

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-24-37



# Методы детекции специфических для опухолевой ткани однонуклеотидных соматических мутаций в препаратах цДНК из плазмы крови

Л. М. Дьяков<sup>1</sup>, О. М. Кривцова<sup>1</sup>, П. А. Хесина<sup>1,2</sup>, И. Ф. Кустова<sup>1</sup>, Н. А. Дьякова<sup>1</sup>, Н. С. Мюге<sup>3,4</sup>, Н. Е. Кудашкин<sup>1</sup>, Ю. И. Патютко<sup>1</sup>, Н. Л. Лазаревич<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»; Россия, 105187 Москва, Окружной проезд, 19;

<sup>4</sup>ФГБУН «Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова Российской академии наук»; Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

**Контакты:** Наталия Леонидовна Лазаревич [lazarevich.nl@gmail.com](mailto:lazarevich.nl@gmail.com)

**Введение.** Жидкостная биопсия рассматривается как малоинвазивный способ проведения молекулярно-генетического анализа, который может быть использован для ранней диагностики, прогноза течения заболевания, мониторинга остаточной болезни или результатов лечения, а также выбора оптимальных для пациента схем лекарственной терапии. Наряду с разработкой тестов, основанных на исследовании панелей онкологически значимых генов или их участков, для различных форм генетически гетерогенных опухолей перспективным подходом может стать использование в качестве объекта жидкостной биопсии индивидуального спектра соматических мутаций конкретного больного, которые могут быть выявлены с помощью высокопроизводительного секвенирования опухолевой ткани.

**Цель исследования** – определить возможность использования различных методов детекции однонуклеотидных соматических мутаций, выявленных в опухолевой ткани конкретного пациента, в препаратах циркулирующей ДНК (цДНК) из плазмы крови, полученных до хирургического удаления опухоли, и выявить возможность количественной оценки доли альтернативного варианта в общем пуле цДНК.

**Материалы и методы.** В работе использованы препараты нормальной и опухолевой тканей, плазмы крови пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, а также различные методы детекции однонуклеотидных соматических мутаций: полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени с интеркалирующим красителем или с зондами TaqMan, капельная цифровая ПЦР и высокопроизводительное секвенирование целевых ампликонов.

**Результаты.** На примере соматической мутации в гене *TLN1*, выявленной в опухолевой ткани пациента с гепатоцеллюлярной карциномой, разработаны и апробированы методы, каждый из которых позволяет специфично детектировать мутантный вариант в малых количествах (2 нг) цДНК из плазмы крови того же пациента. Использование капельной ПЦР и секвенирования целевых ампликонов позволило провести количественную оценку долей мутантного варианта в общем пуле цДНК, которые составили 19,7 и 23,5 % соответственно.

**Заключение.** Капельная цифровая ПЦР и целевое секвенирование ампликонов позволяют не только надежно детектировать мутантные варианты в малых количествах цДНК, но и адекватно проводить их количественную оценку, что особенно важно для разработки способов мониторинга опухолевого роста в процессе лечения. Близкие значения доли мутантного варианта в цДНК, детектированной этими методами, свидетельствуют о точности количественного анализа и возможности их использования для кросс-валидации получаемых результатов.

**Ключевые слова:** гепатоцеллюлярная карцинома, циркулирующая ДНК, соматические мутации, жидкостная биопсия

**Для цитирования:** Дьяков Л. М., Кривцова О. М., Хесина П. А. и др. Методы детекции специфических для опухолевой ткани однонуклеотидных соматических мутаций в препаратах цДНК из плазмы крови. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(3):24–37. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-24-37

## Methods for the detection of tumor-specific single nucleotide somatic mutations in plasma cDNA samples

L. M. Dyakov<sup>1</sup>, O. M. Krivtsova<sup>1</sup>, P. A. Khesina<sup>1,2</sup>, I. F. Kustova<sup>1</sup>, N. A. Dyakova<sup>1</sup>, N. S. Muge<sup>3,4</sup>, N. E. Kudashkin<sup>1</sup>, Yu. I. Patyutko<sup>1</sup>, N. L. Lazarevich<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia;*

<sup>2</sup>*biological faculty of the M.V. Lomonosov Moscow State University; Bld. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;*

<sup>3</sup>*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography; 19 Okruzhnoy proezd, Moscow 105187, Russia;*

<sup>4</sup>*N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences; 26 Vavilova St., Moscow 119334, Russia*

**Contacts:** Natalia Leonidovna Lazarevich [lazarevich.nl@gmail.com](mailto:lazarevich.nl@gmail.com)

**Introduction.** Liquid biopsy is considered as a minimally invasive method of molecular genetic analysis that can be used for early diagnosis, prognosis of disease development, monitoring of residual disease or treatment outcomes, and selection of optimal drug therapy schemes for a patient. Along with the development of tests based on the study of panels of oncologically significant genes or their regions, for various forms of genetically heterogeneous tumors a promising approach could be the use as an object of liquid biopsy of an individual spectrum of somatic mutations of a particular patient that can be detected on the basis of high-throughput sequencing of tumor tissue.

**Aim.** To determine the applicability of different methods for detecting single-nucleotide somatic mutations detected in tumor tissue of a particular patient in cDNA preparations from blood plasma obtained before surgical removal of the tumor and to evaluate the possibility of quantifying the proportion of the alternative variant in the total pool of cDNA.

**Materials and methods.** We used normal and tumor tissue, as well as blood plasma samples from patients with hepatocellular carcinoma, and various methods for detecting single-nucleotide somatic mutations: real-time polymerase chain reaction (PCR) with intercalating dye or with TaqMan probes, droplet digital PCR and high-throughput sequencing of target amplicons.

**Results.** Using the example of a somatic mutation in the *TLN1* gene detected in tumor tissue of a patient with hepatocellular carcinoma, methods were developed and tested, each of which allows specific detection of the mutant variant in small amounts (2 ng) of cDNA from the blood plasma of the same patient. The use of droplet PCR and target amplicon sequencing methods allowed us to quantify the proportion of the mutant variant in the total cDNA pool, which was 19.7 and 23.5 %, respectively.

**Conclusion.** Among the methods investigated, droplet digital PCR and targeted amplicon sequencing allow not only reliable detection of mutant variants in small amounts of cDNA, but also adequate quantification, which is particularly important for the development of ways to monitor tumor growth during treatment. The close values of the proportion of mutant variants in cDNA detected by these methods indicate the accuracy of quantitative analysis and the possibility of their use for cross-validation of the results obtained.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma, circulating DNA, somatic mutations, liquid biopsy

**For citation:** Dyakov L.M., Krivtsova O.M., Hesina P.A. et al. Methods for the detection of tumor-specific single nucleotide somatic mutations in plasma cDNA samples. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):24–37. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-24-37

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время жидкостная биопсия рассматривается как перспективный способ проведения малоинвазивного молекулярно-генетического анализа, который может быть использован для ранней диагностики, прогноза течения заболевания, мониторинга остаточной болезни или результатов лечения, а также для выбора оптимальных для пациента схем лекарственной терапии [1–3]. Наиболее значимых успехов в этом направлении удалось достичь с помощью использования методов, направленных на выявление в крови и других жидкостях организма циркулирующих ДНК (цДНК), которые образуются в результате программируемой/некротической гибели нормальных или опухолевых клеток или направленно секретируются клетками. К несомненным преимуществам этого подхода относятся возможность неинвазивного получения материала для анализа и динамического наблюдения, обеспечиваемая ограниченным сроком жизни макромолекул в биологических жидкостях, а также «сглаживание» эффекта внутриопухолевой гетерогенности и различий в профиле генетических нарушений между разными участками опухоли за счет тестирования общего пула исследуемых маркеров в кровотоке.

За последние годы перспективность использования методов жидкостной биопсии для детекции опухолевых специфических нарушений в цДНК была продемонстрирована не только в фундаментальных, но и в клинических исследованиях [4, 5]. Ярким примером возможности применения такого подхода при выборе тактики лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого стала разработка на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени теста Cobas EGFR Mutation Test v2, позволяющего выявлять клинически значимые мутации в экзонах 18–21 гена *EGFR*, определяющие чувствительность опухолевых клеток к таргетным препаратам [6]. Разработаны и проходят клиническую апробацию в качестве средств вспомогательной диагностики для оценки чувствительности пациентов с некоторыми типами солидных опухолей к таргетным препаратам мультигенные панели онкологически значимых генов или их участков для высокопроизводительного секвенирования цДНК из плазмы крови.

Безусловно, одним из критических факторов для дальнейшего развития и клинической адаптации таких технологий является выбор спектра молекулярных нарушений, характерных для конкретных типов опухолей.

Эта проблема особенно актуальна для генетически гетерогенных типов опухолей, характеризующихся высоким межопухолевым разнообразием спектра функционально значимых соматических нарушений.

К таким типам опухолей, в частности, относится гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – преобладающая форма первичных опухолей печени, которая является 6-й по распространенности и 3-й по уровню смертности формой рака в мире [7]. Для ГЦК характерны поздняя диагностика, быстрая бессимптомная прогрессия опухоли, высокая устойчивость к химиотерапевтическим препаратам и крайне высокая гетерогенность драйверных генетических нарушений [8].

Наиболее часто встречающимися геномными нарушениями при гепатоканцерогенезе являются мутации промоторной области гена *TERT*, а также кодирующих участков генов бета-катенина (*CTNNB1*) (около 25 % случаев, чаще всего в вирус-ассоциированных ГЦК) и опухолевого супрессора *TP53* (25–40 % случаев), которые в большинстве случаев являются взаимоисключающими [9, 10]. Однако даже эти гены могут быть повреждены в разных участках своей кодирующей последовательности, что существенно затрудняет детекцию нарушений с помощью стандартизованных лабораторных тестов, не использующих мультигенные таргетные панели и технологии высокопроизводительного секвенирования. Одним из вариантов решения этой проблемы является разработка панелей для выявления в цДНК эпигенетических маркеров опухоли (например, сайтов аномального метилирования), которые могут иметь более универсальный характер [11, 12].

Для ГЦК и других форм генетически гетерогенных опухолей в качестве альтернативного подхода рассматривается применение в качестве объекта жидкостной биопсии индивидуального спектра мутаций конкретного пациента, которые могут быть выявлены на основании высокопроизводительного секвенирования опухолевой ткани. Определение таких мутаций в цДНК можно использовать для определения минимальной остаточной болезни, мониторинга рецидивирования опухолевого процесса у больных, перенесших резекцию, или эффективности лечения при терапии таргетными препаратами [12].

К настоящему времени в научной литературе можно найти единичные исследования, посвященные детекции соматических мутаций в отдельных генах в образцах цДНК конкретных пациентов с ГЦК. Для выявления таких нарушений применяют ПЦР в реальном времени, капельную цифровую ПЦР или высокопроизводительное таргетное секвенирование целевых ампликонов с высоким покрытием. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки, однако стандартизованных подходов, которые могли бы быть использованы для чувствительной детекции персонализированного спектра мутаций методом жид-

костной биопсии, к настоящему времени не предложено.

**Цель настоящей работы** – определить возможность использования различных методов детекции однонуклеотидных соматических мутаций, выявленных в опухолевой ткани конкретного пациента, таких как ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем или зондами TaqMan, капельная цифровая ПЦР и высокопроизводительное секвенирование таргетных ампликонов в препаратах цДНК из плазмы крови, полученных до хирургического удаления опухоли, а также оценить возможность количественной оценки доли альтернативного варианта в общем пуле цДНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клинические образцы.** В работе использованы образцы нормальной и опухолевой тканей печени пациентов с гистологически верифицированным диагнозом «гепатоцеллюлярная карцинома», полученные при резекции опухолей в хирургическом отделении опухолей гепатопанкреатобилиарной зоны Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также образцы плазмы крови, полученные от тех же пациентов до начала лечения. Сбор образцов проводили после подписания больными информированного согласия на использование биологического материала. Образцы тканей помещали в стерильные криопробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре не менее  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для получения препаратов плазмы крови использовали венозную кровь, собранную в вакуумные пробирки, содержащие  $\text{K}_3\text{-ЭДТА}$ , объемом 9 мл (Greiner Bio-One, Германия). Осаждение форменных элементов крови проводили путем центрифугирования в горизонтальном роторе в течение 20 мин на скорости 1300 g не позднее 2 ч после взятия крови. Слой плазмы, находящийся в верхней части пробирки, отбирали, не задевая промежуточный слой, и повторно центрифугировали в течение 10 мин на скорости 1300 g. Плазму разливали по 1 мл в криопробирки и хранили при температуре не выше  $-70^{\circ}\text{C}$ , не размораживая.

**Выделение ДНК.** Выделение геномной ДНК проводили из замороженных в жидком азоте образцов неопухолевых и опухолевых тканей печени, масса которых не превышала 30 мг, с помощью набора для выделения геномной ДНК PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Циркулирующую ДНК выделяли из 1 мл плазмы крови с использованием набора QIAamp ccfDNA/RNA kit (Qiagen, США). Концентрацию препаратов ДНК определяли на спектрофотометре Qubit с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo FS, США).

**Дизайн праймеров и зондов.** Для анализа нуклеотидных последовательностей в референсном геноме человека (версия hg19/GRCh37) использовали

платформу Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Дизайн праймеров и зондов проводили с использованием программ и сервисов для подбора и анализа олигонуклеотидных праймеров Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Синтез праймеров и зондов осуществляли в ООО «ДНК-Синтез» (Россия). Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

**Методы полимеразной цепной реакции в реальном времени.** Все варианты ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, США) в 96-луночных планшетах. Реакционная смесь одной пробы объемом 25 мкл содержала 2,5 мкл 10-кратного реакционного буфера, 0,4 мкМ специфических праймеров, 1,5 ед. *SynTaq* ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами, 0,25 мМ дезоксинуклозид-трифосфатов, 2,5 мМ  $MgCl_2$ ; 2 нг геномной или цДНК, деионизованную воду (ООО «Синтол», Россия). Все эксперименты проводили не менее чем в 3 независимых повторах.

*Алель-специфическую ПЦР с интеркалирующим красителем* проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии красителя EvaGreen, R-441 (ООО «Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя. Для детекции альтернативного варианта ПЦР выполняли при следующих режимах: начальная денатурация – 5 мин при 95 °С; 40 циклов – 30 с при 95 °С, 30 с при 67 °С, 30 с при 72 °С, регистрация сигнала – 10 с при 87 °С. Для детекции референсного варианта отжиг проводили при 65 °С, регистрацию флуоресценции – при 72 °С.

Для постановки *алель-специфической ПЦР с зондами TaqMan* использовали набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени R-412 (ООО «Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя. Детекцию альтернативного варианта проводили при следующих режимах: начальная денатурация – 3 мин при 95 °С, 40 циклов – 30 с при 95 °С, 30 с при 63,7 °С, 30 с при 72 °С. Для детекции референсного варианта отжиг проводили при 61,7 °С. Анализ данных по каждому маркеру проводили с помощью программы Bio-Rad CFX Maestro (версия 1.1) в режиме количественной оценки.

**Капельная цифровая полимеразная цепная реакция.** Для проведения цифровой капельной ПЦР с зондами TaqMan использовали генератор капель Bio-Rad QX200 Droplet Generator, амплификатор C1000 Touch Thermal Cycler и счетчик капель Bio-Rad QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, США). Реакционная смесь одной пробы объемом 20 мкл содержала: 2 нг геномной или цДНК; 250 нМ зондов TaqMan; 900 нМ праймеров; 10 мкл 2х реакционной смеси Bio-Rad Supermix for probes (Bio-Rad Laboratories, США). Анализ результатов проводили в программе QuantaSoft (Bio-Rad Laboratories, США) по протоколу SNV. При анализе результатов оценивали соотношение количества капель, флуоресцирующих в каналах FAM (референсный или альтернативный вариант *TLN1*), к количеству капель, флуоресцирующих в канале HEX (*ACTB*).

При проведении амплификации использовали следующий температурный режим: начальная денатурация – 10 мин при 95 °С, 40 циклов – 30 с при 95 °С, 30 с при 62 °С, 30 с при 72 °С.

Таблица 1. Используемые в работе праймеры и зонды

Table 1. Primers and probes used in the study

Праймер Primer	Последовательность (5'-3') Subsequence (5'-3')	Метод Method	Температура отжига, °С Annealing temperature, °C	Размер ампли- кона, п. н. Amplicon size, bp
TLN1-NM прямой TLN1-NM forward	GGGAGGGCATCC TGAAGATTG	Алель-специфическая ПЦР с интеркалирующим красителем Allele-specific PCR with intercalating dye	65,0	205
TLN1-AM прямой TLN1-AM forward	AGGGAGGGCAT CCTGAAGATTG		67,0	206
TLN1-R обратный TLN1-R reverse	TAGGGGCATCA GGTCACTACC		–	–
TLN1Pr-LMRef прямой TLN1Pr-LMRef forward	CCTCAGGGAGGG CATCCTGAAGATTG	Алель-специфическая ПЦР с зондом TaqMan, капельная цифровая ПЦР Allele-specific PCR with TaqMan probe, droplet digital PCR	61,7	154
TLN1Pr-LMAlt прямой TLN1Pr-LMAlt forward	AGGGAGGGCA TCCTGAAGATTG		63,7	150
TLN1Pr-R обратный TLN1Pr-R reverse	ACCCAGCTTG ACCACATCAG		–	–
TLN1Pr-Probe TaqMan-зонд TLN1Pr-Probe TaqMan probe	FAM- TGCAAAACGCAGCTG GGAGCCA-BHQ1		–	–

Окончание табл. 1

The end of table 1

Праймер Primer	Последовательность (5'-3') Subsequence (5'-3')	Метод Method	Температура отжига, °С Annealing temperature, °C	Размер ампли- кона, п. н. Amplicon size, bp
ACTB-DNA-F прямой ACTB-DNA-F forward	GCAAGTCTTC TGGACTGTGA	Алель-специфиче- ская ПЦР с TaqMan- зондом, капельная цифровая ПЦР Allele-specific PCR with TaqMan probe, droplet digital PCR	63,5	96
ACTB-DNA-R обратный ACTB-DNA-R reverse	CTCCCTTGAA GGTTGCAGAG			
ACTB-DNA-probe TaqMan-зонд ACTB-DNA-probe TaqMan probe	HEX- AGCCACTGTGTGCTG GGTGGTGGT-BHQ1			
16-YAP1-F	TGACATGGAGT CTGTTTTGGCTG	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	72,0	124
16-YAP1-R	TCCGGTGCA TGTGTCTCCTT			
16-LTA4H-F	GGA CTCTTAAG GTTCTTAAGTTT	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	62,0	150
16-LTA4H-R	ATGACCTATTG GTCCTGCCA			
16-MCCC2-F	TGTGGGCCGT CCTGAGGTTA	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	72,0	127
16-MCCC2-R	TGGTAGAGG GCAGAGCCCAA			
16-HNRNPA0-F	GCTTTCTTCAC CTCCACGCGA	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	72,0	126
16-HNRNPA0-R	CGACAAGCAG TCCGGCAAGA			
16-INTS1-F	CATGAAGAGCG TGCGCAGAAAG	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	61,0	126
16-INTS1-R	ATGAGCAGACC ACGTGTGAGG			
16-STK3-F	AATTCCTAGTGGTT TCTTGGTCTCCA	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	62,0	122
16-STK3-R	ACTGCGAAAAGA CAGCCCATTCT			
16-TLN1-F	CAGCTGCGTTT TGCACCAGGA	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	67,0	109
16-TLN1-R	AGCGGGTAGGGG AGATCTGACTAA			
16-CNPY3-F	ACACAAAGGGGT CAAGGTGGTG	Таргетное секвенирование Targeted sequencing	68,0	126
16-CNPY3-R	ACTGGGCACA GCAACCCTTC			

**Примечание.** Жирным шрифтом выделены позиции, соответствующие заменам, курсивом — дополнительные мисмэтчи. Последовательности праймеров, использованных для таргетного секвенирования, имеют дополнительную последовательность ctacacgagcgtcttccgac (для прямых праймеров) или cacagctgtgctcttccgac (для обратных) на 5'-конце. ПЦР — полимеразная цепная реакция.

*Note.* Positions corresponding to substitutions are in bold type, additional mismatches are in italics. The primer sequences used for targeted sequencing have an additional sequence ctacacgagcgtcttccgac (for forward primers) or cacagctgtgctcttccgac (for reverse primers) at the 5'-end. PCR — polymerase chain reaction.



**Секвенирование целевых ампликонов на платформе Illumina.** Для подготовки библиотек для секвенирования на MiSeq целевые участки, содержащие однонуклеотидные соматические мутации, специфические для опухолевой ткани пациента 16, амплифицировали из общего пула геномной или цДНК с помощью фланкирующих праймеров (см. табл. 1), содержащих на 5'-конце адаптерную последовательность, комплементарные 3'-участкам P5 и P7 адаптеров Truseq Illumina. Амплификацию проводили на приборе C1000 Touch Thermal Cycler с помощью SNPdetect полимеразы (PK022, ЗАО «Евроген», Россия) и используя в качестве матрицы 2 нг геномной ДНК или цДНК каждого образца. Мониторинг эффективности ПЦР проводили по результатам параллельных реакций, проводимых в присутствии красителя EvaGreen. После завершения реакции выполняли анализ размера и количества ампликонов в 2 % агарозном геле. Программа и условия ПЦР: начальная денатурация – 3 мин при 95 °С, 37 циклов – 30 с при 95 °С, 30 с при температуре, подобранной для каждой пары праймеров индивидуально, 30 с при 72 °С.

Продукты ПЦР очищали переосаждением с этиловым спиртом и ацетатом аммония, концентрацию определяли на спектрофотометре Qubit и доводили до 5 нг/мкл. К очищенным ампликонам в ходе дополнительной ПЦР (5 циклов) пришивали TruSeq-адаптеры с индивидуальной комбинацией прямого и обратного индексов для каждого образца. Результат реакции контролировали на агарозном электрофорезе (добавление адаптеров приводит к увеличению длины продукта на ~90 п. н.).

Очистку продукта проводили на магнитных частицах AMPure Beads (Beckman Coulter, США). После определения концентрации каждого ампликона библиотеки объединяли в эквимольном соотношении, доводили до концентрации 5 нМ и денатурировали. Полученный образец разводили до 10 концентрации пМ, добавляли 5 % контрольной библиотеки PhiX, наносили на картридж MiSeq Reagent Kit v2 Nano и секвенировали на приборе MiSeqDX (Illumina, США). Демультимплексирование библиотек проводили с помощью программного обеспечения, предустановленного на приборе. Полученные fq-файлы анализировали с помощью программы fastQC, проводили объединение встречных ридов в программе usearch fastq-mergers, картировали на референсные последовательности ампликонов и создавали индексированные bam-файлы для каждого локуса в программе SeqMan Ngen 12.0.1 (DNASTAR, США). Анализ изменчивости выполняли по результатам визуализации ридов в программе Integrative Genomics Viewer (IGV) v. 2.4.4. [13] относительно референсных последовательностей ампликонов.

**Секвенирование по Сэнгеру.** Секвенирование продуктов ПЦР проводили с обеих цепей ДНК методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems

3730 DNA Analyzer в Центре коллективного пользования «Геном» при Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того чтобы сопоставить возможности и ограничения различных методов детекции однонуклеотидных мутаций, мы использовали одни и те же препараты геномной ДНК из нормальной и опухолевой тканей печени и цДНК тех же пациентов. В работе были применены образцы ткани и плазмы крови больных с гистологически верифицированным диагнозом «гепатоцеллюлярная карцинома». Случай 16 представляет собой крупную опухоль трабекулярного строения низкой степени дифференцировки, стадия П1В (T4N0M0), с признаками сосудистой инвазии, цирроза и очагами некроза. Возраст пациента – 68 лет, пол – женский. Случай 28 – опухоль трабекулярного строения умеренной степени дифференцировки, стадия П (T2N0M0), без признаков сосудистой инвазии, со слабо выраженным фиброзом. Возраст пациента – 77 лет, пол – мужской. Оба случая не ассоциированы с хронической инфекцией вирусами гепатита В или С. Среднее количество цДНК, выделяемое из 1 мл плазмы крови, для пациента 16 составило 70 нг, для пациента 28 – 110 нг.

В качестве модельной системы для разработки методов детекции однонуклеотидных замен, выявленных в опухолевой ткани, в цДНК тех же пациентов была использована однонуклеотидная соматическая мутация в гене талин 1 (*TLN1*) – замена С/Т в положении chr9:35704152 по сборке генома человека hg19 (NM\_006289.3: c.6067G>A; NP\_006280.3: p.Ala2023Thr), определенная нами ранее на основании полно-транскриптомного секвенирования в опухолевой ткани пациента 16 и подтвержденная секвенированием по Сэнгеру (мутация выявляется в геномной ДНК из опухолевой ткани и не выявляется в неопухолевой ткани печени пациента 16). Эта мутация приводит к аминокислотной замене Ala2023Thr в цитоскелетном белке талин 1, который концентрируется в областях межклеточных контактов и играет важную роль в сборке актиновых филаментов и регуляции подвижности клеток. По данным, полученным с помощью различных алгоритмов предсказания функциональной значимости мутаций, эта замена является потенциально патогенной и расценивается нами как возможный драйвер опухолевого роста.

Для выявления этой мутации в нормальной и опухолевой тканях печени, а также в препаратах цДНК было использовано несколько экспериментальных подходов.

1. *Аллель-специфическая ПЦР в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen* проводилась с использованием 2 прямых (аллель-специфических) и 1 обратного (общего для аллель-специфических) праймеров в режиме реального времени. Аллель-специфические (прямые) праймеры на референсный (Ref) и мутантный

(Alt) варианты подобраны таким образом, чтобы их 3'-концевой нуклеотид был комплементарен нуклеотиду, находящемуся в точке мутации, что дестабилизирует связывание ДНК-полимеразы с матрицей, препятствуя образованию неспецифического ПЦР-продукта. Кроме того, были созданы соответствующие описанным аллель-специфические праймеры с неполной комплементарностью, обеспечиваемой за счет внесения дополнительных мисмэтчей в 3-й позиции от 3'-конца, которые, по данным литературы, повышают эффективность распознавания искомого аллеля по сравнению с альтернативным вариантом [14].

Для каждой пары аллель-специфических праймеров были проведены подбор температуры, калибровка и определение оптимальных условий ПЦР с использованием последовательных двукратных разведений геномной ДНК из нормальной (16N) и опухолевой (16T) тканей пациента, последняя из которых содержит как мутантную, так и нормальную копию *TLN1*. Результаты исследования показали, что только праймеры с дополнительным мисмэтчем в 3-й позиции обеспечивают специфичную дифференциальную детекцию мутантного и нормального аллелей в ДНК из опухолевых и нормальных тканей соответственно.

Дальнейшие исследования проводили путем постановки независимых реакций с праймерами на референсный и альтернативный варианты на препаратах геномной ДНК нормальной и опухолевой тканей печени, а также цДНК пациента 16 (16N, 16T и 16C соответственно) и на аналогичных образцах пациента 28, в нормальной и опухолевой тканях которого исследуемая мутация отсутствовала (28N, 28T и 28C соответственно).

Мы установили, что разработанный метод позволяет детектировать мутантный аллель даже в небольшом

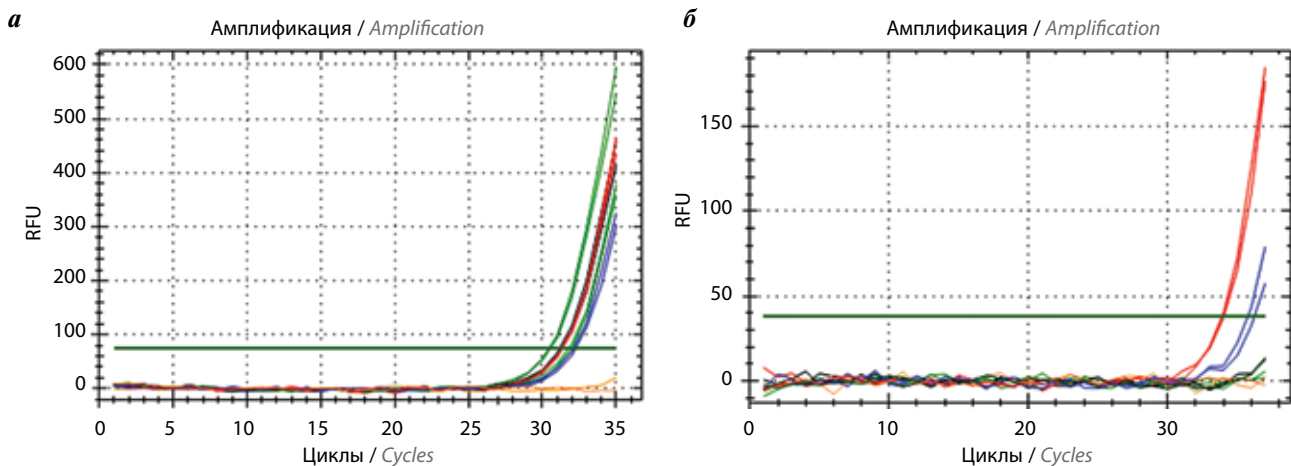
количестве (2 нг) опухолевой ДНК и цДНК пациента 16, но не в образцах геномной или цДНК пациента 28 и ДНК из неопухолевой ткани пациента 16. Типичный результат эксперимента представлен на рис. 1.

Использованный метод не позволяет провести точное количественное определение доли мутантного варианта, однако с применением калибровочных кривых, построенных на основании последовательных двукратных разведений ДНК, был выполнен приблизительный расчет количества нормального и мутантного аллелей в исследованных образцах. При использовании допущения, что в геномной ДНК из опухолевой ткани содержится равное количество копий мутантного и нормального аллелей, по усредненным данным нескольких экспериментов доля мутантного варианта среди суммарного количества ампликонов *TLN1* в цДНК пациента 16 составила 11 %.

2. Более точная оценка доли мутантного аллеля может быть достигнута при использовании метода *аллель-специфической ПЦР в реальном времени с зондами TaqMan*.

В этом случае могут быть использованы 2 варианта дизайна праймеров и зондов: когда альтернативный нуклеотид расположен в одном из праймеров, а зонд *TaqMan* для детекции является общим (1-й вариант), либо когда альтернативный нуклеотид расположен в последовательности зонда, а праймеры являются универсальными (2-й вариант).

Для разработки 1-го варианта ПЦР с зондами *TaqMan* были использованы модификации праймеров к референсной (*TLN1Pr-MRef*) и альтернативной (*TLN1Pr-MAlt*) последовательности *TLN1*, разработанных для ПЦР с *EvaGreen* (с дополнительными мисмэтчами), которые совместимы с универсальным зондом *TaqMan*, меченным флуорофором *FAM*, расположенным внутри ампликона. Для нормализации количества



**Рис. 1.** Результат определения референсного (а) и альтернативного (б) аллелей гена *TLN1* в образцах ДНК пациентов 16 и 28 методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с красителем *EvaGreen*. Образец 16Т обозначен красным цветом, 16С – синим, 16N – черным, образцы пациента 28 – зеленым, контрольный образец без ДНК – оранжевым. RFU – относительные единицы флуоресценции

**Fig. 1.** The result of determining the reference (a) and alternative (b) allele of the *TLN1* gene in the DNA samples of patients 16 and 28 by allele-specific polymerase chain reaction with *EvaGreen* dye. Sample 16T in red, 16C in blue, 16N in black, patient 28 samples in green, no DNA control in orange. RFU – relative fluorescence units

ДНК, внесенной в реакцию, были использованы праймеры и меченный флуорофором HEX TaqMan-зонд к геномной последовательности гена бета-актина (*ACTB*). При таком дизайне праймеров и зондов оценка присутствия в образце референсного и мутантного вариантов происходит на основании постановки 2 независимых реакций с референсными или мутантными праймерами соответственно, а нормировка результатов осуществляется по данным ПЦР с праймерами и зондом к *ACTB*, входящими в каждую реакцию. Для каждого набора праймеров и зондов были проведены подбор температуры, калибровка и определение оптимальных условий ПЦР для выявления референсного или альтернативного вариантов с использованием геномной ДНК из опухолевой ткани пациента 16 (16Т) и продемонстрирована возможность анализа ампликонов *TLN1* и *ACTB* в режиме мультиплексной ПЦР.

В результате исследований, проведенных на описанной выше панели геномной и цДНК пациентов 16 и 28, было установлено, что, как и в предыдущем случае, праймеры и зонд к альтернативному варианту гена *TLN1* специфически детектируют мутантный аллель только в препаратах геномной ДНК из опухолевой ткани и цДНК из плазмы крови пациента 16 (табл. 2). Анализ результатов реакции проводили по относительному количеству ДНК мутантного или нормального аллелей с использованием калибровочных кривых, исходя из допущения, что доля мутантного аллеля в опухолевой ткани составляет 50 %, и нормализовали на количество ДНК *ACTB* в той же реакции. Относительная доля мутантного аллеля среди суммарного количества ампликонов *TLN1* в цДНК пациента 16 при таком анализе составила 36 %. Проведенный таким же образом анализ результатов реакции с праймерами к референсному варианту (калибровка построена по последовательным разведениям геномной ДНК из нормальной ткани) свидетельствует о том, что этот способ является адекватным (так, например, доля нормального аллеля в опухолевой ткани составила около 50 %), но не количественным (сумма долей мутантного и нормального вариантов в препаратах цДНК далека от 100 %).

Второй вариант с использованием общих праймеров и 2 вариантов зондов TaqMan, комплементарных участку с мутацией, проведенный на аналогичной панели образцов, не позволил достичь специфического разделения мутантного и нормального вариантов (данные не представлены). Это прежде всего связано с тем, что для коротких ампликонов, длина которых ограничена малой размерностью основного пула цДНК (около 160 п. н.), существует крайне небольшое количество вариантов олигонуклеотидов, удовлетворяющих условиям подбора эффективных и специфичных праймеров и зондов.

Таким образом, среди методов, основанных на ПЦР в реальном времени, наиболее перспективным для детекции однонуклеотидных соматических мутаций

представляется вариант с аллель-специфическими праймерами и универсальным зондом TaqMan. Внесение дополнительных мисмэтчей в районе 3'-конца аллель-специфического праймера помогает повысить специфичность распознавания референсного и альтернативного вариантов, а использование калибровочных кривых — провести приблизительную оценку доли мутантного ампликона в образце.

**Капельная цифровая полимеразная цепная реакция.** В экспериментах на основе капельной цифровой ПЦР, которая позволяет выполнять количественную детекцию независимо амплифицированных в отдельных каплях эмульсии единичных молекул ДНК, были применены праймеры и зонды, апробированные при постановке аллель-специфической ПЦР с зондами TaqMan. Реакцию проводили с использованием системы для капельной цифровой ПЦР QX0200 (BioRad, США). На 1-м этапе с использованием препаратов ДНК из нормальной и опухолевой тканей печени пациента 16 проводили подбор температуры, которая обеспечивает специфическую амплификацию с праймерами к референсной или альтернативной последовательности гена *TLN1*. Дальнейшие исследования выполняли на описанной выше панели образцов геномной и циркулирующей ДНК пациентов 16 (есть мутация *TLN1*) и 28 (нет мутации). В каждую реакцию брали 2 нг ДНК. Эксперименты проводили в мультиплексном режиме с праймерами и зондами к *TLN1* (референсный или альтернативный вариант — канал FAM) и *ACTB* (канал HEX) для контроля количества ДНК. Типичные результаты эксперимента представлены на рис. 2 а–г.

Представленные результаты наглядно демонстрируют, что референсный вариант *TLN1* детектируется во всех пробах, содержащих ДНК, а мутантный — только в образцах геномной ДНК из опухоли и в цДНК пациента 16, у которого данная мутация выявлена независимыми методами в опухолевой ткани. Для количественной оценки доли альтернативного аллеля в этих образцах была проведена нормализация рассчитанного программой QuantaSoft (Biorad) количества копий вариантов *TLN1* по количеству копий *ACTB* в каждой из реакций. Согласно проведенным расчетам, доля альтернативного варианта в геномной ДНК из опухолевой ткани составила 42 %, в цДНК — 19,7 % (рис. 2д).

**Глубокое секвенирование ампликонов участка ДНК, содержащего таргетную мутацию, на платформе Illumina (MiSeq).** Для создания и отработки протокола в целях получения и глубокого секвенирования библиотек ампликонов на платформе Illumina (MiSeq) использовали 7 однонуклеотидных соматических мутаций, выявленных на основании транскриптомного секвенирования в опухоли пациента 16. Соматический статус мутаций подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру (табл. 3). Кроме того, в качестве внутреннего негативного контроля была исследована последовательность гена *STK3*, не содержащая соматических мутаций.



**Таблица 2.** Результаты определения мутантного (*TLN1Pr-MAlt*) и нормального (*TLN1Pr-MRef*) вариантов гена *TLN1* в препаратах геномной и циркулирующей ДНК 16 и 28 методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с праймерами *TaqMan*

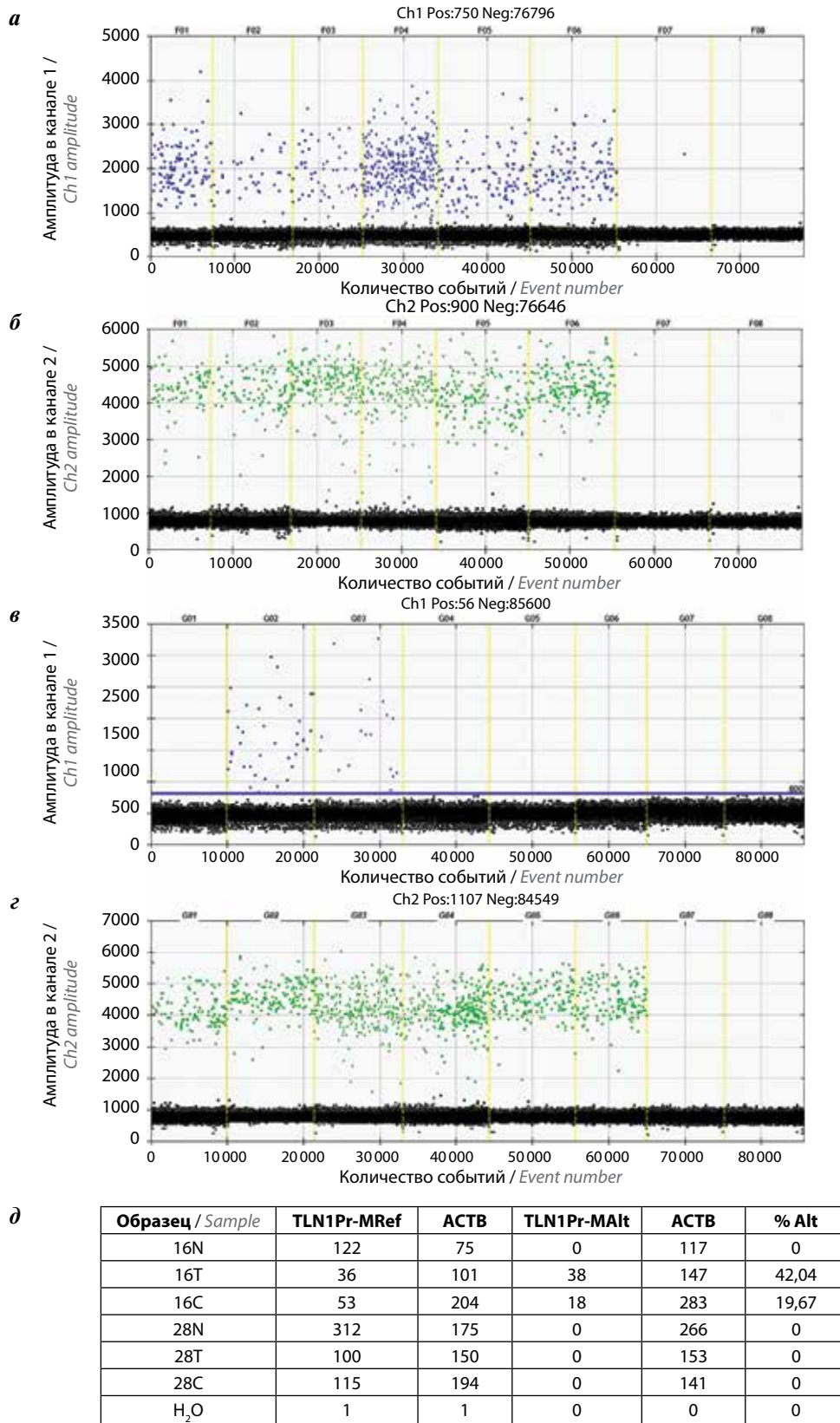
**Table 2.** Results of detection of mutant (*TLN1Pr-MAlt*) and normal (*TLN1Pr-MRef*) *TLN1* gene variants in genomic and cDNA preparations 16 and 28 by allele-specific polymerase chain reaction with *TaqMan* primers

Образец Sample	Вариант гена Variant of the gene		АСТВ		Доля варианта гена, нормированного по АСТВ, % Proportion of variant of the gene normalized by АСТВ, %
	Пороговый цикл Threshold cycle	Относительное количество Relative amount	Пороговый цикл Threshold cycle	Относительное количество Relative amount	
<b>Панель А – мутантный вариант гена <i>TLN1</i></b> <i>Panel A – mutant variant of the <i>TLN1</i> gene</i>					
16N	–	0	29,7	2,74	0
16Т	36,34	2	30,25	2,00	50
16С	35,17	4,08	28,62	5,66	36
28N	–	0	30,47	1,63	0
28Т	–	0	30,14	2,03	0
28С	–	0	28,93	4,6	0
H <sub>2</sub> O	–	0	–	0	0
<b>Панель Б – референсный вариант гена <i>TLN1</i></b> <i>Panel B – reference variant of the <i>TLN1</i> gene</i>					
16N	33,01	2,00	30,74	2,00	100
16Т	34,31	0,94	30,81	1,94	48,0
16С	33,79	1,27	29,30	4,37	29,1
28N	32,02	3,50	31,23	1,55	226,0
28Т	33,06	1,93	30,56	2,22	87,0
28С	32,99	2,00	29,67	3,61	55,0
H <sub>2</sub> O	–	0	–	0	0

Для создания библиотек ампликонов, содержащих исследуемые мутации, были использованы фланкирующие праймеры, амплифицирующие участки ДНК размером от 109 до 150 п. н. и содержащие во внутренних районах участки соматических мутаций. На 5'-конце праймеры содержали адаптерные последовательности, комплементарные 3'-участкам P5 и P7 адаптеров TruSeq Illumina. Для каждой из полученных пар праймеров были подобраны оптимальные условия, обеспечивающие специфическую амплификацию исследуемых ампликонов. Для амплификации исследуемых участков в качестве матрицы использовали по 2 нг геномной (нормальной или опухолевой) ДНК или цДНК пациента 16. Мониторинг эффективности ПЦР проводили по результатам параллельных реакций в присутствии красителя EvaGreen. После завершения реакции, анализа размера и количества ампликонов в агарозном геле и их очистки к ампликонам путем дополнительной ПЦР пришивали TruSeq-адаптеры с индивидуальными индексами. Очищенные на маг-

нитных частицах ПЦР-продукты для каждого из районов объединяли в общий пул в эквимоллярных количествах и секвенировали на платформе Illumina MiSeq. После секвенирования и биоинформатической обработки данных определяли число ридов с нормальным или мутантным вариантом каждого из исследуемых генов в каждом из образцов и определяли процент мутантного аллеля в общем пуле цДНК. Результаты анализа представлены в табл. 3.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все 7 мутаций определяются в геномной ДНК пациента 16, выделенной из опухолевой, но не из нормальной ткани, и являются соматическими (доля альтернативного аллеля составила от 45,7 до 60,9 %). Для всех исследованных ампликонов мутантная ДНК была выявлена и в препаратах цДНК, выделенных из плазмы крови этого больного перед операцией; доля альтернативного варианта составила от 5,1 до 29,6 % от общего количества проанализированных прочтений. Соматических мутаций в негативном контрольном



**Рис. 2.** Результаты цифровой полимеразной цепной реакции с праймерами и зондами к референсному (а) и мутантному (в) вариантам TLN1 и соответствующие им реакции с праймерами к бета-актину (б, г); количество положительных капель в каждой реакции и доля мутантного варианта в препаратах (д). Порядок нанесения образцов ДНК в каждой панели: 1 – 16N, 2 – 16T, 3 – 16C, 4 – 28N, 5 – 28T, 6 – 28C, 7, 8 – вода  
**Fig. 2.** Results of digital polymerase chain reaction with primers and probes for reference (a) and mutant (в) TLN1 variants and corresponding reactions with primers for beta-actin (б, г); number of positive drops in each reaction and the proportion of the mutant variant in the samples (д). The order of applying DNA samples in each panel is 1 – 16N, 2 – 16T, 3 – 16C, 4 – 28N, 5 – 28T, 6 – 28C, 7, 8 – water

Таблица 3. Результаты исследования ампликонов, содержащих мутации, выявленные в опухолевой ткани пациента 16

Table 3. The results of the study of amplicons containing mutations detected in the tumor tissue of patient 16

Номер ампликона ?	Ген Gene	Хромосома Chromosome	Положение (hg 19) Position (hg 19)	Нуклеотидная замена (Ref/Alt) Nucleotide substitution (Ref/Alt)	Тип замены Type of substitution	% альтернативного варианта, РНК % of alternative variant, RNA	Тип мутации (секвенирование по Сэнгеру) Type of mutation (Sanger sequencing)	Доля альтернативного аллеля (глубокое секвенирование), % Proportion of alternative allele (deep sequencing), %		
								Печень Liver	Опухоль Tumor	цДНК cDNA
1	<i>TLN1</i>	9	35704152	C/T	Миссенс Missense	40,7	Соматическая Somatic	0,4	47,7	23,5
2	<i>YAP1</i>	11	102100656	T/G	Миссенс Missense	43,8	Соматическая Somatic	0,6	46,8	25,3
3	<i>LTA4H</i>	12	96412588	C/T	Миссенс Missense	43,1	Соматическая Somatic	1,0	53,0	29,6
4	<i>MCCC2</i>	5	70883332	C/A	«Стоп»-кодон "Stop"-codon	59,3	Соматическая Somatic	0,5	49,8	16,6
5	<i>HNRNPA0</i>	5	137089294	C/G	Миссенс Missense	58,3	Соматическая Somatic	0,3	47,1	5,1
6	<i>INTS1</i>	7	1526278	G/A	Миссенс Missense	70,4	Соматическая Somatic	0,7	60,7	14,1
7	<i>CNPY3</i>	6	42905542	G/T	«Стоп»-кодон "Stop"-codon	33,3	Соматическая Somatic	0,6	45,1	16,8
8	<i>STK3</i>	8	99468083	T	—	—	Нет мутации No mutation	0,2	0,1	0,1

ампликоне *STK3* не было выявлено ни в одном из образцов. Доля мутантных аллелей в образцах нормальной ткани ни в одном из случаев не превысила 1 %.

### ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени в научной литературе опубликован ряд исследований, посвященных выявлению мутаций, характерных для опухолевой ткани конкретных пациентов, в соответствующих препаратах цДНК и продемонстрирована принципиальная возможность мониторинга течения заболевания в отдельных случаях. Аналогичные исследования выполнены и в отношении генетически гетерогенных типов опухолей, таких как ГЦК [15]. Например, при ультраглубоком (5500×) секвенировании образцов цДНК, полученных из плазмы и сыворотки 8 пациентов с ГЦК, подвергнутых хирургическому лечению, с использованием специально разработанной для ГЦК таргетной панели на 58 генов [16] достоверное присутствие мутантного аллеля хотя бы одного из исследованных генов было выявлено лишь в 4 (50 %) случаях ГЦК, причем все они были ассоциированы с инфекцией вирусами гепатита В или С. В 2 случаях «диагностических» мутаций не было обнаружено даже при секвенировании опухолевой ткани тех же пациентов.

Возможной альтернативой исследованию таргетных панелей, включающих ограниченное число онкологически значимых генов, является выполнение полноэкзомного секвенирования опухолевой ДНК для выявления индивидуальных мутаций, присущих конкретной опухоли. На основании анализа обнаруженных нарушений проводятся выбор клональных соматических мутаций и изготовление индивидуальных праймеров для проведения мультиплексной ПЦР и высокопроизводительного секвенирования полученных библиотек ампликонов. Этот подход активно используется в настоящее время, например, американской компанией Naterra в тесте Signatera [17]. Помимо необходимости биоинформатического анализа данных и их функциональной интерпретации, такой подход требует разработки надежных методов, позволяющих уверенно проводить детекцию и качественную оценку доли мутантной опухоль-специфической ДНК в общем пуле цДНК из биологических жидкостей организма.

В настоящей работе мы исследовали возможность применения различных методов детекции однонуклеотидных соматических мутаций, выявленных в опухолевой ткани пациента с ГЦК при высокопроизводительном транскриптомном секвенировании, и возможность количественной оценки доли мутантного варианта

в цДНК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все использованные нами методы позволяют детектировать мутации, специфические для опухолевой ткани, в цДНК того же пациента, но обладают различными ограничениями и потенциалом для применения в жидкостной биопсии.

Важно отметить, что в исследованном нами случае при сравнении методов ГЦК при полнотранскриптомном высокопроизводительном секвенировании не было выявлено мутаций, затрагивающих «канонические» гены, задействованные в канцерогенезе, в том числе в участках, включенных в основные таргетные панели для выявления драйверных или терапевтически значимых нарушений (например, набор AmpliSeq Cancer HotSpot Panel v2 (Illumina, США), включающий горячие участки мутаций 50 опухоль-ассоциированных генов). Успешное выявление идентифицированных на основании транскриптомных данных уникальных для конкретного пациента и малоизученных вариантов свидетельствует о том, что такой подход может быть использован для поиска персонализированных маркеров для жидкостной биопсии.

Среди методов, основанных на ПЦР в реальном времени, наиболее перспективным для детекции одонуклеотидных соматических мутаций представляется вариант с аллель-специфическими праймерами, несущими дополнительные замены в районе 3'-конца аллель-специфического праймера, и универсальным зондом TaqMan. Такой подход обеспечивает специфичность распознавания референсного и альтернативного вариантов, однако количественная оценка доли мутантного варианта в этом случае ограничена необходимостью использования калибровочных кривых и при отсутствии специально разработанных стандартных образцов позволяет провести лишь приблизительную оценку доли мутантного ампликона в образце. Несмотря на это, можно признать, что описанный метод, более дешевый и простой, чем капельная ПЦР и таргетное секвенирование ампликонов, имеет явный потенциал для использования в качестве экспресс-метода, например, для отбора наиболее перспективных персонализированных маркеров для мониторинга динамики изменения опухолевого роста в ходе лечения.

Метод капельной цифровой ПЦР с аллель-специфическими праймерами и зондами TaqMan обеспечивает не только уверенную детекцию мутантных вариантов в небольших количествах цДНК, но и адекватную количественную оценку доли мутантного варианта в общем пуле цДНК без использования калибровочных кривых. Это свидетельствует о значительном потенциале применения такого подхода для жидкостной биопсии даже в случае невысокого содержания цДНК в препаратах плазмы крови, а также исследования опухолей небольшого размера или ранних стадий. Ограничением метода является лимитируемое количеством

каналов в приборе, малое количество маркеров, которые могут быть изучены в каждой реакции.

Глубокое таргетное секвенирование ампликонов, содержащих мутации, на платформе Illumina является более дорогостоящим методом и требует более продолжительной пробоподготовки. Однако этот подход позволяет существенно расширить количество анализируемых мутаций, что особенно важно, учитывая значительную внутриопухольевую гетерогенность злокачественных новообразований. Таргетное секвенирование также дает возможность провести корректную количественную оценку доли мутантного варианта в образцах.

Важно отметить, что для соматической мутации в гене *TLN1* доли альтернативного варианта в цДНК пациента 16, детектированные методами цифровой ПЦР и таргетного секвенирования ампликонов (19,7 и 23,5 % соответственно), очень близки. Это свидетельствует о точности количественного анализа, проведенного с помощью данных методов, и о возможности их использования для кросс-валидации полученных результатов. Согласно данным литературы, у пациентов с ГЦК доля альтернативного аллеля в цДНК для драйверных мутаций может достигать 12–37 %, что отражает, по-видимому, ключевую роль этих мутаций в возникновении опухоли у конкретного пациента, и, соответственно, высокую представленность альтернативного варианта в подавляющем большинстве опухолевых клонов [18].

В проведенном исследовании мы использовали препараты ДНК от пациентов с крупными клинически детектируемыми опухолями. В то же время необходимо отметить, что в описанных экспериментах была применена лишь небольшая часть цДНК, выделенная из 1 мл плазмы крови. В последующих исследованиях мы планируем не только повысить точность детекции методов, но и апробировать их на образцах, полученных от пациентов с ранними стадиями опухолевого процесса, и при возникновении рецидивов, и в ходе терапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, среди исследованных подходов к детекции индивидуальных опухоль-специфичных соматических одонуклеотидных мутаций капельная цифровая ПЦР и таргетное секвенирование ампликонов позволяют не только надежно детектировать мутантные варианты в малых количествах цДНК из плазмы крови, но и адекватно проводить их количественную оценку, что особенно важно для разработки способов мониторинга опухолевого роста в процессе лечения. Близкие значения доли мутантного варианта в цДНК, детектированной этими методами, свидетельствуют о точности количественного анализа и возможности их использования для кросс-валидации получаемых результатов.



## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Siravegna G., Marsoni S., Siena S., Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(9):531–48. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.14
2. Wan J.C.M., Massie C., Garcia-Corbacho J. 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
3. Cescon D.W., Bratman S.V., Chan S.M., Siu L.L. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nat Cancer* 2020;1(3):276–90. DOI: 10.1038/s43018-020-0043-5
4. Kilgour E., Rothwell D.G., Brady G., Dive C. Liquid biopsy-based biomarkers of treatment response and resistance. *Cancer Cell* 2020;37(4):485–95. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.012
5. Cisneros-Villanueva M., Hidalgo-Pérez L., Rios-Romero M. et al. Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review. *Br J Cancer* 2022;126(3):391–400. DOI: 10.1038/s41416-021-01696-0
6. Keppens C., Palma J.F., Das P.M. Detection of EGFR variants in plasma: a multilaboratory comparison of a Real-Time PCR EGFR Mutation test in Europe. *J Mol Diagn* 2018;20(4):483–94. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2018.03.006
7. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
8. Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18
9. Zucman-Rossi J., Villanueva A., Nault J.C. et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149(5):1226–39. PMID: 26099527. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.05.061.
10. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. *Cell* 2017;169(7):1327–41. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.046
11. Кустова И.Ф., Макарова А.С., Лазаревич Н.Л. Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):8–19. DOI: 10.17650/2313-805X-2018
12. Kustova I.F., Makarova A.S., Lazarevich N.L. Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):8–19. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2018
13. Tran N.H., Kisiel J., Roberts L.R. Using cell-free DNA for HCC surveillance and prognosis. *JHEP Rep* 2021;3(4):100304. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100304
14. Thorvaldsdottir H., Robinson J.T., Mesirov J.P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2013;14(2):178–92. DOI: 10.1093/bib/bbs017
15. Liu J., Huang Sh., Sun M. et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods* 2012;8(1):34. DOI: 10.1186/1746-4811-8-34
16. Ng C.K.Y., Di Costanzo G.G., Terracciano L.M., Piscuoglio S. Circulating cell-free DNA in hepatocellular carcinoma: current insights and outlook. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:78. DOI: 10.3389/fmed.2018.00078
17. Labgaa I., Villacorta-Martin C., D’Avola D. et al. A pilot study of ultra-deep targeted sequencing of plasma DNA identifies driver mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2018;37:3740–52. DOI: 10.1038/s41388-018-0206-3
18. Bratman S.V., Yang S.Y.C., Iafolla M.A.J. et al. Personalized circulating tumor DNA analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients treated with pembrolizumab. *Nat Cancer* 2020;1(9):873–81. DOI: 10.1038/s43018-020-0096-5
19. Ikeda S., Tsigelny I., Skjerveik Å. et al. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA reveals frequent alterations in advanced hepatocellular carcinoma. *The Oncologist* 2018;23(5):586–93. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0479

**Вклад авторов**

Л.М. Дьяков: разработка и оптимизация методов, проведение ПЦР, подготовка библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования;

О.М. Кривцова: анализ данных, дизайн праймеров, разработка и оптимизация методов, проведение ПЦР, подготовка библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования;

П.А. Хесина: подготовка библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования;

И.Ф. Кустова: разработка и оптимизация методов, проведение ПЦР, сбор клинических образцов, выделение нуклеиновых кислот;

Н.А. Дьякова: сбор клинических образцов, выделение нуклеиновых кислот;

Н.С. Мюге: подготовка библиотек и проведение высокопроизводительного секвенирования, разработка концепции исследования, метода таргетного секвенирования;

Н.Е. Кудашкин, Ю.И. Патютко: получение клинических образцов, сбор клинических данных;

Н.Л. Лазаревич: разработка концепции исследования, интерпретация данных, написание текста статьи, анализ данных, дизайн праймеров.

**Authors' contributions**

L.M. Dyakov: development and optimization of methods, PCR, library preparation and high-performance sequencing;

O.M. Krivtsova: data analysis, primer design, development and optimization of methods, PCR, library preparation and high-performance sequencing;

P.A. Khesina: library preparation and high-performance sequencing;

I.F. Kustova: development and optimization of methods, PCR, collection of clinical samples, isolation of nucleic acids;

N.A. Dyakova: collection of clinical samples, isolation of nucleic acids;

N.S. Muge: preparing libraries and conducting high-performance sequencing, developing a research concept, a targeted sequencing method;

N.E. Kudashkin, Yu.I. Patyutko: obtaining clinical samples, collecting clinical data;

N.L. Lazarevich: development of the research concept, interpretation of data, writing the text of the article, data analysis, design of primers.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Л.М. Дьяков / L.M. Dyakov: <https://orcid.org/0000-0002-1972-5138>

О.М. Кривцова / O.M. Krivtsova: <https://orcid.org/0000-0002-0207-2724>

П.А. Хесина / P.A. Khesina: <https://orcid.org/0000-0002-4208-5917>

И.Ф. Кустова / I.F. Kustova: <https://orcid.org/0000-0001-6480-0793>

Н.А. Дьякова / N.A. Dyakova: <https://orcid.org/0000-0002-7431-7129>

Н.С. Мюге / N.S. Muge: <https://orcid.org/0000-0001-8957-1931>

Н.Е. Кудашкин / N.E. Kudashkin: <https://orcid.org/0000-0003-0504-585X>

Ю.И. Патютко / Yu.I. Patyutko: <https://orcid.org/0000-0002-5995-4138>

Н.Л. Лазаревич / N.L. Lazarevich: <https://orcid.org/0000-0001-9560-1383>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда научных исследований (грант № 18-29-09164).

**Funding.** The work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-29-09164).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен комитетом по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The local ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia approved the protocol of the study.

All patients signed an informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 01.03.2022. **Принята к публикации:** 17.07.2022.

**Article submitted:** 01.03.2022. **Accepted for publication:** 17.07.2022.