

Т.Н. Соколова^{1,4}, Т.А. Лайдус^{1,2}, Р.И. Меерович³, К.А. Загороднев^{1,2}, А.С. Мартыанов^{1,2},
М.М. Холматов^{1,2}, В.И. Тюрин^{1,2}, А.А. Романько^{1,2}, М.О. Анисимова², О.Л. Власова⁴,
Е.Ш. Кулигина¹, Г.А. Янус^{1,2}

Технические аспекты «жидкостной биопсии»: влияние физиологических и преаналитических параметров на уровень циркулирующей опухолевой ДНК

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург,

³ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», Санкт-Петербург,

⁴Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

«Жидкостная биопсия» — одно из наиболее популярных направлений молекулярной онкологии. Суть данной процедуры сводится к детекции и мониторингу опухоль-специфических маркеров в различных жидкостях организма (крови, моче, плевральной жидкости и т.д.). Значительные усилия направлены на то, чтобы перевести в неинвазивный формат наиболее востребованные мутационные тесты, в частности, анализ генов *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* и т.д. Тем не менее, несмотря на чрезвычайную привлекательность, «жидкостная биопсия» пока не может рутинно применяться в диагностической деятельности, т.к. не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью. Данное исследование направлено на улучшение операционных характеристик этого метода в отношении карцином толстой кишки (РТК), легкого (РЛ) и меланом, содержащих клинически значимые мутации (*KRAS*: нуклеотидные замены в кодонах 12, 13, 61, 146; *EGFR*: ex19del и L858R; *BRAF*: V600E). С помощью цифровой-капельной ПЦР (ddPCR) 417 образцов плазмы от 88 пациентов было протестировано на предмет наличия соответствующих опухолевых мутаций в циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК). Присутствие в плазме «мутантных» копий генов было зафиксировано в 32/57 (56%) РТК, 7/14 (50%) РЛ и в 4/17 (24%) случаях меланомы. Среди пациентов с отдаленными метастазами доля «плазма-позитивных» случаев была выше, чем в группе с локализованным процессом [34/56 (61%) vs. 5/15 (33%), $p = 0.058$]. У 86 пациентов имелись серийные образцы плазмы, полученные, как минимум, в двух разных временных точках (9.00 и 16.00), до и после физической нагрузки, натощак и после приема пищи. Количественный анализ цоДНК в

серийных образцах позволил сделать заключение о том, что циркадианные ритмы и указанные физиологические параметры не оказывают заметного влияния на концентрацию цоДНК в крови онкологических пациентов. Выполненные эксперименты, тем не менее, продемонстрировали наличие существенной вариабельности уровня цоДНК в плазме больных, в том числе у одного и того же пациента, в течение относительно коротких промежутков времени. Это обстоятельство диктует необходимость выполнять серийный забор материала и повторных испытаний для случаев, когда успех «жидкостной биопсии» имеет решающее значение для последующего принятия клинически важных решений.

Ключевые слова: Жидкостная биопсия, преаналитические факторы, ddPCR, рак толстой кишки, рак легкого, меланома, драйверные мутации, *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*

Введение

«Жидкостная биопсия» — одно из наиболее популярных направлений молекулярной онкологии. Суть данной процедуры сводится к детекции и мониторингу опухоль-специфических маркеров (единичных трансформированных клеток, нуклеиновых кислот, белков) в различных жидкостях организма (крови, моче, плевральной жидкости и т.д.). Не прекращаются попытки использовать «жидкостную биопсию» в целях ранней диагностики злокачественных новообразований. Однако наиболее близкими к внедрению в клиническую практику представляются менее амбициозные, но весьма значимые приложения: мониторинг течения заболевания в ходе терапии, а также неинвазивное выполнение рутинных диагностических тестов, в частности, анализ генов *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* и т.д. (рис. 1). Тем

не менее, на пути реализации потенциала «жидкостной биопсии» лежат серьезные препятствия, состоящие в ограниченной чувствительности и специфичности соответствующих биомаркеров и методик их определения. Внедрение в практику новых методов генетического анализа, таких как капельная цифровая ПЦР (ddPCR, digital droplet PCR) и сверхточные разновидности высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS) радикально расширило технические возможности выявления опухоль-специфических мутаций или иных aberrаций нуклеиновых кислот среди пула циркулирующих в плазме крови ДНК и РНК. Однако, невзирая на впечатляющие технологические достижения последних лет, низкое количество опухолевой ДНК, циркулирующей в плазме, по-прежнему остается лимитирующим фактором.

Усовершенствование и стандартизация методики сбора и процессинга биологического материала может оказаться очень важным шагом на пути к успеху «жидкостной биопсии». Парадоксально, но изучению влияния технических особенностей забора клинического материала, протоколов подготовки плазмы и методов выделения нуклеиновых кислот на достоверность и эффективность анализа плазменных опухолевых ДНК-маркеров посвящено крайне малое число работ. Остается неизвестным, существуют ли какие-то особенности физиологического статуса пациента, связанные с повышением или снижением представленности циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) в плазме на момент забора материала. Вместе с тем, за рамками онкологии известен целый ряд примеров подобных закономерностей, связанных с изменением характеристик пула циркулирующих в плазме нуклеиновых кислот.

В проведенной работе систематизированы данные из литературных источников и собственные наблюдения о зависимости уровня цоДНК от клинико-патологических свойств опухоли и о влиянии преаналитических факторов на эффективность детекции опухоль-специфических мутаций в плазме крови онкологических больных.

Процессинг и экстракция нуклеиновых кислот

Полагают, что для выделения цоДНК плазма крови более пригодна, чем сыворотка, поскольку она в меньшей степени контаминирована ДНК «дикого типа» [14, 29]. Традиционно первостепенное внимание всегда уделялось тщательному соблюдению правил сбора и хранения биологического материала на этапах, предшествующих выделению свободных циркулирующих нуклеиновых кислот. Было показано, что многие пре-

аналитические особенности процессинга материала могут существенно менять концентрацию искомого продукта, искажать результаты молекулярного анализа и снижать чувствительность скрининга мутаций [12, 21, 30]. Применение специальных контейнеров для получения бесклеточных циркулирующих нуклеиновых кислот (PAXgene Blood ccfDNA Tube (Qiagen) или cf-DNA/cf-RNA Preservative Tubes (Norgen)) предотвращает гемолиз и снижает контаминацию опухолевой ДНК продуктами разрушения «нормальных» клеток [19]. При использовании стандартных пробирок К2 с EDTA, необходима оперативная сепарация плазмы: промежуток времени более 4-8 часов между забором крови и центрифугированием крайне неблагоприятно влияет на концентрацию цоДНК [13], что особенно вредно, если в дальнейшем планируется применять секвенирование нового поколения [11]. Условия центрифугирования крови, как выяснилось, не имеют большого значения. Стандартный протокол сепарации подразумевает два последовательных центрифугирования — 10 минут 2000 об/мин при комнатной температуре и 10 минут 12400 об/мин при 4°C. После этого супернатант аликвотируют по 1 мл и хранят при -70°C [7, 16, 25].

«Свежие» и замороженные на -70°C образцы плазмы в равной мере пригодны для экстракции нуклеиновых кислот [17]. Chan et al. [5] изучали вопрос, каким образом образование сгустков крови, повторное замораживание и размораживание влияют на степень фрагментации цоДНК и её концентрацию. Оказалось, что критическим деструктивным моментом является повторное замораживание плазмы на этапах, предшествующих выделению нуклеиновых кислот. Сравнительный анализ коммерческих наборов реагентов для выделения низко- и высокомолекулярной фракций бесклеточной ДНК из плазмы крови показал отличные операционные характеристики китов QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN); Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Midi Kit (Norgen Biotek Corp.) Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega) [6, 17].

Влияние физиологического статуса больного на эффективность «жидкостной биопсии»

Существуют данные о том, что физическая нагрузка увеличивает в 2-18 раз уровень циркулирующих ДНК у здоровых испытуемых [2, 3], причем в большей степени этот эффект наблюдается в ситуации поражения сосудов [28]. В отношении онкологических больных этот вопрос совершенно не изучался. Meddeb et al. [18] выяснили, что у больных раком толстой кишки



Рис. 1. Применение «жидкостной биопсии» в онкологической практике

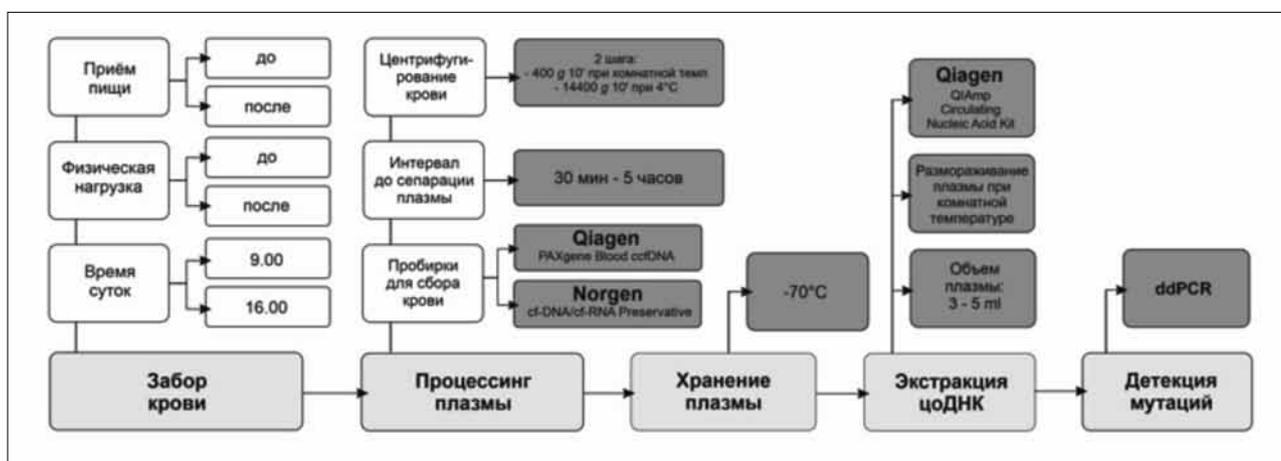


Рис. 2. Схема набора и процессинга материала для «жидкостной биопсии»

(РТК) интервал между употреблением пищи и забором крови также как пол и возраст, существенно не влияют на концентрацию свободно циркулирующих мутированных ДНК. Сомнение в этом исследовании вызывает выбор метода для детекции мутаций — количественная ПЦР, не самый оптимальный метод для прецизионного количественного анализа низкокопийных матриц. Имеется только одна работа, посвященная связи циркадианных ритмов и представленности циркулирующей ДНК в плазме онкологических больных [27]. Авторы исследовали небольшие группы больных РТК, в выявленной вариабельности им не удалось усмотреть закономерностей. Учитывая тот факт, что корреляция с циркадианными ритмами наблюдается для экспрессии приблизительно в 15% всего транскриптома человека, предполагать такую связь можно небезосновательно, особенно в отношении экспрессии микроРНК [8]. У здоровых индивидуумов отмечено падение уровня циркулирующих ДНК к полдню, а затем возрастание к 6 часам вечера [18]. Эти и другие сведения позволяют предположить наличие существенной вариабельности уровня цодНК в плазме больных, в том числе у одного и того же пациента, в зависимости от физиологического статуса и времени суток.

Мы выполнили исследование, направленное на изучение влияния перечисленных параметров преаналитического этапа на успех «жидкостной биопсии» и улучшения операционных характеристик этого метода в отношении РТК, рака легкого (РЛ) и меланом, содержащих клинически значимые мутации KRAS, EGFR, BRAF.

Материалы и методы

Больные РКТ, РЛ и меланомой, включенные в исследование, проходили лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» и ГБУЗ «СПб КНПцСВМП(о)» в период с августа 2017 по декабрь 2019 года. 57 пациентов с KRAS/NRAS/BRAF-позитивным РТК, 14 пациентов с EGFR-позитивным РЛ и 17 пациентов с BRAF-позитивной меланомой были привлечены к созданию коллекции серийных образцов плазмы, различавшихся по времени забора крови (утро, день и вечер) и физиологическому состоянию пациента (до/после физической нагрузки; до/после приема пищи). Схема набора и процессинга биологического материала представлена на рис. 2. 10-15 мл цельной периферической крови забирали в специальные пробирки для получения бесклеточных циркулирующих нуклеиновых кислот PAXgene Blood ccfDNA Tube (Qiagen) или cf-DNA/cf-RNA Preservative Tubes (Norgen). Во всех случаях для получения плазмы был использован стандартный протокол сепарации [Madic et al., 2015]. Выделение циркулирующих нуклеиновых кислот проводилось с помощью специализированного коммерческого набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN).

С помощью цифровой капельной ПЦР (ddPCR) было протестировано 417 образцов «плазменной» цоДНК от 88 пациентов. Для ddPCR были использованы коммерческие наборы реактивов для детекции мутаций в кодонах 12, 13, 61, 146 генов *KRAS/NRAS*, ddPCR BRAF V600 Screening Kit (BioRad), а также праймеры и флуоресцентно-меченные зонды (TaqMan) собственной разработки для детекции точковой мутации L858R и делеций в 19 экзоне гена *EGFR*. Реакцию проводили с помощью системы QX200 Droplet Digital PCR (BioRad). Каждое тестирование выполнялось в трех повторностях: положительный мутантный статус присваивали образцу, если хотя бы в двух испытаниях детектировали мутантные капли: > 2 капли на реакцию ddPCR для локусов *EGFR*, *KRAS* и *NRAS*; для локуса *BRAF* было достаточно наличия единственной мутантной капли. Указанные значения LOB (limits of blank) были установлены в серии предварительных экспериментов на образцах плазмы, заведомо негативных по взятой мутации.

Для анализа ассоциаций клинических параметров и наличия в плазме опухоль-специфической мутации использовали точный критерий Фишера; для сопоставления концентрации мутантных копий в разных вариантах сбора плазмы применяли ранговый критерий Уилкоксона для парных измерений. Все вычисления производились с помощью статистического пакета IBM SPSS v. 26.

Результаты и обсуждение

Присутствие в плазме «мутантных» копий генов, соответствующих свободно циркулирующей ДНК опухолевого происхождения, было зафиксировано в 32/57 (56%) РТК, 7/14 (50%) РЛ и в 4/17 (24%) случаях меланомы. Максимальная конкордантность «опухоль-плазма» по мутационному статусу гена *KRAS* составила 28/44 (64%) в группе метастатических колоректальных карцином, что несколько ниже показателей, описанных другими исследователями (80-89%) [26, 34]. По-видимому, в нашем случае высокий процент «плазма-негативных» пациентов объясняется тем, что значительная доля таких больных (19/45, 42%) на момент сдачи крови находилась в процессе интенсивной противоопухолевой терапии и демонстрировала выраженный ответ на воздействие препаратов. Известно, что на фоне стабилизации опухолевого роста часто наблюдается снижение уровня цоДНК в плазме [23, 20]. Кроме того, полагают, что концентрация цоДНК зависит от многих параметров: размера первичной опухоли, наличия регионарных и отдаленных метастазов, степени злокачественности, интенсивности метаболических процессов в неопластической ткани [1, 4, 31]. Пациенты, участвовавшие в данном исследовании, представляли собой разнородную в этом плане группу. Мы проанализировали связь между «выявляемостью» мутаций в плазме и клинико-патологическими характеристиками пациентов (рис. 3).

Мы не обнаружили зависимости между наличием «циркулирующей» мутации в плазме и раз-

мером первичной опухоли (Т) или присутствием метастазов в регионарных лимфатических узлах (N0 vs. N1-3) ($p = 0.496$ и $p = 0.227$, соответственно). Среди пациентов с отдаленными метастазами (M1) доля «плазма-позитивных» случаев была значительно выше, чем в группе с локализованным процессом (34/56 (61%) vs. 5/15 (33%), $p = 0.058$, точный критерий Фишера), что вполне ожидаемо и согласуется с наблюдениями, сделанными другими исследователями [26, 33, 34].

У 86 пациентов имелись серийные образцы плазмы, полученные, как минимум, в двух разных временных точках (9.00 и 16.00), до и после физической нагрузки, натощак и после приема пищи. Эта коллекция послужила для анализа зависимости концентрации циркулирующих в плазме нуклеиновых кислот от «физиологического» состояния больного и циркадианных ритмов (рис. 4).

53 пациента сдали кровь дважды в течение одного дня — в 9.00 и в 16.00. 18 больных имели положительные результаты мутационных тестов в обоих замерах, один пациент был «негативным» утром, но изменил свой статус на «положительный» после полудня. Всего 14/19 индивидуумов продемонстрировали возрастание количества мутантных копий в плазме в течение дня. Прирост концентрации составил от 22% до 1907% от утреннего уровня, однако эта тенденция не достигла статистической значимости (Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0.107$).

У 74 больных забор крови выполняли натощак и через 30 мин. после легкого завтрака. В 17 случаях оба измерения были «положительными», еще у двух пациентов мутация обнаружилась в плазме после приема пищи. В целом, сравнение концентрации мутантных копий в парных образцах показало, что только в 8/19 случаях прием пищи приводит к увеличению уровня цоДНК, это наблюдение не имело статистической достоверности (Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0.243$).

78 пациентам было предложено сдать кровь до и после умеренной физической нагрузки (подъем по лестнице на 2 пролёта). У 18 больных мутацию детектировали в обеих парных пробах. Оказалось, что это испытание в половине случаев (9/18) сопровождается возрастанием уровня цоДНК в плазме, у оставшихся — к его снижению (Wilcoxon Signed Rank Test, $p = 0.948$).

Таким образом, количественный анализ «циркулирующих» мутантных копий позволил сделать заключение о том, что время забора крови, физическая нагрузка и прием пищи не оказывают однозначного влияния на концентрацию цоДНК в плазме крови. Следовательно,

при выполнении диагностики методом «жидкостной биопсии» данными параметрами можно пренебречь и осуществлять забор материала в произвольном режиме. Интересно, что у 24/86 (28%) больных, сдавших серийные образцы плазмы, наличие циркулирующей мута-

ции было зафиксировано только в отдельных пробах, что иллюстрирует нестабильный характер данного теста и указывает на то, что «успех» жидкостной биопсии во многом зависит от ряда неизвестных неконтролируемых факторов.

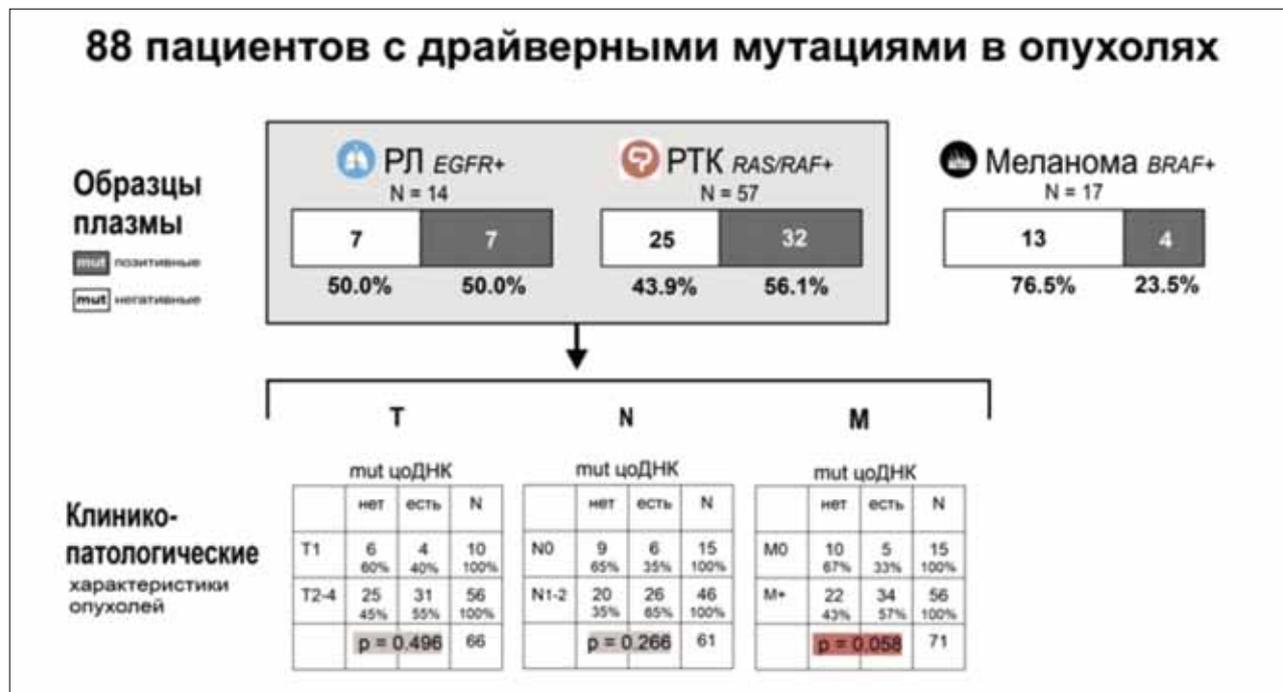


Рис. 3. Зависимость между «выявляемостью» драйверных опухолевых мутаций в плазме и клинико-патологическими характеристиками пациентов. Пациенты с метастатической меланомой были исключены из анализа, поскольку представляли собой селективную группу

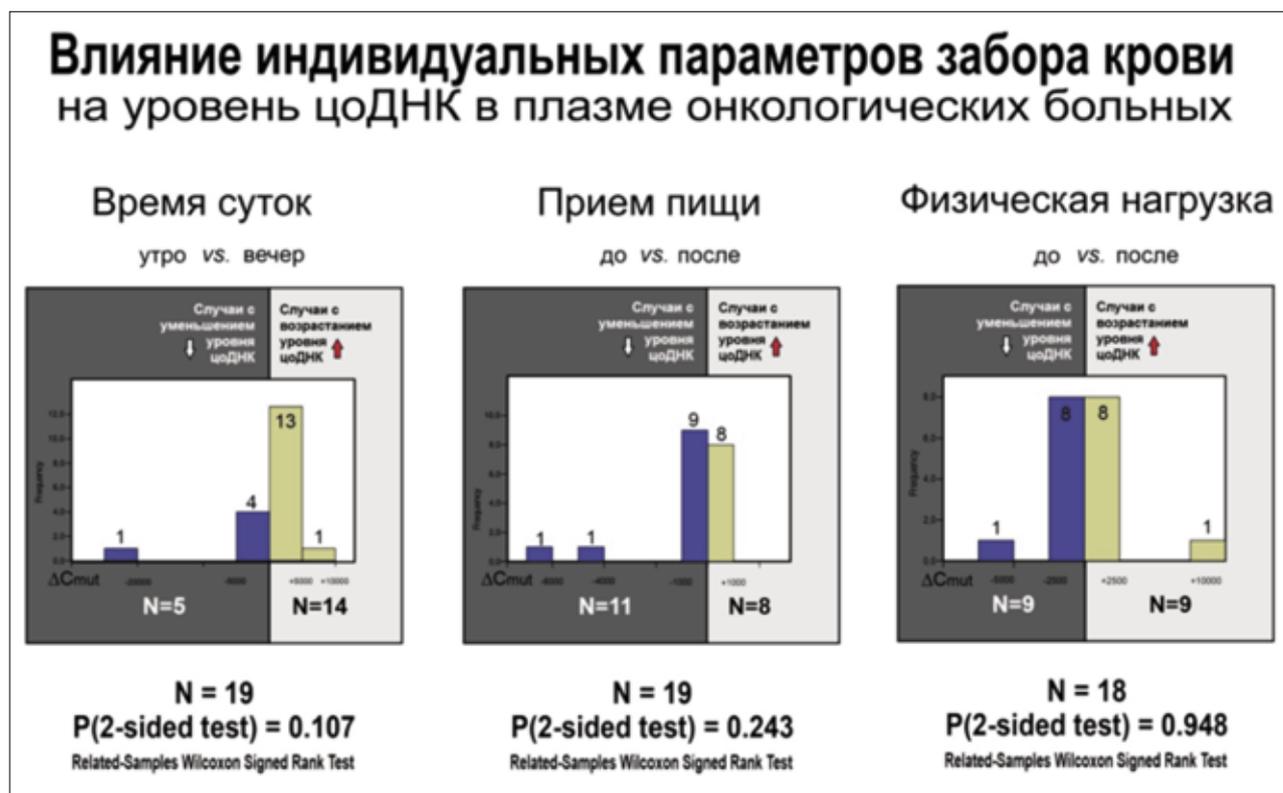


Рис. 4. Зависимость концентрации циркулирующих в плазме нуклеиновых кислот от «физиологического» состояния больного и циркадианных ритмов

Заключение

Достижения в разработке методов «жидкостной биопсии» очень впечатляют и дают основания надеяться, что молекулярная диагностика на основе циркулирующих ДНК-маркеров в скором будущем преодолеет ключевые ограничения «традиционной» биопсии, будет адаптирована к нуждам повседневной клинической практики и позволит с помощью неинвазивных и доступных методов получать необходимую информацию о генетических характеристиках опухоли на разных стадиях онкологического заболевания. Мы оптимизировали и адаптировали к стандартным лабораторным условиям протокол детекции опухоль-специфических мутаций в плазме пациентов с РТК, РЛ и меланомой с помощью ddPCR. Нам не удалось зафиксировать закономерностей влияния конкретных параметров забора материала — времени суток, физической нагрузки и приема пищи — на уровень цоДНК. Выполненные эксперименты, тем не менее, продемонстрировали наличие существенной вариабельности уровня цоДНК в плазме больных, в том числе у одного и того же пациента, в течение относительно коротких промежутков времени. Это обстоятельство диктует необходимость выполнять серийный забор биологического материала и повторных испытаний для случаев, когда успех «жидкостной биопсии» имеет решающее значение для последующего принятия клинически важных решений. Подобный подход может частично снять проблему недостаточной чувствительности «жидкой биопсии» в случае исчезающе низких концентраций циркулирующей матрицы.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-75-10070.

ЛИТЕРАТУРА

- Abbosh C., Birkbak N.J., Wilson G.A. et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution // *Nature*. — 2017. — Vol. 545. — P. 446-451.
- Atamaniuk J., Vidotto C., Tschan H. et al. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise // *Clin Chem*. — 2004. — Vol. 50. — № 9. — P. 1668-1670.
- Breitbach S., Tug S., Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology // *Sports Med*. — 2012. — Vol. 42. — № 7. — P. 565-586.
- Calapre L., Giardina T., Robinson C. et al. Locus-specific concordance of genomic alterations between tissue and plasma circulating tumor DNA in metastatic melanoma // *Mol Oncol*. — 2018. — Vol. 13. — № 2. — P. 171-184.
- Chan K.C., Yeung S.W., Lui W.B. et al. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood // *Clin Chem*. — 2005. — Vol. 51. — P. 781-784.
- Diefenbach R.J., Lee J.H., Kefford R.F., Rizos H. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA // *Cancer Genet*. — 2018. — Vol. 228. — P. 21-27.
- Diehl F., Schmidt K., Choti M.A. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics // *Nat Med*. — 2008. — Vol. 14. — P. 985-990.
- Dierickx P., Van Laake L.W., Geijsen N. Circadian clocks: from stem cells to tissue homeostasis and regeneration // *EMBO Rep*. — 2018. — Vol. 19. — P. 18-28.
- El Messaoudi S., Mouliere F., Du Manoir S. et al. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care // *Clin Cancer Res*. — 2016. — Vol. 22. — № 12. — P. 3067-3077.
- Galot R., van Marcke C., Helaers R. et al. Liquid biopsy for mutational profiling of locoregional recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma // *Oral Oncol*. — 2020. — Vol. 104. — P. 104631.
- Guo Q., Wang J., Xiao J. et al. Heterogeneous mutation pattern in tumor tissue and circulating tumor DNA warrants parallel NGS panel testing // *Mol Cancer*. — 2018. — Vol. 17. — № 1. — P. 131.
- Haselmann V., Ahmad-Nejad P., Geilenkeuser W.J. et al. Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA) // *Clin Chem Lab Med*. — 2018. — Vol. 56. — № 2. — P. 220-228.
- Jung M., Klotzek S., Lewandowski M. et al. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples // *Clin Chem*. — 2003. — Vol. 49. — P. 1028-1029.
- Lee J.S., Kim M., Seong M.W. et al. Plasma vs. serum in circulating tumor DNA measurement: characterization by DNA fragment sizing and digital droplet polymerase chain reaction // *Clin Chem Lab Med*. — 2020. — Vol. 58. — P. 527-532.
- Ma F., Guan Y., Yi Z., Chang L. et al. Assessing tumor heterogeneity using ctDNA to predict and monitor therapeutic response in metastatic breast cancer // *Int J Cancer*. — 2020. — Vol. 146. — № 5. — P. 1359-1368.
- Madic J., Kiialainen A., Bidard F.-C. et al. (2015), Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients // *Int. J. Cancer*. — 2015. — Vol. 136. — P. 2158-2165.
- Markus H., Contente-Cuomo T., Farooq M. et al. Evaluation of pre-analytical factors affecting plasma DNA analysis // *Sci Rep*. — 2018. — Vol. 8. — № 1. — P. 7375.
- Meddeb R., Dache Z.A.A., Thezenas S. et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans // *Sci Rep*. — 2019. — Vol. 9. — № 1. — P. 5220.
- Nikolaev S., Lemmens L., Koessler T. et al. Circulating tumoral DNA: Preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory // *Anal Biochem*. — 2018. — Vol. 542. — P. 34-39.
- Osumi H., Shinozaki E., Takeda Y. et al. Clinical relevance of circulating tumor DNA assessed through deep sequencing in patients with metastatic colorectal cancer // *Cancer Med*. — 2019. — Vol. 8. — № 1. — P. 408-417.
- Parpart-Li S., Bartlett B., Popoli M. et al. The Effect of Preservative and Temperature on the Analysis of Circulating Tumor DNA // *Clin Cancer Res*. — 2017. — Vol. 23. — P. 2471-2477.
- Parsons H.A., Rhoades J., Reed S.C. et al. Sensitive Detection of Minimal Residual Disease in Patients Treated for Early-Stage Breast Cancer // *Clin Cancer Res*. — 2020.

23. Reece M., Saluja H., Hollington P. et al. The Use of Circulating Tumor DNA to Monitor and Predict Response to Treatment in Colorectal Cancer // *Front Genet.* — 2019. — Vol. 10. — P. 1118.
24. Siravegna G., Mussolin B., Buscarino M. et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients // *Nat Med.* — 2015. — Vol. 21. — P. 795-801.
25. Sorber L, Zwaenepoel K, Jacobs J, et al. Circulating Cell-Free DNA and RNA Analysis as Liquid Biopsy: Optimal Centrifugation Protocol // *Cancers (Basel).* — 2019. — Vol. 11. — № 4. — P. 458.
26. Spindler K.L., Pallisgaard N., Appelt A.L. et al. Clinical utility of KRAS status in circulating plasma DNA compared to archival tumour tissue from patients with metastatic colorectal cancer treated with anti epidermal growth factor receptor therapy // *Eur J Cancer.* — 2015. — Vol. 51. — P. 2678-2685.
27. Tith K., Patai V., Kalmr A. et al. Circadian Rhythm of Methylated Septin 9, Cell-Free DNA Amount and Tumor Markers in Colorectal Cancer Patients // *Pathol Oncol Res.* — 2017. — Vol. 23. — P. 699-706.
28. Tug S., Tross A.K., Hegen P. et al. Acute effects of strength exercises and effects of regular strength training on cell free DNA concentrations in blood plasma // *PLoS One.* — 2017. — Vol. 12. — № 9. — P. e0184668.
29. Valle A., Marcq M., Bizieux A. et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients // *Lung Cancer.* — 2013. — Vol. 82. — P. 373-374.
30. van Ginkel J.H., van den Broek D.A., van Kuik J. et al. Preanalytical blood sample workup for cell-free DNA analysis using Droplet Digital PCR for future molecular cancer diagnostics // *Cancer Med.* — 2017. — Vol. 6. — № 10. — P. 2297-2307.
31. Vidal J., Muinelo L., Dalmases A. et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients // *Ann Oncol.* — 2017. — Vol. 28. — P. 1325-1332.
32. Vrabel D., Sedlarikova L., Besse L. et al. Dynamics of tumor-specific cfDNA in response to therapy in multiple myeloma patients // *Eur J Haematol.* — 2020. — Vol. 104. — № 3. — P. 190-197.
33. Wu X., Li J., Gassa A., Buchner D. et al. Circulating tumor DNA as an emerging liquid biopsy biomarker for early diagnosis and therapeutic monitoring in hepatocellular carcinoma // *Int J Biol Sci.* — 2020. — Vol. 16. — № 9. — P. 1551-1562.
34. Xie W., Xie L., Song X. The diagnostic accuracy of circulating free DNA for the detection of KRAS mutation status in colorectal cancer: A meta-analysis // *Cancer Med.* — 2019. — Vol. 8. — № 3. — P. 1218-1231.
35. Yi X., Ma J., Guan Y. et al. The feasibility of using mutation detection in ctDNA to assess tumor dynamics // *Int J Cancer.* — 2017. — Vol. 140. — № 12. — P. 2642-2647.

*T.N. Sokolova^{1,4}, T.A. Laidus^{1,2}, R.I. Meerovich³,
K.A. Zagorodnev^{1,2}, A.S. Martianov^{1,2},
M.M. Kholmatov^{1,2}, V.I. Turin^{1,2}, A.A. Romanko^{1,2},
M.O. Anisimova², O.L. Vlasova⁴, E.S. Kuligina¹,
G.A. Yanus^{1,2}*

**Technical aspects of liquid biopsy:
influence of preanalytical parameters
on the concentration of circulating tumor DNA
in plasma of cancer patients**

¹FSBI «N.N. Petrov NMRC of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russia, St. Petersburg,

²St.Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg,

³State Budgetary Healthcare Institution «Saint-Petersburg clinical scientific and practical center for specialised types of medical care (oncological)», St. Petersburg,

⁴Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg

«Liquid biopsy» is gradually becoming a mandatory procedure in cancer diagnostics. The aim of this procedure is to detect and monitor tumor-specific markers in various body fluids (blood, urine, pleural fluid, etc.). Significant efforts have been made to convert the most common mutational tests (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*) into non-invasive procedures. Despite some advantages, «liquid biopsy» is still not equivalent to traditional tissue analysis due to limited sensitivity and specificity; it cannot be routinely used in cancer medicine until the standardization of pre-analytical procedures is agreed. We intend to improve the performance of liquid biopsy for detection of a number of clinically relevant mutations (*EGFR*: ex19del and L858R; *KRAS*: 12, 13, 61, 146 codon nucleotide substitutions; *BRAF*: V600E). 417 plasma samples obtained from 88 patients (*KRAS/NRAS/BRAF*-mutated colorectal cancer (CRC): n = 57; *EGFR*-mutated lung adenocarcinomas (LC): n = 14; *BRAF*-mutated melanoma: n = 17) were analyzed by ddPCR for the presence of corresponding mutations in the circulating tumor DNA (ctDNA). Presence of tumor-specific mutations in plasma was confirmed in 32/57 (56%) CRC, 7/14 (50%) LC, and 4/17 (24%) melanoma cases. The proportion of mutation-positive plasma cases was tended to be higher in the group of patients with distant metastases compared to subjects with localized disease [34/56 (61%) vs. 5/15 (33%), p = 0.058]. 86 patients provided their blood at 9.00 (morning) and at 16.00 (afternoon). In addition, blood-takes were performed before and 15 minutes after usual breakfast as well as before and 15 minutes after moderate physical exercise. The detection rate of cancer-specific mutations in plasma was not significantly correlated with described above circumstances of blood-take. Meanwhile, the noticeable inpatient variability of circulating mutation success rate has been detected. Thus, depending on clinical circumstances, at least negative ctDNA tests could be advised to be repeated in some patients, in order to ensure the reliability of results.

Key words: liquid biopsy, preanalytical parameters, ddPCR, colorectal cancer, lung cancer, melanoma, *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*

Поступила в редакцию 28.04.2020 г.