

**СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩАЯ ДНК КАК
ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ****Т. М. Горбачева¹, А. В. Паневина¹, А. П. Гуреев¹, В. Ю. Башмаков¹,
С. А. Солодских¹, И. П. Мошуров³, А. А. Михайлов³, А. Ю. Маслов^{1,2}, В. Н. Попов¹**¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»²Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University³Воронежский областной клинический онкологический диспансер

Поступила в редакцию 14.01.19 г.

Аннотация. Свободная ДНК не связана с клетками и определяется практически во всех жидкостях организма. При этом повышение уровня свободной ДНК в плазме и сыворотке крови определяется при многих заболеваниях, включая аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования, инфаркт миокарда и др. До сих пор не ясна физиологическая роль сцДНК, а также ее значение в развитии того или иного заболевания. Определены значения сцДНК у здоровых доноров, которые колеблются в пределах 10-100 нг/мл. Предполагается, что сцДНК у этих больных происходит из опухолевых клеток непосредственно. Принадлежность сцДНК к опухолевым клеткам можно определять по мутациям в ряде генов, связанных с опухолевой прогрессией клеток, например, в гене p53. Хотя концентрация сцДНК не может быть использована как эффективное прогностическое и диагностическое средство, этот параметр можно использовать для мониторинга изменений, происходящих с опухолью в процессе лечения, а так же для раннего выявления онкологических патологий. В отдельных клинических случаях концентрация сцДНК оказывается ниже оптимального для детекции мутаций количества. Как правило, фракция сцДНК, происходящая из опухолевых клеток, составляет от 0.01% до 90% от всей сцДНК крови. Очевидно, что повышенная концентрация сцДНК является отражением протекающих в организме пациента процессов.

Разработан метод аллель-специфичной ПЦР для определения свободно циркулирующей ДНК в крови как результат метастазирования опухоли почек. Методами таргетного секвенирования определялись мутации в ткани удаленной почки и методами аллель-специфичной ПЦР отслеживали ее наличие в крови пациента через равные промежутки времени. Данный метод охарактеризован по следующим показателям: лимит/предел детекции реакции, минимальное определяемое количество ДНК, линейность, чувствительность. Минимальный процент мутантной аллели для анализа составляет 1.6%. Линейность метода наблюдается в промежутке концентраций проб 0.1 нг/мкл до 50 нг/мкл. При 50% мутантной аллели минимум концентрации для детекции составляет 0.1 нг/мкл; при 15% мутантной аллели – 0.6 нг/мкл; при 1.7% мутантной аллели – 0.6 нг/мкл. По значению дельты двух конкурирующих реакций ПЦР определяют наличие, отсутствие или динамику сцДНК в крови пациентов. На основании полученных данных возможно прогнозирование успешности операции и в дальнейшем наличия метастазирования опухоли.

Ключевые слова: аллель-специфичная ПЦР, свободно циркулирующая ДНК, метастазирование, опухоль почек, прогнозирование

Свободная ДНК, свободно циркулирующая, внеклеточная, сокращенно свДНК или сцДНК, не связана с клетками и определяется практически во всех жидкостях организма: плазме, сыворотке, моче, слюне и даже жидкости спинного мозга [1, 2]. При

этом повышение уровня сцДНК в плазме и сыворотке крови определяется при многих заболеваниях, включая аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования, инфаркт миокарда и др. [3, 4]. До сих пор не ясна физиологическая роль сцДНК, а также ее значение в развитии того или иного заболевания. Установлено, что сцДНК находится во внеклеточных жидкостях в виде таких структур,

© Горбачева Т. М., Паневина А. В., Гуреев А. П., Башмаков В. Ю., Солодских С. А., Мошуров И. П., Михайлов А. А., Маслов А. Ю., Попов В. Н., 2019

как микропузырьки, микрочастицы, апоптотические тельца, экзосомы, гистоновые комплексы и виртосомы [5, 6, 7]. Определены значения сцДНК у здоровых доноров, которые колеблются в пределах 10-100 нг/мл. Предполагается, что сцДНК у этих больных происходит из опухолевых клеток непосредственно. Принадлежность сцДНК к опухолевым клеткам можно определять по мутациям в ряде генов, связанных с опухолевой прогрессией клеток, например, в гене p53 [8, 9].

Хотя концентрация сцДНК не может быть использована как эффективное прогностическое и диагностическое средство, этот параметр можно использовать для мониторинга изменений, происходящих с опухолью в процессе лечения, а также для раннего выявления онкологических патологий [8, 9]. В отдельных клинических случаях концентрация сцДНК оказывается ниже оптимального для детекции мутаций количества. Как правило, фракция сцДНК, происходящая из опухолевых клеток, составляет от 0.01% до 90% от всей сцДНК крови.

Очевидно, что повышенная концентрация сцДНК является отражением протекающих в организме пациента процессов. Перед тем, как принять концентрацию сцДНК как информативный эффективный диагностический биомаркер, следует решить ряд вопросов.

Во-первых, выбор метода выделения сцДНК высокого качества в необходимом количестве является ключевым шагом к введению анализа сцДНК в клиническую практику. Показано, что преаналитические условия забора и обработки крови существенно влияют на выход сцДНК [10, 11, 12]. Ввиду высокой сложности, стоимости и продолжительности имеющихся методик выделения сцДНК, Сонненберг с соавторами разработали метод электрокинетического выделения сцДНК [8].

Во-вторых, в большинстве исследований крупного масштаба использовались методы секвенирования. В 2012 году Диаз с соавторами показали, что мутантная по гену KRAS ДНК присутствует в кровотоке пациентов с колоректальным раком. У 38% пациентов в сцДНК в сыворотке обнаруживались мутации KRAS методами масштабного секвенирования в течение 5-6 месяцев после окончания терапии [13]. В другом исследовании анализировались пациенты с метастатическим колоректальным раком перед применением таргетной терапии, и было показано, что 100% диагностическая специфичность мутации V600E в гене

BRAF, а так же 98% специфичность 7 протестированных точечных мутаций в гене KRAS [14].

Существует два подхода к анализу сцДНК плазмы. Первый, так называемый целевой подход, заключается в анализе на предмет наличия хорошо известных генетических изменений, наблюдаемых в основной опухоли, из набора мутаций с известными терапевтическими рекомендациями, например, в генах KRAS и EGFR. Второй подход подразумевает анализ более обширных данных без знания конкретной информации об основной опухоли. В контексте мониторинга заболевания параллельно с полногеномным также используется полноэкзомное секвенирование сцДНК, которое так же не требует точных данных по мутационному профилю в основной опухоли [15, 16, 17, 18, 19].

Целью работы была разработка метода для детекции и оценки количества сцДНК на основании известных точечных мутаций в сцДНК, суть которого заключалась в следующем. Методами таргетного секвенирования определялись мутации в ткани удаленной почки и методами аллель-специфичной ПЦР отслеживали ее наличие в крови пациента через равные промежутки времени.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Ткань удаленной почки стабилизировали в RNeasy lysis buffer («Qiagen», США). ДНК из ткани выделяли Quick-gDNA MiniPrep («Zymo Research», США). Свободно-циркулирующую ДНК выделяли из плазмы крови набором QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit («Qiagen», США). Также использовали синтетическую ДНК - смесь ДНК из нормальной ткани и ДНК из опухолевой ткани с мутацией известной частоты по полученным данным таргетного секвенирования для получения мутантной аллели целевого процента. Данную смесь ДНК и свободно циркулирующую ДНК использовали для проведения аллель-специфичной ПЦР и последующей характеристики данного метода.

Предлагаемый способ диагностики метастазирования опухоли на основании сцДНК включает в себя следующие стадии:

1. получение исходной пары образцов ткани от пациента, где один из образцов получен из предположительно пораженной раком ткани, а второй получен из прилегающей гистологически нормальной ткани («условной нормы»);
2. выделение и очистка препаратов ДНК из исходной пары образцов;

3. создание библиотек AmpliSeq из ДНК исходной пары образцов тканей для целевого ресеквенирования кодирующих последовательностей (экзонов) наиболее значимых онкогенов коммерчески доступной панели праймеров Comprehensive Cancer Panel с целью составления характерной для пациента «карты мутаций» - всего спектра геномных перестроек, возникших в ходе развития опухоли;
4. получение образцов крови от пациента в день операции, через 10-15 дней после операции и через месяц после операции;
5. выделение и очистка препаратов ДНК из образцов крови;
6. проведение полуколичественной или количественной реакции амплификации фрагментов онкогенов с использованием ДНК крови в качестве матрицы, и пар геноспецифичных олигонуклеотидных праймеров, специфически подобранных для каждого пациента;
7. сравнение количества амплифицированных фрагментов ДНК крови онкогенов в день операции, что принимается за базовый уровень, и через месяц. Обнаружение повышения концентрации мутантных аллелей в крови будет свидетельствовать о ремиссии опухолевого роста и возможном прогрессе заболевания, что потребует дополнительного обследования для выявления локализации опухоли и/или мест метастазирования.

Ключевым является разработка праймеров для проведения аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) – полимеразной цепной реакции, в которой аллельные варианты различаются за счёт того, что 3' концевой нуклеотид одного из праймеров гибридизуется непосредственно с позицией однонуклеотидной замены (ОНП или в англоязычной литературе SNP).

Во всех экспериментах ставилось две реакции АС-ПЦР с SNP полимеразой («Евроген», Россия):

- 1) Реакция с праймером дикого типа (WT – wild type) – реакция АС-ПЦР 1 (реакция 1);
- 2) Реакция с аллель-специфичным праймером (AS – allele specific, мутантным) – реакция АС-ПЦР 2 (реакция 2).

Все эксперименты проводились на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», Америка).

Реакцию №1 ставили с нормальным праймером (или праймером дикого типа) следующая: SYBR green I – 1 мкл, реакционный буфер 10x – 2.5 мкл, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов

50x – 0.5 мкл, ДНК-полимераза – 0.2 мкл, смесь праймеров – 1.25 мкл, ДНК матрица – 1 мкл, вода – 3.25 мкл. Состав реакции №2 идентичен составу реакции №1 за исключением смеси праймеров – аллель-специфичный (с мутацией) праймер с обратным праймером.

ПЦР проводилась в амплификаторе при стандартных условиях: начальная денатурация - 95 °С, 3 мин, 1 цикл; 50 циклов - предварительная денатурация 95 °С 30 сек, отжиг праймеров 60°С 30 сек, элонгация 72°С 45 сек.

При постановке ПЦР включается два вида внутренних контролей:

- 1) Контроль 1 – положительный контроль – геномная ДНК, выделенная из опухолевой ткани (мутантная);
- 2) Контроль 2 – отрицательный контроль – геномная ДНК, выделенная из нормальной ткани (нормальная).

ΔCt рассчитывали по следующей формуле: $\Delta Ct = Ct$ реакции 2 (мутантной аллели) – Ct реакции 1 (аллели дикого типа) [20]. Чем больше процент мутантной аллели, тем больше ΔCt реакции.

В ходе разработки набора проведена предварительная оценка следующих показателей метода, а именно лимит/предел детекции реакции, минимальное определяемое количество ДНК, линейность, чувствительность.

Для анализа были выбраны мутации в генах RET, PRKDC, PDGFRA, представляющая собой однонуклеотидную замену/полиморфизм – ОНП, или так называемый SNP. В качестве контроля для ПЦР взята нормальная ДНК. Подбор праймеров осуществляли с помощью программного комплекса Primer Blast на сайте https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome. Список праймеров – два прямых (forward): аллель-специфичный – allele-specific (AS) - и дикого типа - wild-type (WT) – праймеры, и один обратный (reverse) представлены в таблице 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения минимальной детектируемой концентрации ДНК, т.е. лимита детекции, были поставлены эксперименты с разной концентрацией ДНК, содержащей 50% мутантной аллели в образцах (169 нг/мкл). А именно были сделаны разведения опухолевой геномной ДНК для получения проб конечных концентрации 10; 5; 1; 0.5; 0.1; 0.05; 0.01 нг/мкл. Для анализа была выбрана мутация в гене RET, представляющая собой однонуклеотидную замену C/G в хромосоме 10 в поло-

Таблица 1.

Список праймеров для проведения АС-ПЦР

Название праймера	Сиквенс праймера 5'-3'	T _m , °C
RET _{fn}	CCCGAGATGTTTATGAAGAGGATTCC	57
RET _{fm}	CCCGAGATGTTTATGAAGAGGATTCC	57
RETr	CTAGGCTTCCCAAGGGCAC	59
PRKDC _{fn}	ACGAGGTGCTCCAGAACTGGA	60
PRKDC _{fm}	ACGAGGTGCTCCAGAACTGGG	60
PRKDCr	CTAGGCTTCCCAAGGGCAC	59
PDGFRA _{fn}	GGAGGGTCATTGAATCAATCAGCCCA	61
PDGFRA _{fm}	GGAGGGTCATTGAATCAATCAGCCCG	61
PDGFRAr	AACTTACCAAGCACTAGTCCATCTCTTGG	60

жении 43120185 с частотой встречаемости 51.8. В качестве контроля для ПЦР взята нормальная ДНК. Списки праймеров представлены в таблице 1.

Полученные результаты в ходе ПЦР свидетельствуют о том, что при наличии 50% мутантной аллели в образце минимальная концентрация ДНК для анализа с допустимой достоверностью может составлять 0.1 нг/мкл ($P < 0.001$) (рис. 1).

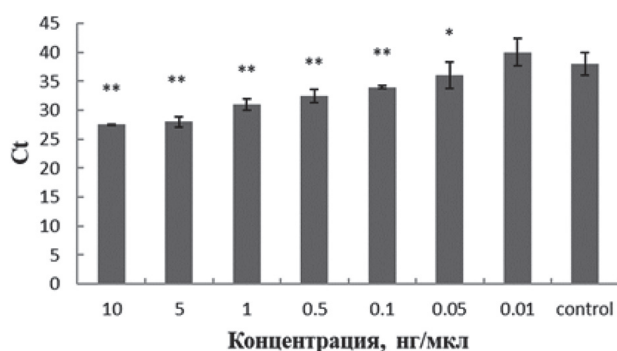


Рис. 1. Определение предела детекции концентрации ДНК с 50% мутантной аллели

С целью определения минимальной детектируемой концентрации ДНК с 15% мутантной аллели в образце была приготовлена также синтетическая ДНК. Синтетическая ДНК приготовлена из ДНК, выделенной из нормальной ткани, с концентрацией 90.4 нг/мкл и ДНК, выделенной из опухолевой ткани, с концентрацией 152 нг/мкл. Исходные образцы ДНК использованы для получения концентраций 10; 5; 2.5; 1.25; 0.6; 0.3; 0.15 нг/мкл. В качестве контроля использовалась нормальная ДНК. При постановке ПЦР анализировалась мутация в гене PRKDC в хромосоме 8 в положении 48848443 с частотой 26.7%.

В результате проведения ПЦР было получено, что при анализе ДНК с 15% мутантной аллели минимальная детектируемая концентрация составляет 0.6 нг/мкл ($P < 0.001$) (рис. 2).

Далее для определения чувствительности метода, была взята ДНК с 1.7% мутантной аллели в образце. Далее данная ДНК разбавлена с полу-

чением концентраций 10; 5; 2.5; 1.25; 0.6; 0.3; 0.15 нг/мкл для проведения АС-ПЦР. Для последовательного разведения использовалась мутация в гене PRKDC с 26.7% мутантной аллели. В качестве контроля использовалась нормальная ДНК в концентрации 5 нг/мкл.

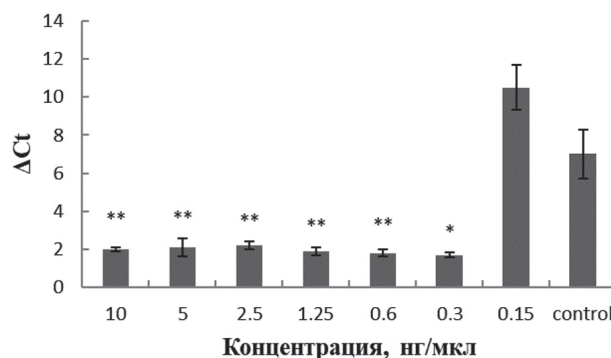


Рис. 2. Определение минимальной детектируемой концентрации синтетической ДНК с 15% мутантной аллели

Проведение АС-ПЦР показало, что при содержании 1.7 % мутантной аллели в образце, необходимое количество матрицы ДНК для анализа составляет 0.6 нг/мкл ($P < 0.001$) (рис. 3).

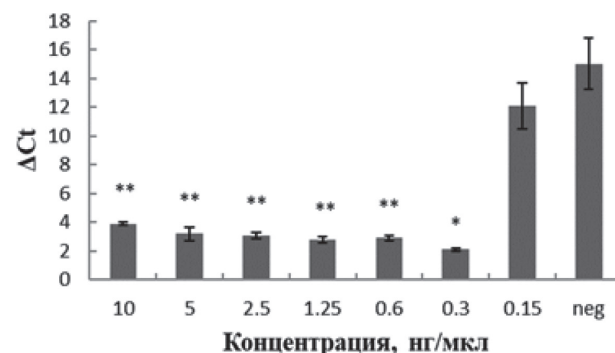


Рис. 3. Определение минимальной детектируемой концентрации синтетической ДНК с 1.7 % мутантной аллели

На основании полученных данных при анализе диапазона концентраций ДНК с разным процентом мутантной аллели – 50% ,15% и 1.7%,

Горбачева Т. М., Паневина А. В., Гуреев А. П., Башмаков В. Ю., Солодских С. А., Мошуров И. П., Михайлов А. А., Маслов А. Ю., Попов В. Н.

линейность анализа мутаций методом АС-ПЦР соблюдается в пределах от 0.1 нг/мкл до 10 нг/мкл. Таким образом, минимальная концентрация образца для анализа составляет 0.1 нг/мкл.

Для установления допустимой максимальной концентрации была протестирована ДНК с гомозиготной мутацией в концентрациях 10, 20, 50, 100 нг/мкл.

Анализировалась эффективность амплификации мутации в гене PDGFRA с заменой А/Г в хромосоме 4 в положении 54274888 с частотой встречаемости 100%, праймеры для проведения АС-ПЦР представлены в таблице 1.

Проведение АС-ПЦР показало, что максимальная концентрация образца, допустимая для анализа, составляет 50 нг/мкл, тогда как большие концентрации приводят к повышению неспецифического отжига праймеров и требуют дополнительного разведения для анализа (рис. 4).

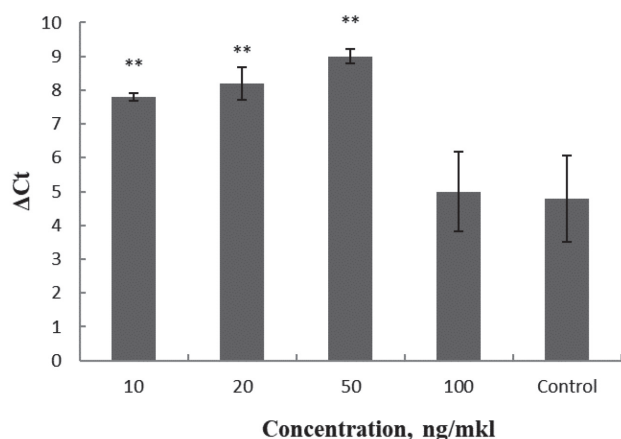


Рис. 4. Определение максимальной детектируемой концентрации ДНК с гомозиготной мутацией

Таким образом, оптимальный диапазон концентраций ДНК для детекции мутаций методом АС-ПЦР, при котором наблюдается линейность, представлен в пределах от 0.1 нг/мкл до 50 нг/мкл.

Следующим показателем для определения была чувствительность (sensitivity) – минимальное количество целевого соединения/продукта – процент мутантной аллели в ДНК, которое может быть определено поверх исходного шума (неспецифической амплификации) системы. Чувствительность зависит не только от прибора, но и от реагентов, в связи с чем важно при сравнении систем использовать одно и то же целевое соединение и реагенты.

Для определения чувствительности метода была получена сделана синтетическая ДНК смешиванием нормальной и опухолевой ДНК с мутацией RET в соотношении 1:1 для получения 25% мутантной аллели, далее разбавлена в 2 раза с не-

мутантной матрицей ДНК (фоновой) для получения следующих % мутантной аллели: 50; 25; 12.5; 6.3; 3.1; 1.6; 0.8; 0.4; 0.2. В качестве контроля взята нормальная ДНК.

В результате проведения ПЦР получено, что минимальный % мутантной аллели, доступный для анализа, составляет 1.6 (P<0.001) (рис. 5).

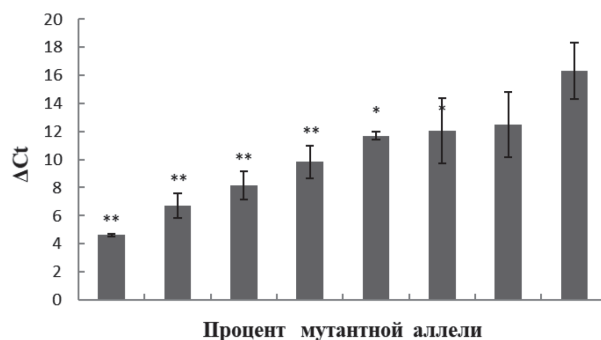


Рис. 5. Определение детекции минимального процента мутантной аллели

После проведения аллель-специфичной ПЦР с геном PRKD с частотой встречаемости 26.7%, получены следующие результаты сДНК, выделенная до операции – ΔCt 7.33, сДНК, выделенная после операции – 7.21, сДНК, выделенная через 3 месяца после операции – 6.54, геномная ДНК, выделенная из опухолевой ткани – 0.75, геномная ДНК, выделенная из нормальной ткани – 7.08.

На основании данных ΔCt была построена гистограмма (рис. 6).

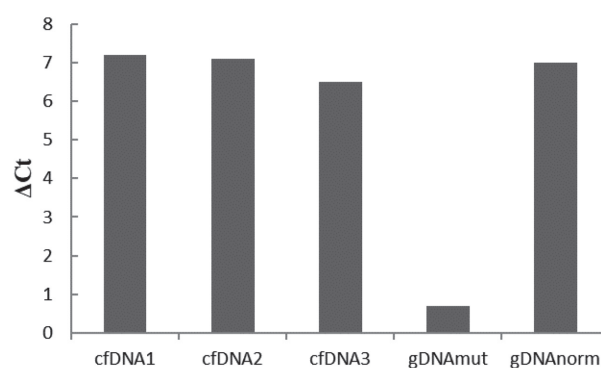


Рис. 6. Сравнение ΔCt в образцах нормальной и опухолевой ДНК

Предварительное секвенирование выявило, что мутация PRKDC встречается в ДНК опухоли с частотой 26.7%. Для образца нормальной ДНК значение ΔCt составляет 7.08, а для опухолевой ДНК – 0.75. Это значит, что образец геномной ДНК имеет мутантный аллель гена PRKDC. Тогда как образцы сДНК имеют ΔCt близкую к ΔCt нормальной ДНК, что свидетельствует об отсутствии мутантных аллелей в них и наличие только аллелей дикого типа.

Таким образом, метод аллель-специфичной ПЦР возможен для анализа присутствия сцДНК в крови пациентов с раком почки с диагностическими и прогностическими целями. Минимальный процент мутантной аллели для анализа составляет 1.6%. Линейность метода наблюдается в промежутке концентраций проб 0.1 нг/мкл до 50 нг/мкл. При 50% мутантной аллели минимум концентрации для детекции составляет 0.1 нг/мкл; при 15% мутантной аллели – 0.6 нг/мкл; при 1.7% мутантной аллели – 0.6 нг/мкл. Соответственно данные характеристики метода нужно учитывать при использовании данного метода анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agostini M., Enzo M.V., Bedin C., Belardinelli V., Goldin E., Del Bianco P., Maschietto E., D'Angelo E., Izzi L., Saccani A., Zavagno G., Nitti D. // *Ann Surg Oncol*. 2011. Vol. 18. № 9, pp. 2461-2468.
2. Shang M., Chang C., Pei Y., Guan Y., Chang J., Li H. // *J Cancer*. 2018. Vol. 9(24), pp. 4627-4634.
3. Arnalich F., Menéndez M., Lagos V., Ciria E., Quesada A., Codoceo R., Vazquez J.J., López-Collazo E., Montiel C. // *Critical Care*. 2010. Vol. 14, pp. 1-11.
4. Nakamura Y., Yoshino T. // *Oncologist*. 2018. Vol. 23(11), pp.1310-1318.
5. Peters D.L., Pretorius P.J. // *Clin. Chim. Acta*. 2011. Vol. 12. №412, pp. 806-811.
6. Oellerich M., Schütz E., Beck J., Kanzow P., Plowman P.N., Weiss G.J., Walson P.D. // *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017. Vol. 54(3). pp. 205-218.
7. Abbou S.D., Shulman D.S., DuBois S.G., Crompton B.D. // *Pediatr Blood Cancer*. 2019. doi: 10.1002/pbc.27595.
8. Chan K.C., Lo Y.M. // *Br. J. Cancer*. 2007. Vol. 12. №96, pp. 681-685.
9. Gorgannezhad L., Umer M., Islam M.N., Nguyen N.T., Shiddiky M.J.A. // *Lab Chip*. 2018. Vol. 18(8). pp. 1174-1196.
10. Swinkels D.W., Wiegerinck E., Steegers E.A., de Kok J.B. // *Clin Chem*. 2003. Vol. 49. № 3, pp.525-6
11. Cheung A.H., Chow C., To K.F. // *J Thorac Dis*. 2018. Vol. 10 (Suppl 14). pp.1645-1651.
12. Lai J., Du B., Wang Y., Wu R., Yu Z. // *Onco Targets Ther*. 2018. Vol. 11. pp. 9111-9116.
13. Diaz L.A., Williams R.T., Wu J., Kinde I., Hecht J.R., Berlin J., Allen B., Bozic I., Reiter J.G., Nowak M.A., Kinzler K.W., Oliner K.S., Vogelstein B. // *Nature*. 2012. Vol. 486, pp. 537-40.
14. Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S., Mollevi C., Lopez-Crapez E., Rolet F., Gillet B., Gongora C., Dechelotte P., Robert B., Del Rio M., Lamy P.J., Bibeau F., Nouaille M., Lorient V., Jarrousse A.S., Molina F., Mathonnet M., Pezet D., Ychou M. // *Nat Med*. 2014. Vol. 20. №4, pp. 430-5.
15. Catarino R., Ferreira M. M., Rodrigues H. // *DNA Cell Biol*. 2008. Vol. 27. № 8, pp.415-421.
16. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. // *Cancer Res*. 1977. Vol. 37. № 3, pp. 646-650.
17. Szpechcinski A., Chorostowska-Wynimko J., Kupis W., Maszkowska-Kopij K., Dancewicz M., Kowalewski J., Orłowski T. // *Expert Opin Biol Ther*. 2012. Vol. 12. № S1, pp. S3-S9.
18. Sai S., Ichikawa D., Tomita H. // *Anticancer Res*. 2007. Vol. 27. №4, pp.2747-2751.
19. Tomita H., Ichikawa D., Ikoma D. // *Anticancer Res*. 2007. Vol. 27. №4C, pp.2737-41.
20. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N. // *BMC Bioinformatics*. 2006. Vol.7, pp. 58 – 60

Воронежский государственный университет

Voronezh State University

*Горбачева Т. М., канд. биол. наук, инженер кафедры генетики, цитологии и биоинженерии
E-mail: gorb.tanya@gmail.com*

*Gorbacheva T. M., PhD, engineer of the department of genetics, cytology and bioengineering
E-mail: gorb.tanya@gmail.com*

*Паневина А.В., аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии
E-mail: anna-panevina@yandex.ru*

*Panevina A. V., post-graduate student, department of genetics, cytology and bioengineering
E-mail: anna-panevina@yandex.ru*

Горбачева Т. М., Паневина А. В., Гуреев А. П., Башмаков В. Ю., Солодских С. А., Мошуров И. П., Михайлов А. А., Маслов А. Ю., Попов В. Н.

Гуреев А. П., аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

E-mail: gureev@bio.vsu.ru

Gureev A. P., post-graduate student, department of genetics, cytology and bioengineering

E-mail: gureev@bio.vsu.ru

Башмаков В. Ю., канд. биол. наук, ассистент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

E-mail: vito-mail2012@yandex.ru

Bashmakov V. Yu, PhD, Assistant Professor, department of genetics, cytology and bioengineering

E-mail: vito-mail2012@yandex.ru

Попов В. Н., доктор биол. наук, заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии

E-mail: pvn@bio.vsu.ru

Popov V. N., PhD., DSci., head of the department of genetics, cytology and bioengineering

E-mail: pvn@bio.vsu.ru

Солодских С. А., аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

E-mail: solodskikh@bio.vsu.ru

Solodskih S. A., post-graduate student, department of genetics, cytology and bioengineering

E-mail: solodskikh@bio.vsu.ru

Университета Йешива, медицинская школа имени Альберта Эйнштейна

Маслов А.Ю., ассистент

E-mail: alex.maslov@einstein.yu.edu

Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University

Maslov A. Yu, M.D., assistant professor

E-mail: alex.maslov@einstein.yu.edu

БВЗ ВО "ВОКОД"

Михайлов А.А., зам. главного врача

E-mail: mail@vokod.zdrav36.ru

Voronezh Regional Clinical Oncology Dispensary

Mikhaylov A. A., head of chief physician

E-mail: mail@vokod.zdrav36.ru

Мошуров И.П., главный врач

E-mail: mail@vokod.zdrav36.ru

Moshurov I. P., chief physician

E-mail: mail@vokod.zdrav36.ru

CELL FREE DNA AS A PROGNOSTIC AND DIAGNOSTIC BIOMARKER

T. M. Gorbacheva¹, A. V. Panevina¹, A.P. Gureev¹, V. Yu. Bashmakov¹, Solodskih S. A.¹,
I. P. Moshurov³, A.A.Mikhaylov³, A. Yu. Maslov^{1,2}, V. N.Popov¹

¹ Voronezh State University

² Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University

³ Voronezh Regional Clinical Oncological Dispensary

Abstract. Cell free DNA (cfDNA) is detected in all liquids of organism. Besides, the increase of cell free DNA in plasma or serum is detected when there is a disease, including autoimmune diseases, cancer, cardiac infarction. Still physiological role of cfDNA is not known, and its role in pathogenesis of any diseases. The diapason of cfDNA is detected in healthy people and it varies from 10 ng/ml to 100 ng/ml. It is supposed that cfDNA is originated from cancer cells. It proved that these cells are cancerogenic based on mutations in genes of cancer progression, for example, p53. Even though cfDNA can not be used as an effective prognostic and diagnostic tool, this parameter can be used for monitoring of changes of tumor during the treatment and for early detection of cancer. In some clinical cases concentration of cfDNA is below optimum for detection of mutations. As a rule, fraction of originated from tumor cfDNA constitute from 0.01% to 90% of total cfDNA of the blood. Obviously that increased concentration of cfDNA is a reflection of the processes occurring in the patient's body.

It was developed a method of allele-specific PCR for determination of free circulating DNA in blood as a result of metastasis of a kidneys tumor. First the mutations were detected by targeted sequencing of kidney tissue, then these mutations were traced by allele-specific PCR at time scale. This method is characterized

by the following indicators: limit/limit of detection reaction, the minimum detectable amount of DNA, linearity, sensitivity. The minimum percent of mutant allele for the analysis is 1.6%. The linearity is observed in the diapason of probe concentration between 0.1 ng/mkl до 50 ng/mkl. When 50% of mutant allele, minimum detectable concentration is 0.1 ng/mkl; when 15% of mutant allele – 0.6 ng/mkl; when 1.7% of mutant allele – 0.6 ng/mkl. The Delta value of two competing reactions PCR is applied to determine the presence, absence, or dynamics cfDNA in the blood of patients. Based on these data, it is possible to predict the success of the operation and in the further presence of tumor metastasis.

Keywords: allele-specific PCR, free circulating DNA, kidneys tumor, metastasis

REFERENCES

1. Agostini M., Enzo M.V., Bedin C., Belardinelli V., Goldin E., Del Bianco P., Maschietto E., D'Angelo E., Izzi L., Saccani A., Zavagno G., Nitti D., *Ann Surg Oncol*, 2011, Vol. 18, № 9, pp. 2461-2468.
2. Shang M., Chang C., Pei Y., Guan Y., Chang J., Li H., *J Cancer*, 2018, Vol. 9(24), pp. 4627-4634.
3. Arnalich F., Menéndez M., Lagos V., Ciria E., Quesada A., Codoceo R., Vazquez J.J., López-Collazo E., Montiel C., *Critical Care*, 2010, Vol. 14, pp. 1-11.
4. Nakamura Y., Yoshino T., *Oncologist*, 2018, Vol. 23(11), pp.1310-1318.
5. Peters D.L., Pretorius P.J., *Clin. Chim. Acta*, 2011, Vol. 12, №412, pp. 806-811.
6. Oellerich M., Schütz E., Beck J., Kanzow P., Plowman P.N., Weiss G.J., Walson P.D., *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2017, Vol. 54(3), pp. 205-218.
7. Abbou S.D., Shulman D.S., DuBois S.G., Crompton B.D. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30614191> (date of the application: 15.12.18)
8. Chan K.C., Lo Y.M., *Br. J. Cancer*, 2007, Vol. 12, №96, pp. 681-685.
9. Gorgannezhad L., Umer M., Islam M.N., Nguyen N.T., Shiddiky M.J.A., *Lab Chip*, 2018, Vol. 18(8), pp. 1174-1196.
10. Swinkels D.W., Wiegerinck E., Steegers E.A., de Kok J.B., *Clin Chem*, 2003, Vol. 49, № 3, pp.525-6
11. Cheung A.H., Chow C., To K.F., *J Thorac Dis*, 2018, Vol. 10 (Suppl 14), pp.1645-1651.
12. Lai J., Du B., Wang Y., Wu R., Yu Z., *Oncotargets Ther*, 2018, Vol. 11, pp. 9111-9116.
13. Diaz L.A., Williams R.T., Wu J., Kinde I., Hecht J.R., Berlin J., Allen B., Bozic I., Reiter J.G., Nowak M.A., Kinzler K.W., Oliner K.S., Vogelstein B., *Nature*, 2012, Vol. 486, pp. 537-40.
14. Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S., Mollevi C., Lopez-Crapez E., Rolet F., Gillet B., Gongora C., Dechelotte P., Robert B., Del Rio M., Lamy P.J., Bibeau F., Nouaille M., Lorient V., Jarrousse A.S., Molina F., Mathonnet M., Pezet D., Ychou M., *Nat Med*, 2014, Vol. 20, №4, pp. 430-5.
15. Catarino R., Ferreira M. M., Rodrigues H., *DNA Cell Biol*, 2008, Vol. 27, № 8, pp.415-421.
16. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J., *Cancer Res*, 1977, Vol. 37, № 3, pp. 646-650.
17. Szpechcinski A., Chorostowska-Wynimko J., Kupis W., Maszkowska-Kopij K., Danciewicz M., Kowalewski J., Orłowski T., *Expert Opin Biol Ther*, 2012, Vol. 12, № S1, pp. S3-S9.
18. Sai S., Ichikawa D., Tomita H., *Anticancer Res*, 2007, Vol. 27, №4, pp. 2747-2751.
19. Tomita H., Ichikawa D., Ikoma D., *Anticancer Res*, 2007, Vol. 27, №4C, pp. 2737-41.
20. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N., *BMC Bioinformatics*, 2006, Vol.7, pp. 58 – 60