

Г.А. Янус^{1,2}, Т.А. Лайдус^{1,2}, А.С. Мартьянов^{1,2}, С.Н. Алексахина^{1,2}, Е.Ш. Кулигина^{1,2},
Е.Н. Имянитов^{1,2,3,4}

Жидкостная биопсия как универсальный метод ранней ДНК-диагностики онкологических заболеваний: проблемы, подходы, решения

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

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

³ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

До недавних пор создание универсального теста, который позволил бы по анализу крови, мочи или иной биологической жидкости выявить любое злокачественное новообразование на ранней стадии, представлялось задачей наподобие разработки «вечного двигателя». На этом пути лежат многочисленные препятствия, и прежде всего — сверхмалые концентрации тех потенциальных маркеров, которые клетки подобных опухолей высвобождают в кровь. Между тем, попытки создания такого теста оказались мощным двигателем прогресса методологии высокоточного ДНК-анализа, а за последние несколько лет на этом поле были достигнуты ошеломляющие практические успехи. Такие разработки, как тест CancerSEEK, уже достигли пороговых показателей, допускающих клиническое использование. Быстро развиваются методики, основанные на поиске различий в паттернах метилирования (тест Galleri, cfMeDIP-seq). Ряд исследований основан на весьма неожиданных подходах, например, анализе циркулирующих в плазме опухоль-ассоциированных вирусных или микробных последовательностей ДНК. Помимо попыток создания универсальных тестов, выявляющих любые или многочисленные разновидности неоплазм у лиц старшего возраста, развитие получили методы ранней ДНК-диагностики опухолей конкретных локализаций в прочих категориях высокого онкологического риска. В свете этих достижений перспективы внедрения жидкостной биопсии в число рутинных диспансерных методов обследования уже не выглядят делом далекого будущего.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, рак, цоДНК, секвенирование нового поколения, молекулярные маркеры, ранняя диагностика

Введение

Концепция «жидкостной биопсии» подразумевает анализ биомаркеров, отражающих какие-либо существенные черты патологического процесса в биологических жидкостях организма, без изучения непосредственно образцов пораженного органа или ткани. Понимаемая широко, эта концепция никак не является новой или даже специфичной для онкологии: почти любой биохимический анализ крови делается именно с этой целью. Тем не менее, в связи с достижениями молекулярной и клеточной биологии, жидкостная биопсия переживает период бурного развития. Прежде всего, это касается онкологии, хотя отдельные интересные работы затрагивают, к примеру, раннюю диагностику отторжения трансплантата по циркулирующей в крови ДНК донора [1], а в такой области, как неинвазивная пренатальная ДНК-диагностика наследственных болезней, жидкостная биопсия давно достигла статуса рутинного метода исследования [2]. Некоторые приложения жидкостной биопсии также успели доказать свою клиническую значимость и в реальной онкологической практике. В частности, если в контексте метастатического рака толстой кишки (РТК), рака легкого (РЛ) или рака молочной железы (РМЖ) затруднено проведение традиционной биопсии, предиктивные молекулярные маркеры (активирующие мутации в генах *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *ESR1*) могут быть выявлены и в ДНК, свободно циркулирующей в плазме крови больного (цоДНК) [3, 4]. Более того, жидкостная биопсия зачастую оказывается более чувствительна к рецидивам болезни, чем традиционные методы наблюдения. Она помогает в режиме «реального времени» следить за эффективностью терапии, позволяя обнаружить экспансию резистентного опухолевого клона или исчезновение мутаций, обеспечивающих

резистентность к таргетной терапии [5]. Вероятно, количественное определение циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) и/или циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) должно в ближайшем будущем стать необходимым компонентом стадирования, наряду с традиционными T, N и M [Yang и соавт., 2018]. В самом деле, выявление цоДНК/ЦОК — независимый от прочих параметров негативный прогностический фактор, причем появляются первые свидетельства эффективности интенсификации терапии у больных, демонстрирующих циркуляцию опухолевых маркеров [6, 7]. И в то же время, несмотря на очевидные и значительные достижения, наиболее амбициозная цель жидкостной биопсии — превращение в средство универсального онкологического скрининга для раннего выявления новообразований — до недавнего времени казалась недостижимой.

Жидкостная биопсия как биологическая проблема

Спектр категорий биомаркеров, которые предлагается использовать в рамках жидкостной биопсии, широк и разнороден: цоДНК; циркулирующие микроРНК; циркулирующие мРНК; ЦОК; внеклеточные везикулы; тромбоциты, поглощающие циркулирующие в сосудистом русле опухолевые транскрипты; различные метаболиты и т. д. В качестве биологических жидкостей может выступать как кровь, так и моча, слюна, кал, спинномозговая жидкость, водянистая влага глаза и т. д. [8]. Все же, поиск цоДНК в плазме крови используется значительно чаще иных модальностей жидкостной биопсии.

ЦоДНК необходимо выявить на фоне фрагментов ДНК, попадающих в кровяное русло при разрушении неизмененных, нормальных клеточных популяций организма, главным образом, гемопоэтического происхождения. Рост крупной, особенно метастатической опухоли, как правило, не обходится без гибели части опухолевых клеток и сопряжен с высвобождением в кровяное русло значительных количеств фрагментированной опухолевой ДНК. В то же время, экстраполяция существующих оценок зависимости концентрации цоДНК от объема опухоли хорошо очерчивает сложность ранней диагностики при помощи этой методики. Согласно таким подсчетам, опухоль объемом в $0,5 \text{ см}^3$ обеспечит концентрацию цоДНК в $0,005\%$ от всей циркулирующей ДНК, а объем в 1 мм^3 будет соответствовать всего один опухолевый геном на всю плазму крови организма. В большинстве случаев, стандартный забор крови в 10 мл не будет содержать ни одного полного генома опухоли, если ее объем состав-

ляет менее 1 см^3 [9]. Здесь следует отметить, что к подобным пессимистическим расчетам следует относиться с осторожностью. Для концентрации цоДНК в крови характерна высокая степень вариабельности, при этом надежно установленных закономерностей, связи концентрации цоДНК с физиологическими процессами, циркадианными ритмами и т.д. выявлено не было [10]. Известно, что период полужизни цоДНК измеряется минутами или часами, однако насколько изменчива скорость элиминации цоДНК, и какой вклад эта изменчивость вносит в количественную динамику цоДНК у больных, неясно [11]. Таким образом, подсчеты Diamandis и Fiala [9] носят весьма ориентировочный характер. Кроме того, опухоли различной локализации разительно не схожи друг с другом по концентрации выделяемой ими цоДНК: к примеру, мелкоклеточный рак легкого даже при малом размере первичного очага выделяет огромные количества цоДНК, а опухоли мозга и светлоклеточный рак почки — малые [12]. Более того, даже в пределах одной и той же локализации, различные молекулярные подтипы новообразований отличаются разной зависимостью выделения циркулирующих нуклеиновых кислот в кровь от объема опухоли [13]. Возможно, если и не придется говорить о поистине универсальном раннем скрининге, жидкостная биопсия окажется полезна в определенных частных случаях групп высокого риска опухолей конкретных локализаций и подтипов. Наконец, насколько необходимо выявлять медленно растущие новообразования сверхмалых размеров, почти не выделяющие в кровь содержимое опухолевых клеток — спорный вопрос, ведь многие подобные неоплазмы в течение человеческой жизни остаются индолентными [14]. В то же время, основываясь на статистических данных регистра SEER (США), в недавней эпидемиологической работе было показано, что даже если бы все опухоли, выявленные на IV стадии, диагностировали хотя бы на III, уже и это снизило бы смертность от онкологических заболеваний на 15% [15].

Малая представленность циркулирующих опухолевых биомаркеров в биологических жидкостях и сложность их экстракции диктует необходимость применения не только высокочувствительных, но и широкоформатных, а в идеале и мультимодальных тестовых платформ, которые смогут выявить следовые количества различных категорий и разновидностей маркеров в одном и том же образце. Этот аспект более значим в связи с тем, что генетическая композиция детектируемой опухоли заранее неизвестна — есть лишь перечень aberrаций, в большей или в меньшей степени характерных для той или иной локализации — их выявление сможет

указать и магистральное направление дальнейшего диагностического поиска в «положительных» случаях. Поэтому для универсальных тестов нельзя опираться на экономически необременительные высокочувствительные методики, хорошо себя зарекомендовавшие для решения таких прикладных задач как оценка предиктивно-значимых маркеров в цДНК, но нацеленных на конкретные соматические мутации (например, «цифровая капельная» ПЦР); для первичного мониторинга, как правило, используются особые сверхточные разновидности высокопроизводительного секвенирования.

Жидкостная биопсия в качестве универсального онкологического скрининга

Одним из ранних примеров подобных широкоформатных тестов являлась методика CAPP-seq, основанная на «глубоком» таргетном секвенировании регионов генома, часто затрагиваемых мутациями, оптимизированной пробоподготовке и нестандартной биоинформатической обработке результатов. За счет этого удалось добиться выявления 50% случаев РЛ I стадии с 96% специфичностью и 0,02% порогом чувствительности в отношении отдельных вариантов [16]. Для борьбы с артефактами таргетного/экзомного секвенирования, возникающими на этапе обогащения секвенируемого образца «целевыми» регионами генома, был предложен ряд подходов. В частности, это т. н. «дуплексное секвенирование» — независимое секвенирование двух антипараллельных нитей ДНК и учет лишь тех генетических вариантов, которые обнаруживаются в обеих нитях, а также «молекулярное штрих-кодирование» — мечение молекул ДНК, выделенных из образца плазмы, и гибридизовавшихся с молекулярными зондами к целевым областям генома, уникальными идентификаторами перед дальнейшим обогащением [17, 18]. Внедрение одной из стратегий «штрих-кодирования» и особого алгоритма обработки данных для элиминации частых артефактов, неустранимых даже «штрих-кодированием» (integrated digital error suppression, iDES), позволило усовершенствовать аналитические показатели CAPP-seq примерно в десять раз [19].

Таргетное секвенирование панелью из 58 «раковых» генов (TEC-seq), высокая точность которого обеспечивалась методологией, крайне сходной в общих чертах с iDES-CAPP-seq, выявляло опухоли легкого, толстой кишки, молочной железы и яичников I-II стадии с чувствительностью 59–71% [20]. При тестировании 44 здоровых доноров ложноположительные результаты выявлены не были. Повторный анализ получен-

ных данных при помощи методики Newman и соавт. [19], iDES, привел к выявлению ряда артефактов. Существенной новизной TEC-seq являлись усилия, направленные на исключение неправильной интерпретации редких наследственных генетических вариантов и мозаичных вариантов в циркулирующей ДНК, происходящей из клеток крови. Действительно, помимо технических артефактов, при проведении секвенирования цДНК могут встретиться мутации ДНК гематогенного происхождения, обязанные своим возникновением клональному гемопоэзу, феномену, особенно частому у пожилых пациентов [21].

Одной из вершин достижений в области сверхчувствительной жидкостной биопсии является мультимодальный тест CancerSEEK, направленный на раннюю диагностику опухолей 8 различных локализаций. В рамках этого теста предполагается таргетное секвенирование небольшой тщательно отобранной ампликонной панели размером чуть менее 2000 нуклеотидов, затрагивающей наиболее часто мутирующие регионы 16 «раковых» генов. Используется «штрих-кодирование», особая биоинформатическая обработка и проверка негематогенного/ненаследственного происхождения мутаций в сомнительных случаях. В дополнение к ДНК-анализу оценивается уровень восьми белковых маркеров, как широко распространенных (CA-125, РЭА), так и не столь часто используемых (OPN, TIMP-1). Интегральный анализ результатов теста включает сложную систему придания различного «веса» разным маркерам. Анализ крупной когорты пациентов I–III стадии (n=1005) показал, что при специфичности, превышающей 99%, чувствительность CancerSEEK варьировала от 33% (РМЖ) до 98% (рак яичников, РЯ). При рассмотрении подгруппы опухолей I стадии (n=199) CancerSEEK продемонстрировал очень высокую чувствительность в отношении ранней детекции рака печени (100%) и низкую — в отношении рака пищевода (20%) [22].

Недавно было завершено проспективное исследование DETECT-A, включавшее почти 10 000 женщин в возрасте 65–75 лет. Помимо стандартного плана рутинных диспансерных обследований, участникам испытания проводился тест CancerSEEK — 4,9% продемонстрировали позитивный результат. Положительные результаты подтверждались повторным анализом, в ходе которого секвенировали также лейкоциты для исключения клонального гемопоэза — было подтверждено 1,35% случаев. 95% из «дважды-позитивных» участников (n=127) проходили ПЭТ-КТ или иные лучевые методы обследования, выявившие подозрительную рентгенологическую картину в 64 (50%) случаях. Наконец,

в 26 случаях был подтвержден диагноз онкологического заболевания (в том числе, 9 РЛ, 6 РЯ и 2 РТК), в дополнение к 24 случаям, выявленным у участников в рамках рутинных плановых диагностических процедур. Еще 46 случаев были пропущены двумя скрининговыми алгоритмами и выявлены благодаря появившимся симптомам. Авторы исследования резонно отмечают, что, хотя в большинстве случаев CancerSEEK корректно указал на происхождение опухоли, без применения ПЭТ-КТ не только резко снижалась специфичность диагностического алгоритма, но неприемлемо высоким оставался и риск неверного диагноза конкретной локализации [23]. В целом, результаты исследования представляются обнадеживающими, тест получил частичное одобрение FDA в отношении РЯ и рака поджелудочной железы (РПЖ), ведутся новые клинические испытания.

Биоинформационная обработка результатов CancerSEEK во время испытания DETECT-A велась менее совершенными методами, чем впоследствии, в работе Cohen и соавт. [22]. Более того, в настоящее время в дизайн CancerSEEK предполагается интегрировать остроумную методику детекции аномалий копийности (copy number variations — CNV), основанную на амплификации одной парой низкоспецифичных праймеров сотен тысяч похожих, но неидентичных коротких последовательностей, равномерно рассыпанных по всему геному. Их можно секвенировать вместе с остальной ДНК-частью панели CancerSEEK и частично картировать — биоинформационная обработка результатов позволяет выявить CNV. Это дополнение почти не снижает специфичности (99%) и увеличивает чувствительность до 38%, в случае РМЖ — 97%; особенно выражено повышение чувствительности в когорте опухолей ранних стадий. Себестоимость такого дополненного анализом CNV теста повышается приблизительно на сотню долларов [24]. Клиническая апробация модифицированного CancerSEEK пока не завершена.

Неожиданно высокими оказались также аналитические показатели тестов, основанных на определении опухолеспецифических паттернов метилирования ДНК. Метилирование цитозинов, локализованных в регуляторных промоторных областях генов — один из основных способов разметки, функционирующих и «молчащих» кодирующих последовательностей генома. Паттерн метилирования многих участков генома высокоспецифичен для различных разновидностей клеток организма, а также для различных «режимов» их существования. Наиболее близким к практическому применению оказался тест Galleri, созданный командой ученых в сотрудничестве с компанией GRAIL (<https://grail.com>).

Он включает в себя бисульфитную обработку ДНК плазмы — при этом осуществляется конверсия метилцитозинов в тимин, с последующим высокопроизводительным секвенированием > 100 000 локусов генома и биоинформационной обработкой результатов для определения наличия онкологического заболевания и его локализации. В исследование вошло 2482 пациентов, у которых был диагностирован рак одной из 50 различных локализаций, а также 4207 онкологически здоровых доноров. При анализе валидационной подгруппы тест Galleri продемонстрировал чувствительность от 18% для опухолей I стадии (n=185) до 81% для опухолей III стадии (n=134). Специфичность теста составила 99,3%. Следует отметить, что на ранних стадиях чувствительность резко различалась между локализациями: очень низкая для РМЖ или рака предстательной железы, она составила 63% для опухолей поджелудочной железы — фатального заболевания, которое почти никогда не удается выявить рано в рамках рутинных диспансерных обследований [25]. Ведутся работы по доработке дизайна теста, запланирован целый ряд клинических испытаний по его апробации. Ряд специалистов выражает скепсис в отношении перспектив практического внедрения теста Galleri, в связи с низкой чувствительностью/положительной предсказательной ценностью метода в отношении детекции опухолей I–II стадии [26]. Тем не менее, эпидемиологические модели, экстраполирующие опубликованные результаты клинических исследований, предсказывают, что внедрение ежегодного прохождения теста в его нынешнем виде в контексте рутинного онкологического скрининга (США) позволит снизить онкологическую смертность на 19–26% [27].

Разработанный независимо от Galleri тест PanSeer обходится меньшим числом оцениваемых локусов — приблизительно 10 000 сайтов метилирования, собранных в 477 локусах генома. Тест оценивался при помощи образцов плазмы из уникального биобанка, собранного в ходе крупного многолетнего популяционного исследования населения г. Taizhou. Тест разрабатывался для детекции наиболее частых новообразований в данном регионе (рак желудка, рак пищевода, рак печени, РЛ, РТК). Аналитические показатели теста оказались субоптимальны (специфичность 95–96%), однако примечательно, что высокая чувствительность — 84–96% сохранялась даже при анализе образцов плазмы, взятых за 4 года до клинического диагноза рака [28].

Бисульфитная обработка ДНК, используемая Galleri и PanSeer, приводит к деградации ДНК и, как следствие, снижению чувствительности. Это препятствие можно обойти, если для отбора метилированных участков генома использовать

иммунопреципитацию антителами к метилированной ДНК. Подобный подход уже нашел практическое применение в области пренатальной диагностики хромосомных болезней [29]. Метод cfMeDIP-seq, использующий иммунопреципитацию целевых областей генома, по-разному метилированных в опухолях и нормальных тканях, продемонстрировал высочайшие аналитические показатели при выявлении опухолей почки и ЦНС, выделяющих в системный кровоток чрезвычайно малые количества ДНК [30]. Ценной представляется и возможность дискриминации между различными разновидностями опухолей ЦНС по результатам cfMeDIP-seq [30]. Другой перспективный, но недостаточно разработанный подход — использование различий в размерах и представленности фрагментов цоДНК и фрагментов ДНК, циркулирующих в плазме у здоровых лиц. В самом деле, в плазме могут персистировать молекулы ДНК, ассоциированные с гистоновыми белками и факторами транскрипции — эти белковые молекулы защищают ДНК от разрезания нуклеазами. В то же время, взаимодействия таких белков с ДНК специфичны для различных тканей, а также опухолевых клеток — фракцию цоДНК отличает от нормальной ДНК, циркулирующей в плазме, меньший размер и обогащение фрагментами, в последовательности которых присутствуют сайты связывания с определенными транскрипционными факторами. Есть ряд работ, в которых выявление цоДНК базируется на обнаружении подобных различий, аналитические показатели подобных методик высоки, однако для целей ранней диагностики рака они остаются малоприменимыми [31].

Такие тесты, как CancerSEEK и Galleri демонстрируют очень высокую специфичность — это одно из условий, принципиально позволяющих использовать их для массового скрининга. Все же, не во всех группах населения их применение принесет сопоставимую пользу: среди людей среднего и молодого возраста онкологические заболевания сравнительно редки и доля ложнопозитивных ошибочных результатов вырастает до неприемлемо высокого уровня даже с учетом высокой специфичности теста. Однако, пожилой возраст — неявное ограничение «универсальности» подобных методов диагностики — самый значимый, но не единственный сильный фактор риска онкологических заболеваний.

Жидкостная биопсия для «таргетной» ранней диагностики в группах высокого риска

Одной из основных категорий лиц повышенного онкологического риска являются пациенты, страдающие наследственными опухолевыми

синдромами. По определению, для них характерен крайне высокий риск развития новообразований одной или нескольких локализаций, вместе с тем, существующие методы ранней диагностики зачастую оставляют желать лучшего. Можно указать на работы, посвященные жидкостной биопсии водянистой влаги глаза при подозрении на ретинобластому: гистологическая верификация в такой ситуации невозможна [32]. Разработка или клиническая валидация подобных тестов, основанных на жидкостной биопсии, часто наталкивается на препятствия, связанные с редкостью синдромов, в которых раннее выявление играло бы особенно важную роль, например, выявление РПЖ у больных синдромом Пейтца–Йегерса, наследственным панкреатитом и т. д. Нужно учитывать, что наследственные разновидности раков могут иметь биологические особенности, отличающие их от спорадических опухолей тех же локализаций: к примеру, наследственный РПЖ нередко лишен мутаций в гене *KRAS* [33]. Учет подобных особенностей помогает оптимизировать методики жидкостной биопсии: например, в случае синдрома Линча предлагается детектировать в цоДНК микросателлитную нестабильность [34].

Другая подобная категория — лица с хроническими воспалительными заболеваниями, предрасполагающими к раку, или люди, постоянно сталкивающиеся с воздействием канцерогенов (например, заядлые курильщики). В частности, низкодозная КТ — единственный метод скрининга РЛ у курильщиков и/или больных хроническими обструктивными заболеваниями легких. Существует много работ, в которых оценивается способность тестов, основанных на анализе цоДНК, профиля ее метилирования, или же паттерна экспрессии микроРНК, расценить потенциал злокачественности выявляемых на КТ подозрительных очагов [35]. В целом, они помогают снизить число ненужных биопсий, хотя полноценного внедрения в клинику эти тесты не достигли. Другой пример — жидкостная биопсия, как вспомогательный метод ранней диагностики рака у пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями кишки [36].

Наконец, очень перспективной представляется жидкостная биопсия как метод раннего выявления вирус-ассоциированных опухолей. Целый ряд исследований, включая недавние клинические испытания, говорит о возможности раннего выявления опухолей, ассоциированных с вирусом Эпштейн-Барр, ВПЧ и т. д. [37]. Интересно, что не только персистенция вирусной ДНК в крови, но и особенности метилирования и фрагментации вирусных последовательностей отличают вирусную цоДНК от транзитной виремии [38]. Недавнее систематическое

исследование опухолевого микробиома показало, что циркуляция вирусных или бактериальных последовательностей оказалась неожиданно широко распространена при различных онкологических заболеваниях, включая РЛ или рак предстательной железы, и способна помочь выявить эти злокачественные новообразования [39].

Заключение

Хотя еще несколько лет назад ранняя детекция новообразований при помощи жидкостной биопсии казалась несбыточной, ситуация быстро меняется. Некоторые тесты, такие как CancerSEEK, достигли показателей, которые позволяют рассматривать их внедрение в реальную практику. За рамками данной работы остаются многие достижения в области использования маркеров, не основанных на ДНК-анализе. Один из многочисленных примеров неожиданных решений — работы, в которых осуществлялась неинвазивная детекция ЦОК фотоакустическим методом. За счет просвечивания поверхностного капилляра кожи лазером и применения УЗИ удастся произвольно менять скорость кровотока и даже манипулировать отдельными форменными элементами, превращая собственный кровеносный сосуд пациента в своего рода проточный цитометр [40]. Эта остроумная идея позволяет без применения афереза обойти важнейшее ограничение — скудость циркулирующих маркеров в объеме крови, который можно взять для анализа. Бурный методологический прогресс и возможность сочетания разных модальностей диагностики позволяет надеяться на решение одной из основополагающих проблем практической онкологии.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-75-10070

ЛИТЕРАТУРА

- Garg N, Hidalgo LG, Aziz F et al. Use of Donor-Derived Cell-Free DNA for Assessment of Allograft Injury in Kidney Transplant Recipients During the Time of the Coronavirus Disease 2019 Pandemic // *Transplant Proc.* 2020;52:2592–2595.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16266–16271.
- van 't Erve I, Greuter MJE, Bolhuis K et al. Diagnostic Strategies toward Clinical Implementation of Liquid Biopsy RAS/BRAF Circulating Tumor DNA Analyses in Patients with Metastatic Colorectal Cancer // *J Mol Diagn.* 2020;22:1430–1437.
- Turner NC, Kingston B, Kilburn LS et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial // *Lancet Oncol.* 2020;21:1296–1308.
- Moati E, Blons H, Taly V et al. Plasma clearance of RAS mutation under therapeutic pressure is a rare event in metastatic colorectal cancer // *Int J Cancer.* 2020;147:1185–1189.
- Hall CS, Karhade MG, Bowman Bauldry JB et al. Prognostic Value of Circulating Tumor Cells Identified Before Surgical Resection in Nonmetastatic Breast Cancer Patients // *J Am Coll Surg.* 2016;223:20–29.
- Naidoo M, Gibbs P, Tie J. ctDNA and Adjuvant Therapy for Colorectal Cancer: Time to Re-Invent Our Treatment Paradigm // *Cancers (Basel).* 2021;13:346.
- Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application // *Cancer Discov.* 2021;11:858–873.
- Diamandis EP, Fiala C. Can circulating tumor DNA be used for direct and early stage cancer detection? // *F1000Res.* 2017;6:2129.
- Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements // *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2020;57:484–507.
- Yao W, Mei C, Nan X, Hui L. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study // *Gene.* 2016;590:142–148.
- Zill OA, Banks KC, Fairclough SR et al. The Landscape of Actionable Genomic Alterations in Cell-Free Circulating Tumor DNA from 21,807 Advanced Cancer Patients // *Clin Cancer Res.* 2018;24:3528–3538.
- Lam VK, Zhang J, Wu CC et al. Genotype-Specific Differences in Circulating Tumor DNA Levels in Advanced NSCLC // *J Thorac Oncol.* 2021;16:601–609.
- Ho AS, Daskivich TJ, Sacks WL, Zumsteg ZS. Parallels Between Low-Risk Prostate Cancer and Thyroid Cancer: A Review // *JAMA Oncol.* 2019;5:556–564.
- Clarke CA, Hubbell E, Kurian AW et al. Projected Reductions in Absolute Cancer-Related Deaths from Diagnosing Cancers Before Metastasis, 2006–2015 // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020;29:895–902.
- Newman AM, Bratman SV, To J et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage // *Nat Med.* 2014;20:548–554.
- Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ et al. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:14508–14513.
- Shiroguchi K, Jia TZ, Sims PA, Xie XS. Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:1347–1352.
- Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA // *Nat Biotechnol.* 2016;34:547–555.
- Phallen J, Sausen M, Adleff V et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA // *Sci Transl Med.* 2017;9:eaan2415.
- Razavi P, Li BT, Brown DN et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants // *Nat Med.* 2019;25:1928–1937.
- Cohen JD, Li L, Wang Y et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test // *Science.* 2018;359:926–930.
- Lennon AM, Buchanan AH, Kinde I et al. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention // *Science.* 2020;369:eabb9601.

24. Douville C, Cohen JD, Ptak J et al. Assessing aneuploidy with repetitive element sequencing // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117:4858–4863.
25. Liu X, Lang J, Li S et al. Fragment Enrichment of Circulating Tumor DNA With Low-Frequency Mutations // *Front Genet*. 2020;11:147.
26. Taylor WC. Comment on 'Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA' by MC. Liu et al. // *Ann Oncol*. 2020;31:1266–1267.
27. Hubbell E, Clarke CA, Aravanis AM, Berg CD. Modeled Reductions in Late-stage Cancer with a Multi-Cancer Early Detection Test // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021;30:460–468.
28. Chen X, Gole J, Gore A et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test // *Nat Commun*. 2020;11:3475.
29. Papageorgiou EA, Karagrigroriou A, Tsaliki E et al. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 // *Nat Med*. 2011;17:510–513.
30. Nassiri F, Chakravarthy A, Feng S et al. Detection and discrimination of intracranial tumors using plasma cell-free DNA methylomes // *Nat Med*. 2020;26:1044–1047.
31. Moulriere F, Chandrananda D, Piskorz AM et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis // *Sci Transl Med*. 2018;10:eaat4921.
32. Xu L, Shen L, Polski A et al. Simultaneous identification of clinically relevant *RB1* mutations and copy number alterations in aqueous humor of retinoblastoma eyes // *Ophthalmic Genet*. 2020;41:526–532.
33. Earl J, Barreto E, Castillo ME et al. Somatic Mutation Profiling in the Liquid Biopsy and Clinical Analysis of Hereditary and Familial Pancreatic Cancer Cases Reveals KRAS Negativity and a Longer Overall Survival // *Cancers (Basel)*. 2021;13:1612.
34. Gilson P, Merlin JL, Harlé A. Detection of Microsatellite Instability: State of the Art and Future Applications in Circulating Tumour DNA (ctDNA) // *Cancers (Basel)*. 2021;13:1491.
35. Liang W, Liu D, Li M et al. Evaluating the diagnostic accuracy of a ctDNA methylation classifier for incidental lung nodules: protocol for a prospective, observational, and multicenter clinical trial of 10,560 cases // *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9:2016–2026.
36. Kinugasa H, Hiraoka S, Nouse K et al. Liquid biopsy for patients with IBD-associated neoplasia // *BMC Cancer*. 2020;20:1188.
37. Chan KCA, Woo JKS, King A et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer // *N Engl J Med*. 2017;377:513–522.
38. Lam WKJ, Jiang P, Chan KCA et al. Methylation analysis of plasma DNA informs etiologies of Epstein-Barr virus-associated diseases // *Nat Commun*. 2019;10:3256.
39. Poore GD, Kopylova E, Zhu Q et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach // *Nature*. 2020;579:567–574.
40. Galanzha EI, Menyayev YA, Yadem AC et al. In vivo liquid biopsy using Cytophone platform for photoacoustic detection of circulating tumor cells in patients with melanoma // *Sci Transl Med*. 2019;11:eaat5857.

Поступила в редакцию 30.04.2021 г.

G.A. Yanus^{1,2}, T.A. Laidus^{1,2}, A.S. Martianov^{1,2}, S.N. Aleksakhina^{1,2}, E.S. Kuligina^{1,2}, E.N. Imyanitov^{1,2,3,4}

Liquid biopsy as the universal DNA-based method for early cancer detection: problems, approaches, solutions

¹ N.N. Petrov Institute of Oncology, St. Petersburg, Russia
² St. Petersburg Pediatric Medical University, Russia
³ I.I. Mechnikov North-Western Medical University, St. Petersburg, Russia
⁴ St. Petersburg State University, Russia

Until recently, the establishment of a universal test, allowing the early cancer detection by the analysis of blood, urine or other biological fluids seemed as realistic as the development of «perpetuum mobile». There are numerous obstacles on this road: above all being the ultra-low concentrations of biomarkers shed by such tumors in the bloodstream. Meanwhile, in attempts to create such a test the methodology of ultrasensitive DNA analysis has emerged, and stunning practical successes have been achieved in this field over the past few years. The performance of the CancerSEEK test has already reached threshold for clinical utility of its practical implementation. Techniques based on the analysis of methylation patterns (Galleri test, cfMeDIP-seq) are also rapidly developing. A number of promising studies are based on quite unconventional approaches, for example, the analysis of tumor-associated viral or microbial DNA sequences circulating in plasma. In addition to universal tests aiming at the detection of any or many types of neoplasms in older people, the methods for early DNA-based detection of certain cancer types in selected high-risk groups are being developed. These advances finally make the prospects for introducing liquid biopsy into routine cancer screening look like a matter of near future.

Key words: liquid biopsy, cancer, ctDNA, NGS, molecular markers, early diagnostics