

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Мешков И.О., Макарова А.С., Снигирь Е.А., Ершов П.В., Маркелова Е.Е., Махотенко А.В., Ивашечкин А.А., Астафьева В.А., Максютин В.В., Маралова Е.Д., Игнатъев Б.Д., Макаров В.В., Юдин В.С., Кескинов А.А.

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ: ПОВТОРЯЕМОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МЕТОДИКИ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКОГО

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, 119121, Москва, Россия

Совершенствование методик диагностики рака легкого (РЛ) направлено на увеличение эффективности лекарственного и хирургического лечения за счет своевременного выявления РЛ. Молекулярно-генетический анализ свободно-циркулирующей внеклеточной ДНК (сцДНК), выделенной из плазмы крови, может в перспективе дополнить методы лучевой диагностики РЛ и стать вариантом исследования при подозрении на РЛ или его рецидив. Ранее нами была разработана методика выявления случаев РЛ по профилю фрагментации сцДНК, выделенной из плазмы крови пациентов. Целью настоящей работы была оценка повторяемости и воспроизводимости результатов, полученных при использовании разработанной нами методики для диагностики РЛ. Исследовали 12 случаев РЛ (стадии I, II, III – 3, 5, 4 случаев, соответственно). Случаи были разделены на две группы по 6 образцов таким образом, что в каждой группе были представлены I, II, III стадии. Для каждого образца высокопроизводительное секвенирование (NGS-анализ) сцДНК фрагментов из плазмы крови выполняли суммарно два раза. Оценка воспроизводимости результатов классификации клинических случаев на основании сравнения двух независимых и непересекающихся групп пациентов с РЛ была выполнена в 1 и 2 день постановки NGS-анализа. При сравнении результатов для групп в 1 день проведения NGS-анализа значение p -величины было равно 1, во 2 день – 0,45. Для всего массива данных повторяемость методики была оценена посредством теста Мак-Немара. Сравнение результатов NGS-анализа, полученных в 1 и 2 день показало, что для каждой группы различий не было обнаружено (p -величина=1). Таким образом, были доказаны воспроизводимость и повторяемость методики диагностики рака легкого по профилю фрагментации сцДНК.

Ключевые слова: рак легкого; внеклеточная ДНК; фрагменты ДНК; повторяемость; воспроизводимость; методика молекулярной диагностики

Для цитирования: Мешков И.О., Макарова А.С., Снигирь Е.А., Ершов П.В., Маркелова Е.Е., Махотенко А.В., Ивашечкин А.А., Астафьева В.А., Максютин В.В., Маралова Е.Д., Игнатъев Б.Д., Макаров В.В., Юдин В.С., Кескинов А.А. Комплексный подход для исследования образцов плазмы крови: повторяемость и воспроизводимость методики диагностики рака легкого. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (7): 358-364.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-7-358-364>

Для корреспонденции: Макарова Анна Сергеевна, канд. биол. наук, аналитик 2-й категории; e-mail: amakarova@cspsfmba.ru

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке ФМБА в рамках Государственного задания № 388-00154-22-00 ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.05.2021

Принята к печати 28.05.2024

Опубликовано 25.06.2024

Meshkov I.O., Makarova A.S., Snigir E.A., Ershov P.V., Markelova E.E., Makhotenko A.V., Ivashechkin A.A., Astafieva V.A., Maksyutina V.V., Maralova E.D., Ignatev B.D., Makarov V.V., Yudin V.S., Keskinov A.A.

AN INTEGRATED APPROACH FOR STUDYING BLOOD PLASMA SAMPLES: REPEATABILITY AND REPRODUCIBILITY OF LUNG CANCER DIAGNOSIS METHOD

Federal State Budgetary Institution «Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks» of the FMBA, 119121, Moscow, Russia

Improvement of methods for diagnostics of lung cancer (LC) is aimed at increasing the effectiveness of drug and surgical treatment through timely detection of LC. Molecular-genetic analysis of circulating-free DNA (cfDNA) isolated from blood plasma can complement methods of radiological diagnosis of LC in prospect and become an option for detection of suspected cases of LC or of its relapse. Previously, we have developed a method for identifying LC cases based on cfDNA fragmentation pattern in the blood plasma samples of patients. The purpose of this study was to assess the repeatability and reproducibility of the developed method for LC diagnostics. We studied 12 LC cases (stage I, II, III – 3, 5, 4 cases, respectively). These cases were divided into two groups of six cases each, in the way that I, II, III stages are present in each group. For each case we performed high-throughput sequencing (NGS-analysis) of cfDNA fragments from blood plasma twice in total. An evaluation was conducted to determine the reproducibility of the outcomes of the classification of clinical cases based on the comparison of two separate and non-overlapping groups of LC cases on the first and second days of NGS-analysis. When comparing the results for the groups on the 1-st day of NGS-analysis, the p -value was equal to 1, on the 2-nd day – 0.45. For the entire data set, the repeatability of the method was assessed using McNemar's test. Comparison of NGS-analysis results obtained on the 1-st and 2-nd days showed no differences for both groups (p -value=1). Thus, the developed method for lung cancer diagnosis by cfDNA fragmentation pattern has been proven to be reproducible and repeatable.

Key words: lung cancer; cell-free DNA; DNA fragments; repeatability; reproducibility; molecular diagnostic technique

For citation: Meshkov I.O., Makarova A.S., Snigir E.A., Ershov P.V., Markelova E.E., Makhotenko A.V., Ivashechkin A.A., Astafieva V.A., Maksyutina V.V., Maralova E.D., Ignatev B.D., Makarov V.V., Yudin V.S., Keskinov A.A. An integrated approach for studying blood plasma samples: repeatability and reproducibility of lung cancer diagnosis method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (7): 358-364 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-7-358-364>

For correspondence: Makarova Anna Sergeevna, PhD (Biological Sciences), an analyst of the 2-nd category; e-mail: amakarova@cspfmba.ru

Information about authors:

Meshkov I.O., <https://orcid.org/0000-0002-7358-6108>;
Makarova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-9711-9256>;
Snigir E.A., <https://orcid.org/0000-0003-1245-7764>;
Ershov P.V., <https://orcid.org/0000-0002-3386-6201>;
Markelova E.E., <https://orcid.org/0009-0007-0628-7582>;
Makhotenko A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7894-9422>;
Ivashechkin A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0148-1112>;
Astafieva V.A., <https://orcid.org/0009-0003-4711-1808>;
Maksyutina V.V., <https://orcid.org/0009-0003-8136-2379>;
Maralova E.D., <https://orcid.org/0009-0008-9095-7346>;
Ignatev B.D., <https://orcid.org/0009-0004-3350-5838>;
Makarov V.V., <https://orcid.org/0000-0001-9495-0266>;
Yudin V.S., <https://orcid.org/0000-0002-9199-6258>;
Keskinov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7378-983X>.

Acknowledgments. This work was supported by the Federal Medical and Biological Agency and carried out in the frame of State Contract n. № 388-00154-22-00 with Federal State Budgetary Institution "Centre for Strategic Planning and Management of Bio-medical Health Risks" of the Federal Medical and Biological Agency.

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interest.

Received 21.05.2024

Accepted 28.05.2024

Published 25.06.2024

Введение. Рак легкого (РЛ) остается одним из наиболее распространенных типов рака и характеризуется высоким уровнем летальности [1]. По данным российского Канцер-регистра [2] за 2021 год, летальность в течение одного года после постановки диагноза составила 47,2 %, и только 56,9 % случаев рака были выявлены на I–III стадиях, что демонстрирует необходимость расширения спектра существующих диагностических методик. Разработка методик ранней диагностики РЛ призвана увеличить эффективность лекарственного и хирургического лечения за счет своевременного обнаружения РЛ. В их числе есть малоинвазивные методики анализа жидкостной биопсии, которые на сегодняшний день являются многообещающими для трансляционной медицины. Анализы образцов жидкостной биопсии в перспективе могут дополнить методы лучевой диагностики РЛ и стать вариантом исследования при подозрении на РЛ или его рецидива при невозможности взятия образца ткани из патологического очага, в том числе при помощи бронхоскопии.

Однако высокочувствительных и высокоспецифичных методик лабораторной диагностики РЛ посредством анализа образцов жидкостной биопсии на данный момент не существует, несмотря на открытие большого числа кандидатных биомаркеров РЛ – биомолекул белковой природы [3], циркулирующей опухолевой ДНК [4] и некодирующих РНК [5,6]. На молекулярном уровне злокачественные изменения в тканях легкого сопряжены с нестабильностью геномной ДНК в опухолевых клетках [7]. Процессы апоптоза и некро-

за опухолевых клеток приводят к накоплению фрагментов ДНК [8], которые попадают в биологические жидкости организма [9]. Такая фракция ДНК получила название свободно-циркулирующей внеклеточной ДНК (сцДНК). Под термином «фрагментом сцДНК» следует понимать совокупность фрагментов сцДНК, находящихся вне источника происхождения, например, фрагментом сцДНК плазмы крови. Молекулярно-генетический анализ фрагмента сцДНК представляет собой активно эволюционирующее направление исследований за рубежом, что следует из ряда новых результатов по изучению диагностической ценности определения профиля фрагментации сцДНК у пациентов с РЛ [10–12] и другими злокачественными новообразованиями (ЗНО) [13]. На данный момент в российской научной и патентной литературе не описаны методики диагностики РЛ с использованием классификаторов, позволяющих с высокой точностью разделять когорты субъектов исключительно по профилю фрагментации сцДНК в плазме крови.

Ранее нами была разработана методика обработки и анализа образцов периферической венозной крови, включающая стадии забора цельной крови, выделения плазмы крови, выделения сцДНК из плазмы крови, подготовки ДНК-библиотек и их высокопроизводительного секвенирования (NGS-анализ) с последующим анализом результатов с применением алгоритмов биоинформатической и биостатистической обработки данных для выявления случаев РЛ по профилю фрагментации сцДНК [14].

Целью работы было проведение исследования по оценке повторяемости и воспроизводимости результатов, полученных при использовании разработанной методики для диагностики РЛ.

Материал и методы. Сбор биоматериала – образцов крови от пациентов с РЛ – проводили в рамках выполнения научно-исследовательской работы (Рег. № АААА-А20-120112390034-8 в системе www.rosrid.ru). Работы по сбору биоматериала были одобрены независимым комитетом по этике при ООО «Арте Мед Ассистанс» (выписка из протокола заседания № 276 от 11 мая 2022 г.).

В когортное исследование были включены субъекты согласно следующим критериям: мужчины и женщины в возрасте >18 лет; наличие клинических признаков и показаний к операции или биопсии по поводу первичного рака легкого; гистологическое подтверждение диагноза после биопсии/операции; удовлетворительная функция печени (билирубин < 2 верхних границ нормы (ВГН); увеличение концентрации аланиновой трансаминазы и аспартат-трансаминазы не более чем до 2,5 ВГН; удовлетворительная функция почек (креатинин ≤ 1,5 ВГН); адекватная функция костного мозга, выраженная в следующих показателях периферической крови: количество нейтрофилов > 1500 × 10⁶/л; количество тромбоцитов > 75 × 10⁶/л; содержание гемоглобина > 90 г/л; отсутствие лечения по поводу рака легкого в прошлом; отсутствие признаков рака легкого IV стадии; отсутствие другого онкологического заболевания в анамнезе за последние 5 лет; отсутствие клинических признаков, указывающих на вторичную природу опухолевых образований в легких, обнаруженных на основании данных компьютерной томографии или других методов лучевой диагностики; отсутствие активного легочного туберкулеза; отсутствие гепатита В, гепатита С, ВИЧ; для женщин – отсутствие беременности на момент исследования и на протяжении последних 5 лет; отсутствие гематологических патологий.

Взятие образцов периферической венозной крови осуществляли в пробирки PAXgene Blood ccfDNA Tubes (QIAGEN, Германия) объемом 10 мл. Хранение пробирок до фракционирования крови осуществляли при температуре от +4 °С до +10 °С в течение не более 7 суток с момента взятия крови.

Фракция плазмы крови была получена центрифугированием согласно протоколу производителя пробирок PAXgene Blood ccfDNA Tubes (QIAGEN, Германия), криоконсервирована и хранилась при температуре –80 °С.

Для выделения сцДНК из образцов плазмы крови использовали набор QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Германия). Ранее было установлено, что с помощью этого набора реагентов можно получать максимальный выход сцДНК из образцов плазмы, что позволяет стандартизировать саму процедуру выделения сцДНК [15].

Концентрацию сцДНК измеряли флуориметром Quantus (Promega, США) с использованием флуоресцентного красителя QuantiFluor ONE dsDNA Dye (Promega, США). Чистоту выделенной сцДНК оценивали спектрофотометрически на NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Распределение сцДНК по длинам фрагментов оценивали с помощью капиллярного электрофореза на автоматизированной станции Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, США).

Библиотеки для NGS-анализа были подготовлены с помощью набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, США). Контроль качества готовых библиотек осуществляли путем измерения концентраций на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) и измерения длины фрагментов ДНК на автоматизированной станции Agilent 4200 TapeStation. Секвенирование проводили на приборах NovaSeq 6000 (Illumina, США) с параметрами 101/8/0/101, учитывая покрытие не менее 100 млн прочтений на образец. NGS-анализ фрагментов сцДНК, выделенных из каждого образца плазмы крови, в этом исследовании выполняли дважды.

Для классификации пациента в группу условно здоровых людей либо группу больных с РЛ проводили биоинформатический и биостатистический анализ профиля фрагментации сцДНК, выделенной из плазмы крови, с применением ранее разработанного классификатора [14]. Показатели чувствительности и специфичности классификатора для детекции РЛ I–III стадий составили 0,81 и 0,79–0,90, соответственно.

При оценке воспроизводимости и повторяемости результатов детекции случаев РЛ с применением раз-

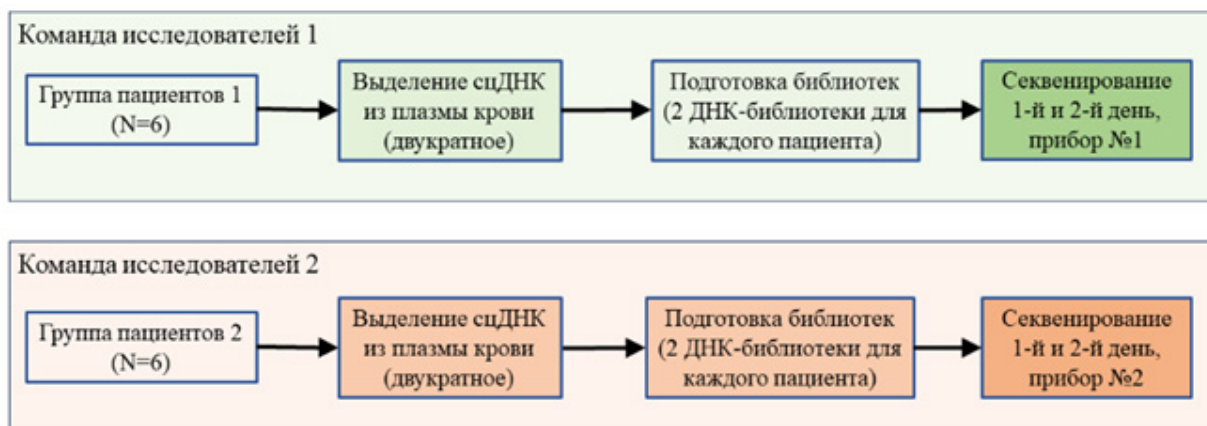


Рис. 1. Дизайн экспериментов по оценке повторяемости и воспроизводимости методики.

работанной методики исследовали два непересекающихся набора образцов плазмы крови пациентов с гистологически верифицированным РЛ: по 6 различных клинических случаев РЛ I–III стадий в каждой группе (I стадия – 3 случая, II стадия – 5 случаев, III стадия – 4 случая). Образцы плазмы крови были обработаны двумя независимыми командами исследователей: для каждого образца были выполнены два независимых выделения сцДНК, последующая подготовка двух ДНК-библиотек и их секвенирование в разные дни (1-й день и 2-й день NGS-анализа сцДНК). Каждой группе пациентов (клинических случаев РЛ) соответствовали отдельная команда исследователей и отдельная приборная база. Дизайн экспериментов по оценке повторяемости и воспроизводимости классификации 12 клинических случаев РЛ на основании анализа профилей фрагментации сцДНК приведен на рис. 1.

Для определения воспроизводимости результатов проводили межгрупповое сравнение результатов классификации клинических случаев РЛ с помощью точного теста Фишера. Повторяемость проверяли с помощью критерия Мак-Немара и Q-критерия Кохрейна. Отсутствие статистически значимых различий между двумя независимыми выборками образцов (группа пациентов 1 и группа пациентов 2) на 1-й и 2-й день секвенирования принимали как показатель хорошей воспроизводимости, отсутствие статистически значимых различий результатов, полученных при исследовании одних и тех же образцов в разные дни, рассматривали в качестве показателя хорошей повторяемости. Было принято, что между выборками (группами пациентов)

отсутствуют статистически значимые различия, если полученное значение p -величины превышает 0,1.

Результаты. В данной работе термин «повторяемость» означает свойство методики показывать один и тот же результат для конкретного клинического случая при повторном анализе одного и того же образца с использованием одних и тех же реактивов, приборов и при участии одной и той же команды исследователей в другой момент времени. Термин «воспроизводимость» означает свойство методики демонстрировать близкие значения чувствительности, специфичности и аккуратности при проверке на различных группах клинических случаев.

Оценка воспроизводимости результатов классификации клинических случаев на основании сравнения двух независимых и непересекающихся групп пациентов с РЛ была выполнена в 1-й и 2-й день постановки NGS-анализа сцДНК (рис. 2). При сравнении распределений результатов классификации, полученных для двух групп случаев, в 1-ый день проведения NGS значение p -величины было равно единице, во 2-й день – 0,45 (см. рис. 2). Таким образом, была доказана воспроизводимость методики.

Повторяемость методики была оценена посредством теста Мак-Немара: для каждой группы случаев было проведено сравнение результатов классификации по выборке наблюдений, полученной в 1-й день выполнения NGS-анализа сцДНК, с результатами по выборке, полученной при выполнении NGS-анализа - во 2-й день. При сравнении результатов по выборкам наблюдений различий не было обнаружено

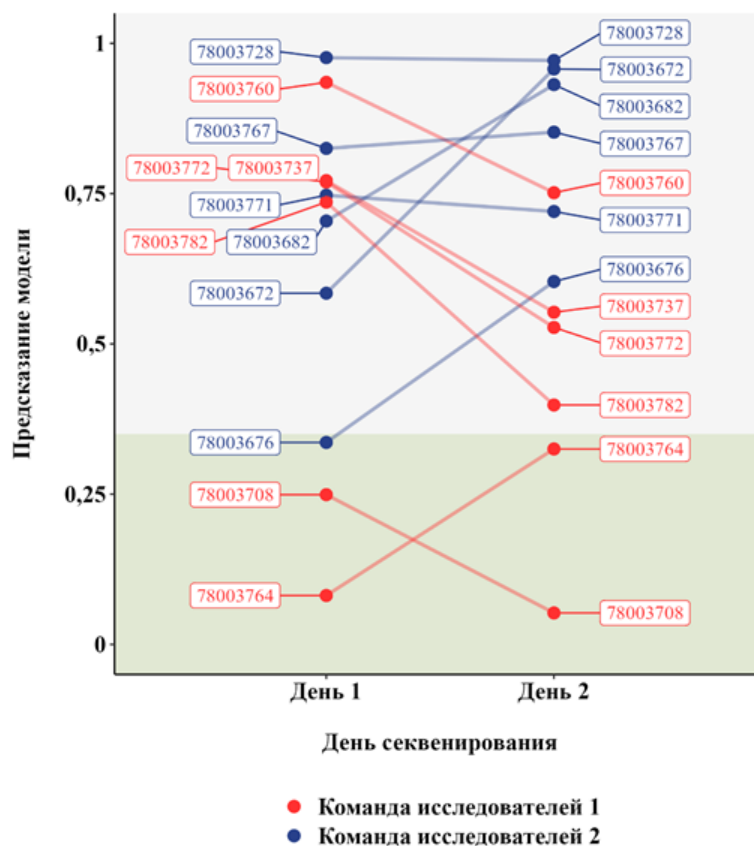


Рис. 2. Оценка повторяемости и воспроизводимости диагностической классификации клинических случаев РЛ. Зеленым цветом обозначена область принадлежности к здоровым субъектам.

(p -величина = 1) (см. рис. 2).

Ранее, при создании диагностической методики, 11 из 12-ти исследуемых клинических случаев были классифицированы как РЛ («оригинальные наблюдения», за исключением клинического случая «78003764», который ранее не классифицировали). При сопоставлении результатов текущего исследования с «оригинальными наблюдениями» также была продемонстрирована повторяемость результатов: 9 случаев в 1-ый день и 10 случаев во 2-й день NGS-анализа сцДНК были классифицированы как РЛ (значение p -величины, согласно Q-критерию Кохрейна, составило 0,22) (рис. 3).

Обсуждение. Для анализа данных NGS-анализа в диагностической методике мы использовали разработанный нами ранее бинарный классификатор со значением AUC («площадь под кривой») $\approx 0,87$, который позволяет различать условно здоровых субъектов и пациентов с РЛ I–III стадий [14]. По данным мета-анализа X. Не и соавторов [16], посвященного оценке аналитической точности биомаркеров на основе сцДНК для диагностики РЛ, было установлено усредненное значение AUC = 0,89, что позволяет оценивать настоящую методику как соответствующую уровню аналогов и имеющую хорошую диагностическую ценность.

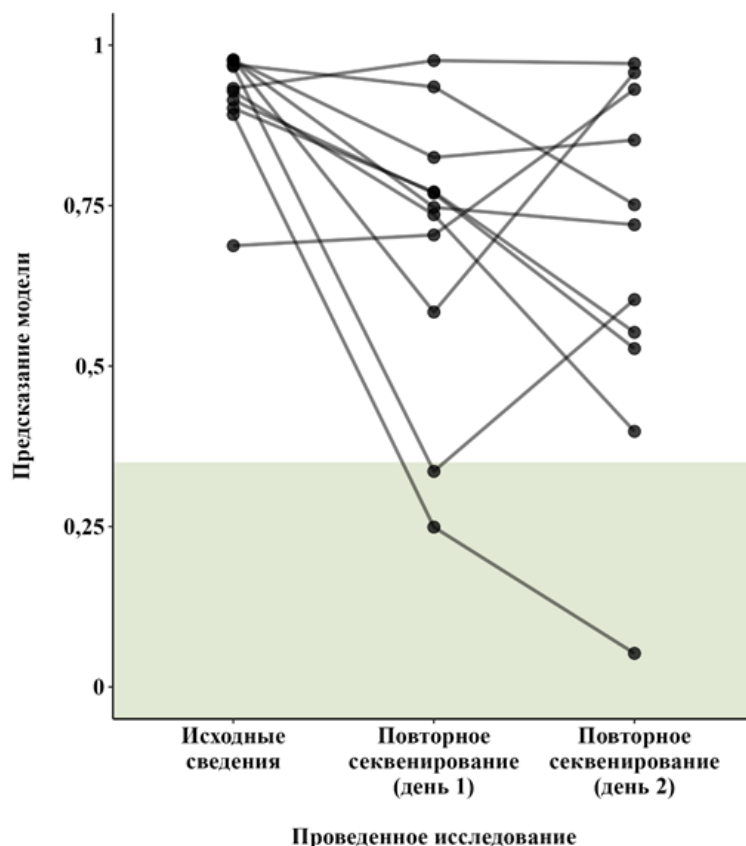


Рис. 3. Оценка повторяемости результатов классификации случаев РЛ. Зеленым цветом обозначена область принадлежности к здоровым субъектам.

Отличительной особенностью нашей методики является ее функционирование для минимально инвазивной диагностики РЛ без использования сведений о дополнительных геномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных биомаркерах, клинических характеристиках субъектов и результатах иных лабораторных или инструментальных исследований, в том числе посредством методик визуализации на основе рентгенографии и компьютерной томографии. Поэтому методика может быть позиционирована как потенциально перспективный диагностический тест, основанный на использовании одного лабораторного метода исследования – NGS-анализа сцДНК, выделенной из образцов плазмы крови.

В целом нужно отметить, что технические решения

[17–20], основанные на определении генетических вариантов (замены нуклеотидов, инсерции, делеции), а также на оценке изменений копийности генов, демонстрируют высокие показатели общей повторяемости и воспроизводимости. Однако широко распространенное определение однонуклеотидных генетических вариантов (SNV) в фрагментированной ДНК с использованием NGS-анализа имеет как преимущества, так и недостатки, причем в числе последних можно выделить невысокую воспроизводимость детекции (*от англ. variant calling*) SNV. Так, в работе [21] было установлено, что этот показатель составил около 80%, подразумевая появление до 20% ошибочных вариантов детекции. Данный недостаток отсутствует при анализе данных о профиле фрагментации сцДНК. Кроме того, сверхмалые концен-

трации (ниже предела определения) циркулирующей опухолевой ДНК с характерным профилем мутаций, выявляемые в образцах жидкостной биопсии на ранних стадиях развития ЗНО, не являются критичными.

В экспериментальной части нашей работы акцент был сделан не на оценку классической биологической повторности, а на оценку повторяемости и воспроизводимости методики, для чего в отношении одного и того же образца плазмы крови проводили NGS-анализ трижды (1 раз ранее, при создании методики, и 2 раза для данного исследования) и, соответственно, трижды проводили биоинформатическую и биостатистическую обработку NGS-данных с использованием классификатора на основе комбинации методов машинного обучения.

Среди подобных исследований, описанных в научной литературе, можно упомянуть следующие две работы. В публикации G. Alexander и соавторов [22] приведены результаты оценки работы бинарного классификатора (в частности, данные о повторяемости и воспроизводимости) в рамках валидации методики ранней диагностики рака по профилю метилирования сцДНК. Так, в ходе четырех тестовых запусков с тремя наборами реагентов и инструментов онкологическое заболевание было правильно детектировано в 77 (из 81) целевых образцах, полученных от пациентов с верифицированным диагнозом, и не детектировалось в 45 (из 45) образцах, полученных от здоровых субъектов [22]. S. Wang и соавторы [23] привели результаты проверки диагностического классификатора, который, учитывая множественные параметры фрагмента сцДНК (включая изменения копийности генов), способен различать случаи РЛ и его отсутствие при значениях чувствительности и специфичности 85–92% и 96–99%, соответственно, и значениях AUC 0,97–0,98. Образцы, полученные от трех здоровых субъектов и трех пациентов с РЛ, были проанализированы в трехкратной повторности, при этом была достигнута 100% аккуратность классификации. Кроме того, имела место высокая согласованность данных: как трех повторов для каждого условия теста, так и между разными запусками и условиями теста (две партии одних и тех же образцов) [23]. Две рассмотренные выше работы с примерами использования методик диагностики РЛ, основанных на анализе профилей фрагментации сцДНК, демонстрируют воспроизводимость и повторяемость их результатов и согласуются с нашими данными. Однако они требуют больше входных данных, чем классификатор, используемый в данном исследовании.

Заключение. Разработанная методика характеризуется воспроизводимостью и повторяемостью и позволяет выявлять РЛ I–III стадий, используя данные, полученные исключительно на основе NGS-анализа профиля фрагментации сцДНК плазмы крови. Результаты выполненного исследования соотносятся с известными данными и подтверждают возможность использования NGS-анализа жидкостной биопсии для диагностики РЛ. Кроме того, полученные результаты указывают на высокий потенциал применимости данного подхода в клинической практике, поскольку демонстрируют не только стабильность результатов многокомпонентного анализа фрагмента сцДНК, но и возможность получать воспроизводимые диагностические оценки при выполнении NGS-анализа разными группами исследо-

вателей и на различном оборудовании.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 3 – 23 с. м. REFERENCES)

1. Информационный портал «Рак сегодня». Доступен по ссылке: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Дата обращения: 11.09.2023.
2. Информационный портал «Канцер-регистр». Доступен по ссылке: <http://www.cancer-reg.ru/>. Дата обращения 11.09.2023.
14. Юдин С.М., Кескинов А.А., Макаров В.В., Юдин В.С., Мешков И.О., Макарова А.С. и др. Способ малоинвазивной диагностики рака легкого по фрагментированной свободно-циркулирующей ДНК на основе методов машинного обучения. Патент РФ № RU2820322; 2024.

REFERENCES

1. Information portal "Cancer today". International Agency for Research on Cancer. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Accession date on 2023, September 11.
2. Information portal "Cancer-Register". Available at: <http://www.cancer-reg.ru/>. Accession date on 2023, September 11. (in Russian)
3. Dhanurdhar Y., Jagaty S.K., Subhankar S., Behera D. Diagnostic and prognostic significance of serum biomarkers - serum amyloid A and CYFRA 21-1 in lung cancer. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* 2023; 13(2): 89-94. DOI: 10.4103/ijabmr.ijabmr.639.22.
4. Li C., Shao J., Li P., Feng J., Li J., Wang C. Circulating tumor DNA as liquid biopsy in lung cancer: Biological characteristics and clinical integration. *Cancer Lett.* 2023; 577: 216365. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216365.
5. Córdoba-Lanús E., Domínguez de-Barros A., Oliva A., Mayato D., Gonzalvo F., Remírez-Sanz A. et al. Circulating miR-206 and miR-1246 as markers in the early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(15): 12437. DOI: 10.3390/ijms241512437.
6. Le P., Romano G., Nana-Sinkam P., Acunzo M. Non-coding RNAs in cancer diagnosis and therapy: focus on lung cancer. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(6): 1372. DOI: 10.3390/cancers13061372.
7. Tian J., Wang H., Lu C., Liu L., Zhang X., Xie Y. et al. Genomic characteristics and prognosis of lung cancer patients with MSI-H: A cohort study. *Lung Cancer*. 2023; 181: 107255. DOI: 10.1016/j.lungcan.2023.107255.
8. Hu Z., Chen H., Long Y., Li P., Gu Y. The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2021; 157: 103166. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.103166.
9. Casagrande G.M.S., Silva M.O., Reis R.M., Leal L.F. Liquid biopsy for lung cancer: Up-to-Date and Perspectives for Screening Programs. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(3): 2505. DOI: 10.3390/ijms24032505.
10. Wang S., Xia Z., You J., Gu X., Meng F., Chen P. et al. Enhanced detection of landmark minimal residual disease in lung cancer using cell-free DNA fragmentomics. *Cancer Res. Commun.* 2023; 3(5): 933-42. DOI: 10.1158/2767-9764.crc-22-0363.
11. Leal A.I.C., Mathios D., Jakubowski D., Johansen J.S., Lau A., Wu T. et al. Cell-free DNA fragmentomics in the diagnostic evaluation of patients with symptoms suggestive of lung cancer. *Chest*. 2023; 164(4): 1019-27. DOI: 10.1016/j.chest.2023.04.033.
12. Mathios D., Johansen J.S., Cristiano S., Medina J.E., Phallen J., Larsen K.R. et al. Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomics. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 5060. DOI: 10.1038/s41467-021-24994-w.
13. Wang F., Li X., Li M., Liu W., Lu L., Li Y. et al. Ultra-short cell-free DNA fragments enhance cancer early detection in a multi-analyte blood test combining mutation, protein and fragmentomics. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2023; DOI: 10.1515/cclm-2023-0541.
14. Yudin S.M., Keskinov A.A., Makarov V.V., Yudin V.S., Meshkov I.O., Makarova A.S. et al. A method for minimally invasive

- diagnosis of lung cancer using fragmented free-circulating DNA based on machine learning methods. Patent RF № RU2820322; 2024. (in Russian).
15. Devonshire A.S., Whale A.S., Gutteridge A., Jones G., Cowen S., Foy C.A. et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406(26): 6499-512. DOI: 10.1007/s00216-014-7835-3.
 16. He X., Chi Y., Peng J., Hu W., Ding C., Li B. A systematic review and meta-analysis of circulating cell-free DNA as a diagnostic biomarker for non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 2022; 14(6): 2103-2111. DOI: 10.21037/jtd-22-646.
 17. Schilter K.F., Smith B.A., Nie Q., Stoll K., Felix J.C., Jarzembowski J.A. et al. Analytical validation and implementation of a pan cancer next-generation sequencing panel, CANSeqTMKids for molecular profiling of childhood malignancies. *Front. Genet.* 2023; 14: 1067457. DOI: 10.3389/fgene.2023.1067457.
 18. Bartlett J., Amemiya Y., Arts H., Bayani J., Eng B., Grafodatskaya D. et al. Multisite verification of the accuracy of a multi-gene next generation sequencing panel for detection of mutations and copy number alterations in solid tumours. *PLoS One.* 2021; 16(10): e0258188. DOI: 10.1371/journal.pone.0258188.
 19. Yu L., Lopez G., Rassa J., Wang Y., Basavanhally T., Browne A. et al. Direct comparison of circulating tumor DNA sequencing assays with targeted large gene panels. *PLoS One.* 2022; 17(4): e0266889. DOI: 10.1371/journal.pone.0266889.
 20. Woodhouse R., Li M., Hughes J., Delfosse D., Skoletsky J., Ma P. et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PLoS One.* 2020; 15(9): e0237802. DOI: 10.1371/journal.pone.0237802.
 21. Qi Y., Liu X., Liu C.G., Wang B., Hess K.R., Symmans W.F. et al. Reproducibility of variant calls in replicate next generation sequencing experiments. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0119230. DOI: 10.1371/journal.pone.0119230.
 22. Alexander G.E., Lin W., Ortega F.E., Ramaiah M., Jung B., Ji L. et al. Analytical validation of a multi-cancer early detection test with cancer signal origin using a cell-free DNA-based targeted methylation assay. *PLoS One.* 2023; 18(4): e0283001. DOI: 10.1371/journal.pone.0283001.
 23. Wang S., Meng F., Li M., Bao H., Chen X., Zhu M., et al. Multidimensional cell-free DNA fragmentomic assay for detection of early-stage lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2023; 207(9): 1203-13. DOI: 10.1164/rccm.202109-2019OC.