

Таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» полимеразной цепной реакции и анализа плавления ДНК

И.В. Ботезату¹, И.О. Панчук¹, А.А. Коломейцева², А.А. Феденко², Н.Н. Мазуренко¹, И.В. Цыганова¹,
О.Ю. Сусова¹, В.Н. Кондратова¹, В.П. Шелепов¹, А.В. Лихтенштейн¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²НИИ клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Цель исследования — оценка возможности применения высокочувствительного метода «обогащенной» полимеразной цепной реакции с последующим анализом плавления ДНК (DNA melting analysis) (ПЦР-DMA) для таргетной жидкостной биопсии у онкологических больных.

Материалы и методы. Метод ПЦР-DMA использовали для мутационного сканирования онкогена KRAS (кодоны 12 и 13) в опухолевой ткани и в плазме крови 20 больных колоректальным раком.

Результаты. Активированный онкоген обнаружен у 16 больных в самой опухоли и у 5 из них — в плазме крови (подтверждено секвенированием). В опухоли и плазме крови еще 2 больных при «обогащенной» ПЦР-DMA выявлено присутствие мутантных аллелей, но в крайне низкой концентрации, не позволявшей их идентифицировать методом Сэнгера. Таким образом, таргетная жидкостная биопсия в предлагаемом варианте оказалась успешной у 7 (~35 %) из 20 исследованных больных. С учетом того факта, что анализ плазмы крови пациентов проводили после многократных лечебных процедур, вызывающих массовую гибель опухолевых клеток, реальная эффективность данного метода может оказаться существенно выше.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, сканирование мутаций, плавление ДНК, KRAS

Для цитирования: Ботезату И.В., Панчук И.О., Коломейцева А.А. и др. Таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» полимеразной цепной реакции и анализа плавления ДНК. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):35–42.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-35-42

Target liquid biopsy using “enriched” polymerase chain reaction and DNA melting analysis

I.V. Botezatu¹, I.O. Panchuk¹, A.A. Kolomeytseva², A.A. Fedenko², N.N. Mazurenko¹, I.V. Tsyganova¹, O. Yu. Susova¹,
V.N. Kondratova¹, V.P. Shelepov¹, A.V. Lichtenstein¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Objective: to evaluate the possibility of using a highly sensitive method of “enriched” polymerase chain reaction followed by DNA melting analysis (PCR-DMA) for target liquid biopsy of cancer patients.

Materials and methods. The “enriched” PCR-DMA was used for mutation scanning of KRAS (codons 12 and 13) in tumor and blood plasma of 20 patients with colorectal cancer.

Results. Activated oncogene was found in tumor tissue of 16 patients and in blood plasma of 5 patients (confirmed by sequencing). Mutant KRAS alleles were also found in tumor and plasma of another 2 patients, but in very low concentrations that did not allow their validation by Sanger sequencing. Thus, in our study the target liquid biopsy was successful in ~35 % patients. Since the plasma tests were carried out after repeated medical procedures causing mass death of tumor cells, the actual efficiency of this approach may appear significantly higher.

Key words: liquid biopsy, mutation scanning, DNA melting analysis, KRAS

For citation: Botezatu I.V., Panchuk I.O., Kolomeytseva A.A. et al. Target liquid biopsy using “enriched” polymerase chain reaction and DNA melting analysis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):35–42.

Введение

Успехи клеточной и молекулярной биологии последнего времени имели следствием появление так называемой трансляционной медицины, призванной внедрять фундаментальные открытия в клиническую практику [1–11]. Одним из ее наиболее активно развиваемых направлений является жидкостная биопсия – обнаружение в биологических жидкостях организма (преимущественно в плазме крови) генетических маркеров опухолевого роста (мутантных и aberrантно метилированных ДНК, специфических РНК и микроРНК). Таким способом удается прогнозировать течение заболевания (в частности, появление рецидивов и метастазов), осуществлять мониторинг роста опухоли, определять тактику индивидуализированного лечения и оценивать его эффективность. Кроме того, жидкостная биопсия позволяет в ряде случаев следить за клональной эволюцией опухоли и соответственно корректировать лечение.

Для выявления мутантных генов применяют 2 метода, каждый из которых существует в разных вариантах: массовое параллельное секвенирование [1–10] и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [12–16]. Первый метод, требующий высокотехнологичного оборудования и биоинформационных ресурсов, востребован в активно проводимых сегодня и далеких от завершения фундаментальных исследованиях мутагенеза во множестве образцов рака одного определенного типа. Так идентифицируют «ядерный» набор мутаций, присутствующих данному типу опухоли и ее клеточным клонам. Это важно как теоретически (для выяснения механизмов канцерогенеза), так и практически (для генодиагностики рака).

Второй метод, быстрый и экономный, используется для таргетного выявления в опухоли конкретного больного какой-либо из уже охарактеризованных мутаций, на присутствие которой клиницист должен оперативно реагировать [16]. В этой ситуации приоритетными становятся реализуемость метода в условиях клинической лаборатории, его простота и производительность. Но все же главной характеристикой, определяющей возможность применения метода для жидкостной биопсии, считается его чувствительность (предел обнаружения мутантных аллелей). Дело в том, что циркулирующие в крови внеклеточные «опухолевые» ДНК, являясь многообещающими диагностическими и прогностическими маркерами, крайне трудны для анализа: их концентрация в плазме крови низка и варьирует в широких пределах (в среднем 5–20 нг/мл) [17, 18], они сильно фрагментированы и, кроме того, разбавлены большим избытком ДНК дикого типа.

В наибольшей степени удовлетворяет условиям клинического применения метод DMA (DNA melting analysis, анализ плавления ДНК) [19, 20]. Ранее мы показали, что флуоресцентные зонды TaqMan в дополнение к уже известным их функциям (мониторингу в реальном времени ПЦР и плавления ДНК) также мо-

гут служить блокирующими агентами, избирательно подавляющими амплификацию аллелей дикого типа. Основанный на этом наблюдении протокол «обогащенной» ПЦР-DMA обеспечивает значительное повышение чувствительности мутационного сканирования генов *NRAS* и *BRAF* [21]. Достигнутый уровень чувствительности этого подхода позволял надеяться на его применимость в качестве экспресс-метода жидкостной биопсии. Для выяснения этой принципиальной возможности мы избрали в качестве объекта исследования ген *KRAS* (кодоны 12 и 13), являющийся одним из наиболее значимых онкомаркеров [22–26].

Материалы и методы

Клинические образцы. Образцы крови и опухолевой ткани 20 больных раком толстой кишки (стадии Т3 и Т4) были получены в отделении химиотерапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Средний возраст больных составил 58 лет (31–84 года).

Выделение ДНК из формализированной ткани, заключенной в парафиновые блоки, проводили посредством депротенинизации протеиназой К опухолевых клеток после макродиссекции депарафинизированных срезов, как описано ранее [23].

Выделение ДНК из плазмы крови. Венозную кровь (5 мл) собирали в пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Плазму крови отделяли центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 мин при 1000g и повторно – в течение 10 мин при 16 000g (аликвоты хранили при температуре –60 °С). Плазму крови (1 мл) инкубировали в течение ночи при температуре 50 °С в присутствии 500 мкг/мл протеиназы К и 1 % саркозила в 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ ЭДТА (конечные концентрации), после чего депротенинизировали фенолом и хлороформом до исчезновения интерфазы. ДНК концентрировали преципитацией этанолом в присутствии гликогена (20 мкг/мл) и растворяли в 50 мкл буфера TE. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, США).

Секвенирование обеих нитей ампликона осуществляли методом Сэнгера (Синтол, Россия).

Праймеры и зонды. Термодинамические расчеты T_m праймеров и зондов ампликона K2 размером 116 пар оснований (п. о.) гена *KRAS* (Genbank Acc.No.: NG_007524.1) проводили с помощью программы MeltCalc [27], а их последовательности определяли с использованием программы Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corp., США) (табл. 1). Схема ампликона K2-116 представлена на рис. 1. Зонды TaqMan «сдвинуты» друг относительно друга (перекрывание – 12 п. о.) для того, чтобы их взаимодействие не препятствовало гибридизации с однонитевыми ампликонами.

Асимметричная ПЦР-DMA (стандартные условия) [19, 20]. Образцы ДНК анализировали в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories,

США) [20, 28]. Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl (рН 8,8); 50 мМ КСl; 0,01 % Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого из дезокси-нуклеозидтрифосфатов; прямой и обратный праймеры в соотношении 1:10 или 10:1 (т. е. 0,04 мкМ/0,4 мкМ или 0,4 мкМ/0,04 мкМ) в зависимости от необходимости синтезировать антисмысловую или смысловую нить ампликона соответственно; 0,2 мкМ соответствующего зонда TaqMan; 1,25 единицы Hot-rescue Taq-полимеразы (Синтол, Россия); 5 мкл раствора ДНК в воде. На реакцию смесь наслаивали 2 капли минерального масла. Условия ПЦР: начальная денатурация – 5 мин при температуре 95 °С, затем 55 циклов – 13 с при 95 °С, 15 с при 57 °С и 20 с при 72 °С (флуоресценцию регистрировали при температуре 72 °С). После завершения ПЦР ее продукты прогревали в течение 1 мин при 95 °С, 2 мин при 55 °С, после чего повышали температуру от 55 до 85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 6 с). Данные анализировали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager (version 1.6), в ряде случаев их экспортировали в Microsoft Excel, пики плавления нормализовали по отношению к их максимальному значению, принятому за 100 %.

Асимметричная «обогащенная» ПЦР-DMA (субоптимальные условия) [21]. Образцы ДНК анализировали в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США), как описано ранее [21], с некоторыми модификациями. Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl (рН 8,8); 50 мМ КСl; 0,01 % Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждого из дезокси-нуклеозидтрифосфатов; 0,2 × EvaGreen (Biotium, США); прямой и обратный праймеры в соотношении 1:15 или 15:1 (т. е. 0,027 мкМ/0,4 мкМ или 0,4 мкМ/0,027 мкМ); по 0,36 мкМ зондов K2-ROX(25)s и K2-Cy5(25)as; 0,63 и 0,44 единицы Hot-rescue Taq-полимеразы (Синтол, Россия) для синтеза антисмысловой и смысловой нитей ампликона соответственно; 5 мкл раствора ДНК в воде. На реакцию смесь наслаивали 2 капли минерального масла. Условия ПЦР: начальная денатурация – 5 мин при температуре 95 °С, затем 80–100 циклов – 13 с при 95 °С, 1 с при 57 °С с регистрацией флуоресценции. После завершения ПЦР ее продукты прогревали в течение 1 мин при 95 °С, затем 2 мин при 55 °С, после чего повышали температуру от 55 до 85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 6 с). В ходе асимметричной «обогащенной» ПЦР оба присутствующих в инкубаци-

онной среде зонда TaqMan функционируют как индикаторы ампликации в реальном времени и как блокирующие агенты, тогда как в постамплификационном плавлении ДНК участвует только один из них, комплементарный односторонней (избыточной) ДНК.

Таблица 1. Праймеры и зонды ампликона K2 размером 116 пар оснований гена KRAS

Table 1. Primers and probes of 116 base pair K2 amplicon of the KRAS gene

Ампликон K2 (кодоны 12, 13) K2 amplicon (codons 12, 13)	Последовательность Sequence
Праймер: Primer:	
прямой forward	5'-aggcctgctgaaaatgactg
обратный reverse	5'-ttggatcatattctgccaca
Зонд (sense, antisense): Probe (sense, antisense):	
K2-ROX(25)s	5'-ROX-cttggttagtgagctggtggcg-BHQ2
K2-Cy5(25)as	5'-Cy5-aaggcactcttgctacgccaccag-BHQ2

Результаты и обсуждение

Сопоставление стандартной и «обогащенной» ПЦР-DMA. За амплификацией в реальном времени следят, как правило, с помощью флуоресцентных зондов TaqMan, расщепляемых 5'-эксонуклеазной активностью Taq-полимеразы (это ведет к пространственному разобщению флуорофора и гасителя и росту флуоресценции, сопряженному с накоплением продукта). Устранение полимеразой лежащего на ее пути препятствия (в виде гибризованного с матрицей зонда) сопряжено со снижением синтетической активности этого фермента [29]. Данное обстоятельство использовано нами для преимущественной ампликации мутантного аллеля (из-за неспаренных оснований его гибрид с зондом менее стабилен, чем гибрид аллеля дикого типа). В стандартных (оптимальных) условиях ПЦР незначительные различия в стабильности комплексов зонд/аллель не оказывают заметного влияния на ход реакции, однако в специально подобранных субоптимальных условиях (снижение концентрации фермента и температуры отжига, присутствие в инкубационной

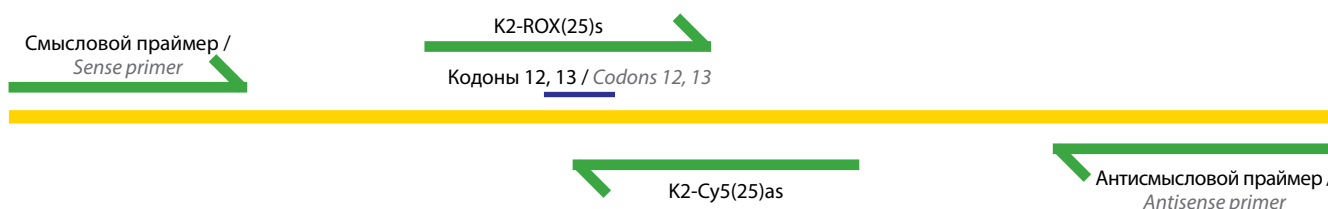


Рис. 1. Схема ампликона K2-116 (название произведено от гена KRAS, номера экзона и размера ампликона, п. о.). Стрелками указаны расположение и ориентация праймеров и зондов TaqMan, а также анализируемый «горячий» участок (кодоны 12 и 13)

Fig. 1. Amplicon K2-116 diagram (the name was derived from the KRAS gene, exon number, and amplicon size, bp). Arrows show locations and orientation of TaqMan primers and probes as well as the analyzed “hot” fragment (codons 12 and 13)

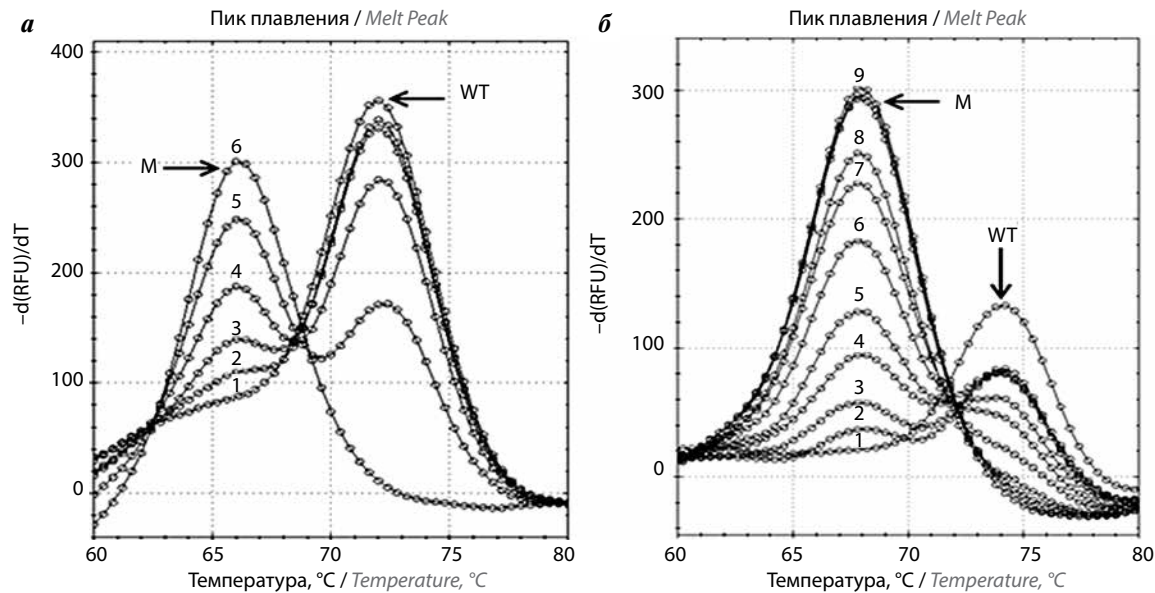


Рис. 2. Сравнение чувствительности определения мутантных аллелей *KRAS*. ДНК клеток SW480 (мутация *KRAS* – GGT12GTT) подвергли серийным разведениям в интактной ДНК (пики плавления аллелей дикого типа (WT) и мутантных (M) обозначены стрелками): а – стандартная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим анализом плавления ДНК (DNA melting analysis, DMA); кривые плавления образцов ДНК с разным содержанием мутантного аллеля: 1 – 0 %, 2 – 6 %, 3 – 12 %, 4 – 25 %, 5 – 50 %, 6 – 100 %; б – «обогащенная» ПЦР-DMA; кривые плавления образцов ДНК с разным содержанием мутантного аллеля: 1 – 0 %, 2 – 0,2 %, 3 – 0,4 %, 4 – 0,8 %, 5 – 1,6 %, 6 – 3,0 %, 7 – 6,0 %, 8 – 12,0 %, 9 – 25–100 %. Пределы обнаружения мутантных аллелей *KRAS* стандартной и «обогащенной» ПЦР-DMA составляют ~6 и 0,2–0,4 % соответственно. $-d(RFU)/dT$ – отрицательная первая производная изменений флуоресценции по температуре

Fig. 2. Sensitivity comparison for detection of mutant *KRAS* alleles. SW480 cell DNA (*KRAS* mutation GGT12GTT) were serially diluted in intact DNA (arrows show melting peaks for wild type (WT) and mutant (M) alleles): a – standard polymerase chain reaction (PCR) with subsequent DNA melting analysis (DMA); melting curves for DNA samples with different content of the mutant allele: 1 – 0 %, 2 – 6 %, 3 – 12 %, 4 – 25 %, 5 – 50 %, 6 – 100 %; б – «enriched» PCR-DMA; melting curves for DNA samples with different content of the mutant allele: 1 – 0 %, 2 – 0,2 %, 3 – 0,4 %, 4 – 0,8 %, 5 – 1,6 %, 6 – 3,0 %, 7 – 6,0 %, 8 – 12,0 %, 9 – 25–100 %. Detection limits for mutant *KRAS* alleles in standard and «enriched» PCR-DMA are ~6 and 0.2–0.4 % respectively. $-d(RFU)/dT$ – negative first derivative of fluorescence changes with respect to temperature

среде обоих зондов, укороченные циклы амплификации) эти различия становятся существенными, что позволяет дискриминировать интактные и мутантные аллели. Разработанный на этой основе прием «обогащения» значительно повышает чувствительность мутационного сканирования генов *BRAF* и *NRAS*, как показано нами ранее [21].

В данном исследовании «обогащенную» ПЦР-DMA применили для мутационного сканирования *KRAS*. В опытах серийных разведений мутантной ДНК клеток SW480 (мутация *KRAS* – GGT12GTT) [30] в ДНК дикого типа была подтверждена на порядок более высокая по сравнению со стандартной процедурой чувствительность данного подхода (предел обнаружения мутантных аллелей 3–6 и 0,2–0,5 % соответственно) (рис. 2).

Выявление мутантного *KRAS* в опухолевой ткани и плазме крови. Для анализа использовали образцы ДНК из опухолевой ткани (парафиновые блоки) и плазмы крови 20 больных колоректальным раком. Поскольку целью работы было выяснение, достаточно ли в принципе чувствительность DMA для жидкостной биопсии, в группу исследованных больных вошли лица с распространенными опухолями, в которых присутствие мутантного *KRAS* было наиболее вероятно (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика больных (n = 20)

Table 2. Patient characteristics (n = 20)

Показатель Characteristic	n
Пол: Sex:	
мужской male	8
женский female	12
Стадия заболевания: Disease stage:	
T1s	1
T3	10
T4	8
не идентифицирована not identified	1
Локализация опухоли: Tumor localization:	
слепая кишка cecum	1
сигмовидная кишка sigmoid colon	3
ободочная кишка colon	9
прямая кишка rectum	7

Таблица 3. Выявление мутаций в ДНК опухолевой ткани и плазмы крови

Table 3. Identification of mutations in tumor and plasma DNA

№ больного Patient No.	Локализация опухоли Tumor localization	Стадия заболевания Disease stage	ДНК опухоли Tumor DNA		ДНК плазмы крови Plasma DNA	
			Стандартная ПЦР-DMA Standard PCR-DMA	«Обогащенная» ПЦР-DMA “Enriched” PCR-DMA	Стандартная ПЦР-DMA Standard PCR-DMA	«Обогащенная» ПЦР-DMA “Enriched” PCR-DMA
1	Сигмовидная кишка Sigmoid colon	T4N2M1	WT	GGC13AGC	WT	WT
2	Прямая кишка Rectum	T3N2M0	WT	GGC13GAC	WT	WT
3	Прямая кишка Rectum	T4NxM1	WT	GGC13AGC	WT	WT
4	Сигмовидная кишка Sigmoid colon	T4N1M0	WT	GGC13AGC	WT	WT
5	Прямая кишка Rectum	T4N2M0	WT	GGC13GAC	WT	WT
6	Ободочная кишка Colon	T4N1M1	GGC13CGC	GGC13CGC	GGC13CGC	GGC13CGC
7	Прямая кишка Rectum	T3N2M0	GGT12GCT	GGT12GCT	WT	GGT12GCT
8	Ободочная кишка Colon	T4N1M1	WT	WT	WT	WT
9	Ободочная кишка Colon	T3N1M1	GGT12TGT	GGT12TGT	WT	WT
10	Ободочная кишка Colon	T4N0M1	WT	GGC13GAC	WT	WT
11	Ободочная кишка Colon	T3N0M0	WT	GGC13AGC	WT	WT
12	Ободочная кишка Colon	T3NxM1	WT	?	WT	?
13	Ободочная кишка Colon	TXNxM1	WT	WT	WT	WT
14	Прямая кишка Rectum	T4N2M1	WT	GGC13AGC	WT	WT
15	Ободочная кишка Colon	T3N0M0	GGT12GAT	GGT12GAT	WT	WT
16	Ободочная кишка Colon	T3N2M1	WT	?	WT	?
17	Прямая кишка Rectum	T3NxM1	WT	GGC13AGC	WT	WT
18	Слепая кишка Cecum	T3N1M1	GGC13GAC	GGC13GAC	?	GGC13GAC
19	Сигмовидная кишка Sigmoid colon	TisN0M0	GGT12GAT	GGT12GAT	WT	GGT12GAT
20	Прямая кишка Rectum	T3NxM0	GGT12GAT	GGT12GAT	GGT12GAT	GGT12GAT

Примечание. ПЦР-DMA – полимеразная цепная реакция с последующим анализом плавления ДНК (DNA melting analysis); WT (wild type) – дикий тип; GGC13AGC и др. – тип мутации (в данном случае замена G → A в кодоне 13); ? – мутация, выявленная методом плавления ДНК, но не идентифицированная при последующем секвенировании (вследствие недостаточной чувствительности метода секвенирования по Сэнгеру).

Note. PCR-DMA – polymerase chain reaction with subsequent DNA melting analysis; WT – wild type; GGC13AGC et al. – mutation type (here, G → A substitution in codon 13); ? – mutation detected by DNA melting analysis but not identified in subsequent sequencing (due to insufficient sensitivity of Sanger sequencing).

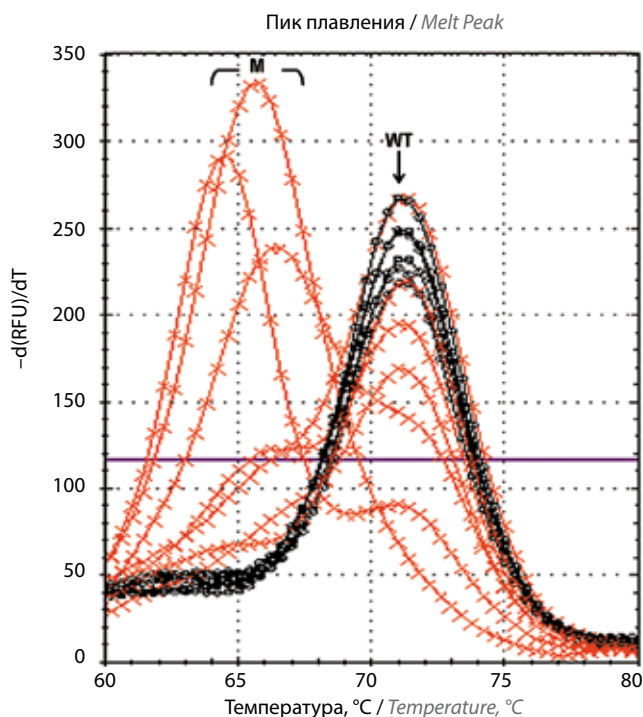


Рис. 3. «Обогащенная» полимеразная цепная реакция с последующим анализом плавления ДНК (DNA melting analysis) образцов ДНК плазмы крови больных колоректальным раком. Образцы ДНК дикого типа (WT) и содержащие мутантные (M) аллели обозначены стрелками. $-d(RFU)/dT$ – отрицательная первая производная изменений флуоресценции по температуре

Fig. 3. “Enriched” polymerase chain reaction with subsequent DNA melting analysis of plasma DNA samples from patient with colorectal cancer. Arrows indicate wild type (WT) DNA samples and mutant (M) alleles. $-d(RFU)/dT$ – negative first derivative of fluorescence changes with respect to temperature

При сравнительном использовании стандартной и «обогащенной» ПЦР-DMA активированный онкоген был обнаружен в ДНК опухолевой ткани соответственно у 7 и 16 больных (табл. 3). Во всех случаях присутствие мутаций подтверждено последующим секвенированием в 2 направлениях методом Сэнгера. Еще у 2 больных «обогащенная» ПЦР-DMA выявила присутствие мутантных аллелей, но в столь низкой концентрации, что чувствительности секвенирования

оказалось недостаточно для их идентификации (предел обнаружения мутантных аллелей секвенированием по Сэнгеру составляет 15–20 %). Обращает на себя внимание тот факт, что в исследованной группе больных необычно высока частота (в 11 из 16 случаев) мутаций *KRAS* в кодоне 13. Это, возможно, объясняется небольшой выборкой больных и случайной флуктуацией (обычно эти мутации составляют ~10 % общего их числа [22, 23]).

Мутантные последовательности *KRAS* обнаружены методом «обогащенной» ПЦР-DMA в плазме крови 5 больных (в упомянутых 2 сомнительных случаях есть основания подозревать мутантный аллель как в самой опухоли, так и в плазме крови, но идентифицировать их методом Сэнгера оказалось технически невозможным). Мутации *KRAS* в опухоли и плазме были неизменно идентичны во всех случаях, когда секвенирование позволяло их сопоставить. На рис. 3 представлены результаты анализа образцов циркулирующей ДНК больных колоректальным раком (соотношение величин пиков плавления дает представление о доле клона мутантных клеток в исследованном клиническом материале). В целом представленные результаты свидетельствуют об адекватности примененного нами подхода поставленной задаче.

Заключение

Таким образом, таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» ПЦР и последующего анализа плавления ДНК оказалась успешной у ~35 % исследованных нами больных. С учетом того факта, что анализ плазмы крови пациентов проводили, как правило, после неоднократных лечебных процедур (хирургического вмешательства и циклов химиотерапии), приводящих к элиминации основной массы опухолевых клеток, реальная эффективность данного метода может оказаться значительно выше (необходимо заметить, что временной интервал между взятием образцов опухолевой ткани и крови составлял от нескольких недель до многих месяцев). Планируемое нами наблюдение больных на протяжении длительного времени позволит оценить прогностический и диагностический потенциал нашего подхода.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Adalsteinsson V.A., Ha G., Freeman S.S. et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat Commun* 2017;8(1):1324. DOI: 10.1038/s41467-017-00965-y. PMID: 29109393.
2. Chaudhuri A.A., Chabon J.J., Lovejoy A.F. et al. Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Discov* 2017;7(12):1394–403. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0716. PMID: 28899864.
3. Comino-Mendez I., Turner N. Predicting relapse with circulating tumor DNA analysis in lung cancer. *Cancer Discov* 2017;7(12):1368–70. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-1086. PMID: 29208774.
4. Goodall J., Mateo J., Yuan W. et al. Circulating cell-free DNA to guide prostate cancer treatment with PARP inhibition. *Cancer Discov* 2017;7(9):1006–17. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0261. PMID: 28450425.
5. Kato S., Krishnamurthy N., Banks K.C. et al. Utility of genomic analysis in circulating tumor DNA from patients with carcinoma of unknown primary. *Cancer Res* 2017;77(16):4238–46. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0628. PMID: 28642281.
6. Kis O., Kaedbey R., Chow S. et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone

- marrow aspirates. *Nat Commun* 2017;8:15086. DOI: 10.1038/ncomms15086. PMID: 28492226.
7. Quigley D., Alumkal J.J., Wyatt A.W. et al. Analysis of circulating cell-free DNA identifies multiclonal heterogeneity of BRCA2 reversion mutations associated with resistance to PARP inhibitors. *Cancer Discov* 2017;7:999–1005. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0146. PMID: 28450426.
 8. Wan J.C.M., Massie C., Garcia-Corbacho J. et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17(4):223–38. DOI: 10.1038/nrc.2017.7. PMID: 28233803.
 9. Tie J., Wang Y., Tomasetti C. et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8(346):346ra92. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6219. PMID: 27384348.
 10. Narayan A., Carriero N.J., Gettinger S.N. et al. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer Res* 2012;72(14):3492–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4037. PMID: 22581825.
 11. Ponomaryova A.A., Cherdynseva N.V., Bondar A.A. et al. Dynamics of line-1 retrotransposon methylation levels in circulating DNA from lung cancer patients undergoing antitumor therapy. *Mol Biol (Mosk)* 2017;51(4):622–8. DOI: 10.7868/S0026898417040140. PMID: 28900080.
 12. Garcia-Fernandez N., Macher H.C., Rubio A. et al. Detection of p53 mutations in circulating DNA of transplanted hepatocellular carcinoma patients as a biomarker of tumor recurrence. *Adv Exp Med Biol* 2016;924:25–8. DOI: 10.1007/978-3-319-42044-8_5. PMID: 27753013.
 13. Gonzalez-Cao M., Mayo-de-Las-Casas C., Molina-Vila M.A. et al. BRAF mutation analysis in circulating free tumor DNA of melanoma patients treated with BRAF inhibitors. *Melanoma Res* 2015;25(6):486–95. DOI: 10.1097/CMR.000000000000187. PMID: 26366702.
 14. Karachaliou N., Mayo-de las Casas C., Queralt C. et al. Association of EGFR L858R mutation in circulating free DNA with survival in the EURTAC trial. *JAMA Oncol* 2015;1(2):149–57. DOI: 10.1001/jamaoncol.2014.257. PMID: 26181014.
 15. Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S. et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014;20(4):430–5. DOI: 10.1038/nm.3511. PMID: 24658074.
 16. Thierry A.R. A targeted Q-PCR-based method for point mutation testing by analyzing circulating DNA for cancer management care. *Methods Mol Biol* 2016;1392:1–16. DOI: 10.1007/978-1-4939-3360-0_1. PMID: 26843041.
 17. Xu R.H., Wei W., Krawczyk M. et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater* 2017;16(11):1155–61. DOI: 10.1038/nmat4997. PMID: 29035356.
 18. Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Current methods of extracellular DNA methylation analysis. *Mol Biol (Mosk)* 2017;51(2):195–214. DOI: 10.7868/S0026898417010074. PMID: 28537228.
 19. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One* 2011;6(4):e19206. DOI: 10.1371/journal.pone.0019206. PMID: 21552536.
 20. Ботезату И.В., Панчук И.О., Строганова А.М. и др. Высокочувствительное сканирование генных мутаций: зонды TaqMan как блокирующие агенты. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(2):42–9. [Botezatu I.V., Panchuk I.O., Stroganova A.M. et al. Highly sensitive scanning of gene mutations: TaqMan probes as blocking agents. *Uspehi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(2):42–9. (In Russ.)].
 21. Botezatu I.V., Panchuk I.O., Stroganova A.M. et al. TaqMan probes as blocking agents for enriched PCR amplification and DNA melting analysis of mutant genes. *Biotechniques* 2017;62(2):62–8. DOI: 10.2144/000114515. PMID: 28193149.
 22. Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012;72:2457–67. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612. PMID: 22589270.
 23. Mazurenko N.N., Gagarin I.M., Tsyganova I.V. et al. The frequency and spectrum of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer. *Vopr Onkol* 2013;59(6):751–5. PMID: 24624786.
 24. Mouliere F., El Messaoudi S., Gongora C. et al. Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load. *Transl Oncol* 2013;6(3):319–28. PMID: 23730412.
 25. Mouliere F., El Messaoudi S., Pang D. et al. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol* 2014;8(5):927–41. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.02.005. PMID: 24698732.
 26. El Messaoudi S., Mouliere F., Du M.S. et al. Circulating DNA as a strong multi-marker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):3067–77. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0297. PMID: 26847055.
 27. Schutz E., von Ahnen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 1999;27(6):1218–22, 1224. PMID: 10631501.
 28. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Asymmetric real-time PCR and multiplex melting curve analysis with TaqMan probes for detecting PIK3CA mutations. *Data Brief* 2015;5:913–7. DOI: 10.1016/j.dib.2015.10.046. PMID: 26702420.
 29. Montgomery J.L., Rejali N., Wittwer C.T. The influence of nucleotide sequence and temperature on the activity of thermostable DNA polymerases. *J Mol Diagn* 2014;16(3):305–13. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2014.01.006. PMID: 24607271.
 30. Capon D.J., Seeburg P.H., McGrath J.P. et al. Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 1983;304(5926):507–13. PMID: 6308467.

Вклад авторов

И.В. Ботезату, И.О. Панчук, В.Н. Кондратова: эксперименты мутационного сканирования;
 А.А. Коломейцева, А.А. Феденко: получение и анализ клинических данных;
 Н.Н. Мазуренко, О.Ю. Сусова: анализ полученных данных;
 И.В. Цыганова: получение данных для анализа;
 В.П. Шелепов: обзор публикаций по теме статьи;
 А.В. Лихтенштейн: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи.

Authors' contributions

I.V. Botezatu, I.O. Panchuk, V.N. Kondratova: mutant scanning experiments;
A.A. Kolomeytseva, A.A. Fedenko: clinical data acquisition and analysis;
N.N. Mazurenko, O.Yu. Susova: analysis of the obtained data;
I.V. Tsyganova: obtaining data for analysis;
V.P. Shelepov: reviewing of publications of the article's theme;
A.V. Lichtenstein: developing the research design, article writing.

ORCID авторов

И.В. Ботезату: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
И.О. Панчук: <https://orcid.org/0000-0002-1323-8638>
А.А. Коломейцева: <https://orcid.org/0000-0002-6762-9511>
А.А. Феденко: <https://orcid.org/0000-0003-4927-5585>
В.Н. Кондратова: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>
В.П. Шелепов: <https://orcid.org/0000-0002-9837-7273>
А.В. Лихтенштейн: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>

ORCID of authors

I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
I.O. Panchuk: <https://orcid.org/0000-0002-1323-8638>
A.A. Kolomeytseva: <https://orcid.org/0000-0002-6762-9511>
A.A. Fedenko: <https://orcid.org/0000-0003-4927-5585>
V.N. Kondratova: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>
V.P. Shelepov: <https://orcid.org/0000-0002-9837-7273>
A.V. Lichtenstein: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 12.02.2018. **Принята к публикации:** 15.02.2018.

Article received: 12.02.2018. **Accepted for publication:** 15.02.2018.