

АНАЛИЗ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ RAS-КАСКАДА СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ МЕТОДОМ УСИЛЕННОЙ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЦР В «РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

Е. Н. Тельшева, Г. П. Снигирева ✉

Лаборатория молекулярной биологии и цитогенетики,
Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва

Анализ внеклеточной ДНК (жидкостная биопсия) — перспективное направление в современной медицине, особенно в онкологии. В статье представлены результаты исследования соматических онкоспецифических мутаций в свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) плазмы крови пациентов с колоректальным раком стадий I–IV методом усиленной аллель-специфической полимеразной цепной реакции в «реальном времени». Названный метод был разработан специально для анализа биологических образцов, содержащих небольшое количество мутантной опухолевой ДНК. В исследование включили 46 человек (18 женщин, 28 мужчин) в возрасте 48–86 лет (средний возраст — $67,1 \pm 8,8$ года). Все пациенты получили хирургическое лечение (радикальное — в 85 % случаев). Молекулярно-генетическое исследование сцДНК плазмы крови проводили на основе результатов стандартного исследования образцов опухолевой ткани. Кровь отбирали до операции и на 5 день после нее. Анализировали мутации в генах *KRAS* и *BRAF*, которые были выявлены в ткани опухоли. Результаты исследования показали, что изучаемый метод позволяет выявлять мутации в генах RAS-каскада чаще на стадиях II–IV заболевания, а порог его чувствительности составляет 0,1 %. Исследование сцДНК до и после операции предположительно может давать дополнительную информацию о качестве хирургического вмешательства, появлении метастазов или существовании недиагностированных метастазов. Метод усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени» должен быть валидирован и оценен в различных клинических ситуациях.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, внеклеточная ДНК, свободно циркулирующая ДНК, циркулирующая опухолевая ДНК, соматические мутации, неинвазивная диагностика, онкология

Благодарности: авторы благодарят Андрея Зарецкого из компании «Евроген» (Москва) за помощь и ценные советы при проведении молекулярно-генетического исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Снигирева Галина Петровна
ул. Профсоюзная, д. 86, г. Москва, 117997; sni_gal@mail.ru

Статья получена: 08.08.2017 **Статья принята к печати:** 17.08.2017

THE USE OF WILD-TYPE BLOCKING ALLELE-SPECIFIC REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE ANALYSIS OF SOMATIC MUTATIONS IN RAS GENES OF CIRCULATING FREE DNA ISOLATED FROM THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Telysheva EN, Snigireva GP ✉

Laboratory of Molecular Biology and Cytogenetics,
Russian Research Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

Screening for cell-free DNA usually referred to as liquid biopsy holds great promise in cancer diagnosis and treatment. This article presents the results of the analysis of somatic tumor-specific mutations in circulating free DNA (cfDNA) isolated from the blood plasma of patients with stages I–IV colorectal cancer, based on the use of wild-type blocking allele-specific real-time polymerase chain reaction. This technique was specially designed for the analysis of biological specimens containing small amounts of mutant circulating tumor DNA. The study included 46 patients (18 female and 28 male participants) between 48 and 86 years of age (mean age was 67.1 ± 8.8 years). All patients underwent surgical treatment (radical surgery was performed on 85 % of the participants). Besides the molecular genetic analysis of cfDNA isolated from the blood plasma, standard histological staining was performed. Patients' blood samples were collected before the surgery and on day 5 after it to test for *KRAS* and *BRAF* mutations. The applied PCR technique proved to be effective in detecting mutations in the RAS genes in stages II–IV of the disease, its sensitivity threshold being 0.1 %. Analysis of cfDNA before and after surgery may provide additional information on the surgical treatment outcome, development of new metastases, or presence of those previously overlooked. Wild-type blocking allele-specific real-time PCR is awaiting further validation in different clinical situations.

Keywords: liquid biopsies, cell-free DNA, circulating free DNA, circulating tumor DNA, somatic mutation, non-invasive testing, cancer

Acknowledgements: the authors thank Andrey Zaretsky of Evrogen (Moscow) for his help and valuable advice in conducting molecular genetic analysis

✉ **Correspondence should be addressed:** Galina Snigireva
ul. Profsoyuznaya, d. 86, Moscow, Russia, 117997; sni_gal@mail.ru

Received: 08.08.2017 **Accepted:** 17.08.2017

Выбор тактики лечения пациентов с учетом индивидуальных молекулярно-генетических характеристик опухоли лежит в основе персонализированного подхода в онкологии. Такой подход позволяет существенно повысить качество и эффективность лечения за счет воздействия таргетными препаратами на генетические нарушения в опухоли. Как показали многочисленные исследования, генетический профиль опухоли является уникальной характеристикой конкретного больного и отражает изменения не только в генах, участвующих в развитии данного заболевания, но и случайные изменения в разных участках генома [1, 2].

Анализ молекулярно-генетических маркеров проводится, как правило, на образцах опухолевой ткани, получаемых при хирургической операции или с помощью биопсии до начала лечения. Однако эти методы сопряжены с серьезными трудностями, связанными с получением материала для исследования, его обработкой, а также информативностью: для опухолей характерна молекулярная гетерогенность [3, 4]. При этом и анализ материала, полученного только из одной части опухоли, не дает полного представления о молекулярно-генетическом профиле опухоли и ее метастазов, а многократная биопсия разных участков опухоли трудоемка и дорогостояща.

Как известно, молекулярно-генетические нарушения, возникшие в процессе канцерогенеза, могут быть выявлены не только в самой опухолевой ткани или ее метастазе, но и в плазме или сыворотке крови пациента с помощью анализа циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК), которая выполняет роль онкомаркера [5, 6]. Анализ внеклеточной ДНК называют жидкостной биопсией, и этот метод позволяет преодолеть ограничения, связанные с получением образцов опухолевой ткани и работой с ними, являясь идеальным инструментом для исследования молекулярно-генетических нарушений у пациентов с онкологическими заболеваниями [7]. Взятие пробы крови является минимально инвазивной процедурой, которая может быть осуществлена в любое время в течение курса терапии, что позволяет наблюдать за молекулярными изменениями в опухоли в динамике [8, 9].

Содержание цоДНК в плазме крови очень небольшое: ее количество зависит от стадии заболевания и часто составляет менее 1 % от общего количества свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) [10, 11]. По этой причине для обнаружения молекулярно-генетических нарушений в цоДНК необходимы высокочувствительные методы анализа, такие как секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS) и цифровая полимеразная цепная реакция (ПЦР; droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR). Высокая чувствительность этих методов при анализе соматических мутаций в сцДНК плазмы крови была подтверждена неоднократно [12–14]. Однако их рутинное применение в онкологии ограничено из-за крайне высокой стоимости одного исследования, а в случае с NGS — также из-за неоправданной избыточности получаемой информации.

Одним из перспективных методов анализа сцДНК плазмы крови является метод усиленной аллель-специфической ПЦР, разработанный компанией «Евроген» (Россия) специально для работы с биологическими образцами, содержащими небольшое количество мутантной ДНК. Принцип метода заключается в сочетании аллель-специфической ПЦР с блокадой амплификации аллеля «дикого типа» — так же, как при использовании метода мутационно-специфической ПЦР [15]. Две пары праймеров подбирают таким образом, чтобы амплифицировать целе-

вой фрагмент с одной конкретной мутацией для анализа. Одним из преимуществ метода является короткая длина ПЦР-продукта — всего лишь 90 п. о., что важно при анализе сцДНК, присутствующей в кровотоке в крайне фрагментированном виде. Теоретически данный метод позволяет анализировать любые мутации. На сегодняшний день с его помощью можно проверить на 7 ключевых мутаций ген *KRAS* (6 замен в кодоне 12 — p.G12D, p.G12V, p.G12C, p.G12S, p.G12A, p.G12R и замену в кодоне 13 — p.G13D) и на 5 мутаций — ген *BRAF* (p.V600E, p.V600E-2, p.V600K, p.V600K-2, p.V600D). Чувствительность метода усиленной аллель-специфической ПЦР составляет не менее 10 копий ДНК с мутацией, а избирательность — 0,1–1,0 % (в зависимости от количества исходной ДНК), при этом частота ложноположительных результатов не превышает 0,05 %.

В настоящей работе представлены результаты анализа мутаций в генах RAS-каскада (*KRAS*, *BRAF*) в сцДНК плазмы крови пациентов с колоректальным раком (КРР) методом усиленной аллель-специфической ПЦР.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты, которые проходили обследование и лечение в Российском научном центре рентгенорадиологии (г. Москва) в 2010–2016 гг. Критерием включения в исследование являлось наличие у пациента морфологически подтвержденной злокачественной эпителиальной опухоли ободочной или прямой кишки.

Основываясь на результатах молекулярно-генетического исследования операционного материала больных КРР (метод ПЦР в «реальном времени» с последующим секвенированием по Сэнгеру), для участия в исследовании отобраны 46 человек, у которых в опухолевой ткани были выявлены активирующие мутации в гене *KRAS* (экзон 2: кодоны 12 и 13) или *BRAF* (экзон 15: кодон 600) [16]. В группу исследования включили 46 человек (18 женщин и 28 мужчин) в возрасте от 48 до 86 лет (средний возраст — $67,1 \pm 8,8$ года).

У 13 пациентов (28 %) была стадия I заболевания, у 10 (22 %) — стадия II, также у 10 — стадия III и еще у 13 — стадия IV (табл. 1). По гистологической структуре практически все опухоли являлись аденокарциномами различной степени дифференцировки: у 4 участников исследования опухоль была низкодифференцированной, у 25 — умереннодифференцированной, у 16 — высокодифференцированной, в одном случае аденокарцинома была слизистой.

Все пациенты получили хирургическое лечение: в 85 % случаев (39 человек) операция носила радикальный характер, в 15 % случаев (7 человек со стадией IV заболевания) — нерадикальный. Пациентам проводили молекулярно-генетическое исследование для обнаружения мутаций, выявленных в ткани опухоли: в гене *KRAS* — мутаций p.G12D, p.G13D, p.G12V, p.G12C, p.G12S, p.G12A, в гене *BRAF* — мутации p.V600E, наиболее распространенной при КРР. Для этого до хирургического вмешательства (n = 46) и через 5 дней после него (n = 35) у пациентов брали кровь. По имеющимся в литературе данным, период полувыведения сцДНК из плазмы крови составляет около 15 ч и зависит от локализации опухоли, ее гистологического типа и от стадии заболевания [17, 18]. Таким образом, отбор крови на 5 сутки после операции гарантировал полное выведение цоДНК из кровяного русла в случае удаления опухоли. Кровь отбирали в объеме 15 мл в

пробирки с ЭДТА, в течение часа после взятия крови плазму отделяли от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 15 мин при 4 °С в три этапа: при 1 400, 3 400 и 4 400 об/мин соответственно. Аликвоты плазмы (по 5 мл) хранили до проведения исследования при –80 °С.

Свободно циркулирующую ДНК выделяли из плазмы с помощью набора QiAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Нидерланды) по протоколу производителя. Объем элюата для каждого образца составил 20 мкл. Концентрацию выделенной сцДНК измеряли методом ПЦР в «реальном времени» с использованием набора «ХУ-Детект» («Синтол», Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Для исследования сцДНК на наличие мутаций в генах KRAS и BRAF применяли метод усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени» с использованием наборов реагентов фирмы «Евроген» (Россия) на приборе 7500 real-time PCR systems (Applied Biosystems, США). Каждый образец сцДНК в исследование брали в объеме 10 мкл.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов Statistica 8 (StatSoft, США) и Microsoft Excel 2013. Сравнение вариационных рядов проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Исследование было одобрено этическим комитетом Российского научного центра рентгенорадиологии (протокол № 3 от 17 марта 2014 г.). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярно-генетическое исследование сцДНК плазмы крови, полученной до операции, показало, что у 24 паци-

ентов (52 %) в циркулирующей опухолевой ДНК присутствуют мутации в экзоне 2 гена KRAS или экзоне 15 гена BRAF, а в цоДНК других 22 пациентов их нет (табл. 1). Мы проанализировали распределение пациентов по подгруппам в зависимости от стадии заболевания и установили, что в группе больных с мутациями в генах RAS-каскада большинство (15 человек, 63 %) имели стадию III или IV, а в группе больных без мутаций в цоДНК большинство (10 человек, 45 %) имели стадию I заболевания.

В табл. 1 также приведены значения концентрации сцДНК и относительного содержания мутантной цоДНК в плазме крови участников исследования. У пациентов с онкоспецифическими мутациями в генах RAS-каскада, выявленных изучаемым методом, содержание сцДНК было выше независимо от стадии заболевания (особенно заметной была разница между подгруппами больных со стадией IV), но различия оказались статистически незначимыми ввиду высокой вариабельности показателя. А вот относительное содержание мутантной цоДНК у пациентов этой группы было достоверно выше, чем в подгруппах пациентов, у которых мутации не были обнаружены ($p < 0,01-0,03$). В этих подгруппах содержание мутантной цоДНК в плазме крови было ниже порога чувствительности метода, использованного в данной работе, который составляет 0,1%.

Мы проанализировали возможную связь результатов молекулярно-генетического исследования до операции с прогнозом заболевания, появлением метастазов и рецидивом.

Срок наблюдения составил 27 мес. В группе пациентов, у которых выявили мутации в сцДНК плазмы крови изучаемым методом до операции ($n = 24$), у 19 человек (79 %) заболевание прогрессировало, причем 15 человек впоследствии умерли (табл. 2). Во второй группе больных

Таблица 1. Распределение пациентов с колоректальным раком по группам в зависимости от стадии заболевания с учетом содержания свободно циркулирующей ДНК в плазме крови до операции и факта выявления онкоспецифических мутаций в генах RAS-каскада методом аллель-специфической ПЦР в «реальном времени»

Стадия заболевания	Показатель	Пациенты с выявленными мутациями, (n = 24)	Пациенты без мутаций, (n = 22)	p-value
I	Число больных (доля в группе, %)	3 (12)	10 (45)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	3,1 (1,4–3,7)	1,4 (1,2–2,6)	0,09
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	1,04 (0,14–12,37)	0,02 (0,0–0,03)	0,01*
II	Число больных (доля в группе, %)	6 (25)	4 (15)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	2,05 (1,6–4,0)	1,4 (0,9–1,8)	0,11
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	0,47 (0,2–1,9)	0,0 (0,0–0,0)	0,01*
III	Число больных (доля в группе, %)	4 (17)	6 (27)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	2,4 (1,4–4,9)	1,9 (0,9–1,9)	0,52
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	2,59 (1,05–10,77)	0,04 (0,0–0,09)	0,01*
IV	Число больных (доля в группе, %)	11 (46)	2 (9)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	3,8 (1,9–6,9)	1,5 (1,3–1,7)	0,14
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	5,65 (1,23–20,96)	0,04 (0,0–0,08)	0,03*

Примечание. Данные представлены в виде M (Q₁–Q₃), т. е. медиана (квартиль первого порядка – квартиль третьего порядка). Достоверность различий определяли при сравнении между собой групп пациентов с выявленными мутациями и без мутаций в генах RAS-каскада. Символом * отмечены статистически значимые различия.

(n = 22) 17 человек были живы в течение всего срока наблюдения, а у 5 человек было отмечено прогрессирование заболевания, они впоследствии умерли. В табл. 2 приведены данные о концентрации сцДНК и относительном содержании мутантной цоДНК в плазме крови. Значения обоих показателей были достоверно выше в подгруппе пациентов с выявленными в цоДНК мутациями и прогрессированием заболевания по сравнению с подгруппой пациентов с невыявленными мутациями и прогрессированием заболевания. В группе пациентов с не выявленными изучаемым методом мутациями содержание сцДНК и мутантной цоДНК было небольшим, что, по-видимому, и не позволило обнаружить мутации. В то же время в случае с 5 больными без прогрессирования заболевания методом усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени» был эффективен, несмотря на низкое содержание сцДНК и цоДНК в плазме крови.

Для 35 из 46 участников исследования сцДНК плазмы крови была проанализирована не только до операции, но и на 5 день после хирургического лечения (табл. 3). В группе больных с выявленными мутациями у 13 человек (76 %) зарегистрировано прогрессирование заболевания, 9 человек из этой группы (53 %) имели стадию IV заболевания, из них 5 получили нерадикальное хирургическое лечение. По-видимому, по факту наличия или отсутствия онкоспецифических мутаций в сцДНК плазмы крови можно судить о степени радикальности хирургической операции, предполагая, что у больных с выявленными мутациями и, соответственно, высоким содержанием мутантной цоДНК, очаги опухоли и метастазов были удалены не полностью или имеются метастазы, которые не были диагностированы.

В группе пациентов, у которых не были выявлены мутации в генах RAS-каскада при молекулярно-генетическом исследовании сцДНК, 14 человек (78 %) были живы на протяжении всего срока наблюдения, а у 4 человек было отмечено прогрессирование заболевания. В этой группе 7 человек имели стадию I заболевания, 5 — стадию II, 5 — стадию III и только 1 — стадию IV.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно, при развитии онкологических заболеваний содержание сцДНК в крови достоверно повышается, но при этом не зависит от локализации опухоли [19]. Имеются данные о связи содержания сцДНК в крови с клиническим течением онкологического заболевания [20], причем более высокое по сравнению с нормой содержание сцДНК в крови часто наблюдается уже на ранних стадиях опухолевого процесса, а также может резко возрасти при метастазировании [21]. При этом концентрация сцДНК может сильно различаться у разных пациентов [10]. Это неудивительно, если учесть, что сцДНК может появляться в крови не только в результате гибели клеток опухоли и окружающих ее тканей, но и при естественном разрушении клеток крови. Вклад в общее содержание сцДНК в крови может вносить также секреция опухолевыми клетками фрагментов нуклеиновых кислот, в том числе амплифицированных. Известно, что амплификация отдельных участков генов — достаточно частое событие при опухолевой патологии. В результате общее количество сцДНК у больных с онкологическими заболеваниями сильно варьирует от пациента к пациенту, что не позволяет использовать концентрацию сцДНК в качестве маркера.

Таблица 2. Характеристика клинического течения заболевания пациентов с колоректальным раком с учетом содержания свободно циркулирующей ДНК в плазме крови до операции и факта выявления онкоспецифических мутаций в генах RAS-каскада методом аллель-специфической ПЦР в «реальном времени»

Прогрессирование заболевания	Показатель	Пациенты с выявленными мутациями, (n = 24)	Пациенты без мутаций, (n = 22)	p-value
Да	Число больных (доля в группе, %)	19 (79)	5 (23)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	3,7 (1,9–6,7)	1,3 (0,9–1,7)	0,01*
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	1,9 (0,85–14,59)	0,0 (0,0–0,08)	0,0007*
Нет	Число больных (доля в группе, %)	5 (21)	17 (77)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	1,7 (1,6–2,2)	1,7 (1,2–1,9)	0,64
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	0,36 (0,21–3,30)	0,01 (0,00–0,04)	0,0009*

Примечание. Данные представлены в виде M (Q₁–Q₃), т. е. медиана (квартиль первого порядка – квартиль третьего порядка). Достоверность различий определяли при сравнении между собой групп пациентов с выявленными мутациями и без мутаций в генах RAS-каскада. Символом * отмечены статистически значимые различия.

Таблица 3. Характеристика клинического течения заболевания пациентов с колоректальным раком с учетом содержания свободно циркулирующей ДНК в плазме крови после операции и факта выявления онкоспецифических мутаций в генах RAS-каскада методом аллель-специфической ПЦР в «реальном времени»

Прогрессирование заболевания	Показатель	Пациенты с выявленными мутациями, (n = 17)	Пациенты без мутаций, (n = 18)	p-value
Да	Число больных (доля в группе, %)	13 (76)	4 (22)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	5,4 (3,5–12,7)	8,65 (5,35–11,50)	0,69
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	2,15 (0,19–8,43)	0,0 (0,0–0,01)	0,003*
Нет	Число больных (доля в группе, %)	4 (24)	14 (78)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	4,75 (2,35–6,95)	5,8 (4,9–8,0)	0,37
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	0,23 (0,16–0,42)	0,02 (0,0–0,07)	0,003*

Примечание. Данные представлены в виде M (Q₁–Q₃), т. е. медиана (квартиль первого порядка – квартиль третьего порядка). Достоверность различий определяли при сравнении между собой групп пациентов с выявленными мутациями и без мутаций в генах RAS-каскада. Символом * отмечены статистически значимые различия.

Косвенно судить о количестве циркулирующей опухолевой ДНК можно, анализируя определенные онкоассоциированные мутации. При этом важно учитывать, что содержание мутантной цоДНК может значительно отличаться от общего содержания цоДНК: быть ниже за счет гетерогенности новообразования [22]. По этой причине не всегда, особенно на ранних стадиях заболевания, удается определить присутствие цоДНК в плазме крови. В свою очередь, это может приводить к ложноотрицательным результатам и, соответственно, снижать чувствительность метода, используемого для анализа сцДНК. Это подтверждают данные нашего исследования, в котором нам не удалось выявить мутации в генах RAS-каскада у пациентов с ранними стадиями заболевания.

В работе Rachiglio и соавт. [13], посвященной исследованию цоДНК плазмы крови 44 пациентов с немелкоклеточным раком легкого и 35 пациентов с колоректальным раком, продемонстрированы возможности методов NGS и цифровой ПЦР. Генетические изменения (мутации в гене *EGFR*) в сцДНК, аналогичные выявленным при анализе опухолевой ткани, методом NGS были обнаружены у 77,3 % больных с немелкоклеточным раком легкого и у 2 больных, у которых в опухолевой ткани стандартным методом ПЦР был выявлен дикий тип *EGFR*. Метод цифровой ПЦР подтвердил наличие мутаций у этих 2 больных как в первичной опухоли, так и в плазме крови. В этом же исследовании в 100 % случаев (6/6) методом NGS в плазме крови были подтверждены мутации в гене *KRAS*, выявленные стандартным методом ПЦР у пациентов, обследованных до хирургического лечения. В то же время у прооперированных пациентов мутации были обнаружены методом NGS только в 46,2 % случаев (6/13). Авторы полагают, что метод обладает высокой чувствительностью для анализа мутаций цоДНК плазмы крови, однако она зависит от присутствия в организме опухолевого очага и гетерогенности драйверных мутаций.

В другом исследовании методом таргетного секвенирования анализировали образцы плазмы крови и ткани опухоли на наличие соматических драйверных мутаций у 58 пациентов с немелкоклеточным раком легкого [12]. Авторами были выявлены часто встречающиеся драйверные мутации в генах *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA* и *TP53*, а также более редкие мутации в других генах в цоДНК плазмы крови и ДНК опухолевой ткани, при этом общая concorдантность метода исследования составила 50,4 %, а чувствительность и специфичность — 53,8 и 47,3 % соответственно. Также ими было отмечено, что уровень содержания

сцДНК коррелирует с некоторыми клиническими характеристиками больных, включая стадию заболевания и подтип опухоли.

В работе Tu и соавт. [14] при исследовании образцов опухолевой ткани и плазмы крови 19 пациентов с колоректальным раком методом капельной цифровой ПЦР было показано соответствие полученных данных по выявленным мутациям в 73 % случаев.

Результаты нашего исследования, а также данные литературы свидетельствуют о том, что жидкостную биопсию, основанную на анализе цоДНК плазмы крови, можно применять в качестве дополнительного метода диагностики онкологических заболеваний, но преимущественно на более поздних стадиях заболевания, а также в тех случаях, когда биопсия по какой-либо причине трудновыполнима или может вызвать осложнения. На сегодняшний день клиническое значение анализа сцДНК, по-видимому, связано с применением в качестве прогностического исследования при индивидуальном мониторинге заболевания. Нами показано, что у пациентов с мутациями в цоДНК, выявленными методом усиленной аллель-специфической ПЦР как до операции, так и на 5 день после хирургического лечения, заболевание прогрессирует. На основании анализа онкоспецифических изменений в плазме крови до и после лечения можно делать предположения о степени агрессивности опухоли и возможном метастазировании, оценивать эффективность терапии и вносить коррективы в лечение при отсутствии необходимого ответа на него.

ВЫВОДЫ

По-прежнему существуют проблемы, ограничивающие внедрение в рутинную клиническую практику метода жидкостной биопсии. В частности, сохраняется потребность в дешевых, но высокочувствительных методах анализа сцДНК плазмы крови больных с онкологическими заболеваниями. Представленные в работе промежуточные результаты исследования сцДНК плазмы крови пациентов с колоректальным раком стадий I–IV продемонстрировали, что метод усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени» более эффективен при выявлении онкоспецифических мутаций на более поздних стадиях заболевания. Возможно, метод сможет занять достойное место среди инструментов молекулярной диагностики в онкологии. Усилия должны быть направлены на его валидацию, а также оценку возможности его применения в различных клинических ситуациях.

Литература

1. Зборовская И. Б. Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике. Успехи молекулярной онкологии. 2014; 2: 4–15. DOI: 10&17650/2313-805X.2014.1.2.4-15.
2. Manne U, Jadhav T, Putha BK. Molecular Biomarkers of Colorectal Cancer and Cancer Disparities: Current Status and Perspective. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2016; 12 (6): 332–44. DOI: 10.1007/s11888-016-0338-1.
3. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME et al. Use of research biopsies in clinical trials: Are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol.* 2013 Jan 1; 31 (1): 17–22. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.1618.
4. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012 Mar 8; 366 (10): 883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205. Erratum in *N Engl J Med.* 2012 Sep 6; 367 (10): 976.
5. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – A survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan; 1775 (1): 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
6. Gonzalez JA, Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *Oncotargets Ther.* 2013 Jul 8; 6: 819–32. DOI: 10.2147/OTT.S44668.
7. Ma M, Zhu H, Zhang C, Sun X, Gao X, Chen G. “Liquid biopsy” – ctDNA detection with great potential and challenges. *Ann Transl Med.* 2015 Sep; 3 (16): 235. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.29.

8. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20; 32 (6): 579–86. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2011.
9. Beije N, Helmijr JC, Weerts MJA, Beaufort CM, Wiggin M, Marziali A et al. Somatic mutation detection using various targeted detection assays in paired samples of circulating tumor DNA, primary tumor and metastases from patients undergoing resection of colorectal liver metastases. *Mol Oncol*. 2016 Dec; 10 (10): 1575–84. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.10.001.
10. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep; 14 (9): 985–90. DOI: 10.1038/nm.1789.
11. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Canc Inst*. 2009; 101 (18): 1284–5. DOI: 10.1093/jnci/djp240.
12. Chen KZ, Lou F, Yang F, Zhang JB, Ye H, Chen W et al. Circulating tumor DNA detection in early-stage non-small cell-lung cancer patients by targeted sequencing. *Sci Rep*. 2016 Aug 24; 6: 31985. DOI: 10.1038/srep31985.
13. Rachiglio AM, Abate RE, Sacco A, Pasquale R, Fenizia F, Lambiase M et al. Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Oct 11; 7 (41): 66595–605. DOI: 10.18632/oncotarget.10704.
14. Tu M, Chia D, Wei F, Wong D. Liquid biopsy for detection of actionable oncogenic mutations in human cancers and electric field induced release and measurement liquid biopsy (eLB). *Analyst*. 2016 Jan 4; 141 (2): 393–402. DOI: 10.1039/c5an01863c.
15. Белоусова А. В., Дрозд О. В., Зарецкий А. Р. Мутационно-специфическая полимеразная цепная реакция для анализа мутаций в «горячих точках» генов K-Ras и B-Raf в биологических образцах онкологических больных. В сб.: Тезисы конференции «Современные принципы диагностики и лечения колоректального рака», посвященной памяти проф. В. И. Кныша; 26–27 мая 2011 г.; Москва. М.: 2011. с. 16.
16. Тельшева Е. Н. Идентификация молекулярно-генетических онкомаркеров с применением инвазивных и неинвазивных методов исследования. *Поволжский онкологический вестник*. 2014; 3: 60–4.
17. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res*. 2014 Mar; 86 (3): 136–42. DOI: 10.4174/ast.2014.86.3.136.
18. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*. 2016 Apr 7; 35: 36. DOI: 10.1186/s40880-016-0092-4.
19. Захаренко А. А., Зайцев Д. А., Беляев М. А., Трушин А. А., Тен О. А., Натха А. С. Возможности жидкой биопсии при раке желудка. *Вопросы онкологии*. 2016; 62 (4): 379–85.
20. Тамкович С. Н., Власов В. В., Лактионов П. П. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике. *Молекулярная биология*. 2008; 42 (1): 12–23.
21. 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. *Вопросы онкологии*. 2013; 59 (6): 673–81.
22. Немцова М. В., Пальцева Е. М., Бабаян А. Ю., Михайленко Д. С., Бабенко О. В., Самофалова О. Ю. И др. Молекулярно-генетический анализ клональной внутриопухолевой гетерогенности в колоректальных карциномах. *Молекулярная биология*. 2008; 42 (6): 1040–7.

References

1. Zborovskaya IB. [Modern strategies for study of tumor's markers in clinical practice]. *Advances in molecular oncology*. 2014; 2: 4–15. DOI: 10.17650/2313-805X.2014.1.2.4-15. Russian.
2. Manne U, Jadhav T, Putcha BK. Molecular Biomarkers of Colorectal Cancer and Cancer Disparities: Current Status and Perspective. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2016; 12 (6): 332–44. DOI: 10.1007/s11888-016-0338-1.
3. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME et al. Use of research biopsies in clinical trials: Are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol*. 2013 Jan 1; 31 (1): 17–22. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.1618.
4. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8; 366 (10): 883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205. Erratum in *N Engl J Med*. 2012 Sep 6; 367 (10): 976.
5. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – A survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan; 1775 (1): 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
6. Gonzalez JA, Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *OncoTargets Ther*. 2013 Jul 8; 6: 819–32. DOI: 10.2147/OTT.S44668.
7. Ma M, Zhu H, Zhang C, Sun X, Gao X, Chen G. “Liquid biopsy” – ctDNA detection with great potential and challenges. *Ann Transl Med*. 2015 Sep; 3 (16): 235. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.29.
8. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20; 32 (6): 579–86. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2011.
9. Beije N, Helmijr JC, Weerts MJA, Beaufort CM, Wiggin M, Marziali A et al. Somatic mutation detection using various targeted detection assays in paired samples of circulating tumor DNA, primary tumor and metastases from patients undergoing resection of colorectal liver metastases. *Mol Oncol*. 2016 Dec; 10 (10): 1575–84. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.10.001.
10. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep; 14 (9): 985–90. DOI: 10.1038/nm.1789.
11. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Canc Inst*. 2009; 101 (18): 1284–5. DOI: 10.1093/jnci/djp240.
12. Chen KZ, Lou F, Yang F, Zhang JB, Ye H, Chen W et al. Circulating tumor DNA detection in early-stage non-small cell-lung cancer patients by targeted sequencing. *Sci Rep*. 2016 Aug 24; 6: 31985. DOI: 10.1038/srep31985.
13. Rachiglio AM, Abate RE, Sacco A, Pasquale R, Fenizia F, Lambiase M et al. Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Oct 11; 7 (41): 66595–605. DOI: 10.18632/oncotarget.10704.
14. Tu M, Chia D, Wei F, Wong D. Liquid biopsy for detection of actionable oncogenic mutations in human cancers and electric field induced release and measurement liquid biopsy (eLB). *Analyst*. 2016 Jan 4; 141 (2): 393–402. DOI: 10.1039/c5an01863c.
15. Belousova AV, Drozd OV, Zaretsky AR. Мутационно-специфическая полимеразная цепная реакция для анализа мутаций в «горячих точках» генов K-Ras и B-Raf в биологических образцах онкологических больных. In: Тезисы конференции «Современные принципы диагностики и лечения колоректального рака», посвященной памяти проф. В. И. Кныша; 2011 May 26–27; Moscow, Russia. Moscow: 2011. p. 16.
16. Telysheva EN. [Identification of molecular-genetic oncomarkers with using invasive and non-invasive methods of investigation]. *Oncology Bulletin of the Volga Region*. 2014; 3: 60–4. Russian.
17. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res*. 2014 Mar; 86 (3): 136–42. DOI: 10.4174/ast.2014.86.3.136.
18. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating

- tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*. 2016 Apr 7; 35: 36. DOI: 10.1186/s40880-016-0092-4.
19. Zakharenko AA, Zaytsev DA, Belyaev MA, Trushin AA, Ten OA, Natkha AS. Vozmozhnosti zhidkoy biopsii pri rake zheludka. *Problems in Oncology*. 2016; 62 (4): 379–85. Russian.
 20. Tamkovich SN, Vlassov VV, Laktionov PP. Circulating DNA in in the blood and its application in medical diagnosis. *Molecular Biology*. 2008; 42 (1): 9–19.
 21. Vasilyeva IN, Bepakov VG. [Role of extracellular DNA in the appearance and development of malignant tumors and possibilities of its use in the diagnosis and treatment of cancer]. *Problems in Oncology*. 2013; 59 (6): 673–81. Russian.
 22. Nemtsova MV, Paltseva EM, Babayan AYu, Mihaylenko DS, Babenko OV, Zaletaev DV et al. Molecular genetic analysis of the intratumoral clonal heterogeneity of colorectal adenocarcinomas. *Molecular Biology*. 2008; 42 (6): 925–31.