

Возможности клинического применения свободно-циркулирующей в крови ДНК при раке почки

Е.И. Якубович, А.Г. Полищук, В.И. Евтушенко

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, Ленинградская ул., 70

Контакты: Елена Игоревна Якубович jakubovichelena@mail.ru

Ранняя диагностика карциномы почки является ключевым фактором, определяющим выживаемость пациентов. Бессимптомное течение и отсутствие надежных диагностических маркеров приводят к тому, что более чем в 30 % случаев заболевание выявляется на продвинутой стадии, когда прогноз неблагоприятен, поскольку опухоли почки устойчивы к стандартной химиотерапии и облучению. Более чем у 30 % пациентов с локализованными опухолями после нефрэктомии развиваются рецидивы и метастазы. Несмотря на внедрение новых таргетных и иммунотерапевтических методов лечения, показатели 5-летней выживаемости при метастатической карциноме почки остаются неудовлетворительными. Среди возможных причин низкой эффективности лечения могут быть высокая межопухолевая и внутриопухолевая гетерогенность и эволюция опухоли на фоне терапии, а также отсутствие предиктивных биомаркеров ответа на терапию. Новые возможности ведения пациентов с раком почки открывает жидкостная биопсия, основанная на тестировании свободно-циркулирующей ДНК (сцДНК) в крови пациентов. Диагностический и предиктивный потенциал этих малоинвазивных биомаркеров продемонстрирован для различных типов рака. Использование высокочувствительных методов анализа сцДНК позволяет выявить заболевание на ранних стадиях и предсказать развитие постоперационного рецидива до появления клинических и радиологических изменений. Последовательные образцы сцДНК, собранные до и в процессе лечения, дают возможность в режиме реального времени контролировать динамику мутационных изменений в объеме всей опухоли и метастазах, а также возникновение резистентности в ходе лечения. Эта информация может стать полезным инструментом для оптимизации персонализированных терапевтических стратегий. В данном обзоре рассматривается потенциал клинического использования сцДНК для пациентов с раком почки.

Ключевые слова: карцинома почки, биомаркер, свободно-циркулирующая ДНК, скрининг, мониторинг лечения

Для цитирования: Якубович Е.И., Полищук А.Г., Евтушенко В.И. Возможности клинического применения свободно-циркулирующей в крови ДНК при раке почки. Онкоурология 2020;16(3):174–89.

DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-3-174-189



Potential clinical application of free-circulating DNA from blood in renal cancer

E.I. Yakubovich, A.G. Polishchuk, V.I. Evtushenko

A.M. Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia; 70 Leningradskaya St., Pesochnyy, Saint-Petersburg 197758, Russia

Early diagnosis of renal cancer carcinoma is a key determinant of patient survival. The asymptomatic disease course and lack of reliable diagnostic markers lead to the fact that more than 30 % renal cancer cases discovered at an advanced stage, when the prognosis is poor because kidney tumors are resistant to standard chemotherapy and radiation. More than 30 % of renal cancer carcinoma recur or metastasize after surgical treatment. Despite the implementation of novel targeted drugs and immune point inhibitors, the 5-year survival rate for metastatic renal cancer carcinoma remains dismal. Unsatisfactory result of renal cancer treatment may be caused by high inter- and intra-tumor heterogeneity and tumor evolution during therapy, as well as the lack of predictive and on-treatment monitoring biomarkers. Liquid biopsy test that utilizes free-circulating DNA (cfDNA) in the blood of patients, opens up new opportunities for managing patients with renal cancer. The diagnostic and predictive potential of these minimally invasive biomarkers has been demonstrated for various types of cancer. The use of highly sensitive methods of cfDNA analysis may allow early cancer detection and prediction of postoperative disease recurrence before clinical and radiographic progression. Serial cfDNA samples, that were collected before and during course of treatment, can provide information about the dynamic mutational changes in the volume of the entire tumor and metastases in real time, and the emergence of drug resistance during treatment. This information may be promising tool for optimizing patient-specific therapeutic strategies. This review is focusing on the potential clinical application of cfDNA from blood in renal cancer.

Key words: renal cell carcinoma, biomarker, free-circulating DNA, screening, treatment monitoring

For citation: Yakubovich E.I., Polishchuk A.G., Evtushenko V.I. Potential clinical application of free-circulating DNA from blood in renal cancer. Onkourologiya = Cancer Urology 2020;16(3):174–89. (In Russ.).

Введение

В 2018 г. среди всех зарегистрированных онкологических заболеваний доля рака почки составила 2,2 %, доля смерти от этого заболевания — 1,8 % [1]. Более 80 % выявляемых опухолей почки приходится на карциному почки (КП). КП представляет гетерогенную группу опухолей эпителия почечных канальцев. Самый распространенный гистологический вариант — светлоклеточная КП (75 %). КП характеризуется медленным и бессимптомным течением и агрессивным непредсказуемым поведением. В настоящее время стандартом диагностики и стадирования заболевания остается мультифазная компьютерная томография. В 70 % случаев опухоль диагностируется как локализованная. В этом случае самым эффективным методом лечения является хирургический. Однако более чем у трети пациентов в разные сроки после операции развиваются рецидивы, что может быть связано с наличием визуально не выявляемых микрометастазов в предоперационном периоде.

Резистентность КП к стандартной химиотерапии, гормональным препаратам и облучению значительно ухудшает прогноз у пациентов с метастатическими формами. В последние 20 лет благодаря расширению знаний о молекулярных механизмах патогенеза был достигнут определенный прогресс в лечении метастатических форм КП. Использование таргетных препаратов и ингибиторов иммунных контрольных точек позволило увеличить медиану выживаемости пациентов с метастатической КП с 13 до 30 мес [2]. В настоящее время нет надежных прогностических и предиктивных биомаркеров, позволяющих предсказать, какой препарат или их комбинация будут наиболее эффективны в каждом конкретном случае. Поэтому до сих пор, несмотря на множество доступных таргетных препаратов с разными целевыми мишенями, их назначение проводится на основе клинико-морфологических характеристик опухоли почки, а не персонализировано, с учетом генетических и эпигенетических особенностей патогенеза у пациента. При этом большое количество исследований выявляют корреляцию молекулярных нарушений с ответом на таргетную терапию [2, 3].

В настоящее время для изучения опухоли применяется тканевый материал, полученный при рутинной биопсии. Однако при использовании биопсийного материала в диагностических и лечебных целях клиницист сталкивается с существенной проблемой. Как первичные злокачественные новообразования, так и их метастазы состоят из гетерогенной популяции опухолевых клеток, имеющих различную морфологию, метаболизм, метастатический потенциал и экспрессию генов. Гетерогенность опухолевых клеток по всем этим признакам формируется как в процессе естественной эволюции опухоли, так и на фоне лечения [4, 5].

Очевидно, что единичный биопсийный образец, полученный из одного участка солидной опухоли и, чаще всего, еще до начала терапии, не отражает молекулярно-генетические особенности опухоли в реальном времени, что может привести к выбору неадекватного лечения. Получение же нескольких тканевых биоптатов сопряжено с серьезными рисками для пациента и не всегда технически возможно.

Альтернативой традиционной биопсии может быть малоинвазивная жидкостная биопсия, основанная на детекции и анализе свободно-циркулирующей ДНК (сцДНК) в крови и/или других биологических жидкостях, включая мочу, слюну, плевральную жидкость.

Свободно-циркулирующая ДНК

Впервые сцДНК в периферической крови была обнаружена в 1948 г. [6]. Она представляет собой внеклеточные двухцепочечные короткие фрагменты геномной ДНК, средняя длина которых составляет примерно 150–200 пар оснований (п. о.), что соответствует длине участка ДНК в составе нуклеосомы, и длинные отрезки (до 21 тыс. п. о.). Детали образования и высвобождения фрагментов сцДНК разной длины в системную циркуляцию пока мало изучены. Полагают, что основными путями могут быть апоптоз, некроз, клеточный лизис, фагоцитоз и активная метаболическая секреция живыми клетками [7]. Пионерскими исследованиями клинического потенциала сцДНК в области онкологии стали работы S.A. Leon и соавт. [8], V. Vasioukhin и соавт. [9] и G.D. Sorenson и соавт. [10]. S.A. Leon и соавт. обнаружили, что средняя концентрация сцДНК в сыворотке крови онкологических пациентов выше, чем у здоровых лиц (50–500 и 0–50 нг/мл соответственно), и возрастание или сохранение высокого уровня сцДНК на фоне терапии является признаком плохого прогноза [8]. Впервые в сцДНК были выявлены опухолевоспецифичные генетические мутации, что послужило доказательством того, что источником сцДНК у онкологических пациентов может быть опухоль [9, 10]. Результаты дальнейших исследований показали, что опухолевая сцДНК содержит фрагментированную ДНК не только из разных участков первичного очага, но и из метастазов различной локализации, поэтому может отражать опухолевую гетерогенность и быть предиктивным маркером при назначении терапии [11, 12]. Важное значение с точки зрения клинического применения имеет короткий период полураспада сцДНК (по разным оценкам от 16 мин до 2 ч). Быстрое выведение из циркуляции старых и высвобождение новых молекул позволяют использовать сцДНК для детекции минимальной остаточной болезни, оценки эффективности лечения, выявления рецидивов и мониторинга развития резистентности [13, 14].

Доля опухолевой сцДНК в общем пуле сцДНК варьирует от 0,01 % до более чем 90 % и зависит

как от типа опухоли, уровня васкуляризации, опухолевой массы и стадии заболевания, так и от степени воспалительного процесса и повреждения ткани [15]. Для выявления мутантных аллелей, которые у пациентов с начальными стадиями заболевания могут встречаться с частотой <0,01 %, требуются методы с высокой чувствительностью и специфичностью. Помимо генетических мутаций опухоли характеризуются изменением метилового профиля, который также может быть проанализирован с помощью сцДНК [16].

Несмотря на огромное количество работ, доказывающих, что сцДНК имеет перспективы применения в качестве биомаркера при разных типах рака, до сих пор очень мало известно о возможностях применения сцДНК при КП.

В данном обзоре мы попытались суммировать результаты имеющихся исследований сцДНК в крови пациентов с раком почки с точки зрения их значимости для клинической практики (см. таблицу).

Свободно-циркулирующая ДНК как диагностический маркер

В большинстве работ, изучавших возможности сцДНК для диагностики КП, сравнивалось количество сцДНК в сыворотке и/или плазме крови онкологических пациентов и контрольной группы, которую представляли либо здоровые лица [17–24], либо пациенты с доброкачественными опухолями почки [25]. Уровень сцДНК определялся с использованием либо количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) фрагментов различных генов длиной от 60 до 350 п. о., либо методом прямой спектрофотометрии или флуориметрии. В этих исследованиях было выявлено, что среднее значение уровня сцДНК в группе онкологических пациентов выше (иногда в несколько раз), чем в группе здоровых лиц. Статистическая обработка результатов показала, что уровень сцДНК в плазме крови позволяет с высокой специфичностью (78–97 %) дифференцировать больных и здоровых доноров, однако чувствительность этого маркера обычно не превышает 60 %. Достаточно низкая диагностическая чувствительность методов определения количества сцДНК связана со значительным разбросом значений концентраций сцДНК у пациентов в каждом отдельном исследовании. Типичным примером в этом отношении является работа R.A. Perego и соавт. [19]. В ней представлен результат измерения (по фрагменту 73 п. о. гена *бета-глобина*) количества сцДНК в плазме крови пациентов со светлоклеточной КП ($n = 54$) и здоровых доноров ($n = 41$). Несмотря на то что среднее значение количества сцДНК у пациентов гораздо выше, чем у здоровых лиц (26,4 нг/мл против 3,2 нг/мл), разброс значений в группах очень большой: у пациентов – 0,2–299,7 нг/мл, у здоровых лиц – 1,3–7,1 нг/мл. При специфичности данного анализа 97 % его чувствительность составила

63 %. Более высокие диагностические характеристики уровня сцДНК в крови были получены при использовании митохондриальных фрагментов (79 и 230 п. о.) [21]. Уровень концентрации как длинных, так и коротких фрагментов митохондриальной ДНК в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми лицами значительно повышен и позволяет отличить группы с 97 % специфичностью и 84 % чувствительностью.

Таким образом, определение количества сцДНК в плазме или сыворотке крови имеет потенциал в качестве дополнительного теста для подтверждения отсутствия КП у обследованных, поскольку специфичность теста высокая, однако использование этого параметра в качестве теста для диагностики КП представляется проблематичным из-за его низкой чувствительности.

Другим параметром для оценки опухолевоспецифичных изменений в сцДНК является так называемый индекс целостности (ИЦ) сцДНК, определяемый как соотношение количества более длинных к более коротким фрагментам ДНК.

S. Hauser и соавт., используя количественную ПЦР в реальном времени, сравнили соотношение концентраций фрагментов гена *бета-актина* длиной 384 и 106 п. о. в сцДНК сыворотки крови и показали, что ИЦ выше в группе пациентов с КП ($n = 35$), чем в группе здоровых доноров ($n = 54$) [20]. Данные об увеличении ИЦ в сыворотке крови пациентов с КП были получены и в работе F. Gang и соавт. Авторы, используя обычную ПЦР, оценили присутствие фрагментов гена *GAPDH* разной длины (109, 193, 397 и 456 п. о.) в сыворотке крови пациентов со светлоклеточной КП ($n = 78$) и здоровых доноров ($n = 42$). Короткие фрагменты (109 и 193 п. о.) были обнаружены в обеих группах, а фрагменты длиной 397 и 456 п. о. детектированы только у пациентов с КП (у 91 и 82 % пациентов соответственно) [26].

Противоположный результат, доказывающий уменьшение ИЦ сцДНК у пациентов с опухолями, получили H. Lu и соавт., которые оценили методом количественной ПЦР в реальном времени концентрацию ядерных (ген *APP*, повторяющиеся последовательности *Alu*) и митохондриальных фрагментов сцДНК различной длины в плазме крови пациентов со светлоклеточной КП и здоровых лиц [23]. Авторы показали, что ИЦ геномной сцДНК у пациентов как с локализованными, так и с метастатическими светлоклеточными КП ниже по сравнению с таковым в контрольной группе (увеличена концентрация коротких фрагментов гена *APP* размером 67 п. о. и снижена концентрация более длинных фрагментов этого гена размерами 180 и 306 п. о.).

Таким образом, несмотря на то что во всех описанных исследованиях пациенты с КП отличались по ИЦ от лиц контрольной группы, сделать вывод о диагностическом потенциале этого параметра при КП на данный момент невозможно, прежде всего

Сводная информация о проанализированных исследованиях *сцДНК* в крови пациентов с КП
Summary of studies analyzing blood *cfDNA* in patients with RCC

Год публикации, источник Year of publication, reference	Биомаркер Biomarker	Потенциальное клиническое значение Potential clinical value	Биоматериал Biomaterial	Число пациентов/число лиц контрольной группы Number of patients/number of controls	Метод детекции (геномный участок) Detection method (genomic site)	Основные результаты Main results	Чувствительность/специфичность, % Sensitivity/specificity, %
2002 [17]	Концентрация <i>сцДНК</i> Concentration of <i>cfDNA</i>				Спектрофотометрия Spectrophotometry	В среднем выше у пациентов, чем у ЗД: 94 нг/мл vs 36 нг/мл Mean value was higher in patients than in HC: 94 ng/mL vs 36 ng/mL	—/—
	Алельный дисбаланс в 9–20 хромосомных локусах Allelic imbalance in chromosomal loci 9–20	Диагностическое Diagnostic	Сыворотка Serum	53 КП/20 ЗД 53 RCC/20 HC	Фрагментный анализ Fragment analysis	Микросателлитный анализ позволяет с высокой чувствительностью выявлять опухолевоспецифичные изменения в сыворотке пациентов с КП. Частота выявления микросателлитных изменений выше у пациентов с продвинутой стадией Microsatellite analysis is a highly specific method for the detection of tumor-specific changes in serum of patients with RCC. Frequency of microsatellite changes was higher in patients with advanced disease	74–87 (в зависимости от количества анализируемых маркеров)/85 74–87 (depending on the number of markers analyzed)/85
2006 [18]	Концентрация <i>сцДНК</i> Concentration of <i>cfDNA</i>				кПЦР-РВ (<i>АСТВ</i>) qRT-PCR (<i>АСТВ</i>)	Медианное значение выше у пациентов по сравнению со ЗД: 81 (23,3–176,6) нг/мл vs 35 (3–147) нг/мл Median value was higher in patients than in HC: 81 (23,3–176,6) ng/mL vs 35 (3–147) ng/mL	—/—
	Метилирование генов <i>APC</i> , <i>FHIT</i> , <i>RASSF1</i> , <i>LRRC3B</i> , <i>VHL</i> и <i>ITGA9</i> Methylation of <i>APC</i> , <i>FHIT</i> , <i>RASSF1</i> , <i>LRRC3B</i> , <i>VHL</i> , and <i>ITGA9</i> genes	Диагностическое Diagnostic	Плазма Plasma	27 КП/15 ЗД 27 RCC/15 HC	Количественная/метилспецифическая ПЦР в реальном времени Quantitative/methylation-specific real-time PCR	Частота метилирования генов <i>APC</i> , <i>FHIT</i> , <i>RASSF1</i> и <i>LRRC3B</i> выше у пациентов, чем у ЗД Frequency of methylation of <i>APC</i> , <i>FHIT</i> , <i>RASSF1</i> , and <i>LRRC3B</i> genes was higher in patients than in HC	Индивидуальная чувствительность маркеров 0–74; специфичность 66–100. Комбинация маркеров (<i>APC</i> , <i>FHIT</i> и <i>RASSF1</i>): чувствительность 77,8–92,3; специфичность 86,7–93,3 Individual markers: sensitivity 0–74; specificity 66–100. Combination of markers (<i>APC</i> , <i>FHIT</i> , and <i>RASSF1</i>): sensitivity 77,8–92,3; specificity 86,7–93,3

Продолжение таблицы
Continuation of the table

Год публикации, источник Year of publication, reference	Биомаркер Biomarker	Потенциальное клиническое значение Potential clinical value	Биоматериал Biomaterial	Число пациентов/число лиц контрольной группы Number of patients/number of controls	Метод детекции (геномный участок) Detection method (genomic site)	Основные результаты Main results	Чувствительность/специфичность, % Sensitivity/specificity, %
2008 [19]	Концентрация сДНК Concentration of cfDNA	Диагностическое, прогностическое* Diagnostic, prognostic*	Плазма Plasma	54 скКП/41 ЗД 54 ccRCC/41 HC	кПЦР-РВ (бета-глобин) qRT-PCR (beta-globin)	Предоперационный уровень в среднем выше у пациентов по сравнению с ЗД: 26,4 ± 48,3 нг/мл vs 3,2 ± 1,5 нг/мл. Комбинированный анализ концентрации сДНК и микросателлитных изменений позволяет прогнозировать развитие рецидива Mean preoperative level was higher in patients than in HC: 26.4 ± 48.3 ng/mL vs 3.2 ± 1.5 ng/mL. Combination analysis of cfDNA concentration and microsatellite changes allows the prediction of relapses	63/97 (порог отсечения 6,1 нг/мл) 63/97 (cutoff value 6.1 ng/mL)
	Алельный дисбаланс в 5 локусах 3p Allelic imbalance in 5 loci of 3p			20 КП 20 RCC	Фрагментный анализ микросателлитных локусов до операции и в течение 26–64 мес после нее Fragment analysis of microsatellite loci preoperatively and 26–64 months postoperatively		—/—
2010 [20]	Концентрация сДНК Concentration of cfDNA	Диагностическое Diagnostic	Сыворотка Serum	35 КП/54 ЗД 35 RCC/54 HC	кПЦР-РВ (ACTB-384, ACTB-106) qRT-PCR (ACTB-384, ACTB-106)	Медианное значение выше у пациентов, чем у ЗД: ACTB-384: 1,77 нг/мл vs 0,61 нг/мл; ACTB-106: 1,31 нг/мл vs 0,77 нг/мл Median value was higher in patients than in HC: ACTB-384: 1.77 ng/mL vs 0.61 ng/mL; ACTB-106: 1.31 ng/mL vs 0.77 ng/mL	ACTB-384: 57/81 (порог отсечения 1,7 нг/мл) ACTB-106: 68/70 (порог отсечения 1,03 нг/мл) ACTB-384: 57/81 (cutoff value 1.7 ng/mL) ACTB-106: 68/70 (cutoff value 1.03 ng/mL)
	ИЦ сДНК cfDNA InI					ИЦ выше у пациентов, чем у ЗД: 1,07 vs 0,72 InI was higher in patients than in HC: 1.07 vs 0.72	—/—
2010 [26]	ИЦ сДНК cfDNA InI	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Плазма Plasma	78 скКП/42 ЗД 78 ccRCC/42 HC	кПЦР (фрагменты гена GAPDH: 109, 193, 397 и 456 п.о.) до операции и через 7 дней после нее qPCR (fragments of the GAPDH gene: 109, 193, 397, and 456 bp) preoperatively and 7 days postoperatively	Выше у пациентов с КП, чем у ЗД. Длинные фрагменты (397 и 456 п.о.) обнаружены только у пациентов. После операции их уровень снижается. Выявлена прямая корреляция ИЦ со стадией заболевания, а также с размером опухоли Higher in patients than in HC. Long fragments (397 and 456 bp) were found only in patients. Their level decreased postoperatively. Direct correlation between InI and disease stage, as well as tumor size was identified	GAPDH-397: 91/100 GAPDH-456: 88,5/100

Продолжение таблицы
Continuation of the table

Год публикации, источник Year of publication, reference	Биомаркер Biomarker	Потенциальное клиническое значение Potential clinical value	Биоматериал Biomaterial	Число пациентов/число лиц контрольной группы Number of patients/number of controls	Метод детекции (геномный участок) Detection method (genomic site)	Основные результаты Main results	Чувствительность/специфичность, % Sensitivity/specificity, %
2012 [25]	Концентрация сцДНК Concentration of cfDNA	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Сыворотка Serum	157 КП/43 пациентов с доброкачественными опухолями почки 157 RCC/43 patients with benign kidney tumors	кПЦР-РВ (<i>RNF-185</i> и <i>RNF-249</i>) qRT-PCR (<i>RNF-185</i> and <i>RNF-249</i>)	Выше у пациентов с КП, чем в контрольной группе: 3319 ± 3181 гз/мл vs 1288 ± 913 гз/мл. Высокая концентрация сцДНК ассоциирована с низкой выживаемостью (порог отсечения 2400 гз/мл) Higher in patients than in HC: 3319 ± 3181 GE/mL vs 1288 ± 913 GE/mL. High cfDNA concentration was associated with poor survival (cutoff value 2400 GE/mL)	51/93 ПЗПР: 96,4 ПЗОР: 34,2 51/93 РРВ: 96,4 NPV: 34,2
	Метилирование генов <i>VHL</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>P16</i> , <i>PTGS2</i> Methylation of <i>VHL</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>P16</i> , and <i>PTGS2</i> genes					Частота метилирования генов <i>VHL</i> и <i>RASSF1A</i> выше у пациентов с КП. <i>VHL</i> -метилирование чаще детектируется при скКП Frequency of methylation of <i>VHL</i> and <i>RASSF1A</i> genes was higher in patients with RCC. <i>VHL</i> gene methylation was more often detected in patients with ccRCC	<i>VHL</i> : 50,3/90,7 ПЗПР: 95,2 ПЗОР: 33,3 <i>RASSF1A</i> : 45,9/93 ПЗПР: 96 ПЗОР: 32 <i>VHL</i> : 50,3/90,7 РРВ: 95,2 NPV: 33,3 <i>RASSF1A</i> : 45,9/93 РРВ: 96 NPV: 32
2012 [21]	Концентрация митохондриальной сцДНК Concentration of mitochondrial cfDNA	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Сыворотка Serum	33 КП/71 ЗД 33 RCC/71 HC	кПЦР-РВ (<i>16S-79</i> , <i>16S-230</i>) qRT-PCR (<i>16S-79</i> , <i>16S-230</i>)	Медианное значение выше у пациентов с КП, чем у ЗД: <i>16S-79</i> : $0,7 \times 10^7$ ($0,1-2 \times 10^7$) копий/мл vs $0,1 \times 10^7$ ($0-0,3 \times 10^7$) копий/мл <i>16S-230</i> : $0,7 \times 10^7$ ($0-2,4 \times 10^7$) копий/мл vs $0,1 \times 10^7$ ($0-0,3 \times 10^7$) копий/мл Median value was higher in patients with RCC than in HC: <i>16S-79</i> : $0,7 \times 10^7$ ($0,1-2 \times 10^7$) copies/mL vs $0,1 \times 10^7$ ($0-0,3 \times 10^7$) copies/mL <i>16S-230</i> : $0,7 \times 10^7$ ($0-2,4 \times 10^7$) copies/mL vs $0,1 \times 10^7$ ($0-0,3 \times 10^7$) copies/mL	<i>16S-79</i> : 90,9/98,7 (порог отсечения $0,35 \times 10^7$ копий/мл) <i>16S-230</i> : 87,7/94,9 (порог отсечения $0,2 \times 10^7$ копий/мл) <i>16S-79</i> : 90,9/98,7 (cutoff value $0,35 \times 10^7$ copies/mL) <i>16S-230</i> : 87,7/94,9 (cutoff value $0,2 \times 10^7$ copies/mL)

Продолжение таблицы
Continuation of the table

Год публикации, источник Year of publication, reference	Биомаркер Biomarker	Потенциальное клиническое значение Potential clinical value	Биоматериал Biomaterial	Число пациентов/число лиц контрольной группы Number of patients/number of controls	Метод детекции (геномный участок) Detection method (genomic site)	Основные результаты Main results	Чувствительность/специфичность, % Sensitivity/specificity, %
2013 [27]	ИЦ InI	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Сыворотка Serum	33 КП/71 ЗД 33 RCC/71 HC	кПЦР-РВ (16S-79, 16S-230) qRT-PCR (16S-79, 16S-230)	ИЦ выше в группе пациентов с КП. Выявлена обратная корреляция ИЦ со стадией заболевания InI was higher in patients with RCC. Negative correlation between InI and disease stage was identified	81,8/43 (порог отсеивания 0,56) 81,8/43 (cutoff value 0,56)
	Метилирование генов APC, RASSF1, TIMP3, P16, GSTP1, ARF, RAR-beta, PTGS2 Methylation of APC, RASSF1, TIMP3, P16, GSTP1, ARF, RAR-beta, and PTGS2 genes	Диагностическое Diagnostic	Сыворотка Serum	35 КП/54 ЗД 35 RCC/54 HC	Рестрикция ДНК метилчувствительными ферментами с последующей ПЦР Digestion of DNA with methyl-sensitive restriction enzymes followed by PCR	Частота метилирования APC, RAR-beta, RASSF1, PTGS2, GSTP1 выше у пациентов с КП Frequency of methylation of APC, RAR-beta, RASSF1, PTGS2, and GSTP1 genes was higher in patients with RCC	Индивидуальная чувствительность маркеров 17,1–54,3; Специфичность 85,2–100. Комбинация маркеров (GSTP1 или PTGS2): чувствительность 62; специфичность 87 Individual markers: sensitivity 17.1–54.3; specificity 85.2–100. Combination of markers (GSTP1 or PTGS2): sensitivity 62; specificity 87
2013 [22]	Концентрация сДНК Concentration of cfDNA	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Плазма Plasma	92 скКП/44 ЗД 92 ccRCC/44 HC	кПЦР-РВ (ACTB-384) до операции и через 2–36 мес после нее qRT-PCR (ACTB-384) preoperatively and 2–36 months postoperatively	Предоперационный уровень выше у пациентов с метастатической скКП, чем у пациентов с локализованной КП и у ЗД: 6,04 ± 0,72 нг/мл vs 5,29 ± 0,53 и 0,65 ± 0,29 нг/мл соответственно. Пациенты с высоким уровнем сДНК в плазме имеют более короткий безрецидивный период, чем пациенты с низким дооперационным и постоперационным уровнем Preoperative levels were higher in patients with metastatic ccRCC than in patients with localized RCC and HC: 6.04 ± 0.72 ng/mL vs 5.29 ± 0.53 and 0.65 ± 0.29 ng/mL respectively. Patients with high plasma cfDNA levels had shorter relapse-free period than patients with low preoperative and postoperative cfDNA levels	Выявление рецидива на основе уровня сДНК 86,4/82,4 через 2 мес после нефрэктомии 100/73,5 через 12 мес после нефрэктомии 100/90,8 через 36 мес после нефрэктомии Detection of relapse based on cfDNA level 86.4/82.4 two months after nephrectomy 100/73.5 twelve months after nephrectomy 100/90.8 thirty-six months after nephrectomy

Продолжение таблицы
Continuation of the table

Год публикации, источник Year of publication, reference	Биомаркер Biomarker	Потенциальное клиническое значение Potential clinical value	Биоматериал Biomaterial	Число пациентов/число лиц контрольной группы Number of patients/number of controls	Метод детекции (геномный участок) Detection method (genomic site)	Основные результаты Main results	Чувствительность/специфичность, % Sensitivity/specificity, %
2013 [28]	Концентрация сцДНК Concentration of cfDNA	Предиктивное** Predictive**	Плазма Plasma	18 пациентов с метастатической скКП, получающих лечение сорафенибом 18 patients with metastatic ccRCC receiving sorafenib	кПЦР-РВ (ACTB-384) до начала лечения и через 4, 8, 12, 16 и 24 нед после начала терапии qRT-PCR (ACTB-384) before treatment initiation and 4, 8, 12, 16, and 24 weeks after treatment initiation	У пациентов в ремиссии уровень сцДНК в плазме с 8-й по 24-ю неделю значительно снижается по сравнению с таковым у пациентов, у которых заболевание прогрессирует Patients in remission had lower plasma cfDNA levels from week 8 to week 24 compared to patients with progressive disease	67/100 на 8-й неделе 67/100 on week 8
2016 [23]	Концентрация и целостность митохондриальной и ядерной сцДНК Concentration and integrity of mitochondrial and nuclear cfDNA	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Плазма Plasma	145 скКП / 84 пациентов с метастатической скКП / 40 ЗД 145 ccRCC / 84 patients with metastatic ccRCC / 40 HC	кПЦР-РВ (APR1-67, APR2-180, APR3-306, Mito1-65, Mito2-175, SINE1-79, SINE2-248) qRT-PCR (APR1-67, APR2-180, APR3-306, Mito1-65, Mito2-175, SINE1-79, SINE2-248)	Концентрация APR3-306 у пациентов с КП ниже, чем у ЗД. Концентрация митохондриальных фрагментов выше в группе с метастатической скКП, чем с локализованными КП. ИЦ снижается в ряду контроль–локализованная КП–метастатическая КП. Использование маркеров повышает точность диагноза и прогноза после нефрэктомии Concentration of APR3-306 was lower in RCC patients than in HC. Concentration of mitochondrial fragments was higher in patients with metastatic ccRCC than in patients with localized RCC. InI decreased in the row control–localized RCC–metastatic RCC. The assessment of biomarkers increased the accuracy of diagnosis and prognosis after nephrectomy	Дискриминация между группами больных и ЗД: 58–70/78–90. Между группами с локализованными опухолями и ЗД: 55–70/88–90. Между группами с локализованными и метастатическими опухолями: 67–85/65–75 Discrimination between patients and HC: 58–70/78–90. Between patients with localized tumors and HC: 55–70/88–90. Between patients with localized tumors and patients with metastatic tumors: 67–85/65–75

Продолжение таблицы
Continuation of the table

Год публикации, источник Year of publication, reference	Биомаркер Biomarker	Потенциальное клиническое значение Potential clinical value	Биоматериал Biomaterial	Число пациентов/число лиц контрольной группы Number of patients/number of controls	Метод детекции (геномный участок) Detection method (genomic site)	Основные результаты Main results	Чувствительность/специфичность, % Sensitivity/specificity, %
2017 [29]	Метилирование <i>PCDH17</i> <i>PCDH17</i> gene methylation	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Сыворотка Serum	142 КР/34 ЗД 142 RCC/34 HC	Метилспецифическая ПЦР Methylation-specific PCR	Наличие метилированных аллелей коррелирует с плохим прогнозом Presence of methylated alleles correlated with poor prognosis	57,7/100
2017 [30]	Мутационный профиль Mutation profile	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Плазма Plasma	34 пациента с метастатической КР 34 patients with metastatic RCC	Таргетное секвенирование на основе NGS (73 гена) Targeted NGS (73 genes)	Выявление мутаций и их число коррелирует с размером опухоли Mutations and their number correlated with the tumor size	—/—
2017 [31]	Мутационный профиль Mutation profile	Предиктивное Predictive	Плазма Plasma	1 пациент с метастатической ск КР с эффективным ответом на ниволумаб 1 patient with metastatic ccRCC who responded to nivolumab	Таргетное секвенирование на основе NGS (73 гена) Targeted NGS (73 genes)	В сдНД перед началом иммунотерапии выявлено >6 генетических мутаций. Положительный ответ на иммунотерапию коррелирует с исчезновением генетических мутаций в сдНД Before immunotherapy, >6 genetic mutations were detected in cfDNA. Response to immunotherapy correlated with genetic mutations disappearance from cfDNA	—/—
2017 [32]	Мутационный профиль Mutation profile	Предиктивное Predictive	Плазма Plasma	220 пациентов с метастатической КР 220 patients with metastatic RCC	Таргетное секвенирование на основе NGS (73 гена) Targeted NGS (73 genes)	Мутации обнаружены у 78,6 % пациентов. Показано изменение мутационного профиля сдНД между 1-й и 2-й линиями терапии, чаще всего в генах <i>TP53</i> , <i>VHL</i> , <i>NFI</i> , <i>EGFR</i> и <i>PIK3CA</i> Mutations were detected in 78.6 % of patients. There was a change in cfDNA mutation profile between first- and second-line therapy, most frequently in genes <i>TP53</i> , <i>VHL</i> , <i>NFI</i> , <i>EGFR</i> , and <i>PIK3CA</i>	—/—

Продолжение таблицы
Continuation of the table

Год публикации, источник Year of publication, reference	Биомаркер Biomarker	Потенциальное клиническое значение Potential clinical value	Биоматериал Biomaterial	Число пациентов/число лиц контрольной группы Number of patients/number of controls	Метод детекции (геномный участок) (genomic site)	Основные результаты Main results	Чувствительность/специфичность, % Sensitivity/specificity, %
2018 [24]	Концентрация сцДНК Concentration of cfDNA	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Плазма Plasma	92 скКП/41 ЗД 92 ccRCC/41 HC	кПЦР-РВ (ACTB-106) qRT-PCR (ACTB-106)	Медианное значение выше, чем в контрольной группе: 3803 копий/мл vs 2242 копий/мл Median value was higher in patients than in controls: 3803 copies/mL vs 2242 copies/mL	63/78 (на основе уровня сцДНК, порог отсеечения 2878 копий/мл) 63/78 (based on cfDNA level; cutoff value 2878 copies/mL)
	Размер сцДНК Size of cfDNA				Электрофорез Agilent bioanalyzer 2100 Electrophoresis using the Agilent bioanalyzer 2100	Медианный размер меньше, чем в контрольной группе: 170 (141–181) п.о. vs 171 (164–181) п.о. Пациенты с сцДНК размером <166 п.о. имеют меньшую выживаемость без прогрессирования Patients had shorter fragments than controls: 170 (141–181) bp vs 171 (164–181) bp. Patients with cfDNA <166 bp had lower progression-free survival	33/95 (на основе длины, порог отсеечения 166 п.о.) 33/95 (based on the length of DNA fragments; cutoff value 166 bp)
2019 [33]	Концентрация сцДНК Concentration of cfDNA	Диагностическое, прогностическое, предиктивное Diagnostic, prognostic, predictive	Плазма Plasma	53 скКП 53 ccRCC	Флуориметрия Fluorimetry	Выявление опухолевоспецифических мутаций в цДНК и ее высокая фрагментация ассоциированы с более коротким безрецидивным периодом и более низкой выживаемостью.	—/—
	Размер сцДНК Size of cfDNA				Электрофорез Agilent bioanalyzer 2100 Electrophoresis using the Agilent bioanalyzer 2100	Выявлены снижение частоты мутантных аллелей в цДНК после операции и возобновление роста при прогрессировании заболевания Tumor-specific mutations in cfDNA and its high fragmentation were associated with a shorter relapse-free period and poorer survival. There was a reduction in the frequency mutant alleles in cfDNA after surgery and its increase in case of disease progression	
	Мутационный профиль Mutation profile				Таргетное секвенирование на основе NGS (48 генов) Targeted NGS (48 genes)		

Окончание таблицы
End of the table

Год публикации, источник Year of publication, reference	Биомаркер Biomarker	Потенциальное клиническое значение Potential clinical value	Биоматериал Biomaterial	Число пациентов/число лиц контрольной группы Number of patients/number of controls	Метод детекции (геномный участок) Detection method (genomic site)	Основные результаты Main results	Чувствительность/специфичность, % Sensitivity/specificity, %
2019 [34]	Метилирование тела гена <i>SHOX2</i> <i>SHOX2</i> gene body methylation	Диагностическое, прогностическое Diagnostic, prognostic	Плазма Plasma	100 КП 100 RCC	Количественная/метилспецифическая ПЦР Quantitative/methylation-specific PCR	Уровень метилирования <i>SHOX2</i> в сДНК положительно коррелирует с уровнем <i>SHOX2</i> -мРНК в опухолевой ткани, со стадией заболевания и агрессивностью опухоли There was a positive correlation between <i>SHOX2</i> gene methylation level in cfDNA and level of mRNA in tumor tissue, as well as disease stage, and tumor aggressiveness	—/—
2020 [35]	Мутационный профиль Mutation profile	Прогностическое, предиктивное Prognostic, predictive	Плазма Plasma	91 КП 91 RCC	Таргетное и полногеномное секвенирование Targeted and whole genome sequencing	Частота выявления опухолевой сДНК в плазме увеличивается с увеличением размера опухоли. Снижение уровня опухолевой сДНК в плазме ассоциировано с ремиссией или ответом на терапию, увеличение — с прогрессированием заболевания Frequency of cfDNA detection in plasma increased with the increase of tumor size. Reduction in plasma cfDNA level was associated with remission or response to therapy, whereas its increase was associated with disease progression	—/—

* Прогностическое значение маркера — возможность оценить безрецидивную и общую выживаемость.

** Предиктивное значение маркера — возможность предсказать эффект от лечения.

Примечание. сДНК — свободно-циркулирующая ДНК; КП — карцинома почки; ЗД — здоровый донор; ПЦР — полимеразная цепная реакция; к ПЦР — количественная ПЦР; к ПЦР-РВ — количественная ПЦР в реальном времени; ск КП — светлоклеточная карцинома почки; ИЦ — индекс целостности; п.о. — пар оснований; гз/мл — геном эквивалент/мл; ПЗПР/ПЗОР — прогностическая значимость положительного/отрицательного результата; NGS — секвенирование нового поколения.

* Prognostic value of biomarker reflects the possibility to evaluate relapse-free and overall survival.

** Predictive value of biomarker reflects the possibility to predict the effect of treatment.

Note. cfDNA — circulating cell-free DNA; RCC — renal cell carcinoma; HC — healthy controls; PCR — polymerase chain reaction; q-PCR — quantitative PCR; qRT-PCR — quantitative real-time PCR; ccRCC — clear-cell renal cell carcinoma; InI — integrity index; bp — base pair; GE/mL — genome equivalent/mL; PPV/NPV — positive predictive value/negative predictive value; NGS — next-generation sequencing.

из-за ограниченного количества публикаций. Неоднозначные результаты об изменении ИЦ сцДНК крови были получены и при других опухолях, в том числе одной локализации [36–39]. Например, у пациентов с раком молочной железы в одной работе было выявлено увеличение ИЦ сцДНК в плазме крови по сравнению с контрольной группой [36], в другой – снижение [39]. В первой работе ИЦ оценивался по соотношению концентрации фрагментов *бета-актина* длиной 400 и 100 п. о., в другой – по соотношению концентраций длинных и коротких фрагментов повторяющихся последовательностей *Alu* (260 и 111 п. о.) и *LINE* (266 и 97 п. о.).

В описанных исследованиях, изучавших диагностическое значение концентрации и ИЦ сцДНК, измерялся общий пул сцДНК, включающий фрагменты ДНК как из опухолевых клеток, так и из нормальных. Опухоловоспецифичная сцДНК составляет только небольшую часть всей сцДНК в крови (как указывалось выше, иногда <0,01 %), однако несомненно имеет больший клинический потенциал, чем тотальная, поскольку представляет собой доступный источник генетического материала, ассоциированного с опухолью. Поэтому разработка высокочувствительных методов детекции опухолевой сцДНК является приоритетной задачей в области исследований возможности использования сцДНК в качестве биомаркера в онкологической практике.

В 1994 г. были опубликованы 2 работы, в которых авторы впервые смогли обнаружить онкоспецифичные мутации в плазме крови пациентов с лейкемией (в онкогене *N-ras*) [9] и в плазме и сыворотке крови пациентов с карциномой поджелудочной железы (в онкогене *K-ras*) [10]. С тех пор спектр опухолеассоциированных изменений, выявляемых при анализе сцДНК крови у пациентов с разными видами рака, значительно расширился (амплификации, структурные перестройки, микросателлитная нестабильность, абберантное метилирование).

Работ, исследующих возможности использования сцДНК для идентификации молекулярно-генетических нарушений, ассоциированных с патогенезом КП, в настоящее время опубликовано значительно меньше, чем для опухолей других локализаций, таких как колоректальный рак, рак мочевого пузыря, рак легкого, рак молочной железы. В большинстве работ, исследующих диагностический потенциал сцДНК при КП, анализируется метилирование разных генов.

Так, I. Skrypkina и соавт. оценили в сцДНК из плазмы крови уровень метилирования промоторов генов опухолевой супрессии: *APC*, *FHIT*, *RASSF1*, *LRRC3B*, *VHL* и *ITGA9*. Было обнаружено, что у пациентов с КП частота выявления метилированных аллелей некоторых генов значительно выше, чем в группе здоровых доноров: *LRRC3B* 74,1 % против 33,3 %, *APC* 51,9 % против 6,7 %, *FHIT* 55,6 % против 0 % и *RASSF1*

63,0 % против 6,7 % соответственно. Однако каждый биомаркер в отдельности имел низкую чувствительность и/или специфичность, поэтому оценка метилирования только одного гена не имеет диагностической значимости. Авторами было показано, что комбинация маркеров (например, *APC*, *FHIT* и *RASSF1*) позволяет улучшить диагностические характеристики теста [18]. S. Nauser и соавт., используя панель других генов, также сделали вывод о том, что только комбинация метилированных генов может иметь диагностическое значение [27]. Например, комбинированный анализ метилирования генов *GSTP1* (кодирует фермент глутатион-S-трансферазу Р) и *PTGS2* (простагландин-эндопероксид синтаза 2) позволяет дифференцировать группы пациентов с опухолями и здоровых лиц с чувствительностью 62,9 % и специфичностью 87 %. Определение метилирования сцДНК может быть маркером для предоперационной гистологической классификации опухоли. Было показано, что у пациентов со светлоклеточной карциномой метилирование гена *VHL* в сыворотке выявляется чаще, чем у пациентов с папиллярной и хромофобной КП [25].

В ряде работ показана возможность использования в диагностических целях микросателлитного анализа сцДНК [17, 19]. Так, R. von Knobloch и соавт. смогли детектировать аллельный дисбаланс микросателлитов, идентичный опухолевому, в сцДНК из сыворотки у 74 % пациентов с КП, используя 9 микросателлитных маркеров. Чувствительность метода достигала 87 % при увеличении количества анализируемых маркеров до 20. Специфичность метода составила 85 %.

Стоит заметить, что в большинстве опубликованных работ оценивались только чувствительность и специфичность теста, однако в контексте скрининга более информативными для клинической практики, особенно в случае малораспространенных заболеваний, являются такие показатели, как прогностическая значимость положительного/отрицательного результата [40].

Описанные работы показывают, что сцДНК при КП может быть дополнительным источником диагностической информации. Вариабельность между результатами исследований разных лабораторий не позволяет на этом этапе транслировать полученные данные в клиническую практику. Различия в полученных результатах могут быть связаны как с биологическими, так и с техническими факторами, такими как подготовка пациента перед взятием крови, использование разного диагностического материала (сыворотка или плазма крови), разное время от забора образца до его анализа, применение разных методов и реактивов для выделения сцДНК и ее анализа. Для решения этой проблемы требуется стандартизация протоколов исследования, а также аналитическая валидация

методов анализа сцДНК на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах [41, 42].

Свободно-циркулирующая ДНК как прогностический маркер безрецидивной и общей выживаемости

На настоящий момент опубликовано несколько работ, указывающих на корреляционную связь уровня сцДНК с выживаемостью пациентов с локализованной КП после нефрэктомии. J. Wan и соавт. оценили возможности сцДНК для прогнозирования рецидива после проведения нефрэктомии у 76 пациентов с локализованной КП [22]. В исследовании использовалась стратегия последовательного забора образцов крови, причем первый получали до операции, следующий — через 2 мес после нее, а последующие — с периодичностью в 6 мес в течение 34 мес. Методом ПЦР в реальном времени фрагмента гена *бета-глобина* определялось количество сцДНК в образцах плазмы крови. В исследовании было показано, что начиная со 2-го месяца после нефрэктомии количество сцДНК значительно ниже в образцах пациентов без рецидива, чем пациентов с рецидивом заболевания. Чувствительность теста начиная со 2-го месяца наблюдения колебалась в пределах 86–91 %, а специфичность — 82–100 %. Используя регрессионную модель Кокса, авторы показали, что количество сцДНК является прогностическим маркером безрецидивной выживаемости пациентов после нефрэктомии, независимым от патоморфологических параметров (стадии TNM, размера опухоли и градации ядер по Фурману).

Во всех остальных опубликованных работах анализировалась только сцДНК, выделенная до операции. H. Lu и соавт., используя количественную ПЦР в реальном времени, измерили дооперационный уровень сцДНК в плазме крови 145 пациентов с локализованной светлоклеточной КП, проходивших лечение с 2005 по 2012 г. и наблюдавшихся после операции до 2014 г. [23]. В работе была определена концентрация фрагментов разной длины гена *APP* (APP1-67, APP2-180 и APP3-306), последовательностей *Alu* (SINE1-79 и SINE2-248) и митохондриальной ДНК (Mito1-65 и Mito2-175). Полученные данные сопоставили с такими клиническими показателями, как общая выживаемость и интервал безрецидивной выживаемости. Авторами было установлено, что концентрация фрагмента SINE1-79 в плазме крови может быть независимым (от патоморфологических параметров) маркером общей выживаемости, а концентрация фрагментов Mito1-65 и SINE1-79, а также коэффициент соотношения количества APP3/APP2 — маркерами безрецидивной выживаемости пациентов после нефрэктомии [23]. Y.L. Lin и соавт. показали, что выявление в предоперационном периоде в сыворотке крови метилирования промотора гена *PCDH17* (опухолевый супрессор) является фактором неблагоприятного прогноза. Эти пациенты имели

более низкие показатели безрецидивной и 5-летней общей выживаемости [29]. Еще в одном исследовании со схожим дизайном была выявлена корреляция уровня метилирования в плазме крови фрагмента гена *SHOX2* с общей выживаемостью [34].

Суммируя результаты этих исследований, необходимо отметить, что несмотря на выявление в отдельных исследованиях статистически значимой взаимосвязи между концентрацией или метилированием определенных фрагментов геномной и митохондриальной ДНК во фракции сцДНК в крови и выживаемостью пациентов с локализованной КП, для оценки прогностической значимости этих потенциальных маркеров необходимы мультицентровые исследования.

Свободно-циркулирующая ДНК как маркер чувствительности к таргетной терапии и иммунотерапии

Несмотря на то что таргетная терапия метастатического рака почки является сегодня стандартом лечения, назначение таргетных препаратов проводится на основе клинико-морфологических характеристик опухоли, а не персонализировано, с учетом генетических и эпигенетических особенностей ее патогенеза у конкретного пациента. Для мониторинга генетических изменений в опухоли на фоне терапии необходим анализ последовательных образцов опухоли, отобранных в ходе лечения. Забор повторных и тем более последовательных биопсийных проб у пациента в большинстве случаев невыполним. С этим связан тот факт, что в настоящее время практически нет данных о том, как изменяется молекулярный профиль опухоли почки и метастазов на фоне лечения и как эти изменения связаны с развитием резистентности к лечебным препаратам. При этом стратегия последовательного забора образцов крови с последующим секвенированием сцДНК для выявления опухолевоспецифичных генетических мутаций, связанных с устойчивостью к некоторым таргетным препаратам, а также с появлением рецидивов после радикальной терапии, была успешно применена для разных типов опухолей, включая опухоли молочной железы, яичников, легкого [12], поджелудочной железы [43], кишечника [44].

S.K. Pal и соавт. было выполнено первое исследование, в котором динамика генетических изменений в сцДНК в ходе лечения пациентов с метастатической КП была изучена методом секвенирования нового поколения (NGS) [32]. Авторы проанализировали сцДНК у 220 пациентов между 1-й (сунитиниб и пазопаниб) и последующей (ниволумаб, эверолимус, акситиниб и кабозантиниб) линиями терапии и пришли к выводу о том, что сцДНК может быть эффективным инструментом для получения в режиме реального времени данных о генетических изменениях, сопровождающих прогрессию опухоли. Выявленные мутации могут быть

биологическим обоснованием для назначения терапии. Например, только у 3 % пациентов до начала терапии 1-й линии была выявлена мутация в гене *NF1*, но после 1-й линии терапии мутации в гене *NF1* были обнаружены уже у 21 % пациентов. Ген *NF1* кодирует отрицательный регулятор mTOR-сигнального пути, поэтому выявление этой мутации может быть маркером повышенной чувствительности КП к эверолимусу.

Кроме обнаружения специфических генетических мутаций клиническое значение может иметь и такой параметр, как изменение частоты выявления мутаций на фоне терапии. Исчезновение мутированных аллелей генов *VHL*, *TERT*, *ARID1A*, *ERBB2* и *TP53* наблюдали в сцДНК плазмы крови у пациента с метастатической формой КП в ходе эффективной терапии ниволумабом [31]. Авторы другого исследования, изучая динамику изменения мутационного профиля опухолевой сцДНК у 14 пациентов с метастатической КП, пришли к выводу о том, что по изменению частоты выявления мутантных аллелей в сцДНК в ходе лечения можно оценивать эффективность комплексной терапии [35].

Однако опубликованы и работы, в которых не выявлено корреляции опухолевой сцДНК с ответом на терапию [30]. В исследовании участвовали 28 пациентов с метастатической КП разных гистологических вариантов, получавших VEGF-направленную и/или иммуно- и/или таргетную терапию. Сравнивались 2 группы: у пациентов 1-й группы ($n = 16$) была обнаружена опухолевая сцДНК в плазме крови, у больных 2-й группы ($n = 12$) — нет. Существенных различий в ответах на терапию между группами не отмечено [30].

В работе G. Feng и соавт. было показано, что эффективность терапии сорафенибом у пациентов с метастатической КП можно оценивать по изменению концентрации тотальной сцДНК в плазме крови в ходе лечения [28]. Установлено, что пациенты, у которых на фоне лечения в плазме крови сохранялся высокий уровень сцДНК, имели плохой прогноз. У пациентов в ремиссии в сравнении с пациентами, у которых заболевание прогрессировало, за весь период наблюдения (с 8 до 24 нед) сохранялся низкий уровень сцДНК. С помощью ROC-анализа авторы определили, что по уровню сцДНК, измеренному на 8-й неделе после начала лечения сорафенибом, можно с 67 % чувствительностью и 100 % специфичностью (при пороге отсечения 5,019 нг/мл) предсказать вероятность прогрессирования заболевания.

Имеющиеся данные показывают, что анализ сцДНК при КП может иметь клиническую ценность, но для того, чтобы эти результаты транслировать в клиническую практику, требуются дополнительные исследования.

Между опубликованными работами имеются значительные различия. Так, если S.K. Pal и соавт. выявили мутации в сцДНК у 78,6 % из 220 пациентов с метастатической КП [32], то M.C. Maia и соавт. обнаружили мутации только у 53 % из 34 пациентов [30]. Yamamoto и соавт. смогли выявить мутантную сцДНК только у 30 % из 53 пациентов [33], а C.G. Smith и соавт. — у 27,5 % из 91 [35]. Разный дизайн этих исследований не позволяет сравнить полученные результаты. Малое количество фракции опухолевой сцДНК требует разработки высокочувствительных методов и алгоритмов детекции. Эффективным подходом для выявления опухолевой сцДНК может быть секвенирование, совмещенное с иммунопреципитацией (cfMeDIP-seq) [45]. Возможности такого подхода для КП продемонстрированы K. Lasseter и соавт., которые показали, что использование метода cfMeDIP-seq увеличивает чувствительность и специфичность детекции опухолевой сцДНК в плазме крови пациентов с метастатической КП более чем в 1,5 раза [46]. Методом таргетного секвенирования опухолевая сцДНК была обнаружена только у 21 % из 34 пациентов. С использованием метода cfMeDIP-seq опухолевая сцДНК была детектирована у всех 34 пациентов (чувствительность 100 %, специфичность 88 %).

Заключение

Имеющиеся данные показывают, что сцДНК открывает новые возможности для диагностики и персонализированного лечения пациентов с КП. Такие параметры сцДНК, как ее концентрация, характер фрагментации, мутационный и эпигенетический профиль, могут стать малоинвазивным источником диагностической, прогностической и предиктивной информации. Кроме этого, поскольку сцДНК отражает динамику опухолевого процесса в период лечения, то сцДНК может быть маркером для раннего выявления рецидивов и мониторинга эффективности лечения. Последние 2 клинических параметра представляются наиболее многообещающими областями применения сцДНК при КП. Однако надо отметить, что несмотря на большое количество уже обнаруженных потенциальных сцДНК биомаркеров, все они были выявлены в единичных, главным образом ретроспективных исследованиях с относительно небольшим размером выборки. Для внедрения этих маркеров в онкологическую практику требуются разработка стандартных протоколов исследования и валидация аналитических методик для тестирования сцДНК. Клиническое значение маркеров должно быть подтверждено в мультицентровых исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019;144(8):1941–53. DOI: 10.1002/ijc.31937.
2. Carril-Ajuria L., Santos M., Roldán-Romero J.M. et al. Prognostic and predictive value of PBRM1 in clear cell renal cell carcinoma. *Cancers* 2020;12(1):16. DOI: 10.3390/cancers1201001.
3. Hsieh J.J., Chen D., Wang P.I. et al. Genomic biomarkers of a randomized trial comparing first-line everolimus and sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2017;71(3):405–14. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.10.007.
4. 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. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205.
5. Turajlic S., Xu H., Litchfield K. et al. Tracking cancer evolution reveals constrained routes to metastases: TRACERx renal. *Cell* 2018;173(3):581–94.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.057.
6. Mandel P., Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguine chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142:241–3.
7. Thierry A.R., El Messaoudi S., Gahan P.B. et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016;35(3):347–76. DOI: 10.1007/s10555-016-9629-x.
8. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646–50. PMID: 837366.
9. Vasioukhin V., Anker P., Maurice P. et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86(4):774–9. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x.
10. Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H. et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3(1):67–71.
11. Chan K.C., 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 Chem* 2013;59(1):211–24. DOI: 10.1373/clinchem.2012.196014.
12. Murtaza M., Dawson S.J., Tsui D.W. et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497(7447):108–12. DOI: 10.1038/nature12065.
13. Bettgowda C., Sausen M., Leary R.J. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra24. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094.
14. Heitzer E., Haque I.S., Roberts C.E., Speicher M.R. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 2019;20(2):71–88. DOI: 10.1038/s41576-018-0071-5.
15. Barlebo Ahlborn L., Østrup O. Toward liquid biopsies in cancer treatment: application of circulating tumor DNA. *APMIS* 2019;127(5):329–36. DOI: 10.1111/apm.12912.
16. Roy D., Tiirikainen M. Diagnostic power of DNA methylation classifiers for early detection of cancer. *Trends Cancer* 2020;6(2):78–81. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.12.006.
17. Von Knobloch R., Hegele A., Brandt H. et al. High frequency of serum DNA alterations in renal cell carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *Int J Cancer* 2002;98(6):889–94. DOI: 10.1002/ijc.10263.
18. Skrypkina I., Tsyba L., Onyshchenko K. et al. Concentration and methylation of cell-free DNA from blood plasma as diagnostic markers of renal cancer. *Dis Markers* 2016;2016:3693096. DOI: 10.1155/2016/3693096.
19. Perego R.A., Corizzato M., Brambilla P. et al. Concentration and microsatellite status of plasma DNA for monitoring patients with renal carcinoma. *Eur J Cancer* 2008;44(7):1039–47. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.03.008.
20. Hauser S., Zahalka T., Ellinger J. et al. Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with renal cell cancer. *Anticancer Res* 2010;30(7):2785–9.
21. Ellinger J., Müller D.C., Müller S.C. et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urol Oncol* 2012;30(4):509–15. DOI: 10.1016/j.urolonc.2010.03.004.
22. Wan J., Zhu L., Jiang Z., Cheng K. Monitoring of plasma cell-free DNA in predicting postoperative recurrence of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Int* 2013;91(3):273–8. DOI: 10.1159/000351409.
23. Lu H., Busch J., Jung M. et al. Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients. *Clin Chim Acta* 2016;452:109–19. DOI: 10.1016/j.cca.2015.11.009.
24. Yamamoto Y., Uemura M., Nakano K. et al. Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2018;9(29):20467–75. DOI: 10.18632/oncotarget.24943.
25. de Martino M., Klatte T., Haitel A., Marberger M. Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: a diagnostic and prognostic marker. *Cancer* 2012;118(1):82–90. DOI: 10.1002/cncr.26254.
26. Gang F., Guorong L., An Z. et al. Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum. *Urology* 2010;75(2):262–5. DOI: 10.1016/j.urology.2009.06.048.
27. Hauser S., Zahalka T., Fechner G. et al. Serum DNA hypermethylation in patients with kidney cancer: results of a prospective study. *Anticancer Res* 2013;33(10):4651–6.
28. Feng G., Ye X., Fang F. et al. Quantification of plasma cell-free DNA1 in predicting therapeutic efficacy of sorafenib on metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Dis Markers* 2013;34(2):105–11. DOI: 10.3233/DMA-120950.
29. Lin Y.L., Wang Y.P., Li H.Z., Zhan X. Aberrant promoter methylation of PCDH17 (Protocadherin 17) in serum and its clinical significance in renal cell carcinoma. *Med Sci Monit* 2017;23:3318–23. DOI: 10.12659/msm.902077.
30. Maia M.C., Bergerot P.G., Dizman N. et al. Association of circulating tumor DNA (ctDNA) detection in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with tumor burden. *Kidney Cancer* 2017;1(1):65–70. DOI: 10.3233/KCA-170007.
31. Dizman N., Bergerot P., Bergerot C. et al. Exceptional response to nivolumab rechallenge in metastatic renal cell carcinoma with parallel changes in genomic profile. *Eur Urol* 2018;73(2):308–10. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.08.006.
32. Pal S.K., Sonpavde G., Agarwal N. et al. Evolution of circulating tumor DNA profile from first-line to subsequent therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2017;72(4):557–64. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.03.046.
33. Yamamoto Y., Uemura M., Fujita M. et al. Clinical significance of the mutational landscape and fragmentation of circulating tumor DNA in renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2019;110(2):617–28. DOI: 10.1111/cas.13906.
34. Jung M., Ellinger J., Gevensleben H. et al. Cell-free SHOX2 DNA methylation in blood as a molecular staging parameter for risk stratification in renal cell carcinoma patients: a prospective observational cohort study. *Clin Chem* 2019;65(4):559–68. DOI: 10.1373/clinchem.2018.297549.

35. Smith C.G., Moser T., Mouliere F. et al. Comprehensive characterization of cell-free tumor DNA in plasma and urine of patients with renal tumors. *Genome Med* 2020;12(1):23. DOI: 10.1186/s13073-020-00723-8
36. Wang B.G., Huang H.Y., Chen Y.C. et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res* 2003;63(14):3966–8.
37. Jiang W.W., Zahurak M., Goldenberg D. et al. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int J Cancer* 2006;119(11):2673–6. DOI: 10.1002/ijc.22250.
38. Umetani N., Kim J., Hiramatsu S. et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or perianapillary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006;52(6):1062–9. DOI: 10.1373/clinchem.2006.068577.
39. Madhavan D., Wallwiener M., Bents K. et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Brest Cancer Res Treat* 2014;146(1):163–74. DOI: 10.1007/s10549-014-2946-2.
40. Fiala C., Diamandis E.P. Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Med* 2018;16(1):166. DOI: 10.1186/s12916-018-1157-9.
41. Merker J.D., Oxnard G.R., Compton C. et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 2018;36(16):1631–41. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.8671.
42. Ralla B., Stephan C., Meller S. et al. Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014;51(4):200–31.
43. Wei T., Zhang Q., Li X. et al. Monitoring tumor burden in response to FOLFIRINOX chemotherapy via profiling circulating cell-free DNA in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2019;18(1):196–203. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1298. DOI: 10.3109/10408363.2014.914888.
44. Reinert T., Schöler L.V., Thomsen R. et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* 2016;65(4):625–34. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308859.
45. Shen S.Y., Singhanian R., Fehring G. et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature* 2018;563(7732):579–83. DOI: 10.1038/s41586-018-0703-0.
46. Lasseter K., Nassar A.H., Hamieh L. et al. Plasma cell-free DNA variant analysis compared with methylated DNA analysis in renal cell carcinoma. *Genet Med* 2020;22(8):1366–73. DOI: 10.1038/s41436-020-0801-x.

Вклад авторов

Е.И. Якубович: написание разделов обзора: «введение», «свободно-циркулирующая ДНК как прогностический маркер безрецидивной и общей выживаемости», «свободно-циркулирующая ДНК как маркер чувствительности к таргетной терапии и иммунотерапии», составление таблицы;

А.Г. Полищук: написание разделов обзора: «свободно-циркулирующая ДНК», «свободно-циркулирующая ДНК как диагностический маркер»;

В.И. Евтушенко: участие в редактировании и написании финальной версии обзора.

Authors' contributions

E.I. Yakubovich: drafted sections “Background”, “Cell-free DNA as a prognostic marker for relapse-free and overall survival”, “Cell-free DNA as a marker of sensitivity to targeted therapy and immunotherapy”, and compiled the table;

A.G. Polishchuk: drafted sections “Cell-free DNA” and “Cell-free DNA as a diagnostic marker”;

V.I. Evtushenko: participated in manuscript editing and preparing the final version of the review.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.И. Якубович / E.I. Yakubovich: <https://orcid.org/0000-0002-0107-5413>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 07.07.2020. Принята к публикации: 08.09.2020.

Article submitted: 07.07.2020. Accepted for publication: 08.09.2020.