, приводя к увеличению репарационных процессов [16]. Повышение содержания вкДНК через 5 часов после облучения с последующим снижением через сутки, впервые выявленное нами, может использоваться в качестве показателя эффективности лучевой терапии онкологических больных и применимо для новых методов терапии, таких как селективная внутренняя радиотерапия с адресной доставкой меченых микросфер [5]. Развитие жидкостной биопсии широко применяется для ведения онкологических пациентов. При исследовании вкДНК могут быть получены характеристики генетических и эпигенетических изменений для стратификации индивидуальной терапии, прослежены молекулярные изменения во время терапии для мониторинга ее эффективности, обнаружена и охарактеризована возможная молекулярная резистентность при проведении терапии, а также возможно высокочувствительное обнаружение минимальной остаточной болезни или доклинического прогресса [17].

Исследование содержания внеклеточной ДНК в крови молодых и старых крыс при индукции доброкачественной гиперплазии предстательной железы

Нами изучено содержание вкДНК в плазме крови молодых (3 месяца) и старых (2 года) самцов крыс с индуцированной доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) в сравнении с интактными молодыми и старыми животными. ДГПЖ индуцировали с помощью введения пролонгированного препарата тестостерона после кастрации. Обнаружено значимое увеличение уровня вкДНК у интактных старых самцов крыс по сравнению с молодыми [18]. У пожилых людей также отмечается повышенный уровень вкДНК в крови; полагают, что вкДНК выделяется не только в связи с системной потерей клеток с возрастом, но и в результате хронических воспалительных процессов [18]. ДГПЖ развивалась через месяц от начала введения тестостерона, при этом у старых крыс степень ДГПЖ была значимо выше, чем у молодых. По-видимому, реакция на введение экзогенного

тестостерона молодым и старым животным различна. У молодых крыс с увеличением уровня тестостерона в крови содержание вкДНК не изменялось значимо, тогда как у старых крыс содержание вкДНК было существенно выше, чем у молодых животных, при одинаковом уровне тестостерона в крови. Таким образом, мы впервые выявили, что у старых крыс при развитии ДГПЖ наблюдается усиление гибели клеток в тканях, проявляемой в увеличении содержания вкДНК [18]. Полученные нами результаты обосновывают возможность применения вкДНК в качестве диагностического критерия при исследовании состояния здоровья пожилых мужчин с ДГПЖ.

Исследование внеклеточной ДНК в крови крыс с перевитым раком яичника

Нами оценена динамика изменения содержания вкДНК в плазме крови и асците при развитии перевиваемого асцитного рака яичника (РЯ) у самок крыс. Исследование проведено на 12-недельных крысах-самках Вистар массой 210 ± 35 г. В работе использована адекватная модель перевиваемого РЯ, которая развивается

в брюшной полости так же, как РЯ на поздних стадиях у человека [19]. По-видимому, увеличение содержания вкДНК при РЯ ассоциировано с повышением соотношения митотического и апоптозного индексов. Вызываемое диоксидом значимое (на 56%) увеличение продолжительности жизни сопровождается снижением уровня вкДНК через 2 дня после внутрибрюшинного введения препарата, уровень вкДНК также остается ниже, чем в контрольной группе, в течение 4–6 последующих дней после трансплантации РЯ. Таким образом, определение вкДНК может быть использовано для оценки эффективности действия цитостатика, а также диагностики патологического процесса и мониторинга лечения в клинике.

Внеклеточная ДНК у больных с хроническими заболеваниями бронхолегочной системы

Нами обнаружено пониженное содержание вкДНК в плазме крови больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) в состоянии ремиссии по сравнению с больными хроническим необструктивным бронхитом (ХНБ) и здоровыми донорами, причем содержание вкДНК у больных ХНБ и здоровых доноров не различалось достоверно [14, 20]. Содержание вкДНК у близких родственников пациентов с ХОБЛ и ХНБ не различалось значимо и не отличалось от содержания у здоровых доноров [20]. С возрастом у больных ХОБЛ наблюдалась тенденция к увеличению содержания вкДНК, однако ее содержание было значимо ниже, чем у здоровых доноров того же возраста. Возрастные увеличения уровня вкДНК отмечены другими авторами [18]. Снижение содержания вкДНК в крови у пациентов ХОБЛ в ремиссии согласуется с общими представлениями о снижении апоптоза в патогенезе развития заболевания [1] и соответствует современным представлениям о происхождении значительной ее части из нейтрофилов в результате нетоза в ответ на провоспалительные агенты [21]. Так, снижение уровня вкДНК при ХОБЛ в ремиссии сопровождается

снижением уровня нейтрофилов [22]. Если обострение ХОБЛ характеризуется усилением апоптоза, то при ремиссии могут происходить восстановительные процессы в легочной ткани, когда процессы регенерации преобладают над процессами апоптоза, что может служить одним из объяснений повышения развития рака легкого у данных пациентов в связи с накоплением генетически поврежденных клеток [20]. Это согласуется с общими представлениями о том, что у людей с высоким риском развития злокачественных опухолей процессы клеточной гибели и соответственно уровень вкДНК снижены, а при развитии злокачественных опухолей растут [23]. Определение вкДНК можно использовать при наблюдении за больными ХОБЛ с целью ранней диагностики рака легкого.

Исследование низкомолекулярной внеклеточной ДНК у больных с острым нарушением мозгового кровообращения

Нами обнаружено, что острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) характеризуется повышением содержания вкДНК в течение 3 суток после острого периода [9, 14, 24]. При ОНМК геморрагического типа максимальное увеличение содержания вкДНК в плазме крови отмечено через 3 часа после начала болезни, а в случае ОНМК ишемического типа — через 24 часа. Аналогичная фракция вкДНК в том же количестве была обнаружена в спинномозговой жидкости больных с ишемическим ОНМК [14]. Полученные результаты обосновывают возможность использования определения вкДНК для дифференциальной диагностики ОНМК по ишемическому или геморрагическому типу на ранних стадиях заболевания, а также подтверждают роль апоптоза в развитии ОНМК и могут служить показателем тяжести повреждения головного мозга [24].

Количественные показатели содержания вкДНК в плазме крови, полученные в наших экспериментальных и клинических исследованиях, приведены в таблице.

Заключение

Уровень вкДНК отражает процессы апоптоза в организме. В проведенных нами экспериментальных и клинических исследованиях выявлены изменения содержания вкДНК в плазме крови при различных патологиях. Ионизирующее облучение крыс вызывает увеличение содержания вкДНК пропорционально дозе облучения. Секвенирование вкДНК облученных крыс показывает, что вкДНК выделяется из различных участков генома и тканей. Исследовано содержание вкДНК при предраковых заболеваниях. У старых интактных крыс самцов уровень вкДНК значимо повышается по сравнению с молодыми самцами крыс; при индукции ДГПЖ тестостероном у молодых крыс уровень вкДНК не меняется, тогда как у старых значительно увеличивается, что говорит об усилении процессов апоптоза с возрастом и при развитии ДГПЖ у старых животных. У пациентов с ХОБЛ в период ремиссии содержание вкДНК снижается, что говорит об уменьшении гибели клеток в легких и ослаблении воспалительного процесса. У больных с ОНМК содержание вкДНК увеличено в течение 3 суток после острого периода, причем динамика уровней вкДНК у больных с ишемическим и геморрагическим инсультом различается, что может использоваться как для оценки тяжести повреждения головного мозга, так и дифференциальной диагностики различных типов инсультов. Таким образом, определение вкДНК в плазме крови может быть использовано в доклинических исследованиях лекарственных средств, в минимально инвазивной диагностике рака, для формирования групп риска, мониторинга заболеваний, изучения механизмов действия и других целей.

Список литературы

1. Thompson C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease // *Science*. — 1995. — Vol. 267, N. 5203. — P. 1456–1462.
2. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer // *Cell*. — 2000. — Vol. 100, N. 1. — P. 57–70.
3. Gregory C. D., Peterson M. An apoptosis-driven 'onco-regenerative niche': roles of tumour-as-

- sociated macrophages and extracellular vesicles // *Phil. Trans. R. Soc. B.*— 2017.— Vol. 373.— 20170003.
4. Васильева И. Н., Подгорная О. И., Беспалов В. Г. Нуклеосомная фракция внеклеточной ДНК как показатель апоптоза // *Цитология.*— 2015.— Т. 57, № 2.— С. 87–94.
 5. Васильева И. Н., Беспалов В. Г. Роль внеклеточной ДНК в возникновении и развитии злокачественных опухолей и возможности ее использования в диагностике и лечении онкологических заболеваний // *Вопр. онкол.*— 2013.— Т. 59, № 6.— С. 673–681.
 6. Stroun M., Anker P., Lyautey J. et al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*— 1987.— Vol. 23, N. 6.— P. 707–712.
 7. Vladimirov V. G., Belokhvostov A. S., Sherlina S. S. et al. Extracellular DNA level in the blood of irradiated rats // *Intern. J. Radiat. Biol.*— 1992.— Vol. 62.— P. 667–671.
 8. Vasilyeva I. N. Low-molecular-weight DNA in blood plasma as an index of the influence of the influence of ionizing radiation // *Ann. NY Ac. Sci.*— 2001.— Vol. 942.— P. 221–228.
 9. Зинкин В. Н., Васильева И. Н., Вознюк И. А. Определение внеклеточной низкомолекулярной ДНК в крови как диагностический метод для клинических и экспериментальных исследований // *Авиакосм. и экол. мед.*— 2011.— Т. 45, № 5.— С. 47–51.
 10. Vasilyeva I., Bepalov V., Baranova A. Radioprotective combination of α -tocopherol and ascorbic acid promotes apoptosis that is evident by release of low-molecular weight DNA fragments into circulation // *Intern. J. Radiat. Biol.*— 2015.— Vol. 91.— P. 872–877.
 11. Underhill H. R., Kitzman J. O., Hellwig S. et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA // *PLoS Genet.*— 2016.— Vol. 12, N. 7.— P. e1006162.
 12. Thierry A. R., Messaoudi S. El., Gahan P. B. et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology // *Cancer Metastasis Rev.*— 2016.— Vol. 35.— P. 347–376.
 13. Feng J., Gang F., Li X. et al. Plasma cell-free DNA and its DNA integrity as biomarker to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate-specific antigen // *Int. Urol. Nephrol.*— 2013.— Vol. 45.— P. 1023–1028.
 14. Васильева И. Н., Зинкин В. Н. Значение низкомолекулярной ДНК плазмы крови в диагностике патологических процессов различного генеза. // *Биомед. химия.*— 2013.— Т. 59, вып. 3.— С. 58–73.
 15. Kostyuk S. V., Tabakov V. J., Chestkov V. V. et al. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts // *Mutat. Res.*— 2013.— Vol. 747–748.— P. 6–18.
 16. Mitra I., Khare N. K., Raghuram G. V. et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes // *J. Biosci.*— 2015.— Vol. 40, N. 1.— P. 91–111.
 17. Holdenrieder S. Liquid Profiling of Circulating Nucleic Acids as a Novel Tool for the Management of Cancer Patients // *Advances in Experimental Medicine and Biology.*— 2016.— Vol. 924.— P. 53–60.
 18. Vasilyeva I. N., Bepalov V. G., Von J. D. et al. Cell-free DNA plasma levels differ in age-specific pattern in healthy rats and castrated with testosterone-induced benign prostatic hyperplasia // *Int. J. Genomics.*— 2019. doi.org/10.1155/2019/8173630.
 19. Bepalov V. G., Kireeva G. S., Belyaeva O. A. et al. Experimental study of antitumor activity and effects on leukocyte count of intraperitoneal administration and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC) with dioxadet in a rat model of ovarian cancer // *J. Chemotherapy.*— 2016.— Vol. 28.— P. 203–209.
 20. Васильева И. Н., Беспалов В. Г. Низкомолекулярная ДНК плазмы крови у больных хронической обструктивной болезнью легких // *Тер. архив.*— 2017.— Т. 89, № 3.— С. 24–28.
 21. Wright T. K., Gibson P. G., Simpson J. L. et al. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease // *Respirology.*— 2016.— Vol. 21, N. 3.— P. 467–475.
 22. Liu J., Pang Z., Wang G. et al. Advanced role of neutrophils in common respiratory diseases // *J. Immunol. Res.*— 2017.— 6710278.
 23. Wielscher M., Vierlinger K., Kegler U. et al. Diagnostic Performance of Plasma DNA Methylation Profiles in Lung Cancer, Pulmonary Fibrosis and COPD // *EBioMedicine.*— 2015.— Vol. 2, N. 8.— P. 929–936.
 24. Васильева И. Н., Вознюк И. А., Беспалов В. Г. Содержание низкомолекулярной ДНК в плазме крови и спинномозговой жидкости больных с острым нарушением мозгового кровообращения // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.*— 2015.— Т. 9, № 2.— С. 50–53.

Для цитирования. Васильева И. Н., Беспалов В. Г., Семенов А. Л., Точильников Г. В. Внеклеточная ДНК при онкологических и других заболеваниях, связанных с нарушением апоптоза // *Медицинский алфавит. Серия «Диагностика и онкотерапия».*— 2019.— Т. 3.— 28 (403).— С. 47–51.

MANAGE PAIN
УПРАВЛЯЙ БОЛЬЮ

M O S C O W

14–16 NOVEMBER 2019
НОЯБРЯ

M O S K V A

**X Interdisciplinary
International Congress
«Manage Pain»**

**X Междисциплинарный
Международный Конгресс
«Управляй Болью»**

EuLAP
European League Against Pain

**АССОЦИАЦИЯ
МЕДИЦИНЫ**