УДК 616-006:577.113

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

Фоменко Ю.М.[1], Жумакаева С.С.[1], Жумакаева А.М.[1], Сирота В.Б.[1], Муравлёва Л.Е.[1]

[1]Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, e-mail: lem2403@mail.ru

В обзоре приведен анализ данных исследования внеклеточных нуклеиновых кислот при онкопатологии. Количество внеклеточных нуклеиновых кислот в крови больных со злокачественными образованиями было выше, чем у больных с доброкачественными образованиями и у здоровых лиц. Больные, у которых после лечения сохранялся высокий уровень внеклеточных нуклеиновых кислот, имели более плохой прогноз. Часть внеклеточных ДНК имеют опухолевое происхождение и содержат различные опухоль-ассоциированные изменения, в том числе точечные мутации, микросателлитные изменения, инверсии и делеции и др., что представляет безусловный интерес для жидкостной биопсии. Обсуждаются пути высвобождения внеклеточных нуклеиновых кислот в кровь, в том числе гипотеза о том, что для разных типов раков механизмы высвобождения нуклеиновых кислот из клеток могут различаться. Приводятся данные о различных формах существования внеклеточных нуклеиновых кислот в крови: в свободном виде, связанные с эритроцитами и лейкоцитами, с белками, белковыми комплексами, в составе везикул. Негативные эффекты внеклеточных нуклеиновых кислот при онкопатологии связаны с ингибирующим воздействием на иммунную систему. Обсуждаются вопросы использования внеклеточных НК для диагностики, прогноза и мониторинга эффективности лечения онкопатологии.

Ключевые слова: внеклеточные нуклеиновые кислоты, кровь, биомаркеры, онкология.

EXTRACELLULAR NUCLEIC ACIDS IN ONCOLOGICAL PATHOLOGY

Fomenko Yu.M.[1], Zhumakaeva S.S.[1], Zhumakaeva A.M.[1], Sirota V.B.[1], Muravlyova L.E.[1]

[1]Karaganda State Medical University, Karaganda, e-mail: lem2403@mail.ru

In the review, we have done the analysis of scientific results of extracellular nucleic acids in oncopathology. The concentration of extracellular nucleic acids in the blood of patients with malignant formations is higher than in patients with benign neoplasm and in healthy ones. Patients with the high level of extracellular nucleic acids after treatment have a worse prognosis. Part of extracellular DNA has a tumor origin and contains various tumor-associated changes, including point mutations, microsatellite changes, inversions and deletions, etc. That fact has undoubted interest for liquid biopsy. The ways of extracellular nucleic acids releasing into the blood are discussed, including the hypothesis that mechanisms of the releasing of nucleic acids from cells depend on different types of cancers. Extracellular nucleic acids in the blood exist in the different forms: free form, associated with erythrocytes and leukocytes, in the form of complexes with proteins, in the vesicles. Negative effects of extracellular nucleic acids in oncopathology are associated with their inhibitory effect on the immune system. The prospects of extracellular nucleic acids detection for the diagnosis, prognosis and monitoring of the effectiveness of oncopathology treatment are discussed.

Keywords: extracellular nucleic acids, blood, biomarkers, oncology.

С момента открытия присутствия в крови и других биологических жидкостях (ликворе, лимфе, моче и т.д.) человека внеклеточных или циркулирующих нуклеиновых кислот (вкНК) проводятся исследования не только их биологической роли, но и возможности использования в качестве диагностических показателей при различных патологических состояниях. вкНК рассматриваются как потенциальные диагностические, прогностические и предиктивные биомаркеры рака [1; 2]. Leon S.A. и соавт. [3] установили увеличение концентрации вкДНК в крови больных со злокачественными новообразованиями с различной локализацией опухоли (колоректальный рак, рак легких, молочной железы, желудка и пищевода и др.) по сравнению со здоровыми лицами. Было показано, что в

сыворотке крови у больных с онкологическими заболеваниями концентрация внДНК варьировала в пределах от 50 до 5000 нг/мл, тогда как у лиц контрольной группы – не превышала 50 нг/мл [4].

Поскольку вкДНК имеют достаточно короткий период полувыведения из организма, то, по мнению Leon S.A. и соавт. [3], её можно рассматривать как маркер опухолевой нагрузки.

Abo-El-Eneen M.S. и соавт. [5] показали, что концентрация вкДНК в крови больных со злокачественными новообразованиями превышала не только аналогичный показатель здоровых лиц, но и больных с доброкачественными опухолями. После лучевой терапии уровень вкДНК снижался у больных раком легких, яичников, матки, молочной железы и др., но степень снижения существенно варьировала. У больных, у которых отсутствовал ответ на противоопухолевую терапию, содержание вкДНК в сыворотке крови сохранялось на высоком уровне или продолжало возрастать. Показано, что больные, у которых после лечения сохранялся высокий уровень вкДНК, имели более плохой прогноз [4; 6; 7]. Проведен анализ содержания вкДНК в крови больных после хирургического лечения опухолей. У больных без рецидивов после хирургического лечения содержание вкДНК снижалось. У больных, у которых заболевание прогрессировало, уровень вкДНК оставался высоким [8].

До сих пор нет единого мнения по вопросу, что лучше использовать для определения вкНК – плазму или сыворотку крови. Содержание вкДНК в сыворотке крови существенно превышает таковое в плазме за счет выхода вкДНК из погибающих в процессе свертывания крови лейкоцитов [4].

Было предложено использовать определение концентрации вкНК в плазме/сыворотке крови больных для скрининга некоторых видов рака (рак легких, рак молочной железы и колоректальный рак). В качестве аргумента приводили результаты, полученные Frattini M. et al., которые показали, что количественное определение вкДНК в плазме крови больных с колоректальным раком является более чувствительным методом, чем раково-эмбриональный антиген [9; 10].

Hashad D. et al. выявили взаимосвязь между стадией, размером опухоли и увеличением вкДНК в крови больных раком молочной железы [11]. Вместе с тем опубликованы и другие данные, которые не выявили взаимосвязи между уровнем вкДНК, размером и локализацией опухоли. Кроме того, был установлен существенный рост концентрации вкНК в крови при других патологических состояниях (воспаление, сепсис), после тяжелой физической нагрузки, а также у пожилых людей. Другим фактором, ограничивающим внедрение количественного определения вкДНК в клинике, является

проблема стандартизации методов. В связи с этим применение количественной оценки вкДНК как маркера онкопатологии на сегодняшний день не рекомендовано к использованию в клинике [12].

Развитие методов генетических исследований позволило вывести анализ вкНК на новый уровень. Достигнуты определенные успехи в идентификации типов вкНК в биологических жидкостях больных различными видами раков. Stroun и соавторы [13] высказали предположение, что часть вкДНК, которая определяется в плазме крови больных, имеет опухолевое происхождение. Friel A.M. et al. [14] сообщили о появлении в крови больных специфических mRNA, ассоциированных с наличием рака молочной железы. Fleischhacker M. и Schmidt B. [15] показали, что циркулирующие нуклеиновые кислоты в крови онкологических больных имеют опухолевое происхождение, причем опухоль-ассоциированные изменения определяются как в вкДНК, так и в вкРНК. При этом фракция циркулирующей опухолевой ДНК часто может составлять менее 1% от общей вкДНК [16]. Установлено, что во вкДНК обнаруживаются нарушения, идентичные таковым как в первичной опухоли, так и в метастазах. В вкДНК обнаружены точечные мутации, микросателлитные повторы, инверсии и делеции. Микросателлитные повторы состоят из коротких ди-, три-, тетра-, пента- или гексануклеотидов, продублированных от нескольких до сотен раз. Увеличение количества микросателлитных повторов выше определенного порогового значения и их расположение в геноме приводит к развитию генетических дефектов. Кроме того, в вкДНК обнаружено гиперметилирование промотерных последовательностей. В плазме крови вкДНК также могут присутствовать в комплексе с нуклеосомами, митохондриальные ДНК [17]. Обсуждается их возможный прогностический и предиктивный потенциал, а также использование как инструмента для мониторинга последующей терапии.

Была сформулирована гипотеза геометастазов [18], согласно которой ДНК из опухолевых клеток способна проникать в здоровые клетки и индуцировать злокачественную трансформацию последних, что в конечном итоге приводит к образованию метастазов.

Помимо внеклеточных ДНК, проводится изучение внеклеточных РНК, главным образом microRNA. microRNA – это маленькие некодирующие одноцепочечные молекулы РНК. microRNA вовлечены в разнообразные процессы, включая иммунный ответ, репарацию ДНК, апоптоз, реакции окислительного стресса. Достаточно большое количество microRNA найдено в биологических жидкостях. Основная функция циркулирующих microRNA – обеспечение внеклеточной коммуникации, что играет важную роль в дифференциации и пролиферации. Высказано предположение о существовании активного механизма высвобождения внеклеточных microRNA, в частности посредством церамид-зависимого

секреторного механизма. miRNA циркулирует в плазме крови в комплексе с липопротеинами, апоптотическими тельцами, микровезикулами или экзосомами, что делает их достаточно стабильными [19].

Дизрегуляция microRNA играет важную роль в инициации, развитии и прогрессировании некоторых видов рака у человека. Исследование microRNA является перспективным для ранней диагностики, прогноза и лечения злокачественных новообразований. На сегодняшний день предложено определение в сыворотке или плазме по меньшей мере 79 microRNA в качестве биомаркеров солидных или гематологических опухолей [19]. Получены предварительные данные о том, что циркулирующие microRNA могут быть маркерами предрасположенности к онкопатологии. Вполне вероятно, что сами циркулирующие microRNA могут быть потенциальными мишенями для лечения отдельных видов рака.

Обсуждается гипотеза о механизме передачи опухолевых сигнальных молекул при участии экзосом, в составе которых выявлены мРНК и микроРНК. При этом микроРНК подавляют иммунный ответ [20]. Бондарь Г.В. и соавт. (2013) высказали мнение, что внеклеточные нуклеиновые кислоты могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее воздействие на иммунную систему. Эффект определяется нуклеотидной последовательностью вкНК, метилированием, а также зависит от того, находится ли вкНК в составе белкового комплекса [21].

Исследованиями Е.Ю. Рыковой и соавт. (2008) показано, что у 13% женщин с фиброаденомой и у 60% больных раком молочной железы в вкДНК плазмы крови встречается метилированная форма одного из трех генов опухолевой супрессии RASSF1A, Cyclin D2, RARb2. Если для исследования методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции использовали суммарную вкДНК (вкДНК плазмы крови и из элюатов с форменных элементов клеток крови) метилированные формы этих генов выявляются у 95% женщин с раком молочной железы и у 87% с фиброаденомой молочной железы. Эти же авторы, используя метод количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, установили достоверное увеличение количества копий 18S рРНК и мРНК генов RASSF8 и Ki-67 в крови больных раком молочной железы по сравнению с аналогичными параметрами группы контроля и с фиброаденомой. Чувствительность метода анализ 18S рРНК в плазме крови составила 82%, специфичность 92% [22].

У 83% больных колоректальным раком мутации гена KRAS обнаружены не только в тканях, но и в циркулирующей вкДНК. Помимо этого, у 27% здоровых доноров также обнаружены мутантные гены KRAS в циркулирующей вкДНК, хотя онкологического процесса выявлено не было. Авторы исследования высказали предположение, что это может

быть связано с более высоким риском развития колоректального рака [23]. Было показано, что совместное определение наличия мутантных генов KRAS в циркулирующей вкДНК и увеличение опухолевого маркера CA 19-9 в крови позволяют повысить чувствительность прогностического теста до 90% [24].

Получены интересные результаты о формах существования вкНК в крови онкобольных. Под действием экзонуклеаз вкДНК распадается на короткие олигомерные последовательности, которые связываются с эритроцитами. Связывание с эритроцитами олигонуклеотидов предотвращает появление в крови больных мононуклеотидов и продуктов их катаболизма, которые выполняют функцию аларминов. вкНК могут образовывать комплексы с лейкоцитами, что объясняет возможный механизм переноса ДНК опухолевых клеток в ткани, учитывая способность лейкоцитов к миграции [25].

Г.В. Бондарь и соавт. (2013) также показали более высокий уровень внНК опухолевого генеза в эритроцитарной фракции онкобольных. Кроме того, этими авторами установлено присутствие в эритроцитарной фракции высокомолекулярных последовательностей L1, продукты которой обладают эндонуклеазной активностью и участвуют в деградации внеклеточных нуклеиновых кислот опухолевого происхождения [21].

По данным С.Н. Тамкович и соавт. (2005) [26], в крови больных раком молочной железы не обнаружены вкНК, связанные с поверхностью клеток. У больных раком толстой кишки и раком желудка происходит снижение внРНК, связанных с клетками крови, по сравнению с группой контроля. Не было обнаружено зависимости степени увеличения вкНК от стадии заболевания и размера опухоли. В то же время опубликованы данные о снижении внНК, связанных с эритроцитами, в крови женщин с раком молочной железы относительно контроля [27].

Показано, что вкДНК – олигомеры могут связываться с белками, в частности с альбумином, фибронектином, лактоферрином и др. Приблизительно 1.5% белков плазмы крови обладают способностью связывать вкНК. Химическая модификация вкДНК оказывает безусловное влияние на их свойства. С клетками крови (эритроцитами и лейкоцитами) вкНК могут связываться как с помощью ионных взаимодействий, так и с белками клеточной мембраны [25].

Остается открытым вопрос о происхождении внНК в крови онкологических больных. Причинами увеличения вкНК в крови являются апоптоз/некроз клеток опухоли [2; 25; 28]. Кроме того, высказано предположение о существовании механизма активного высвобождения вкНК опухолевыми клетками (активная метаболическая секреция) [28]. Согласно этому механизму вкДНК секретируется в комплексе с РНК и гликопротеинами.

Наконец, определенный вклад в общий пул вкНК могут вносить и нейтрофильные внеклеточные ловушки, при образовании во внеклеточное пространство которых секретируется ДНК в комплексе с гистонами и ферментами, высвобождаемыми из гранул нейтрофилов [28]. М.Л. Филипенко (2017) считает, что механизмы высвобождения нуклеиновых кислот из клетки могут различаться для разных типов рака [28].

Изменение концентрации вкНК может также быть обусловлено за счет микровезикул, которые образуют опухолевые клетки. Циркулирующие микровезикулы выделены из крови больных некоторыми видами рака. Вполне вероятно участие микровезикул в межклеточной сигнализации между опухолевыми клетками и окружающей средой. Такие везикулы содержат рецепторы, белки, липиды, mRNA, microRNA. Rak J. использовал название «онкосома» для везикул, которые образуются опухолевыми клетками, и высказал предположение, что онкосомы могут содержать онкобелки и другие биологически активные молекулы, способные стимулировать прогрессирование опухоли, инвазию, ангиогенез и метастазы [29]. Высказана гипотеза, что microRNA, входящие в состав опухолевых микровезикул, подавляют иммунитет [25]. Кроме клеток опухолей, микровезикулы могут образовывать тромбоциты, клетки эндотелия и клетки воспалительного ответа. Циркулирующие микровезикулы рассматриваются как источник потенциальных биомаркеров для прогноза прогрессирования опухолей, ангиогенеза, тромбоза и ответа на таргетную терапию [30].

Следовательно, в настоящее время можно выделить следующие направления исследования вкНК. Одно направление связано с изучением количества циркулирующих нуклеиновых кислот в крови больных с различными видами опухолей. Причем проводится определение вкДНК или РНК не только в плазме или сыворотке крови, но и связанные с клетками крови. Большой интерес представляет исследование динамики изменения концентрации вкНК в процессе лечения, особенно при применении различных видов терапии и их комбинации.

Другое важное направление связано с использованием циркулирующих ДНК для жидкостной биопсии, что представляется весьма перспективным для ранней диагностики опухолевого процесса. Перспективность исследования связана с тем, что в отличие от ДНК, полученной из биоптата пораженного органа, исследование вкДНК дает информацию не только о генетическом профиле первичной опухоли, но и метастазов. В этом плане представляются перспективными исследования последних лет, посвященных исследованию эпигенетических модификаций циркулирующей ДНК, важность которых подчеркнута в работе М.Л. Филипенко (2017) [28]. Речь идет о программном разделении метилированной вкДНК по фракциям, которые соответствуют специализированным клеткам организма

человека, что дает возможность определять патологически измененные клетки органа, которые избыточно синтезируют и секретируют специфичную вкДНК [28].

Наряду с изучением вкДНК проводятся интенсивные исследования циркулирующих microRNA. Учитывая то, что microRNA в биологических жидкостях являются достаточно стабильными, ведется разработка определения множественного профиля циркулирующих в крови microRNA в качестве диагностического инструмента. Весомым аргументом являются результаты Bertoli G. et al. [31], показавших информативность определения профилей циркулирующих microRNA для ранней диагностики (miR-9, miR-10b и miR-17-5p), прогноза (miR-148a и miR-335), а также прогнозирования результатов лечения (miR-30c, miR-187 и miR-339-5p) рака молочной железы. Не менее перспективным направлением является разработка новых лекарственных препаратов, основанных на microRNA.

Третье направление связано с исследованием молекулярных механизмов высвобождения вкНК, форм их существования и путей утилизации вкНК из крови онкологических больных, что обеспечит безусловный прогресс в изучении роли вкНК в патогенезе опухолевого процесса.

Список литературы

1. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers // Curr. Mol. Med. 2010, vol. 10 (2), pp. 142-165.
2. Внеклеточные нуклеиновые кислоты как маркеры опухолевого роста / В.Н. Кондратова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. - 2013. - Т. 12, № 3. - С. 3-10.
3. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Varos M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy // Cancer Res. 1977, vol. 37. N. 3, pp. 646–650.
4. O'Driscoll L. Extracellular nucleic acids and their potential as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers // Anticancer Res. 2007, vol. 27 (3A), pp. 1257-1265.
5. Abo-El-Eneen M.S., Anwar M.M., El-Zoghby S.M. et al. Cell-free DNA concentration and integrity as a screening tool for cancer // Indian Journal of Cancer, 2013, vol. 50, no. 3, pp. 175-183.
6. Catarino R., Ferreira M.M., Rodrigues H. et al. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer // DNA Cell. Biol. 2008, vol. 27. no. 8, pp. 415–421.
7. Paci M., Maramotti S., Bellesia E. et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer // Lung Cancer, 2009, vol. 64, no. 1, pp. 92–97.
8. Szpechcinski A., Chorostowska-Wynimko J., Kupis W. et al. Quantitative analysis of free circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC // Expert Opin. Biol. Ther. 2012, vol. 12, suppl. 1, pp. 3-9.

9. Frattini M., Gallino G., Signoroni S. et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer // Cancer Lett, 2008, vol. 263, no. 2, pp. 170–181.

10. Spindler K.G. Methodological, biological and clinical aspects of circulating free DNA in metastatic colorectal cancer // Acta Oncol., 2017, vol. 56 (1), pp. 7-16.

11. Hashad D., Sorour A., Ghazal A., Talaat I. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer // J. Clin. Lab. Anal. 2012, vol. 26, no. 6, pp. 467–472.

12. Zhang R., Shao F., Wu X., Ying K. Value of quantitative analysis of circulating cell-free DNA as a screening tool for lung cancer: a meta-analysis // Lung Cancer, 2010, vol. 69, no. 2, pp. 225–231.

13. Stroun M., Maurice P., Vasioukhin V. et al. The origin and mechanism of circulating DNA // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000, vol. 906, pp. 161–168.

14. Friel A.M., Corcoran C., Crown J., O'Driscoll L. Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer // Breast Cancer Res. Treat, 2010, vol. 123 (3), pp. 613-625.

15. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey // Biochim. Biophys. Acta. 2007, vol. 1775, no. 1, pp. 181-123.

16. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics // Nat. Med. 2008, vol, no. 9, pp. 985-990.

17. Телышева Е.Н. Свободно-циркулирующая ДНК плазмы крови. Возможности применения в онкологии // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. - 2017. - № 2. - С. 1-29.

18. Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J. et al. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis // Histol Histopathol. 1999, vol. 4, pp. 1159–1164.

19. Allegra A., Alonci A., Campo S. et al. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review) // Int. J. Oncol. 2012, vol. 41 (6), pp. 1897-912.

20. Ichim T.E., Zhong Z., Kaushal S. et al. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications // J. Transl. Med. 2008, 6, p. 37. DOI: 10.1186/1479-5876-6-37.

21. Функция нуклеиновых кислот в эритроцитах: роль ретротранспозонов Line 1 в чувствительности к химиотерапии / Г.В. Бондарь [и др.] // Университетская клиника. - 2013. - Т. 9, N 2. - С. 201-204.

22. Циркулирующие внеклеточные ДНК и РНК крови в диагностике опухолей молочной железы / Е.Ю. Рыкова [и др.] // Биомедицинская химия. - 2008. - Т. 54, вып. 1. - С. 94-103.

23. Kopreski M.S., Benko F.A., Borys D.J. et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring KRAS mutations with the use of plasma DNA // J. Natl. Cancer Inst. 2002, vol. 92, no 11, pp. 918–923.
24. Holdhoff M., Schmidt K., Donehower R., Diaz LA Jr. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations // J. Natl. Cancer Inst., 2009, vol. 101, no. 18, pp. 1284-1285.
25. Рыкова Е.Ю. Экзогенные и секретируемые клетками нуклеиновые кислоты, их взаимодействия с компонентами крови в норме и при онкологических заболеваниях: автореф. дис. … докт. биол. наук. – Новосибирск, 2009. - 42 с.
26. Циркулирующие нуклеиновые кислоты в крови больных раком желудка и толстой кишки / С.Н. Тамкович [и др.] // Биомедицинская химия. - 2005. - Т. 51, вып. 3. - С. 321-328.
27. Sirota V.B., Muravlyova L.E., Bakirova R.E. et al. Extracellular Nucleic Acids and Purine Bases in blood of patients with locally Invasive breast carcinoma // World Journal of Medical Sciences, 2014, vol. 11 (2), pp. 171-174.
28. Филипенко М.Л. Диагностический потенциал внеклеточной ДНК в качестве жидкостной биопсии // Вестник РГМУ. - 2017. - № 4. – С. 5-13.
29. Rak J. Microparticles in cancer // Semin. Thromb. Hemost, 2010, vol. 36 (8), pp. 888-906.
30. Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients // Nat. Rev. Cancer, 2011, vol. 11, no 6, pp. 426–437.
31. Lehmann-Werman R., Neiman D., Zemmour H. et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. 2016, 29, 113 (13), pp. E1826-1834.
32. Skrypkina I., Tsyba L., Onyshchenko K. et al. Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer // Dis Markers. 2016, Article ID 3693096, 10 p. DOI: 10.1155/2016/3693096.
33. Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer // Theranostics, 2015, vol. 5 (10), pp. 1122-1143.