

Исследование циркулирующей опухолевой ДНК (жидкая биопсия). Перспективы использования в онкологии

Н.В. Жуков^{1,2}, А.Р. Зарецкий^{1,3}, С.А. Лукьянов^{1,3}, С.А. Румянцев^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1;

²ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва; 117198, Россия, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

³ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва; 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Контакты: Николай Владимирович Жуков zhukov.nikolay@rambler.ru

Современный набор исследовательских методик позволяет изучать опухоль практически на любом уровне: экспрессия белков, нарушения в структуре ДНК, РНК, эпигенетические изменения, активность сигнальных путей, микроокружение, взаимодействие с иммунной системой и т. д. Однако образцы опухоли, на основании которых проводятся эти исследования, получают так же, как и 100 лет назад – путем выполнения биопсии опухолевых очагов перед началом лечения. С учетом имеющихся данных о наличии внутриопухолевой гетерогенности, а также изменении опухоли в процессе лечения, это может быть одним из факторов, замедляющих получение необходимых знаний о биологии опухолей. Согласно результатам исследований, анализ циркулирующей опухолевой ДНК (цОДНК) позволяет надеяться на преодоление ключевых недостатков, характерных для рутинной биопсии. Одним из ключевых преимуществ анализа цОДНК является возможность более комплексного изучения опухоли при сохранении высокого уровня специфичности, практически не уступающего рутинной биопсии. Чувствительность определения цОДНК продолжает нарастать благодаря разработке новых технологий ее анализа. Изучение цОДНК может дать прорывные результаты в области понимания молекулярной гетерогенности опухолей, развития резистентности к противоопухолевой терапии и способов ее преодоления, скрининга и ряде других ключевых направлений современной онкологии.

Ключевые слова: циркулирующая опухолевая ДНК, жидкая биопсия, секвенирование, метилирование, злокачественные опухоли, внутриопухолевая гетерогенность

Circulating tumor DNA detection (liquid biopsy): prospects in oncology

N.V. Zhukov^{1,2}, A.R. Zaretskiy^{1,3}, S.A. Lukyanov^{1,3}, S.A. Romyantsev^{1,2}

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow; 1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997;

²Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow; 1, Samory Mashela st., Moscow, Russia, 117198;

³M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow; 16/10, Miklukho-Maklaya st., Moscow, Russia, 117198

Modern research techniques allows tumor studying in almost any level: protein expression, structural changes of DNA, RNA, epigenetic changes, activity of signaling pathways, microenvironment, interaction with the immune system, etc. However, tumor samples are obtained as 100 years ago – by tumor biopsy prior to treatment. Based on available data about intratumoral heterogeneity and tumor changes during treatment, it may be one of the factors braking to obtain required information of tumor biology. According to study, the analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) allows to hope to overcome the key limitations of routine biopsy. One of the key benefits of ctDNA analysis is the ability to a more comprehensive tumor investigation, while maintaining a high level of specificity, almost as well as a routine biopsy. Detection sensitivity of ctDNA continues to increase due to the development of new technology. The study of ctDNA may lead to breakthrough results in understanding of tumors molecular heterogeneity, development of resistance to anticancer therapy and ways to overcome it, screening and a number of other key areas of modern oncology.

Key words: circulating tumor DNA, liquid biopsy, sequencing, methylation, malignant tumors, intratumoral heterogeneity

Введение

За предыдущие 20 лет онкологи получили в свое распоряжение невиданный доселе инструментарий для исследования опухолей. Еще совсем недавно мы могли изучать опухоль лишь с помощью микроскопа и ограниченного набора иммуногистохимических тестов. Современный набор исследовательских методик позволяет оценить ее практически на любом

уровне: экспрессия белков, нарушения в структуре ДНК, РНК, эпигенетические изменения, активность сигнальных путей, микроокружение, взаимодействие с иммунной системой 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 мо-

делирование без проведения «биологического» эксперимента).

Благодаря данным, полученным в рамках этих исследований, значимо расширился набор доступных противоопухолевых препаратов, многие из которых в настоящее время создаются целенаправленно — под конкретную «мишень», выявленную при исследовании опухолевых клеток. Появились не просто новые препараты, а новые классы лекарств — блокаторы сигнальных путей, антиангиогенная и эпигенетическая терапия, противоопухолевые моноклональные антитела, иммунопрепараты с новым, никогда ранее не использовавшимся механизмом действия.

Однако при всем многообразии «инструментов» реальных прорывов в области противоопухолевой терапии за последние годы оказалось не так уж и много. Несмотря на накопленную теоретическую базу в области биологии опухоли и появившуюся возможность целенаправленного создания противоопухолевых лекарств, частота неудачных попыток их внедрения в клиническую практику остается почти такой же, как и в эпоху «эмпирической» химиотерапии — менее 10 % препаратов с многообещающими теоретическими предпосылками эффективности проходят этап клинических испытаний и выходят в практику. И даже если новый препарат преодолевает этот барьер и демонстрирует «приемлемую» для регистрации эффективность, то выигрыш от его использования (по сравнению с ранее существовавшей терапией) зачастую измеряется увеличением медианы выживаемости на несколько месяцев или 5–10 % прибавкой в 5-летней выживаемости. Отдельные исключения — препараты, действительно изменившие прогноз ряда заболеваний (иматиниб, трастузумаб, ритуксимаб, ипилимумаб, полностью транс-ретиноевая кислота и т. д.), лишь подтверждают это правило — их высокая эффективность до момента клинических испытаний оставалась все такой же «неожиданной» (теоретические предпосылки их эффективности не были более весомыми, чем у препаратов, не показавших достаточной эффективности в процессе исследований).

Причин подобной ситуации может быть много. Но одной из них, по нашему мнению, является то, что образцы опухоли, на основании которых проводится ее исследование, мы получаем так же, как и 100 лет назад.

Уже имея однозначные доказательства наличия внутриопухолевой гетерогенности [1, 2], понимая возможность клональной эволюции опухоли [3, 4] и ее изменения под воздействием противоопухолевой терапии [5, 6], мы пытаемся изучать опухоль на основе небольшого образца (биоптата), полученного из одного очага до начала лечения или в момент прогрессирования.

Подход к изучению опухолей с использованием материала, полученного при рутинной биопсии, страдает значимыми «врожденными» недостатками, ос-

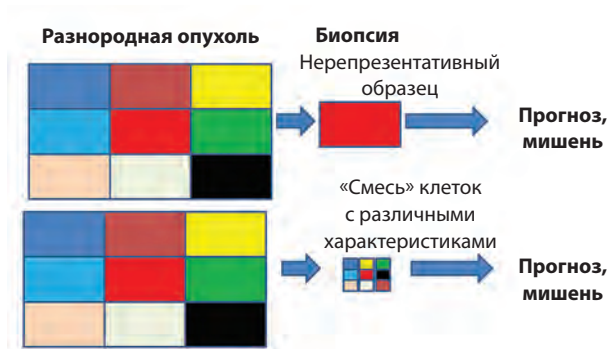


Рис. 1. Возможные причины нерепрезентативности биопсии

новным из которых является то, что случайным образом выбранный фрагмент опухоли (первичной или метастаза) может не отражать всего многообразия, обусловленного внутриопухолевой гетерогенностью. Но даже в случае, если удастся получить репрезентативный образец опухолевой ткани, клон опухоли, отвечающий за резистентность к выбранной терапии, может быть крайне мал на момент начала лечения (рис. 1).

Образец опухолевой ткани при рутинной биопсии получается в фиксированной временной точке (перед началом лечения и/или на момент прогрессирования), и изменения, происходящие в опухоли в процессе естественной эволюции или на фоне противоопухолевой терапии, не могут быть адекватно оценены в динамике. При этом за прогрессию (рецидив) болезни может отвечать минорная на момент начала терапии или развернутого клинического прогрессирования (рецидива) популяция опухолевых клеток. Логично предположить, что если в результате проведения терапии удастся добиться выраженного противоопухолевого эффекта, то до ее начала основная масса опухоли была представлена клетками, чувствительными к использовавшимся препаратам. Гибелью этих клеток и обусловлен клинический эффект — значительное (вплоть до полной регрессии) сокращение опухолевой массы. Однако даже достижение полной регрессии клинически определяемых очагов далеко не всегда обозначает излечение. Очевидно, что рецидив или прогрессирование после ранее достигнутого эффекта обусловлены наличием резистентного клона, который существовал на момент начала терапии или возник в процессе ее проведения. За резистентность этого клона отвечают характеристики, скорее всего отсутствовавшие в клетках, не переживших терапию (в противном случае гибели этих клеток не произошло бы и клинический эффект достигнут бы не был). Однако на момент первичной биопсии клеток, несущих признаки, отвечающие за резистентность, было крайне мало (при наличии исходно резистентного клона) или они отсутствовали вовсе (при вторичной резистентности, возникающей в процессе лечения). В связи с этим шанс на то, что клетки, несущие признаки, отвечающие за развитие резистентности, попадут в биоптат,

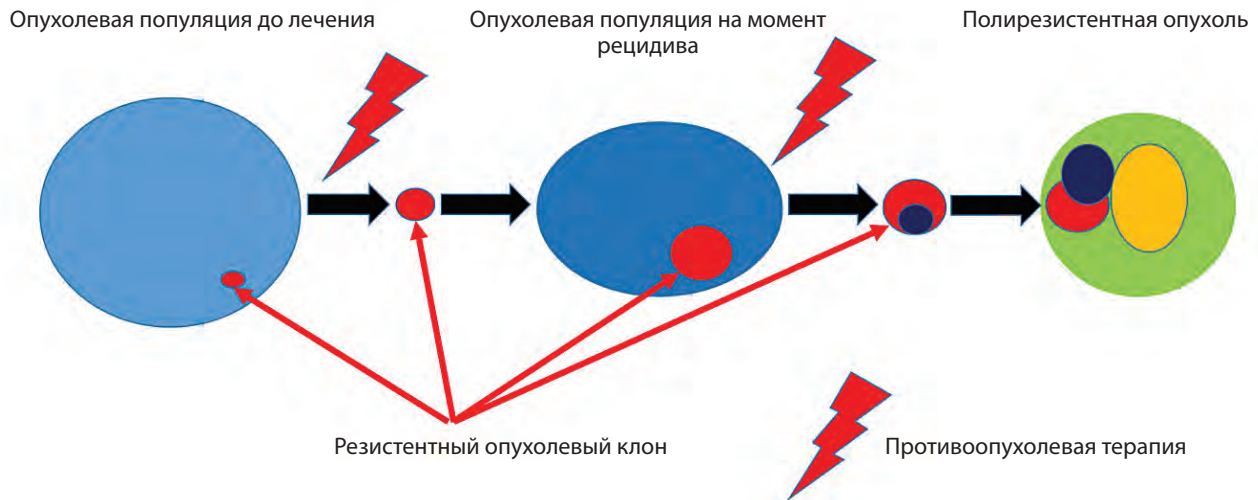


Рис. 2. Возможные причины неудач выявления резистентного опухолевого клона при рутинной биопсии

полученный до начала терапии, невелик. Даже если они будут присутствовать в исходном образце, в связи с малочисленностью их ключевые характеристики могут быть не выявлены (восприняты как «шум» на фоне гораздо более часто встречающихся в опухоли aberrаций). На момент же рецидива популяция опухолевых клеток опять может быть весьма разнородна, и клон, обусловивший резистентность к терапии, вновь будет представлен меньшинством клеток. Это косвенно подтверждается тем, что даже у некоторых больных с рецидивом заболевания может быть достигнута ремиссия (хотя и непродолжительная) при проведении терапии [7], аналогичной терапии первой линии (т. е. большая часть опухолевых клеток даже в случае рецидива опять не будет обладать признаками, обусловившими развитие резистентности) (рис. 2).

Проблему оценки репрезентативной опухолевой популяции отчасти можно считать решенной лишь в отношении «жидких» гемобластозов (лейкозы), при которых большинство опухолевых клеток присутствуют в периферической крови и костном мозге, получение образцов которых на любом из этапов лечения не представляет больших технических проблем. Более того, методики определения минимальной остаточной болезни (МОБ) позволяют выявлять наличие опухолевых клеток даже на этапе максимальной редукции их количества в процессе терапии. При других видах злокачественных новообразований возможность получения полноценной информации об опухолевой популяции и ее видоизменении в процессе терапии до недавнего времени отсутствовала. Одним из методов, позволяющих надеяться на решение этой проблемы для больных с солидными опухолями и гемобластозами, для которых нехарактерно присутствие опухолевых клеток в периферической крови, является определение циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК). ЦоДНК представляет собой фрагменты ДНК погибших опухолевых клеток, попавшие в сис-

темный кровоток. Большинство фрагментов цоДНК состоит из 180–200 пар оснований, что свидетельствует о том, что они чаще возникают в процессе апоптоза, однако выделяется цоДНК и из клеток, подвергшихся некрозу [8].

Свободно циркулирующие фрагменты опухолевой ДНК потенциально позволяют получить гораздо более полную информацию о генетических характеристиках опухоли. Они могут быть как измерены количественно (для определения истинного объема опухолевой массы, ее динамики в процессе лечения), так и оценены качественно – в идеальной ситуации являясь «отпечатками пальцев» всей опухоли, а не ее отдельного фрагмента. Несмотря на то, что «представительство» ДНК из различных очагов может быть неодинаковым, данная методика представляется весьма перспективным инструментом для изучения опухолей.

Фрагменты свободно циркулирующей (вне клеточной фракции) ДНК впервые были обнаружены Mandel и Metais [9] в 1948 г. и до недавнего времени наиболее успешно использовались для диагностики генетически обусловленных заболеваний плода [10, 11]. Именно эти исследования положили начало разработке и клиническому применению инструментов поиска циркулирующей в крови ДНК, качественно отличающейся от соматической ДНК организма «хозяина».

В целом, пациенты со злокачественными опухолями имеют более высокое содержание циркулирующей ДНК, чем здоровые люди, что обусловлено дополнительным поступлением в кровоток фрагментов ДНК, выделяющихся из опухолевых клеток [12–14]. 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 кро-

воток 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 ткани процесс фагоцитоза менее эффективен, в связи с чем происходит накопление клеточного детрита, выделяющего опухолевую ДНК в циркуляцию [15]. Доля опухолевой ДНК в общем количестве циркулирующей ДНК может составлять от 0,01 до 90 % [16].

Однако, несмотря на привлекательность использования цоДНК в онкологии, этому длительное время препятствовало отсутствие эффективных и надежных методов выделения цоДНК среди общей циркулирующей ДНК пациента и методик количественного подсчета цоДНК.

Для выделения цоДНК среди общего пула свободной циркулирующей ДНК (опухолевого и неопухолевого происхождения) требовалась разработка методик определения во фрагментах циркулирующей ДНК специфичных для опухоли мутаций, не присутствующих в остальных клетках организма. Поскольку соматические мутации, наблюдающиеся в опухоли, наиболее часто представлены точечной заменой нуклеотидов, задача не могла быть решена до разработки методов, позволяющих эффективно и, что немаловажно, относительно недорого выявлять эти изменения генетического материала. В настоящее время такие методики стали доступны, что дает возможность использовать точечные мутации в качестве маркера, эффективно выделяющего цоДНК из общего пула циркулирующей ДНК организма. При использовании ранних методик секвенирования удавалось выявлять цоДНК лишь у пациентов с очень большой опухолевой массой (и, соответственно, значительным количеством цоДНК) [16, 17]. В настоящее время исследование цоДНК в онкологии значительно упростилось за счет разработки новых цифровых технологий, позволяющих выявлять цоДНК даже при крайне малом ее содержании. Благодаря этому во многом изменилась и «тональность» статей, посвященных диагностической и исследовательской ценности цоДНК. До появления новых технологий секвенирования и анализа данных даже сам факт выявления цоДНК представлял техническую проблему — ее удавалось выявить лишь у 30–50 % больных с распространенными (метастатическими) опухолями и крайне редко — при локализованном процессе [18–20]. В связи с этим некоторыми авторами информативность анализа цоДНК оценивалась даже ниже, чем ценность оценки циркулирующих опухолевых клеток [21]. Однако современные цифровые технологии, обладающие крайне высокой чувствительностью, позволили решить эту технологическую проблему — при их использовании мутации, выявляе-

мые в опухолевой ткани, практически во всех случаях удается выявить в цоДНК, а сама цоДНК выделяется практически у всех пациентов [22]. Использование секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS) позволяет выявлять даже редкие мутации при небольшом содержании цоДНК [23, 24].

Современные методики позволяют определять в цоДНК не только точечные мутации, но и комплексные aberrации с изменениями количества (амплификация, делеция, анеуплоидия) или последовательности (транслокации, инверсии) больших фрагментов ДНК. С этой целью разработаны 2 новых метода, основанные на персонализированном анализе реаранжировки окончаний (personalized analysis of rearranged ends, PARE) и цифровом кариотипировании [25–28]. Чувствительность этих методов крайне высока, что позволяет выявлять цоДНК при ее содержании в циркулирующей ДНК организма менее 0,001 % [23, 25]. В случае изначального определения в опухолевой ткани реаранжировки ДНК могут отслеживаться в цоДНК так же, как и точечные мутации. Более того, этот подход может использоваться и для поиска заранее неизвестных изменений. К примеру, амплификация HER2/neu (ERBB2) или реаранжировка ALK могут быть определены в крови без потребности получения образцов опухолевой ткани при помощи рутинной биопсии [29]. Основным недостатком этих методик является их высокая цена. Несколько недавно опубликованных исследований свидетельствуют о том, что изменения в метилиции опухолевого генома так же могут определяться в цоДНК, а уровень метилирования цоДНК будет соответствовать уровню метилирования в опухоли [30, 31]. Однако специфичность определения метилированной цоДНК ниже, чем определение генетических aberrаций в цоДНК. Метилирование не является опухоль-специфичным процессом, а эпигенетическая регуляция, присутствующая в опухоли, может наблюдаться и в нормальных тканях (т.е. одни и те же гены могут быть гиперметилированы как в опухоли, так и за ее пределами) [32]. Однако даже с этими поправками изменения метилиции цоДНК могут оказаться полезным маркером динамических изменений, происходящих в опухоли. Несмотря на низкую специфичность, чувствительность определения метилиции цоДНК значительно выше, особенно при ранних стадиях заболевания, так как эпигенетические изменения часто являются более ранними событиями в процессе канцерогенеза. Это делает исследование метилиции цоДНК потенциально привлекательным в отношении дальнейшего использования в качестве скринингового теста.

Таким образом, на настоящий момент в цоДНК могут быть оценены практически любые изменения генетического материала, которые ранее могли быть исследованы лишь при изучении материала, полученного при рутинной биопсии опухоли. Однако в отличие от обычной биопсии исследование цоДНК позво-

ляет оценить весь спектр генетических aberrаций, имеющихся в опухоли (вне зависимости от внутриопухолевой гетерогенности), так как в кровоток попадают фрагменты из всех опухолевых очагов, находящихся в организме [29, 33]. В связи с этим анализ цоДНК может рассматриваться как «тотальная» жидкая биопсия опухоли.

Количественное определение циркулирующей опухолевой ДНК

В настоящее время существуют 2 подхода к определению цоДНК для ее использования в качестве биомаркера опухоли. При одном из них изначально определяются генетические aberrации, присутствующие в опухоли пациента (т. е. требуется предварительное проведение рутинной биопсии), после чего среди циркулирующей ДНК ищутся фрагменты, содержащие выявленные в биоптате опухоли генетические изменения. При использовании такого подхода выявленные при биопсии aberrации служат маркером, позволяющим выделять цоДНК из общего пула циркулирующей ДНК [16]. При альтернативном подходе с этой же целью используют заранее определенный набор мутаций, характерных для данного типа опухолей без предварительного анализа опухолевой ткани конкретного пациента [34, 35]. Однако в обоих случаях цоДНК оценивается количественно (в абсолютном количестве мутантных фрагментов и/или по соотношению мутантных фрагментов и всей циркулирующей ДНК организма).

При наличии отдаленных метастазов (большой опухолевой массе) выявить цоДНК удастся практически у всех больных, т. е. чувствительность метода приближается к 100 % [16, 22]. Однако чувствительность зависит от биологических особенностей опухоли, особенностей организма больного и технологических факторов, связанных с методикой определения. В наибольшей степени чувствительность метода зависит от объема опухолевой массы. При ранних стадиях заболевания или ограниченном метастатическом поражении количество цоДНК значительно ниже, что требует применения более чувствительных методик во избежание ложноотрицательных результатов [17]. При использовании полимеразной цепной реакции чувствительность метода технологически ограничена частотой ошибки ДНК-полимеразы, которая обычно составляет 0,01 %. При меньшем относительном содержании цоДНК среди всей циркулирующей ДНК крови результат исследования считается отрицательным [36]. Новые технологии, например NGS, обладают более высокой чувствительностью [24, 37], что крайне важно, так как ложно-негативные результаты, особенно когда результаты анализа используются для принятия решения относительно тактики лечения, могут приводить к серьезным негативным последствиям.

Потенциальной областью клинического применения «количественной» жидкой биопсии может стать ее использование для оценки объема опухолевой массы (как исходно, так и в динамике — на фоне лечения). В настоящее время для этого используются различные методы визуализации (компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, ультразвуковое исследование и т. д.), оценивающие размер определяемых опухолевых очагов, и некоторые белковые маркеры (простатический специфический антиген, раково-эмбриональный антиген, хорионический гонадотропин, различные раковые антигены — СА125, СА15.3, СА19.9 и т. д.). Однако оценка объема опухолевой массы при помощи методов визуализации сложна (особенно при множественных очагах поражения), сопряжена с множественными ограничениями, связанными с технической возможностью оценки размера опухолевых очагов, их конфигурацией, определением границы с окружающими тканями. Еще большую проблему представляет оценка динамики опухолевого процесса в случае, если происходит изменение конфигурации очагов (например, распад опухолевых конгломератов) или изменение их характеристик (плотности, границы очагов и т. д.) [38–40]. Для многих опухолей не выявлены белковые биомаркеры, а существующие не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью, их уровень может изменяться по причинам, отличным от динамики опухолевого процесса. Многие биомаркеры присутствуют в циркуляции недели и месяцы, что делает их «ответ» на изменение опухолевой массы отсроченным [41–43]. Кроме того, большинство белковых биомаркеров в определенном количестве синтезируются и нормальными клетками организма, т. е. их уровень никогда не будет равен нулю, что не позволяет использовать их для контроля МОБ. Кроме того, и визуализирующие методы, и белковые маркеры обладают достаточно большой инерцией — их реакция на реальные изменения, происходящие в опухоли, всегда запаздывает. В ряде случаев изменения размеров опухоли при достижении противоопухолевого эффекта, приводящего к значимому продлению жизни или даже излечению, может вовсе не происходить (например, при лечении гастроинтестинальных стромальных опухолей или некоторых видов лимфом).

Использование цоДНК в качестве метода мониторинга объема опухолевой массы имеет ряд потенциальных преимуществ перед существующими в настоящий момент методами. В отличие от белковых маркеров, цоДНК имеет относительно короткий период полужизни в крови (примерно 2 ч), что позволяет оценивать динамику опухолевой массы через несколько часов после ее реального изменения, а не спустя недели или месяцы [16]. Кроме того, цоДНК — крайне специфичный метод оценки, так как выявляет соматические мутации, присутствующие

только в опухоли и не характерные для других клеток организма, что исключает наличие ложноположительных результатов.

Ряд предварительных исследований при раке толстой кишки, молочной железы, колоректальном раке и меланоме подтвердили, что цоДНК может с успехом использоваться в качестве суррогатного маркера объема опухолевой массы. При прогрессировании заболевания наблюдался резкий рост уровня цоДНК и, наоборот, при достижении противоопухолевого эффекта (или успешном удалении опухолевых очагов) происходило резкое снижение ее уровня [16, 34, 35, 44]. Подобный подход может быть использован в клинике в ситуациях, когда методы визуализации или исследование белковых опухолевых маркеров не дают однозначного ответа о динамике процесса (стабилизация, смешанный ответ, сомнение в жизнеспособности остаточной опухоли). Потенциально определение динамики уровня цоДНК может использоваться и для более быстрого решения вопроса о модификации терапии (не дожидаясь месяцев и недель для объективной оценки изменений опухолевой массы). Может использоваться цоДНК и для исходного определения опухолевой массы с целью более точной стратификации пациентов на группы риска, так как в отличие от методов визуализации цоДНК «учитывает» и наличие опухолевых клеток, рассеянных в организме без формирования очагов.

Однако более практически значимой областью применения количественного определения цоДНК на современном этапе является выявление МОБ после хирургического или лекарственного лечения с куративной целью. Хирургическое удаление первичной опухоли само по себе (без дополнительной системной терапии) излечивает достаточно большую долю больных с ранними стадиями рака молочной железы, толстой кишки, легкого, мягкотканых сарком и остеогенной саркомы. Однако у части пациентов удаление видимых проявлений опухоли не приводит к излечению, что обусловлено наличием микрометастазов, которые без выполнения дополнительного системного лечения приводят к развитию рецидива. Именно эта подгруппа больных и выигрывает от проведения дополнительного (адьювантного) системного лечения, в то время как пациенты, не имеющие микрометастазов, получают от дополнительного системного лечения лишь токсичность. Однако до настоящего времени нет эффективных методов исследований, позволяющих выявить среди больных, подвергшихся радикальному хирургическому лечению, тех, кто действительно излечен (и, соответственно, не требует дополнительной терапии), и отличить их от пациентов, у которых сохраняется МОБ. Имеющиеся в настоящее время прогностические признаки (в том числе основанные и на генетическом тестировании опухоли) позволяют оценить лишь риск рецидива среди группы больных, но не в состоянии ответить на вопрос о на-

личии микрометастазов у конкретного пациента [45]. В связи с этим адьювантную терапию получают большинство больных. Схожая ситуация наблюдается и при использовании куративной химиотерапии при герминогенных опухолях, некоторых лимфомах и солидных опухолях в педиатрии. Достижение полной клинической ремиссии не гарантирует отсутствие рецидива, и в ряде случаев пациенты подвергаются дополнительной, более агрессивной терапии, основываясь не на факте подтвержденного наличия МОБ, а исходя из риска развития рецидива на основании весьма неточных прогностических факторов.

В связи с вышеперечисленными особенностями (высокая специфичность, быстрое изменение концентрации при изменении объема опухоли) определение цоДНК после проведенного куративного хирургического лечения (окончания стандартной куративной химиотерапии) является весьма привлекательным маркером наличия МОБ.

Весьма обнадеживающие результаты были получены при использовании цоДНК для определения МОБ у больных раком толстой кишки, подвергнутых потенциально куративному хирургическому лечению [16]. Мутационный профиль определялся в резецированной первичной опухоли, и эта персонализированная «подпись» опухоли использовалась для определения цоДНК после резекции. У всех пациентов, имевших определяемые уровни цоДНК после резекции, в течение 2–5 лет развились рецидивы, в то время как ни у одного из пациентов, не имевших цоДНК после резекции опухоли, при сопоставимых сроках наблюдения рецидива отмечено не было. Другое независимое проведенное исследование, в котором в качестве маркера цоДНК использовалось наличие мутации в гене *KRAS*, показало значимую корреляцию между сохраняющимся после куративной резекции опухоли уровнем цоДНК в крови и рецидивом колоректального рака [46].

Таким образом, как минимум на примере колоректального рака показана высокая диагностическая ценность цоДНК в отношении выявления МОБ и предсказания рецидива после хирургического лечения с куративной целью. Наиболее вероятно, что в будущих исследованиях послеоперационного уровня цоДНК все же будут использовать именно персонализированные наборы, специфичные для конкретного пациента, так как генетические aberrации в опухолях одного гистологического типа могут быть достаточно разнообразны, что может негативно отразиться на чувствительности и специфичности тестов с ограниченным количеством наиболее характерных генетических изменений. Применение подобных методик может помочь в решении вопроса о необходимости проведения дополнительного лечения после потенциально куративных операций или модификации лечения у больных, получающих потенциально куративное лекарственное лечение.

Исследование циркулирующей опухолевой ДНК для мониторинга развития резистентности и изучения внутриопухолевой гетерогенности

Возникновение резистентности к ранее эффективной терапии наиболее часто обусловлено приобретением опухолью дополнительных генетических аберраций или изменением баланса сигнальных путей, отвечающих за жизнедеятельность опухоли. Эти же механизмы (в случае, если они присутствовали в опухолевых клетках исходно) отвечают за первичную резистентность заболевания. В настоящее время для выявления механизмов резистентности к терапии наиболее часто используют экспериментальные модели (клеточные линии или ксенографты), что во многом обусловлено трудностью получения необходимого количества образцов опухолевой ткани от пациента в процессе лечения. Даже если пациент участвует в клинических исследованиях, то по техническим и этическим причинам образец опухолевой ткани чаще всего может быть получен лишь только перед началом лечения и, значительно реже, в момент прогрессирования заболевания. Кроме того, рутинной биопсии может быть подвергнуто лишь ограниченное количество опухолевых очагов. При наличии образцов опухоли, полученных до лечения и на момент прогрессирования, молекулярные исследования могут быть использованы для обнаружения различий между ними. Однако это может позволить выявить резистентный клон лишь в случае, если он является доминирующим в образце, взятом для исследования после прогрессирования (см. рис. 2).

Имеющиеся в настоящее время исследования свидетельствуют о том, что цоДНК может быть эффективно использована для выявления резистентных клонов опухоли, возникающих в процессе терапии. Генетическая основа развития вторичной резистентности к различным таргетным препаратам была описана при некоторых солидных опухолях [47, 48] и гемобластозах [49]. Потенциально определение в цоДНК известных мутаций, отвечающих за резистентность к таргетной терапии, может быть использовано для мониторинга в процессе лечения для своевременного изменения терапии.

Так, относительно недавно были выявлены механизмы развития приобретенной резистентности к ингибиторам тирозинкиназы эпидермального фактора роста (EGFR). Примерно у 50 % больных резистентность к препаратам из этой группы (гефитинибу и эрлотинибу) развивается за счет возникновения мутации T790M, отвечающей за синтез модифицированного варианта EGFR [29, 48]. Мутация в остатке 790 приводит к повышению аффинности EGFR к аденозинтрифосфату (АТФ), что позволяет АТФ вытеснить анти-EGFR-препараты из связи с рецептором. Эти данные изначально были получены при изучении рутинных биопсий опухолей пациентов, у которых наблюдалось прогрессирование после

ранее эффективной анти-EGFR-терапии. В последующем было показано, что данная мутация может быть успешно обнаружена в цоДНК, что явилось первым примером того, что развитие резистентности солидных опухолей к терапии может быть выявлено по анализу крови без проведения рутинной биопсии [50]. Аналогично, вторичная резистентность к моноклональным антителам против EGFR (цетуксимаб и панитумумаб) ассоциируется с развитием мутации KRAS и амплификации MET. Как показали исследования, обнаружение KRAS-мутированных вариантов среди цоДНК может предшествовать клиническому прогрессированию на месяцы. Другим открытием этих исследований явилось то, что за развитие резистентности у одного пациента могут отвечать множественные приобретенные в процессе лечения мутации, которые также могут быть выявлены при анализе цоДНК [33, 51].

Приведенные выше исследования основывались на поиске уже известных специфических мутаций, отвечающих за развитие резистентности к определенным препаратам. Весьма вероятно, что будущие исследования по использованию цоДНК для мониторинга клональной эволюции опухолей и резистентности к противоопухолевой терапии будут лишены этих недостатков и позволят проводить полноценный поиск, не ограниченный небольшим набором известных мутаций. В небольшом исследовании Murtaza et al. была показана принципиальная возможность использования цоДНК для полного секвенирования опухолевого экзона и наблюдения за его эволюцией в процессе лечения рака молочной железы, яичников и легкого [29]. Анализ цоДНК позволил оценить весь спектр генетических аберраций, имеющихся в опухолях пациентов, а также динамические изменения мутационного профиля в процессе лечения. При увеличении спектра доступных противоопухолевых препаратов с направленным механизмом действия понимание механизмов приобретенной резистентности и возможность их мониторинга «в реальном времени» могут быть использованы для упреждающего изменения терапии до развития клинически определяемого прогрессирования заболевания.

Заключение

Согласно результатам имеющихся на настоящий момент исследований, анализ цоДНК позволяет надеяться на преодоление ключевых недостатков, характерных для рутинной биопсии. Одним из принципиальных преимуществ анализа цоДНК является возможность более комплексного изучения опухоли (без поправки на внутриопухолевую гетерогенность) при сохранении высокой специфичности, практически не уступающей рутинной биопсии. Благодаря разработке новых технологий чувствительность определения цоДНК продолжает увеличиваться, что позволяет использовать этот метод у больных с неболь-

шой опухолевой массой (в том числе и для изучения МОБ). Изучение цодНК может дать прорывные результаты в понимании молекулярной гетерогенности опухолей, механизмов развития резистентности к противоопухолевой терапии и способов ее преодоления, ранней диагностики злокачественных ново-

образований и ряде других направлений современной онкологии.

Благодарности

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-35-00 105.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883–92.
2. Taniguchi K., Okami J., Kodama K. et al. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer sci* 2008;99(5):929–35.
3. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481(7381):306–13.
4. Campbell L.L., Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 2007;6(19):2332–8.
5. Desai J., Shankar S., Heinrich M.C. et al. Clonal evolution of resistance to imatinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13 (18 Pt 1):5398–405.
6. Wårdelmann E., Merkelbach-Bruse S., Pauls K. et al. Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clinical Cancer Res* 2006;12(6):1743–9.
7. Raetz E.A., Borowitz M.J., Devidas M. et al. Reinduction platform for children with first marrow relapse of acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008;26(24):3971–8.
8. Jahr S., Hentze H., Englisch S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantifications and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61(4):1659–65.
9. 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.
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. Papageorgiou E.A., Karagrigoriou A., Tsaliki E. et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med* 2011;17(4):510–3.
12. Schwarzenbach H., Miller 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.
13. Hashad D., Sorour A., Ghazal A., Talaat I. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J Clin Lab Anal* 2012;26(6):467–72.
14. 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.
15. Stroun M., Lyautey J., Lederrey C. et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001;313(1–2): 139–42.
16. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2007;14(9):985–90.
17. Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(45):16368–73.
18. Daniotti M., Vallacchi V., Rivoltini L. et al. Detection of mutated BRAFV600E variant in circulating DNA of stage III–IV melanoma patients. *Int J Cancer* 2007;120(11):2439–44.
19. Morgan S.R., Whiteley J., Donald E. et al. Comparison of KRAS mutation assessment in tumor DNA and circulating free DNA in plasma and serum samples. *Clin Med Insights Pathol* 2012;5:15–22.
20. Kimura H., Kasahara K., Kawaiishi M. et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):3915–21.
21. Punnoose E.A., Atwal S., Liu W. et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: Association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res* 2012;18(8): 2391–401.
22. Higgins M.J., Jelovac D., Barnathan E. et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res* 2012;18(12): 3462–9.
23. 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.
24. Kinde I., Wu J., Papadopoulos N. et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(23):9530–5.
25. Leary R.J., Sausen M., Kinde I. et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 2012;4(162):162ra154.
26. Chan K.C.A., Jiang P., Zheng Y.W. et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin Chemistry* 2013;59(1): 211–24.
27. McBride D.J., Orpana A.K., Sotiriou C. et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49(11):1062–9.
28. Beck J., Urnovitz H.B., Mitchell W.M., Schütz E. Next generation sequencing of serum circulating nucleic acids from patients with invasive ductal breast cancer reveals differences to healthy and nonmalignant controls. *Mol Cancer Res* 2010;8(3):335–42.
29. 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.
30. Bailey V.J., Keeley B.P., Zhang Y. et al. Enzymatic Incorporation of Multiple Dyes for Increased Sensitivity in QD–FRET Sensing for DNA Methylation Detection. *ChemBiochem* 2010;11(1):71–4.
31. Weaver K.D., Grossman S.A., Herman J.G. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma. *Cancer Invest* 2006;24(1):35–40.
32. Li M., Chen W.D., Papadopoulos N. et al. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol* 2009;27(9):858–63.
33. Diaz L.A. Jr, Williams R.T., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486(7404):537–40.
34. Dawson S.J., Rosenfeld N., Caldas C. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;368(13):1199–209.
35. Forshew T., Murtaza M., Parkinson C. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012;4(136):136ra68.

36. Li M., Diehl F., Dressman D. et al. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Met* 2006;3(2):95–7.
37. Thomas R.K., Nickerson E., Simons J.F. et al. Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimens by massively parallel picoliter reactor sequencing. *Nat Med* 2006;12(7):852–5.
38. Wahl R.L., Jacene H., Kasamon Y., Lodge M.A. From RECIST to PERCIST: evolving considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* 2009;50(Suppl 1):122S–50S.
39. Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J. et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45(2):228–47.
40. Benjamin R.S., Choi H., Macapinlac H.A. et al. We should desist using RECIST, at least in GIST. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1760–4.
41. Riedinger J.M., Wafflard J., Ricolleau G. et al. CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. *Ann Oncol* 2006;17(8):1234–8.
42. Yoshimasu T., Maebeya S., Suzuma T. et al. Disappearance curves for tumor markers after resection of intrathoracic malignancies. *Int J Biol Markers* 1998;14(2):99–105.
43. Ito K., Hibi K., Ando H. et al. Usefulness of analytical CEA doubling time and half-life time for overlooked synchronous metastases in colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32(2):54–8.
44. Shinozaki M., O'Day S.J., Kitago M. et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007;13(7):2068–74.
45. Goncalves R., Bose R. Using multigene tests to select treatment for early-stage breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11(2):174–82.
46. Mouliere F., Robert B., Arnau Peyrotte E. et al. High fragmentation characterizes tumor-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011;6(9):e23418.
47. Antonescu C.R., Besmer P., Guo T. et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 2005;11(11):4182–90.
48. 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.
49. Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003;102(1):276–83.
50. Taniguchi K., Uchida J., Nishino K. et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011;17(24):7808–15.
51. Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486(7404):532–6.