

Г.А. Янус<sup>1,2</sup>, Т.А. Лайдус<sup>1</sup>, К.А. Загороднев<sup>2</sup>, А.С. Мартьянов<sup>2</sup>, Т.Н. Соколова<sup>1,3</sup>,  
С.Н. Алексахина<sup>1,2</sup>, Е.Ш. Кулигина<sup>1,2</sup>, Е.Н. Имянитов<sup>1,2</sup>

## Перспективы анализа циркулирующей опухолевой ДНК для нужд практической онкологии: достижения и нерешённые проблемы

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

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

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Попытки выявить в крови и иных биологических жидкостях изменения, сопутствующие ходу опухолевого процесса, имеют очень давнюю историю. Однако, реальная возможность мониторировать поведение опухоли в режиме «реального времени» появилась лишь с возникновением высокоточных методов ДНК-анализа. Следует разделить два направления в рамках этого раздела современной онкологии: 1) попытки раннего выявления опухолей среди условно здоровых лиц, а также 2) применение «жидкостной биопсии» у пациентов с уже выявленным онкологическим заболеванием для широкого круга задач: диагностики рецидивов, контроля эффективности лечения и т.д.

Можно констатировать, что первое направление пока не дало результатов, пригодных для массового внедрения в практику. Тем не менее, ошеломляют технологические достижения в совершенствовании аналитических показателей применяемых модификаций высокопроизводительного секвенирования. Вызывают интерес нестандартные подходы, основанные на использовании недавно открытых особенностей фрагментации циркулирующей опухолевой ДНК плазмы, комбинирование различных методов. Второе, менее амбициозное направление «жидкостной биопсии», оказывается значительно ближе к использованию в клинике. Этот подход уже широко применяется для такой актуальной задачи, как неинвазивное выявление мутаций T790M в гене EGFR у больных метастатическим раком легкого, получающих ингибиторы EGFR. Помимо практических достижений, в рамках изучения различных аспектов «жидкостной биопсии» удается получить ценные фундаментальные сведения, например, касательно паттернов (моделей или путей) возникновения резистентности к противоопухолевому лечению и динамики ее обратного развития после смены линии терапии.

**Ключевые слова:** жидкостная биопсия; онкомаркеры; циркулирующая опухолевая ДНК

### Введение

«Жидкостная биопсия» является малоинвазивным инструментом детекции в биологических жидкостях организма различных онкомаркеров — белковых молекул, циркулирующих раковых клеток, фрагментов бесклеточной опухолевой ДНК и РНК, экзосом и везикул, нуклеопротеиновых комплексов и др. [1, 2]. Белковые маркеры, в определенной мере специфичные для опухолей (такие как раковый эмбриональный антиген (СЕА), ПСА при раке простаты, альфа-фетопроtein при карциноме печени, СА15-3 при раке молочной железы и др.), а также сам факт циркуляции клеток опухоли в кровяном русле у пациентов с распространенными формами новообразований известны уже на протяжении десятков лет [3, 4, 5]. Подробно описаны и многочисленные недостатки подобных маркеров, ограничивающие их использование в диагностических тестах. Например, уровень белковых молекул зачастую колеблется из-за различных физиологических изменений в организме вне зависимости от прогрессии опухоли, а циркулирующие опухолевые клетки трудно дифференцировать от других клеточных элементов крови.

Гораздо более пригодным объектом для молекулярно-генетического и количественного анализа оказались фрагменты свободно циркулирующих в крови фрагментов ДНК опухолевых клеток (цоДНК). Лимитирующим фактором для развития этого направления «жидкостной биопсии» являются методические затруднения, вызванные крайне низкой концентрацией опухолевых-специфических фрагментов в плазме крови. Техническая возможность сколько-нибудь надежного выявления опухолевых-специфических мутаций или иных aberrаций нуклеиновых кислот среди пула циркулирующих в плазме крови

ДНК и РНК появилась относительно недавно. Это связано с возникновением новых методов генетического анализа, в частности, капельной цифровой ПЦР (droplet digital PCR) и сверхточных разновидностей высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS). В данной работе систематизированы сведения о перспективах использования анализа цоДНК в клинической онкологии.

### **Происхождение, состав и динамика цоДНК в периферической крови онкологических пациентов**

В плазме крови онкологических больных, наряду с бесклеточной ДНК опухолевого происхождения, циркулируют фрагменты генома разнообразных «здоровых» клеток. В норме львиная доля циркулирующей ДНК несет признаки гемопоэтического происхождения. Суммарная концентрация свободных плазменных ДНК варьирует от 0-5 до >1000 нг/мл у больных раком и 0 — 100 нг/мл у здоровых индивидуумов [6]. Как полагают, циркулирующая бесклеточная ДНК, в основном, высвобождается в кровоток из клеток, подвергшихся апоптозу [6, 7]. Как правило, размер молекул свободной ДНК, получившихся в результате каспаза-зависимой фрагментации, составляет 167 п.о. [8, 9]. Предполагается, что такие фрагменты ДНК, попавшие в плазму, защищены от действия ферментов нуклеосомами. Обнаружилось, что фракция циркулирующей бесклеточной ДНК опухолевого происхождения неоднородна по составу и отличается от «нормальной». Основная ее масса состоит из укороченных фрагментов (<145 п.о.) [10], причем фрагменты, несущие опухоль-специфические мутации, имеют меньший размер, чем фрагменты с аллелями «дикого типа» [11, 12].

Кроме продуктов апоптотического распада клеток, в плазме циркулируют также необычно длинные фрагменты 250-320 п.о. [9]. В основе высвобождения в кровь таких крупных обломков опухолевого генома лежат, по-видимому, альтернативные механизмы — некроз, фагоцитоз, экзоцитоз и/или активный выброс [6].

Время полужизни циркулирующих бесклеточных ДНК в периферическом русле варьирует от 16 мин до 2,5 часов [13, 14]. Механизмы элиминации цоДНК понятны не вполне, но есть основания полагать, что ключевую роль в этом процессе выполняет фермент DNase I [15, 16]. Скорость деградации зависит также от ассоциации циркулирующих фрагментов с плазменными белками и везикулами [6], что, в свою очередь, связано с физиологическими параметрами крови — температурой, рН и др. [17]. Кроме того,

есть сведения, что цоДНК могут взаимодействовать с поверхностными клеточными рецепторами, подвергаться обратному захвату и транспортироваться в ядро [18, 19].

Доля мутированных фрагментов цоДНК в общем пуле бесклеточных нуклеиновых кислот сильно варьирует от случая к случаю — от 0.003% до 95% [20] — и зависит, прежде всего, от размеров и патофизиологических особенностей опухоли. Итоговая концентрация цоДНК в плазме крови является результатом баланса между интенсивностью высвобождения и скоростью деградации: очевидно, ее уровень связан и с физиологическими параметрами организма.

Раннее выявление злокачественных новообразований при помощи «жидкостной биопсии».

Наиболее амбициозная задача, стоящая перед «жидкостной биопсией», состоит в ранней неинвазивной диагностике опухолей [21, 22, 23]. Очевидно, что единого ДНК-маркера для различных новообразований не существует, поэтому обычно для этой цели применяются методы широкоформатного генетического анализа на базе секвенирования нового поколения (NGS, next generation sequencing). Кроме того, данное приложение «жидкостной биопсии» максимально требовательно в отношении чувствительности методов детекции. Прогресс в области технологий NGS и последующей биоинформатической обработки его результатов позволил достичь выявления < 0,01% копий опухолевого генома в общем пуле циркулирующей неопухоловой ДНК (методы CAPP-seq, TЕС-seq и т.д.) [22, 24, 25]. Любопытно, что исключительно высокими оказались аналитические показатели детекции аномалий метилирования ДНК, требующие, однако, достаточно нестандартных и технически сложных методов пробоподготовки [26, 27]. Тем не менее, несмотря на высокую аналитическую чувствительность методов анализа ДНК, задача раннего выявления опухолей наталкивается на затруднения. Так, при использовании метода TЕС-Seq удалось достигнуть выявления мутаций в цоДНК лишь в 59-71% случаев опухолевых заболеваний I-II стадии [22, 28, 29].

Следует отметить, что различные виды опухолей сильно отличаются друг от друга количеством ДНК, высвобождаемым ими в кровяное русло. Например, в отношении рака печени I стадии «жидкостная биопсия» намного более чувствительна, чем в отношении рака пищевода (~100% против 20%) [30]. Данное исследование является примером успеха комбинированного подхода к жидкостной биопсии: для детекции использовались не только ДНК, но и белковые онкомаркеры, что позволило увеличить чувствительность метода без существенного снижения специфичности.

Помимо применения комбинаций маркеров различной природы, несколько улучшить результаты помогает использование знаний об молекулярных особенностях пула циркулирующей ДНК в норме и при онкологических заболеваниях. Так, хорошие результаты дает обогащение анализируемой циркулирующей ДНК фракцией коротких фрагментов нуклеиновых кислот [9]. Более того, известно, что на спектр фрагментов цоДНК оказывают влияние гистоновые белки и факторы транскрипции, защищающие ДНК от разрезания нуклеазами. Паттерн взаимодействия подобных белков с ДНК тканеспецифичен, поэтому по представленности сайтов связывания различных факторов транскрипции среди границ фрагментов циркулирующей ДНК можно судить о тканевом происхождении этих фрагментов [31]. Оказалось, что на основе уже одного лишь этого показателя, даже не прибегая к выявлению опухоль-специфичных мутаций, можно выявить аденокарциномы толстой кишки I стадии с чувствительностью 71% и специфичностью 72% [32].

Интересно недавнее сообщение о новом методе детекции анеуплоидии, основанном на высокопроизводительном секвенировании нескольких сотен тысяч коротких продуктов амплификации (120-145 п.о.), получаемых при помощи одной пары специальных низкоспецифичных праймеров (RealSeqS). При таком дизайне амплифицированные участки оказываются сравнительно равномерно распределены по всему геному; таким образом, представляется возможным оценить уровень анеуплоидии (хромосомной нестабильности) — ключевого признака злокачественных заболеваний. Признаки множественных хромосомных aberrаций были обнаружены в 49% образцов «жидкостной биопсии» от больных нематастатическим раком прямой кишки, пищевода, печени, легких, яичника, желудка, молочной и поджелудочной железы. В итоге, дополнение поиска «циркулирующих» мутаций и белковых онкомаркеров анализом анеуплоидии обеспечило увеличение до 80% чувствительности выявления онкологической патологии [33].

Специфичность молекулярного анализа в ситуации, требующей сверхчувствительных подходов, также субоптимальна. Для устранения технических артефактов широко применяются подходы, основанные на т.н. «молекулярном баркодировании» [22, 25]. Маркируя изначально присутствующие в образце молекулы ДНК при помощи уникальных адаптеров-идентификаторов, удается свести к минимуму влияние артефактов, возникающих в ходе дальнейших этапов анализа. Кроме того, для устранения ошибок, связанных с появлением в циркулирующей ДНК химически модифицированных нуклеотидов,

иногда применяют предварительную обработку выделенной ДНК ферментами репарации [25].

Наконец, помимо технических артефактов, можно столкнуться с выявлением реально существующего генетического мозаицизма, в том числе и применительно к «раковым генам», возникших в результате мутаций не в опухолевых клетках крови за счет феномена клонального гемопоэза [34]. Поэтому, чтобы обеспечить отбор лишь клинически значимых мутаций, желательно дополнять анализ цоДНК анализом генома лейкоцитов крови.

### **Применение «жидкостной биопсии» у пациентов с онкологическими заболеваниями**

Высокая чувствительность требуется от «жидкостной биопсии» и в ситуации, когда она применяется после радикального хирургического вмешательства, для выявления минимальной остаточной болезни, раннего выявления рецидива и оценки его риска, мониторинга ответа опухоли на терапию. В данном случае задача несколько упрощается за счет возможности предварительного анализа опухолевой ткани стандартными методами. Далее, для «визуализации» цоДНК в плазме будет достаточно применять высокочувствительный персонализированный тест на одну или несколько мутаций, присущих именно данному новообразованию. В техническом отношении наиболее проста для «жидкостной биопсии» ситуация, когда опухолевая масса велика: у больного наблюдается крупная распространенная опухоль. В таких случаях цоДНК избилует в плазме крови и зачастую каких-либо особенных методических ухищрений для её детекции не требуется [35, 36]. В противном случае, с этой целью могут применяться такие сверхточные методики генетического анализа как цифровая капельная ПЦР (digital droplet PCR, ddPCR) [37], метод BEAMing (beads, emulsions, amplification, and magnetics) [38], а также различные модификации таргетного секвенирования панелей ампликонов, содержащих «целевые» мутации [39, 40]. Хотя аналитические показатели данных методов схожи в отношении отдельных мутаций, ddPCR обладает наименьшей себестоимостью и наибольшей технической простотой. В то же время, возможность выявлять сразу целый ряд мутаций, свойственная таргетному секвенированию, увеличивает вероятность выявления хоть какой-либо из них и повышает общую чувствительность теста.

Существует множество свидетельств того, что обнаружение цоДНК после радикального хирургического вмешательства является неблагоприятным прогностическим признаком [37, 40, 41].

Важно, что персистенция цоДНК в плазме после окончания всех использованных вариантов лечения еще в большей степени ассоциирована с ранним рецидивом [41, 42]. Эти данные служат лишь косвенным свидетельством клинической значимости выявления цоДНК: действительно, пока еще неочевидно, принесет ли превентивное лечение пользу пациентам, у которых единственным признаком угрозы рецидива служит появление в плазме цоДНК. Крайне интересно недавнее исследование, в котором удалось показать, что возобновление выявления цоДНК на месяцы предшествует всем иным признакам рецидива рака молочной железы, включая повышение уровня СА 15-3 (в тех случаях, когда этот маркер оказался информативен) [39].

Существуют ситуации, в которых требуется молекулярно-генетический анализ предикторов эффективности таргетной терапии, но взятие «традиционной» биопсии почему-либо затруднено, либо требуется многократная «серийная» биопсия: в этих случаях целесообразно применение «жидкостной биопсии» [43, 44]. Так, в одном из ранних исследований применение «традиционной» аллель-специфической ПЦР продемонстрировало 100%-ую диагностическую чувствительность и специфичность в отношении мутаций V600E в гене *BRAF* и 90%-ую точность при выявлении семи частых мутаций в гене *KRAS* в плазме больных метастатическим колоректальным раком [45].

### Заключение

Несмотря на ошеломляющие достижения последних лет в разработке сверхточных методов генетического анализа, нет сомнений, что наступит такой момент, когда дальнейшее наращивание мощности методов само по себе не найдет практического применения. Действительно, по некоторым оценкам, маленькая опухоль диаметром менее сантиметра высвобождает в кровь столь малые количества ДНК, что в 10 миллилитрах крови, взятых для анализа, не найдется и одного полного генома опухоли [46]. Поиск методов, дополняющих анализ опухоль-специфических мутаций (изучение характеристик фрагментов циркулирующей ДНК, метилирования, экспрессии микроРНК, белковых маркеров, иммунологических реакций на опухоль), в какой-то мере способен увеличить эффективность использования плазмы для диагностики новообразований. В настоящее время не полностью исчерпан потенциал усовершенствования преаналитических этапов «жидкостной биопсии». Действительно, вызывает удивление тот факт, что влияние простых переменных в процедурных особенностях

сбора и процессинга материала (время забора крови, физическая нагрузка, режимы сегрегации плазмы и др.) изучено значительно хуже, чем тончайшие и сложнейшие аспекты методов высокопроизводительного секвенирования. Так или иначе, но на данный момент остается констатировать, что применение целого арсенала самых современных методов ДНК-диагностики не обеспечивает показателей, позволяющих использовать анализ плазмы крови для рутинного общепопуляционного скрининга в отношении ранней диагностики рака. Кроме того, стоимость комплекса анализов, необходимых даже для субоптимального, лишь приближенного к реальным нуждам решения такой задачи, оказывается непомерно высока. И все же данное направление определяет технологический прогресс всей данной области и способствует развитию более близких к практике приложений, в частности мониторинга динамики роста и гетерогенности опухоли на фоне терапии, молекулярно-генетический анализ труднодоступных очагов, детекции резидуальной опухоли после операции.

#### *Конфликт интересов*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### *Финансирование*

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 075-15-2019-1721, RFMEFI60419X0216).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Perakis S., Speicher M.R. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med.* 2017; 15(1): 75.
2. Junqueira-Neto S., Batista I.A., Costa J.L. et al. Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytol.* 2019; 63(6):479-488.
3. Booth S.N., King J.P., Leonard J.C. et al. Serum carcinoembryonic antigen in clinical disorders. *Gut.* 1973;14(10):794-799.
4. Buamah P.K., Bent D.J., Bodger W.A. et al. A profile of serum CA 15-3, carcinoembryonic antigen, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyl transferase levels in patients with breast cancer. *J Surg Oncol.* 1993; 53:84-87.
5. Kim M.Y., Oskarsson T., Acharyya S. et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell.* 2009; 139(7):1315-1326.
6. 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: 347-376.
7. Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(45):16368-16373.
8. Jiang P., Lo Y.M.D. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* 2016; 32: 360-371.

9. Mouliere F., Chandrananda D., Piskorz A.M. et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med.* 2018;10(466): pii: eaat4921.
10. Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J. et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell.* 2016; 164: 57-68.
11. Hellwig S., Nix D.A., Gligorich K.M. et al. Automated size selection for short cell-free DNA fragments enriches for circulating tumor DNA and improves error correction during next generation sequencing. *PLoS One.* 2018; 13(7).
12. Liu X., Lang J., Li S. et al. Fragment Enrichment of Circulating Tumor DNA With Low-Frequency Mutations. *Front Genet.* 2020;11: 147.
13. Yao W., Mei C., Nan X. et al. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene.* 2016; 590(1):142-148.
14. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14:985-90.
15. Alekseeva L.A., Mironova N.L., Brenner E.V. et al. Alteration of the exDNA profile in blood serum of LLC-bearing mice under the decrease of tumour invasion potential by bovine pancreatic DNase I treatment. *PLoS One.* 2017; 12(2): e0171988.
16. Bronkhorst A.J., Ungerer V., Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019; 17: 100087.
17. Chelobanov B.P., Laktionov P.P., Vlasov V.V. Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids. *Biochemistry (Mosc).* 2006; 71: 583-96.
18. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Extracellular nucleic acids. *Bioessays.* 2007; 29(7):654-667.
19. Khier S., Lohan L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Future Sci OA.* 2018; 23(4): FSO295.
20. Mouliere F., El Messaoudi S., Gongora C. et al. Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Transl Oncol.* 2013; 6(3):19-28.
21. Aravanis A.M., Lee M., Klausner R.D. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell.* 2017; 168(4):571-574.
22. Phallen J., Sausen M., Adleff V. et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2017; 9: pii: eaan2415.
23. Wu X., Li J., Gassa A. 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; 16(9):1551-1562.
24. Newman A.M., Bratman S.V., To J. et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014; 20(5):548-554.
25. Newman A.M., Lovejoy A.F., Klass D.M. et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016; 34: 547-555.
26. Shen S.Y., Singhania R., Fehring G. et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature.* 2018; 563(7732):579-583.
27. Locke W.J., Guanzon D., Ma C. et al. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Front Genet.* 2019;10: 1150.
28. Kaiser J. 'Liquid biopsy' for cancer promises early detection. *Science.* 2018;359(6373):259.
29. Lam W.K.J., Chan K.C.A. Plasma DNA for early cancer detection — opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019; 19: 5-7.
30. Cohen J.D., Li L., Wang Y. et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 2018; 359: 926-930.
31. Cristiano S., Leal A., Phallen J. et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 2019; 570(7761):385-389.
32. Ulz P., Perakis S., Zhou Q. et al. Inference of transcription factor binding from cell-free DNA enables tumor subtype prediction and early detection. *Nat Commun.* 2019; 10(1):4666.
33. Douville C., Cohen J.D., Ptak J. et al. Assessing aneuploidy with repetitive element sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117(9):4858-4863.
34. Razavi P., Li B.T., Brown D.N. et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med.* 2019; 25: 1928-1937.
35. Bettegowda 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: 224ra224.
36. Lebofsky R., Decraene C., Bernard V. et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol.* 2015; 9(4):783-790.
37. Garcia-Murillas I., Chopra N., Comino-Mendez I. et al. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2019.
38. O'Leary B., Hrebien S., Beaney M. et al. Comparison of BEAMing and Droplet Digital PCR for Circulating Tumor DNA Analysis. *Clin Chem.* 2019; 65(11):1405-1413.
39. Coombes R.C., Page K., Salari R. et al. Personalized Detection of Circulating Tumor DNA Antedates Breast Cancer Metastatic Recurrence. *Clin Cancer Res.* 2019; 25(14):4255-4263.
40. 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.
41. Tie J., Cohen J.D., Wang Y. et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut.* 2019;8(4):663-671.
42. Reinert T., Henriksen T.V., Christensen E. et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2019.
43. Ou S.I., Nagasaka M., Zhu V.W. Liquid Biopsy to Identify Actionable Genomic Alterations. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2018; 38: 978-997.
44. 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;104: 104631.
45. Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S. et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 2014; 20(4): 430-435.
46. Fiala C., Diamandis E.P. Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Med.* 2018; 16: 166.

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

*G.A. Yanus<sup>1,2</sup>, T.A. Laidus<sup>1</sup>, K.A. Zagorodnev<sup>2</sup>,  
A.S. Martianov<sup>2</sup>, T.N. Sokolova<sup>1,3</sup>, S.N. Aleksakhina<sup>1,2</sup>,  
E.S. Kuligina<sup>1,2</sup>, E.N. Imyanitov<sup>1,2</sup>*

**Perspectives for the analysis of circulating tumor DNA in clinical oncology: achievements and unresolved issues**

<sup>1</sup>N.N. Petrov Institute of Oncology, St. Petersburg,

<sup>2</sup>St. Petersburg Pediatric Medical University,  
St. Petersburg,

<sup>3</sup>Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University,  
St. Petersburg

The efforts to detect specific tumor-associated changes in blood and other biological fluids are by no means new. However, only the development of the most precise modifications of DNA analysis provided real opportunity to monitor tumor behavior in “real time” manner. Two directions should be distinguished within this field of modern oncology: 1) the early detection of cancer in apparently healthy individuals; 2) the use of liquid biopsy in patients with confirmed cancer diagnosis for a broad range of applications, such as the early diagnosis of recurrence or monitoring the treatment efficacy.

It should be stated, that the first direction of the research has not yet led to the results suitable for implementation in real world practice. Nevertheless, there are staggering technological advances in the analytical performance of NGS-based methods, which are applied to this task. The emerging non-standard approaches, involving the use of recently discovered peculiarities of the ctDNA fragmentation in plasma, or the complex approaches, utilizing a number of diverse methods simultaneously, are of great interest. The second, less ambitious direction of liquid biopsy studies is much closer to clinical use. This approach has already been widely used for such an actual issue, as the early non-invasive T790M detection in plasma of metastatic lung cancer patients, undergoing anti-EGFR therapy. Aside from the practical advances, the studies of various aspects of liquid biopsy provide all sorts of invaluable scientific information, for example regarding the precise timing patterns of the emergence of the resistance to anticancer drugs and the dynamics of its regression after changing of therapy regimen.

Key words: liquid biopsy; tumor markers; circulating tumor DNA