

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ В КРОВИ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК КАК МАРКЕРА СОСТОЯНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Аракелян Арсен Самвелович

студент, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, РФ, г. Москва

Галеева Алсу Камилевна

студент, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, РФ, г. Москва

Сушенцев Никита Андреевич

студент, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, РФ, г. Москва

Дегтяревская Татьяна Юрьевна

научный руководитель, канд. биол. наук, доц. кафедры биологии и общей генетики, ПМГМУ им. И.М. Сеченова, РФ, г. Москва

Чебышев Николай Васильевич

Высокий уровень заболеваемости и смертности, трудности при диагностике, необходимость проведения массовых профилактических мероприятий, сложное и дорогостоящее лечение, зачастую недостаточно удовлетворительные результаты лечения онкологических больных ставят перед врачами-клиницистами и организаторами здравоохранения сложные задачи.

На сегодняшний день онкологические заболевания занимают второе место по смертности и заболеваемости в Российской Федерации.

Разработка программ ранней диагностики и скрининга является одним из приоритетных направлений развития онкологии и позволяет значительно улучшить результаты лечения. Несмотря на отсутствие централизованного онкологического скрининга в России, в обязанности врачей-терапевтов входит назначение тех или иных диагностических мероприятий в зависимости от особенностей каждого пациента.

За последние несколько десятилетий была накоплена значительная теоретическая база в области молекулярных и генетических особенностей опухолевой трансформации клеток, открыто множество генов, специфичных для определенных видов опухолей, и генов, отвечающих за приобретение клоном резистентности и способности к метастазированию. К примеру, ген *t790m* [1; 13], ответственный за возникновение резистентности к ингибиторам факторов эпидермального роста (EGFR), и *mts1*, который, как выяснилось, играет важную роль в приобретении метастатического потенциала опухолевым клоном [16]. Однако, несмотря это, ни один из принципиально новых диагностических методов не был внедрен в общественное здравоохранение.

Современный набор исследовательских методик позволяет оценить опухоль практически на любом уровне: трансляционном, нарушения в структуре ДНК и РНК, эпигенетических изменений, активности сигнальных путей, взаимодействии с микроокружением и

иммуноцитами и т. д. Программы цифровой обработки данных уже сейчас позволяют интегрировать полученные при использовании различных методик результаты и даже моделировать происходящие процессы *in silico* (компьютерное моделирование без проведения «биологического» эксперимента).

Доказано, что опухоль — гетерогенная структура [6], имеющая в своей основе колониальное происхождение [12]. Данный факт приводит к логичному выводу о том, что единичная биопсия и даже биопсия различных участков опухолей может не захватить клон, отражающий реальную степень малигнизации опухоли. А методов, позволяющих определить генетическую структуру опухоли и отслеживать ее генетическую эволюцию во всем разнообразии их популяций, недостаточно, и они имеют ряд своих недостатков. Поэтому появляется проблема внедрения нового метода, который позволит учитывать внутриопухолевую гетерогенность и способность клонов эволюционировать с приобретением резистентности к различным «таргетным» препаратам. Таковым, по нашему мнению, является метод анализа циркулирующих опухолевых ДНК (цоДНК). Использование данного метода наряду с другими, как мы считаем, позволит точнее оценить специфику исследуемого злокачественного новообразования.

Каждый тип опухоли имеет строго специфичный набор мутаций, вследствие чего фрагменты опухолевых ДНК являются перспективными маркерами.

цоДНК — фрагменты ДНК разрушенных опухолевых клеток, попавшие в кровеносное русло. Гибель опухолевых клеток с последующим выделением фрагментов ДНК происходит путем апоптоза и, чаще всего, некроза [2].

Впервые ученые описали обнаружение циркулирующих ДНК (цДНК) в крови человека еще в 1948 [11], а цоДНК — в 1977. Первоначально открытие использовалось для диагностики генетических отклонений плода [10; 14]. Однако сам факт открытия цДНК дал толчок для развития и совершенствования приборов для количественной и качественной диагностики циркулирующих ДНК в крови, в том числе опухолевых.

При онкологических заболеваниях общий уровень цДНК повышается, как раз за счет повышения количества цоДНК [3;16]. На долю цоДНК и общего количества приходится от 0,01 до 90 % [4]. Характеристика цоДНК имеет множество преимуществ по сравнению с применяемыми сегодня методами диагностики, и некоторые абсолютные преимущества, в частности выявление резистентности на различных этапах таргетной терапии.

Так же, количество цоДНК зависит от объема опухоли, т. е. чем больше объем опухоли, тем больше объем выделяемой ими цоДНК, следовательно, цоДНК является хорошим показателем объема и динамики роста опухоли.

Современные методики позволяют определять в цоДНК не только точечные мутации, но и комплексные aberrации хромосомного материала с изменениями количества (амплификация, делеция, анеуплоидия) или последовательности (транслокации, инверсии), больших фрагментов ДНК.

Некоторые из них:

- Принцип аллель-специфичной ПЦР-РВ.
- Метод пиросеквенирования.
- Система капиллярного электрофореза.
- SOLID.
- Цифровая ПЦР в эмульсии (BEAMing).
- Персонализированном анализе реаранжировки окончаний (personalized analysis of rearranged ends, PARE).
- Цифровое кариотипирование.
- Многие другие методы на основе ПЦР.

Чувствительность этих методов крайне высока, что позволяет выявлять цоДНК при ее содержании в циркулирующей ДНК организма менее 0,001 % [8; 9].

Сравнение с другими методами диагностики.

Биопсия. Кроме упомянутого недостатка биопсии по отношению к гетерогенности опухоли, биопсия так же имеет «привязанный ко времени» характер, и информация, полученная в результате процедуры в начале лечения, носит скорее статистический характер и со временем становится неточной, так как опухоль эволюционирует. Повторные множественные биопсии могли бы решить эту проблему, однако необходимо решить ряд этических и технических вопросов. Кроме этого, на поздних стадиях развития онкологических заболеваний у пациентов возможно присутствие нескольких опухолей с различной локализаций, часто сложно доступных для биопсии.

Белковые онкомаркеры. В целом цоДНК обладает выигрышными для клинических исследований характеристиками: время полураспада цоДНК колеблется от 1—2 часов, что дает преимущество по сравнению с белковыми онкомаркерами, время полураспада которых более 7 дней, и позволяет отслеживать рак с опозданием не более 2 часов. Так же преимущество перед другими биомаркерами заключается в специфичности цоДНК, так как выявляемая мутация не может быть найдена в кровообращении, если остаточные опухолевые клетки не присутствуют где-то в теле пациента.

Кроме этого, белковые маркеры определены не для всех типов опухолей.

На примере карциноэмбрионального антигена (СЕА), который является стандартным биомаркером при заболевании пациентов колоректальным раком и широко используется при ведении болезни [15], можно проследить отличия двух методов. Только 10 из 18 пациентов имели уровень СЕА > 5 нг мл⁻¹ (край нормального диапазона) до начала исследования. Эта разница в чувствительности между двумя анализами (СЕА по сравнению с цоДНК) была статистически значимой; 56 % по сравнению с 100 %, соответственно ($p = 0,008$, тест McNemar). Более того, даже у тех испытуемых с положительным уровнем СЕА до операции, полная резекция опухоли привела к гораздо менее заметному уменьшению СЕА, чем при наблюдении цоДНК (среднее снижение 99,0 % по сравнению с 32,5 % в цоДНК против СЕА, соответственно). Наконец, при измерении на первом послеоперационном повторном посещении с 24 по 48 дн., способность уровня СЕА предсказать рецидив заболевания был менее впечатляющим, чем с помощью уровня цоДНК. Так, у 4 из 22 пациентов, которым провели операцию и не обнаружили цоДНК в плазме крови (от 2 до 10 дней после операции) рецидивы не произошли [5].

Рутинное использование УЗИ выявляет опухоль лишь на стадии метастазирования или прорастания. В сравнении с **УЗИ и лучевыми методами диагностики** цоДНК дает более полную генетическую характеристику опухоли.

Недостатки метода. Уровень цоДНК очень отличается у разных людей, и его сложно выявить, особенно для маленьких опухолей на ранних стадиях [9]. Большинство исследований были проведены на небольшом количестве пациентов и только с некоторыми типами рака. В вопросе с биопсией цоДНК относительно дорогой метод, требует много времени, манипуляций и обученных специалистов. Методы диагностики по циркулирующим опухолевым клеткам по цоДНК невозможно определить комбинированный генотип и фенотип опухолевых клеток. В сравнении с УЗИ лучевыми методами диагностик цоДНК не показывает точное расположение опухоли, ее морфологические и цитологические характеристики. В сравнении с белковыми онкомаркерами цоДНК находится в крови в предельно низких концентрациях и иногда результат анализа ложноположителен. Последнее особенно важно, так, как, говоря про внедрение данного метода в здравоохранение и массовое клиническое использование, метод должен обладать надежными свойствами для того, чтобы служить основанием для постановки диагноза, назначения и смены курса терапии. Хотя результаты многообещающие, они должны быть проверены в более значительных и массовых исследованиях пока не станет ясным, на самом ли деле цоДНК показывает точную картину, и что более важно, можно ли спасать или улучшать жизни людей с помощью этого метода.

Помимо цоДНК активно изучаются циркулирующие опухолевые клетки и мРНК, и хотя и те, и другие имеют свои преимущества и недостатки, мы считаем, что совместное применения нескольких методов в различных комбинациях наряду с применяемыми сегодня методами

позволит уменьшить смертность и улучшить качество жизни онкологических больных.

Перспективы развития. Описываемый нами метод имеет два основных направления дальнейшего развития. Перспективой развития данного метода является его научная значимость, а именно изучение патофизиологических процессов, происходящих в опухолевых клетках, для более детального понимания и дальнейшего развития новых видов лечения. С помощью цоДНК и приборов по определению мутаций можно создать банк характерных для каждого вида рака мутаций, для облегчения работы многих приборов, работающих уже с известными мутациями и упрощения постановки диагнозов.

Также этот метод имеет важное клиническое значение. С помощью него возможно проведение диагностики наличия опухолевого процесса при невозможности использования других методов (учитывая необходимость специальных программ по скринингу населения); метод позволяет определять возникновение резистентности, и менять тактику лечения; метод диагностики с исследованием цоДНК с большой вероятностью предсказывает возникновение рецидива. Помимо цоДНК активно изучаются цоклетки и мРНК, хотя и те, и другие имеют свои преимущества и недостатки, мы считаем, что совместное применения нескольких методов в различных комбинациях наряду с применяемыми сегодня методами позволит уменьшить смертность и улучшить качество жизни онкологических больных.

Осознавая преимущества метода диагностики онкологической патологии по цоДНК, несмотря на пока существующие недостатки, при должном финансировании со стороны государства этот метод, по нашему мнению, должен развиваться и поддерживаться в стране.

Список литературы:

1. Г.П. Георгиев. Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей. Соросовский образовательный журнал, том 6, № 11, 2000.
2. Attie T.J.I. Go, Allerdien Visser, Monique A.M. Mulders et al. The Origin of Circulating Free DNA Clinical Chemistry 53, № 12, 2007 DOI: 10.1373/clinchem.2007.097071.
3. Delgado P.O., Alves B.C., Gehrke F.S. et al. Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. Tumor Biol 2013; 34 (2): 983—6.
4. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med 2007; 14 (9): 985—90.
5. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med. 2008 Sep;14 (9):985—90. doi: 10.1038/nm.1789. Epub 2007 Jul 31.
6. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing Cancer Research UK London Research Institute, London, United Kingdom. (N Engl J Med. 2012 Sep 6; 367 (10): 976).
7. Hashad D., Sorour A., Ghazal A., Talaat I. et al. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. J Clin Lab Anal 2012; 26 (6): 467—72.
8. Leary R.J., Kinde I., Diehl F. et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. Sci Transl Med 2010; 2 (20): 20ra14.
9. Leary R.J., Sausen M., Kinde I. et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with wholegenome sequencing. Sci Transl Med 2012; 4 (162): 162ra154.
10. Lo Y.M.D., Hjelm N.M., Fidler C. et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998;339 (24): 1734—8.
11. Mandel P., Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil 1948;142 (3—4): 241—3.
12. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W. et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature 2013; 497 (7447): 108—12.
13. Pao W., Miller V.A., Politi K.A. et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med 2005; 2 (3):e73.
14. Papageorgiou E.A., Karagrigoriou A., Tsaliki E. et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. Nat Med.
15. Sarah-Jane Dawson, F.R.A.C.P., Ph.D., Dana W.Y. Tsui et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer N Engl J Med 2013; 368:1199-1209 March 28,

2013DOI: 10.1056/NEJMoa1213261.

16. Schwarzenbach H., Müller V., Milde Langosch K. et al. Evaluation of cell-free tumor DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. *Mol BioSystems* 2011;7 (10): 2848–54.