

Жидкостная биопсия: анализ циркулирующей опухолевой ДНК крови

Д. С. Щербо, А. П. Коваль, С. Н. Щербо, М. И. Савина, Т. И. Туркина

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва

РЕЗЮМЕ

Циркулирующие в крови фрагменты ДНК опухолевого происхождения (цоДНК) служат важным источником информации об опухоли. Анализ цоДНК осложняется присутствием избытка ДНК из нормальных клеток и требует разработки высокочувствительных лабораторных методов. В обзоре рассматриваются основные типы биомаркеров цоДНК и особенности их детекции, а также направления развития перспективных технологий в области жидкостной биопсии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: жидкостная биопсия, кровь, онкодиагностика, циркулирующие фрагменты ДНК опухолевого происхождения (цоДНК), обзор.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Liquid biopsy: the analysis of circulating tumour DNA

D. S. Shcherbo, A. P. Koval, S. N. Shcherbo, M. I. Savina, T. I. Turkina

N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

SUMMARY

Circulating tumour DNA (ctDNA) fragments found in blood represent a critical source of information about the tumour. However, the analysis of ctDNA is challenging due to the overwhelming presence of DNA from non-malignant cells and requires the development of highly sensitive laboratory techniques. This review discusses the major categories of ctDNA biomarkers, their detection methodologies, and explores the potential of emerging technologies within the liquid biopsy field.

KEYWORDS: liquid biopsy, blood, oncodiagnostics, circulating fragments of tumor DNA (ctDNA), review.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare no conflict of interest.

Достигнутый в последние десятилетия прогресс в изучении геномики канцерогенеза на фоне сложившегося консенсуса о генетической природе онкологических заболеваний делает возможной всё более точную интерпретацию механизмов их возникновения и развития, что, в свою очередь, открывает новые перспективы для скрининга, диагностики и терапии [1]. Молекулярно-генетическая классификация опухолей постепенно дополняет и заменяет гистологическую [2], а терапевтические методы всё чаще становятся прицельно направленными на характерные молекулярные изменения в опухолевых клетках [3]. Формирующаяся в результате этих процессов прецизионная онкология призвана учитывать всё многообразие данных о молекулярных характеристиках опухоли и нуждается в более совершенных и малоинвазивных методах для получения этой информации [4]. Наличие в крови здоровых людей свободно циркулирующих фрагментов ДНК (сцДНК) было показано в середине прошлого века [5]. В крови пациентов с онкологическими заболеваниями зачастую имеется небольшая фракция сцДНК опухолевого происхождения. Развитие генетических технологий сделало возможными разработку и клиническое применение инструментов для поиска циркулирующей в крови опухолевой ДНК (цоДНК), качественно отличающейся от соматической ДНК организма в целом. В кровь пациентов с онкологическими заболеваниями опухолевая ДНК попадает из первичных

опухолей, циркулирующих опухолевых клеток, микрометастазов или явных метастазов, как правило, в результате некроза и апоптоза клеток [6]. Ряд исследований также показал, что жизнеспособные опухолевые клетки могут высвобождать экзосомы, содержащие двухцепочечную ДНК, но роль такой ДНК в канцерогенезе окончательно не ясна [7].

Как правило, пациенты со злокачественными опухолями имеют более высокое содержание циркулирующей ДНК, чем здоровые люди, что может быть обусловлено дополнительным поступлением в кровоток фрагментов ДНК, выделяющихся из опухолевых клеток [8], однако существуют работы, показывающие, что источником избыточной ДНК в крови таких пациентов могут быть лейкоциты [9]. Количество цоДНК зависит от опухолевой массы в организме пациента – с увеличением объема опухоли одновременно нарастает и количество опухолевых клеток, подвергшихся апоптозу и некрозу, что в свою очередь увеличивает количество цоДНК. Кроме объема опухолевой массы, количество выделяемой в кровоток цоДНК может зависеть от гистологического типа опухоли, размера опухолевых очагов и их васкуляризации. Увеличению количества цоДНК способствуют и особенности утилизации погибших опухолевых клеток: если при физиологической гибели нормальных клеток организма продукты их распада поглощаются и перерабатываются фагоцитами, то в опухолевой

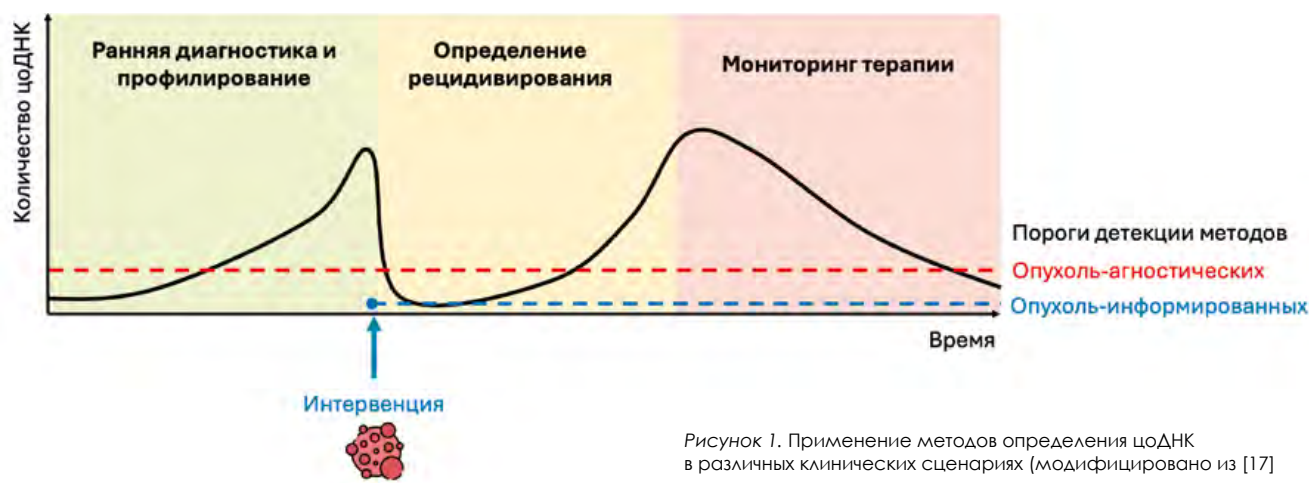


Рисунок 1. Применение методов определения цоДНК в различных клинических сценариях (модифицировано из [17])

ткани процесс фагоцитоза менее эффективен, в связи с чем происходит накопление клеточного детрита, выделяющего опухолевую ДНК в циркуляцию [10].

В целом предлагаемые клинические применения цоДНК подразделяются на две категории: неинвазивную характеристику молекулярных особенностей опухоли (профилирование) и количественное определение, при котором уровень представленности ДНК отражает опухолевую нагрузку [11]. Для обеих категорий клиническая полезность будет зависеть от степени надежности обнаружения цоДНК, когда она присутствует (аналитическая чувствительность), а также от доли пациентов, для которых должна обнаруживаться цоДНК (клиническая чувствительность) [12]. Хотя цоДНК выявляется при различных типах опухолей и, как правило, ее количество коррелирует со стадией заболевания, абсолютные уровни цоДНК широко варьируют в каждой субпопуляции [13]. Обнаружение цоДНК дополнительно затруднено высокими фоновыми уровнями циркулирующей ДНК из нормальных клеток, наблюдаемыми не только у людей со злокачественными новообразованиями, но и у здоровых людей [14]. На ранней стадии заболевания (в некоторых случаях — при метастазировании) цоДНК может представлять собой чрезвычайно редкую субпопуляцию на фоне общего уровня сцДНК в количестве, соответствующем одному геном-эквиваленту на 5 мл плазмы [13, 15]. Также представленность цоДНК может варьировать в зависимости от опухолевой нагрузки, анатомической близости опухоли к сосудистой сети и биологических особенностей клеток организма, включая скорость апоптоза и метастатический потенциал [12].

Стратегии детекции цоДНК можно подразделить на две категории: опухоль-агностические и опухоль-информированные (рис. 1). В первом случае маркерами опухолевой ДНК служат её особенности, общие для большинства опухолей данного типа (например, характерные паттерны метилирования или изменения копийности). Это позволяет разрабатывать универсальные тесты с порогом детекции до 0,1 % фракции опухолевой ДНК. В основе опухоль-информированных методов лежит априорная информация об опухоли (например, наличие определённых соматических мутаций), что требует проведения предварительного анализа опухолевого материала пациента. При этом

предел обнаружения может достигать значений $<0,001\%$ фракции опухолевой ДНК. Зачастую при этом создаются персонализированные тесты включающие индивидуальные для каждого пациента регионы генома; примером может служить тест Signatera от компании Natera [16].

В качестве основных классов опухоль-специфичных маркеров, позволяющих отличить цоДНК, можно выделить точечные мутации и небольшие инделы, изменения копийности и эпигенетические изменения. Соматические мутации, в силу их ключевой роли в канцерогенезе, являются одними из наиболее специфичных и надёжных признаков ДНК опухолевого происхождения [15]. Наибольшее практическое применение в клинике на сегодняшний день получил прямой анализ соматических мутаций в гене EGFR при немелкоклеточном раке лёгкого в образцах сцДНК для определения оптимальной схемы лечения таргетными препаратами [18]. С помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS) соматические мутации можно детектировать либо “глубоким” секвенированием определённых наборов генов с высоким покрытием (100x–10000x), либо, используя высокую частоту встречаемости мутаций на единицу длины генома во многих типах опухолей, при помощи “широкого” полногеномного секвенирования с более низким покрытием (1x–10x). Практический предел обнаружения мутаций в сцДНК стандартными методами “глубокого” NGS составляет порядка 0,1–0,5 % фракции опухолевой ДНК [19]. Для достижения более высокой чувствительности необходима коррекция ошибок секвенирования, например при помощи уникальных молекулярных баркодов (УМБ) [20] или применения специально разработанных алгоритмов супрессии ошибок [21]. УМБ представляют собой метки с уникальными последовательностями, позволяющими восстановить последовательности исходных молекул сцДНК нивелировав накопленные в процессе амплификации ошибки.

Актуальные направления исследований в анализе циркулирующих нуклеиновых кислот сегодня сосредоточены не в области идентификации единичных опухоль-специфических изменений в сцДНК, таких как, отдельные точечные мутации или транслокации генов, а комплексного одновременного анализа большого числа изменений, каждое из которых в отдельности не может служить

однозначным маркером, однако совокупность которых позволяет сделать определённый вывод с достаточно высокой достоверностью, увеличивая диагностическую чувствительность и специфичность метода. Одним из примеров такого подхода могут служить недавние работы по одновременному анализу рекуррентных соматических мутаций в сцДНК в комбинации с белковыми маркерами [22]. Сосредоточившись на задаче ранней диагностики 8 операбельных форм рака, исследователи скомбинировали панели белковых маркеров, свидетельствующих о гистологическом типе рака, с панелью соматических мутаций, повышающих чувствительность системы в целом, однако не дающих достоверной информации об органе, в котором развивается патологический процесс. В результате такой комбинации были достигнуты достаточно высокие показатели чувствительности и специфичности, особенно для рака яичников, однако сильно различающиеся в зависимости от стадии и типа заболевания. Другим примером может служить исследование паттернов метилирования сцДНК. Ранее подобные исследования были в основном сосредоточены на выявлении отдельных изменений, таких, как статус метилирования промотора гена SEPT9 при колоректальном раке [23], однако в последние годы всё большее внимание уделяется мультипараметрическим исследованиям в полногеномном масштабе с применением методов машинного обучения для классификации результатов [24]. Учитывая, что профили метилирования высоко специфичны для разных типов тканей, а также тот факт, что масштабные изменения в статусе метилирования генома начинают происходить достаточно рано в ходе канцерогенеза, значительные усилия направлены на разработку тестов для ранней диагностики и определения типа рака на основе статуса метилирования. Примером может служить тест Galleri, разрабатываемый компанией Grail и проходящий в настоящее время валидацию в крупных клинических исследованиях [25]. Однако предварительные результаты показывают его невысокую чувствительность для диагностики ранних стадий некоторых типов рака (в частности, РМЖ, рака простаты, почек и лёгких). Тест Guardant Shield, напротив, разработан для ранней диагностики одного типа рака – колоректального – и основан на комбинации генетических и эпигенетических маркеров, что при скрининге 10258 участников исследования позволило получить чувствительность 87,5% на I–III стадиях при специфичности 89,6% [26]. Среди других примеров альтернативных многопараметрических подходов следует упомянуть исследование пула циркулирующих РНК, включая сигнатуры микроРНК [27], а также отдельных метаболитов в сочетании с геномными маркерами [28]. Исследованию особенностей фрагментирования сцДНК, как ещё одному уровню её структуры, уделяется всё больше внимания. В последнее десятилетие постоянно накапливались свидетельства в пользу того, что длина фрагментов сцДНК отличается у здоровых людей и больных со злокачественными новообразованиями [29]. В 2019 году была опубликована одна из ключевых работ на эту тему, в которой авторы, основываясь на наблюдаемой разнице в медиане длины фрагментов сцДНК в полногеномном масштабе у здоровых и онкобольных всего лишь в 3,5 п. о. выдвинули

и экспериментально подтвердили гипотезу о том, что эту разницу можно рассматривать как качество опухолевого маркера и использовать для онкодиагностики [30]. Ряд исследователей применяет другой подход к этому вопросу и делает ставку на распределение свободных концов фрагментов сцДНК для определения локальной степени фрагментированности сцДНК [31].

Анализ циркулирующей опухолевой ДНК осложняется небольшими количествами сцДНК в образцах, порядка 10–40 нг (1000–6000 копий генома), при этом фракция опухолевой ДНК часто составляет <<1%–10% от этого количества. Важным техническим ограничением является возникновение аналитических ошибок при амплификации и секвенировании, однако технологии анализа постоянно и достаточно быстро совершенствуются. Мониторинг эффективности терапии, молекулярных механизмов резистентности, диагностика рецидивов в режиме реального времени, а также ранняя диагностика онкологических заболеваний, – лишь некоторые из возможных приложений жидкостной биопсии в прецизионной онкологии [32]. Внедрение этих методик в рутинную клиническую практику в ближайшие годы способно принципиально изменить возможности врача в ведении онкобольных. Более полная информация об ответе пациента на применяемую терапию позволит своевременно её корректировать при необходимости, данные о послеоперационных рецидивах и более ранняя диагностика онкологических заболеваний на ранних стадиях позволит назначать оптимальные схемы лечения.

Список литературы / References

1. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E. et al. 2013. "Cancer Genome Landscapes." *Science* 339 (6127): 1546–58.
2. Mamajani Y., Agnihotri S., Goldenberg A. et al. 2017. "Molecular Signatures for Tumor Classification: An Analysis of The Cancer Genome Atlas Data." *The Journal of Molecular Diagnostics*: JMD 19 (6): 881–91.
3. Doherty G.J., Petruzzelli M., Beddowes E. 2019. "Cancer Treatment in the Genomic Era." *Annual Review of Biochemistry* 88 (June): 247–80.
4. Heitzer E., Haque I.S., Roberts Ch. Et al. 2019. "Current and Future Perspectives of Liquid Biopsies in Genomics-Driven Oncology." *Nature Reviews. Genetics* 20 (2): 71–88.
5. Mandel P., Metais P. 1948. "Les Acides Nucléiques Du Plasma Sanguin Chez L'homme." *Comptes Rendus Des Seances de La Société de Biologie et de Ses Filiales* 142 (3–4): 241–43.
6. Alix-Panabières C., Pantel K. 2016. "Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy." *Cancer Discovery* 6 (5): 479–91.
7. Kalluri R., LeBleu V.S. 2016. "Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*
8. Delgado P.O., Alves B., Gehrke F. et al. 2013. "Characterization of Cell-Free Circulating DNA in Plasma in Patients with Prostate Cancer." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (2): 983–86.
9. Mattox A.K., Douville Ch, Wang Y. et al. 2023. "The Origin of Highly Elevated Cell-Free DNA in Healthy Individuals and Patients with Pancreatic, Colorectal, Lung, or Ovarian Cancer." *Cancer Discovery*, August. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1252>.
10. Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., et al. 2001. "About the Possible Origin and Mechanism of Circulating DNA Apoptosis and Active DNA Release." *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry* 313 (1–2): 139–42.
11. Kiddess E., Jeffrey S. 2013. "Circulating Tumor Cells versus Tumor-Derived Cell-Free DNA: Rivals or Partners in Cancer Care in the Era of Single-Cell Analysis?" *Genome Medicine* 5 (8): 70.
12. Ignatiadis M., Lee M., Jeffrey S. 2015. "Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (21): 4786–4800.
13. Bettgowda Ch., Sausen M., Leary R. et al. 2014. "Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies." *Science Translational Medicine* 6 (224): 224ra24.
14. Swarup V., Rajeswari M. 2007. "Circulating (cell-free) Nucleic Acids – a Promising, Non-Invasive Tool for Early Detection of Several Human Diseases." *FEBS Letters* 581 (5): 795–99.
15. Newman A.M., Bratman S.V., To J. et al. 2014. "An Ultrasensitive Method for Quantifying Circulating Tumor DNA with Broad Patient Coverage." *Nature Medicine* 20 (5): 548–54.
16. Abbosh Ch., Birkbak N.J., Wilson G.A. et al. 2017. "Phylogenetic ctDNA Analysis Depicts Early-Stage Lung Cancer Evolution." *Nature* 545 (7655): 446–51.
17. Watanabe K., Nakamura Y., Low S-K. 2021. "Clinical Implementation and Current Advancement of Blood Liquid Biopsy in Cancer." *Journal of Human Genetics* 66 (9): 909–26.
18. Reckamp K.L., Melnikova V.O., Karlovich Ch. et al. 2016. "A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (10): 1690–1700.

19. Deveson I.W., Gong B., Lai K. et al. 2021. "Evaluating the Analytical Validity of Circulating Tumor DNA Sequencing Assays for Precision Oncology." *Nature Biotechnology*, April, 1–14.
20. Nielsen H.J., Anagnostou V., Fijneman R. et al. 2017. "Direct Detection of Early-Stage Cancers Using Circulating Tumor DNA." *Science Translational Medicine* 9 (403): eaan2415.
21. Wan Jonathan C.M., Heider K., Gale D. et al. 2020. "ctDNA Monitoring Using Patient-Specific Sequencing and Integration of Variant Reads." *Science Translational Medicine* 12 (548): eaaz8084.
22. Cohen J.D., Li L., Wang Y. et al. 2018. "Detection and Localization of Surgically Resectable Cancers with a Multi-Analyte Blood Test." *Science* 3247 (January): eaar3247.
23. Warren J.D., Xiong W., Bunker A.M. et al. 2011. "Septin 9 Methylated DNA Is a Sensitive and Specific Blood Test for Colorectal Cancer." *BMC Medicine* 9 (December): 133.
24. Shen Sh. Y., Singhania R., Fehrer G. et al. 2018. "Sensitive Tumour Detection and Classification Using Plasma Cell-Free DNA Methylomes." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0703-0>.
25. Liu M.C., Oxnard G.R., Klein E.A. et al. 2020. "Sensitive and Specific Multi-Cancer Detection and Localization Using Methylation Signatures in Cell-Free DNA." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO xxx (xxx)*. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.02.011>.
26. Chung D.C., Gray II D.M., Singh H. et al. 2024. "A Cell-Free DNA Blood-Based Test for Colorectal Cancer Screening." *The New England Journal of Medicine* 390 (11): 973–83.
27. Schwarzenbach H., Nishida N., Calin G., Pantel K. 2014. "Clinical Relevance of Circulating Cell-Free microRNAs in Cancer." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 11 (3): 145–56.
28. Mayers J.R., Wu Ch, Clish C. et al. 2014. "Elevation of Circulating Branched-Chain Amino Acids Is an Early Event in Human Pancreatic Adenocarcinoma Development." *Nature Medicine* 20 (10): 1193–98.
29. Lapin M., Oltedal S., Tjensvoll K. et al. 2018. "Fragment Size and Level of Cell-Free DNA Provide Prognostic Information in Patients with Advanced Pancreatic Cancer." *Journal of Translational Medicine* 16 (1): 300.
30. Cristiano S., Leal A., Phallen J. et al. 2019. "Genome-Wide Cell-Free DNA Fragmentation in Patients with Cancer." *Nature* 570 (7761): 385–89.
31. Sun K., Jiang P., Cheng S. et al. 2019. "Orientation-Aware Plasma Cell-Free DNA Fragmentation Analysis in Open Chromatin Regions Informs Tissue of Origin." *Genome Research* 29 (3): 418–27.
32. Corcoran R.B. 2019. "Circulating Tumor DNA: Clinical Monitoring and Early Detection." *Annual Review of Cancer Biology* 3 (1): 187–201.

Статья поступила / Received 02.09.24
Получена после рецензирования / Revised 10.09.24
Принята в печать / Accepted 15.09.24

Сведения об авторах

Щербо Дмитрий Сергеевич, к.б.н., доцент, с.н.с.
WoS Researcher ID B-3549–2019. Scopus Author ID 18435270800.
ORCID: 0000-0002-0266-7015

Коваль Анастасия Павловна, научный сотрудник лаборатории биомаркеров НИИ Трансляционной медицины. WoS Researcher ID AAB-5984–2020.
Scopus Author ID 8618442700

Щербо Сергей Николаевич, д.б.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФДПО. WoS Researcher ID K-9314–2018.
Scopus Author ID 6602618674

Савина Марина Ивановна, д.б.н., проф. кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО

Туркина Татьяна Ивановна, д.б.н., проф. кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО

ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Автор для переписки: Щербо Сергей Николаевич. E-mail: shcherbos@mail.ru

About authors

Shcherbo Dmitry S., PhD Bio, associate professor, senior researcher.
WoS Researcher ID B-3549–2019. Scopus Author ID 18435270800.
ORCID: 0000-0002-0266-7015

Koval Anastasia P., researcher at the Laboratory of Biomarkers, Research Institute of Translational Medicine. WoS Researcher ID AAB-5984–2020.
Scopus Author ID 8618442700

Shcherbo Sergei N., Dr Bio Sci (habil.), professor, head of Clinical Laboratory Diagnostics Dept, Faculty of postgraduate education.
WoS Researcher ID K-9314–2018. Scopus Author ID 6602618674

Savina Marina I., Dr Bio Sci (habil.), professor at Clinical Laboratory Diagnostics Dept, Faculty of postgraduate education.

Turkina Tatiana I., Dr Bio Sci (habil.), professor at Clinical Laboratory Diagnostics Dept, Faculty of postgraduate education.

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Corresponding author: Shcherbo Sergei N. E-mail: shcherbos@mail.ru

Для цитирования: Щербо Д.С., Коваль А.П., Щербо С.Н., Савина М.И., Туркина Т.И. Жидкостная биопсия: анализ циркулирующей опухолевой ДНК крови. Медицинский алфавит. 2024; (20): 9–12. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2024-20-9-12>

For citation: Shcherbo D.S., Koval A.P., Shcherbo S.N., Savina M.I., Turkina T.I. Liquid biopsy: the analysis of circulating tumour DNA. *Medical alphabet*. 2024; (20): 9–12. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2024-20-9-12>

