

Список литературы:

1. Изображение кинезина (рис. 1): «Моторные белки», 2015. [Электронный ресурс] URL: <http://mumi-teacher.narod.ru/School/myMBC/mumiMot/mumiMot.pdf> (дата обращения: 15.02.2021).
2. Изображение кинезина (рис. 2): Атлас контактов молекулы кинезина, Андреев Г., Барабашева С., 2019. [Электронный ресурс] URL: <https://kodom.fbb.msu.ru/~mu4/term2/contactatlas/ContactsJmol.html#1> (дата обращения: 20.10.2020).
3. Шестаков Д.А. Кинезин: механика молекулярного мотора [Электронный ресурс] // Российский журнал биомеханики. 2014. № 4. С. 414–429. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kinezin-mehanika-molekulyarnogo-motora> (дата обращения: 18.11.2020).
4. Intracellular transport proteins: classification, structure and function of kinesins/Chudy A., Gajewska B., Gutowicz M., Barańczyk-Kuźma A. [Электронный ресурс] // Postepy Hig Med Dosw (online). 2011. №65. С. 589-590. URL: <https://phmd.pl/resources/html/article/details?id=52002&language=en> (дата обращения: 17.03.2021).
5. Zhong, A., Tan, F.-Q., Yang, W.-X. Chromokinesin: Kinesin superfamily regulating cell division through chromosome and spindle [Электронный ресурс] // Gene. 2016. №583(1), 43-48. С. 1-20. URL: <https://sci-hub.do/10.1016/j.gene.2016.05.026> (дата обращения: 22.11.2020).
6. Sweeney, H. L., Holzbaur, E. L. F. Motor Proteins. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology [Электронный ресурс] //Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2018. №10(5), a021931. С.2-11. URL: <https://sci-hub.do/10.1101/cshperspect.a021931> (дата обращения: 29.11.2020).
7. Sanhaji M., Friel C. T., Wordeman L., Louwen F., Yuan J. Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK): a potential cancer drug target. [Электронный ресурс] 2011. №12. С.936. URL: <https://www.oncotarget.com/article/416/text/> (дата обращения: 18.11.2020).

УДК 576

Новикова С.М., Гулаев И.Ж., Кулышева М.А., Бекишов А.В., Шуман Е.А.

**АНАЛИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК ПРИ РАКЕ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И
ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ БИОМАРКЕР**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская Федерация

**Novikova S.M., Gulaev I.J., Kulysheva M.A., Bekishov A.V., Shuman E.A.
ANALYSIS OF CIRCULATING TUMOR DNA IN BREAST CANCER
AS A DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC BIOMARKER**

Department of Medical Biology and Genetics
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: i.gulaev_1998@mail.ru

Аннотация. В статье рассмотрены и обобщены существующие данные об использовании циркулирующая опухолевая ДНК (ctDNA) конкретно при раке молочной железы, включая методы обнаружения, диагностическую точность, роль в генетике и эпигенетической оценке опухоли и сравнение с другими биомаркерами.

Annotation. The article discusses and summarizes the existing evidence on the use of ctDNA specifically in breast cancer, including detection methods, diagnostic accuracy, role in genetics and epigenetics evaluation of the tumor, and comparison with other biomarkers.

Ключевые слова: циркулирующая опухолевая ДНК, рак молочной железы, жидкостная биопсия, прогрессирование заболевания, биомаркер, ответ на терапию

Key words: Circulating tumor DNA, Breast cancer, Liquid biopsy, Disease progression, Biomarker, Response to therapy

Введение

Несмотря на все достижения в диагностике и лечении рака молочной железы, большое количество пациенток страдает от поздней диагностики или рецидива своего заболевания. Современные доступные методы визуализации не выявляют микрометастазов, а биопсия опухоли является инвазивным методом выставления ранней стадии или рецидива рака, что свидетельствует о необходимости недорогого, неинвазивного диагностического метода. Исследование ctDNA было опробовано для ранней диагностики и таргетной терапии рака молочной железы, но ее диагностическая и прогностическая полезность все еще находятся в стадии изучения. В этом обзоре обобщены существующие данные об использовании ctDNA конкретно при раке молочной железы, включая методы обнаружения, диагностическую точность,

роль в генетике и эпигенетической оценке опухоли и сравнение с другими биомаркерами. Современные данные свидетельствуют о том, что повышение уровня ctDNA при раке молочной железы может иметь значительную диагностическую ценность для раннего выявления рака молочной железы, хотя чувствительность и специфичность методов все еще являются неоптимальными. Кроме того, ctDNA позволяет характеризовать опухоль неинвазивным способом и контролировать ответ на терапию, хотя диссонанс результатов ctDNA с прямой биопсией (то есть из-за гетерогенности опухоли) все еще считается заметным ограничением.

Цель исследования – рассмотреть и обобщить существующие данные об использовании ctDNA конкретно при раке молочной железы.

Материалы и методы исследования

Методы исследования – описательный, сравнительный, исторический.

Результаты исследования и их обсуждение

Рак молочной железы не может быть идентифицирован с помощью клинических и рентгенологических исследований на первом этапе заболевания. Микрометастазирование может происходить на ранних стадиях злокачественного новообразования и мигрировать в виде циркулирующих опухолевых клеток (ЦТК) из исходной опухоли в костный мозг. В дополнение к циркулирующим опухолевым клеткам дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), высвобождаемые из опухолевых клеток, могут поступать в кровоток в виде внеклеточной опухолевой ДНК (ctDNA) [1]. Идентификация и измерение ctDNA может позволить не только раннее обнаружение, но и анализ геномных мутаций опухоли, что приведет к более индивидуализированной терапии рака молочной железы.

Циркулирующая опухолевая ДНК

В дополнение к собственной ДНК человека в крови можно обнаружить две формы циркулирующей ДНК человека: ДНК плода у беременных женщин и ДНК опухоли у больных раком. Первоначальные работы по выделению эмбриональной ДНК в материнской крови были сосредоточены на редких эмбриональных ядродержащих клетках. С тех пор накопились доказательства того, что плацентарные нити ДНК в избытке обнаруживаются в материнской крови в виде внеклеточных циркулирующих ДНК.

Злокачественные клетки у больных раком выделяют в кровоток форму внеклеточной ДНК. Злокачественный процесс влечет за собой перенос стимулирующего рак клеточного содержимого не только в соседние клетки внутри опухолевого микроокружения, но и в кровоток. Предполагается, что бесклеточная ДНК наряду с экзосомами, микроРНК и цитокинами активно выводится злокачественными клетками в кровоток для содействия ангиогенезу и метастазированию [2].

Леон сначала измерял концентрацию бесклеточной ДНК в кровотоке с помощью радиоиммуноанализа с использованием сыворотки пациента с системной красной волчанкой в качестве источника антител. Концентрация

циркулирующей бесклеточной ДНК среди здоровых лиц и лиц с различными типами рака была измерена на уровне 13 ± 3 нг/мл и 180 ± 38 нг/мл соответственно. Использование референтного диапазона 0-50 нг/мл дало бы специфичность 93%, но чувствительность только 50% при идентификации онкологических больных, поэтому авторы пришли к выводу, что ctDNA имеет низкую диагностическую ценность при обнаружении с помощью радиоиммуноанализа [3].

Новые методы измерения показали, что естественная циркулирующая ДНК имеет два источника: один - это ДНК, происходящая из апоптотических клеток, а другой - из живых опухолевых клеток. Исследования, измеряющие длину фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), показали, что апоптотические фрагменты ДНК равномерно усечены и имеют длину менее 200 пар оснований, в то время как живые опухолевые клетки производят фрагменты ДНК, которые более изменчивы по длине и могут достигать нескольких килобэйд пар оснований. Использование "индекса целостности" было предложено в качестве диагностической метрики для рака.

Как только ctDNA идентифицируется в кровотоке, методы идентификации генетических и эпигенетических профилей этих фрагментов становятся доступными и могут помочь в обнаружении специфических раковых мутаций. ctDNA является высокоспецифичным и эффективным биомаркером для выявления специфических мутаций у больных раком легких. В многочисленных исследованиях были использованы аналогичные методы для выявления генетических и эпигенетических изменений у больных раком молочной железы. Количественная ПЦР в реальном времени широко используется для измерения концентрации специфических фрагментов ctDNA.

По-видимому, лучше всего ограничить область секвенирования ctDNA у больных раком молочной железы известными мутациями. Это позволило бы использовать более целенаправленные методы, такие как plasma-seq, для идентификации и измерения ctDNA, вместо массового параллельного секвенирования всего генома [4].

Эпигенетические характеристики рака молочной железы также могут быть определены с помощью анализа ctDNA. Например, Агостини использовали метод MethyLight, флуоресцентный ПЦР-анализ в реальном времени, для идентификации эпигенетических характеристик ctDNA у больных раком молочной железы и сообщили, что этот метод может идентифицировать метилирование ALU247 с чувствительностью и специфичностью более 99% и 69% соответственно.

Подробное сравнение вышеупомянутого метода было предметом недавнего системного обзора и метанализа, проведенного Лином, в котором он объединил различные методы, используемые для измерения ctDNA при раке молочной железы, и пришел к выводу, что общая диагностическая чувствительность и специфичность этих методов составляет 0,7 и 0,87, соответственно, при этом метод qPCR имеет лучшую точность, чем другие

количественные методы, а NGS демонстрирует самые высокие перспективы в качестве метода с высокой чувствительностью.

Многочисленные исследования документировали повышенный уровень ctDNA у пациентов с опухолями молочной железы и его прямую корреляцию. Уровни ctDNA снижаются после резекции первичной опухоли. Однако установление порогового уровня концентрации ctDNA в качестве диагностического все еще остается проблемой.

Генетический анализ фрагментов ctDNA может быть сосредоточен на специфических мутациях в генах, которые, как известно, связаны с раком молочной железы, таких как BRCA1/2, а также различных киназах и фосфатазах. Эпигенетический анализ, с другой стороны, фокусируется на метилировании ДНК, что может дать значительную диагностическую информацию, особенно у бессимптомных пациентов с недостоверными маммограммами и неточными исследованиями молочной железы.

В целом, гены, мутации в которых были изучены в ДНК у больных раком молочной железы, включают *ESR1*, *PCDH20*, *OR4X1*, *ALK*, *DNPEP*, *SH3TC2*, *DDR2*, *MLL3*, *GAPDH*, *CD1A*, *IQCA1*, *ZFYVA21*, *KIAA0406*, *NOTCH1*, *AKT1*, *FBXL4*, *EIF4B*, *MDM4*, *NFASC*, *CAMK1G*, *STK24*, *ERBB2*, *CDK6*, *TP53* и *PIK3CA*. Изменения метилирования *MAL*, *SFRP1*, *RASSF1A*, *SFN*, *P16*, *PCDHGB7*, *HOXD13*, *hMLH1*, *ERβ* и *RARβ2* [5] также были идентифицированы во фрагментах ctDNA больных раком молочной железы.

Также было показано, что генетический профиль рака молочной железы может изменяться с течением времени, и Гевенслебен показал, что изменение фенотипа заболевания при прогрессировании может быть идентифицировано с помощью цифровой ПЦР ctDNA.

Биомаркером, часто используемым при раке молочной железы, является раковый антиген 15-3 (CA 15-3). Хотя этот биомаркер обладает высокой чувствительностью для диагностики, его уровни не изменяются в связи с прогрессированием или ремиссией. Напротив, неоднократно было показано, что уровни ctDNA коррелируют с прогрессированием заболевания.

Доусон сравнивал уровни ctDNA, CA 15-3 и СТС у больных раком молочной железы I и II стадий и показал, что все эти биомаркеры положительно коррелируют друг с другом и с прогрессированием заболевания, но ctDNA имеет превосходную чувствительность и имеет больший динамический диапазон, который коррелирует с изменениями опухолевой нагрузки. Точно так же Шоу определил, что ctDNA проявляет большую корреляцию с изменениями опухолевой нагрузки по сравнению с уровнями CA 15-3 и КТК [6].

Выводы

Современные данные свидетельствуют о том, что уровень ctDNA повышается у больных раком молочной железы, что может иметь важное значение для идентификации микрометастазов и мониторинга прогрессирования заболевания. Следует отметить, что диагностическая и прогностическая

ценность ctDNA обсуждалась для различных подтипов рака молочной железы, включая люминальный рак молочной железы.

Методы, используемые для измерения и анализа ctDNA в кровотоке, простираются от ПЦР и методов секвенирования следующего поколения до флуоресцентных анализов. Измерение ctDNA также может обеспечить неинвазивный подход для выявления канцерогенных мутаций или эпигенетических вариаций, что приводит к инициации геноспецифической терапии на более ранних стадиях заболевания.

Технические проблемы, связанные с получением, использованием и анализом образцов ctDNA, а также отсутствие стандартов ее измерения и интерпретации являются двумя наиболее важными факторами, ограничивающими использование ctDNA в диагностике и терапии рака молочной железы в настоящее время. Хотя некоторые исследования показывают, что уровни ctDNA повышаются у больных раком молочной железы и снижаются в ответ на терапию, фактические мутации, выявленные в ctDNA, часто могут быть диссонирующими с тем, что обнаруживается при прямой биопсии, а гетерогенность опухоли может препятствовать количественной оценке ценности ctDNA как меры опухолевой нагрузки.

Список литературы:

1. Хуан ЖЖ, Ли ЛХ, Хуа Д. Количественный анализ циркулирующей ДНК плазмы крови при диагностике и наблюдении больных раком молочной железы. *Cancer Lett.* 2006;243:64-70. doi: 10.1016/j.canlet.2005.11.027.
2. Ван дер Ваарт М., Преториус П. Циркулирующая ДНК. Её происхождение и колебания. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1137:18-26. doi: 10.1196/annals.1448.022.
3. Леон С. А., Шапиро Б., Скларов Д. М., Ярос М. Ю. Свободная ДНК в сыворотке крови онкологических больных и эффект терапии. *Cancer Res.* 1977;37:646-50.
4. Heidary M, Auer M, Ulz P, Heitzer E, Petru E, Gasch C и др. Динамический диапазон циркулирующей опухолевой ДНК при метастатическом раке молочной железы. *Рак молочной железы Res.* 2014;16:421. doi: 10.1186/s13058-014-0421-y.
5. Мирза С., Шарма Г., Паршад Р., Шривастава А., Гупта С., Ралхан Р. Клиническое значение метилирования промоторов Стратифина, Эральфы и PR в опухолевой и сывороточной ДНК у индийских больных раком молочной железы. *Клин Биохим.* 2010;43:380-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.11.016. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Shaw JA, Stebbing J. циркуляция свободной ДНК в лечении рака молочной железы. *Ann Transl Med.* 2014;2:3. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2013.06.06.

УДК 612.313.63