

РАЗНООБРАЗИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ

Обзор

© 2024 Е.Ш. Кулигина^{1*}, Г.А. Янус^{1,2}, Е.Н. Имянитов^{1,2}

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
197758 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: kate.kuligina@gmail.com

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет
Минздрава России, 194100 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 26.08.2024

После доработки 30.09.2024

Принята к публикации 01.10.2024

За последнее десятилетие жидкостная биопсия (ЖБ) стала одним из рутинных диагностических тестов, применяемых в практической онкологии. Её возможности включают раннюю диагностику, молекулярное типирование, уточнение прогноза онкологических заболеваний, а также предсказание и мониторинг ответа опухоли на терапию. Обычно ЖБ представляет собой экспрессию из плазмы крови и молекулярный анализ только одной из фракций опухоль-ассоциированных молекул или клеточных элементов – циркулирующих опухолевых ДНК (цодНК), опухолевых клеток (ЦОК), РНК (цоРНК) или содергимого внеклеточных везикул (экзосом, ВВ). Несмотря на техническое совершенство методов молекулярного анализа циркулирующих онкомаркеров, такой вариант диагностики имеет ограниченную информативность. У значительного числа онкологических пациентов (10–50% случаев, в зависимости от типа опухоли) не удается выявить и проанализировать ни одного из этих анализов, несмотря на наличие в организме крупных прогрессирующих неопластических очагов. Есть основания полагать, что разнородные фракции циркулирующих в крови опухоль-специфических биомаркеров дополняют друг друга, и что одновременный анализ нескольких фракций поможет не только повысить чувствительность метода, но и более точно охарактеризовать и спрогнозировать клиническую ситуацию. Данный обзор рассматривает возможности и преимущества применения комбинированного мультипараметрического подхода к ЖБ, подразумевающего тестирование нескольких циркулирующих анализов в одном образце крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: жидкостная биопсия, цодНК, экзосомы, ЦОК, цоРНК, белковые онкомаркеры, прогностические маркеры, предиктивные маркеры, рак.

DOI: 10.31857/S0320972524110121 EDN: IKGNCM

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия жидкостная биопсия (ЖБ) преодолела путь от сугубо экспериментальной методики до рутинного диагностического инструмента, внедрённого в онкологическую практику. Её возможности включают раннюю

диагностику, молекулярное типирование, уточнение прогноза онкологических заболеваний, а также предсказание и мониторинг ответа опухоли на терапию. Одним из примечательных свойств ЖБ является способность преодолевать ограничения, присущие традиционной «тканевой» биопсии. Обходя такие сложности, как пространственная

Принятые сокращения: ВВ – внеклеточные везикулы; ЖБ – жидкостная биопсия; РЖ – рак желудка; РЛ – рак лёгкого; РМЖ – рак молочной железы; РП – рак простаты; РПЖ – рак поджелудочной железы; РТК – рак толстой кишки; РЯ – рак яичника; цодНК – циркулирующая опухолевая ДНК; ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки; СА-125 – раковый антиген-125; PSA – prostate-specific antigen, простатический специфический антиген.

* Адресат для корреспонденции.

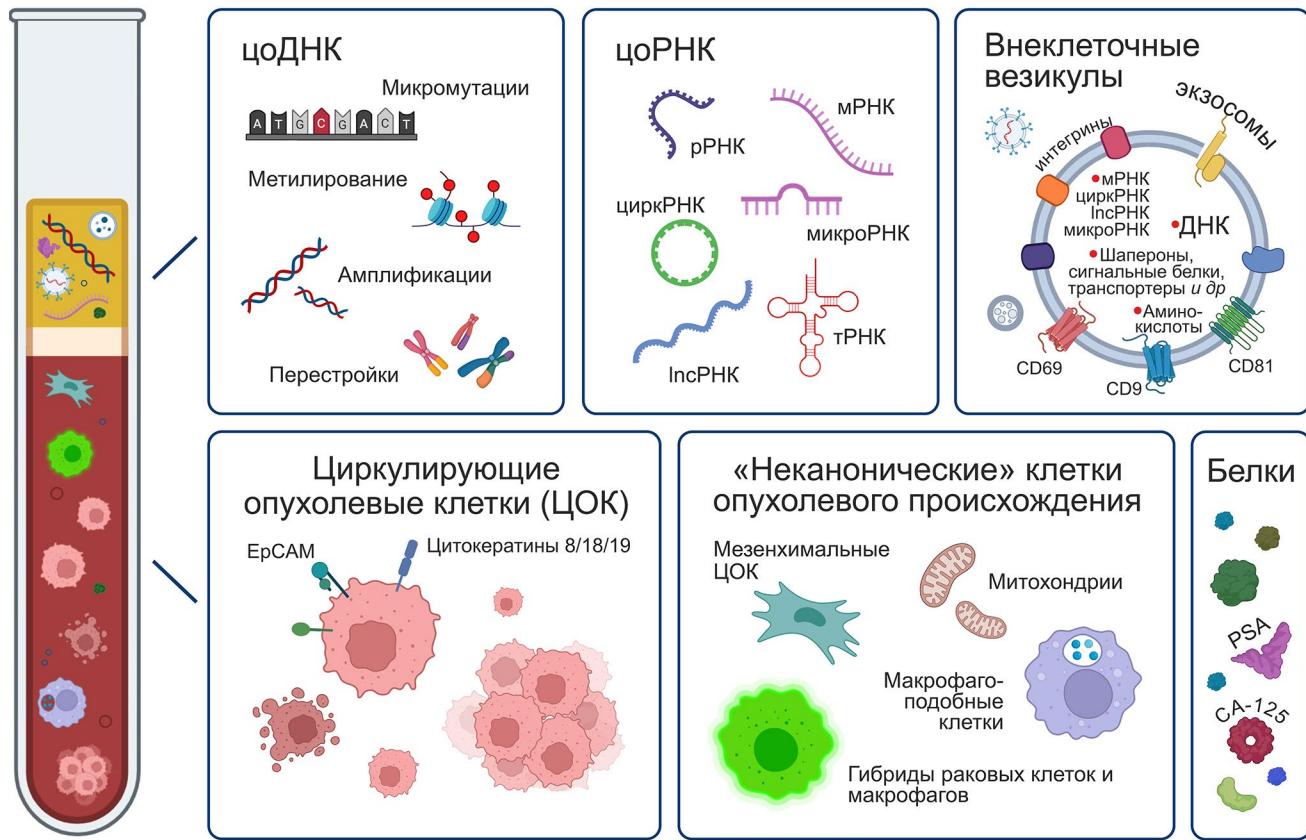


Рис. 1. Циркулирующие в периферической крови молекулы и клеточные элементы опухолевого происхождения, используемые для ЖБ

гетерогенность и травматичность серийного забора материала, ЖБ позволяет в режиме реального времени анализировать развивающуюся картину заболевания, обеспечивает количественную и качественную оценку эволюции опухоли.

Самый распространённый и стандартизованный вариант ЖБ подразумевает использование свободно циркулирующих опухолевых ДНК (цоДНК), поскольку этот анализ проще всех остальных поддаётся экстракции, количественной оценке и в значительных количествах существует даже на начальных этапах заболевания. Несколько реже в клинических целях анализируют циркулирующие в кровотоке опухолевые клетки (ЦОК) и экзосомы, в которых нуклеиновые кислоты и белки защищены от деградации мембранами. За истекшее десятилетие более ста циркулирующих в крови опухолевых белков были одобрены для клинической диагностики [1]. Сами по себе протеины сыворотки крови не являются достаточно надёжными предикторами, однако их включение в цоДНК-панели увеличивает информативность ЖБ, особенно в отношении опухолей на ранних стадиях [2].

Наряду с этими более привычными маркерами в последние годы становятся всё более значимыми и другие молекулы опухолевого происхожде-

ния, свободно циркулирующие в биологических жидкостях (рис. 1). Применение высокочувствительных техник на базе РНК-секвенирования позволило выявить и охарактеризовать разнообразные фракции дрейфующих в крови опухолевых РНК, в частности, таких молекул как информационные (mRNK), длинные некодирующие (lncRNA, lncРНК), микроРНК (miRNA), кольцевые (cirRNA, циркРНК) и транспортные (tRNK) РНК [3, 4]. С помощью сканирующей лазерной цитометрии и иммуноферментного анализа было показано, что одновременно с «каноническими» неопластическими клетками из злокачественного очага в кровеносное русло проникают и другие элементы – мезенхимальные и эпителиально-мезенхимальные ЦОК (EMT-CTC), ассоциированные с опухолью макрофагоподобные клетки (cancer-associated macrophage-like cells, CAMLs), гибриды раковых клеток и макрофагов (dual-positive cells, DPcells), свободные митохондрии и т.д. [5, 6]. Соотношение фракций этих клеток и их молекулярные особенности отражают процессы, происходящие в «материнской» опухоли, и могут служить прогностическими маркерами, дополняя возможности традиционной ЖБ. Наряду с плазмой крови в качестве источника циркулирующих опухоль-специфических маркеров могут быть использо-

ваны и другие биологические жидкости – моча, спинномозговая жидкость, плевральная или перитонеальная жидкость, слюна и др. [7].

Данный обзор рассматривает преимущества применения комбинированного подхода к ЖБ, подразумевающего тестирование нескольких циркулирующих анализов в одном образце крови (т.н. мультипараметрическая ЖБ). Есть все основания полагать, что разнородные опухоль-специфические биомаркеры не конкурируют, а являются комплементарными; таким образом, одновременный анализ нескольких фракций поможет не только увеличить чувствительность метода, но и достовернее охарактеризовать и спрогнозировать клиническую ситуацию [8].

МНОГООБРАЗИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ

Циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК). ЦоДНК представляет собой малочисленную фракцию свободных фрагментов ДНК длиной 160–2000 пар оснований (п.о.), которые проникают в кровеносное русло или в другие жидкости организма из опухолевого очага в результате разрушения неопластических клеток путём апоптоза, некроза, пироцитоза или других биологических процессов – активной секреции, эксцизионной репарации и т.д. [9]. ЦоДНК, как правило, более фрагментирована, чем внеклеточная ДНК из «здоровых» клеток, эта фракция обогащена фрагментами длиной 90–150 п.о. [10]. Период полураспада цоДНК в периферической крови варьирует от 15 минут до нескольких часов [11], что делает цоДНК очень подходящим маркером для оценки динамики опухоли в реальном времени [12]. В настоящее время этот циркулирующий анализ является наиболее изученным; для него оптимизированы и стандартизованы методы сбора и процессинга биоматериала [13, 14].

Прогностическая ценность динамики и состава цоДНК подтверждена практически для всех типов неоплазм, включая наиболее распространённые и социально значимые – рак лёгкого (РЛ), толстой кишки (РТК), молочной железы (РМЖ), яичника (РЯ), простаты (РП), меланомы и др. [15–17]. Концентрация в крови цоДНК при постановке диагноза, т.е. до начала лечения, может служить прогностическим маркером для пациентов с ранним РМЖ, РЯ, РЛ, РТК, меланомой [18–21]. Как правило, высокий исходный уровень цоДНК коррелирует с худшими результатами лечения и показателями продолжительности жизни. Быстрое падение уровня цоДНК вплоть до полного исчезновения в первые сутки или недели после начала таргетной терапии [22, 23], химиотерапии [24] или иммуно-

терапии [25] является благоприятным показателем и ассоциируется с лучшим ответом опухоли на воздействие и более продолжительным временем до прогрессирования (progression-free survival, PFS). Кроме того, анализ цоДНК позволяет охарактеризовать спектр молекулярных мишней опухоли, что делает его ценным инструментом для выбора таргетного лечения. При этом возможна детекция как отдельных мутаций [26], так и интегральных показателей, таких как опухолевая мутационная нагрузка (tumor mutation burden, TMB) и уровень дефицита гомологичной рекомбинации (homologous recombination deficiency, HRD) [27].

«Золотым стандартом» молекулярного анализа цоДНК признано использование сверхчувствительных модификаций полимеразной цепной реакции (droplet digital PCR (ddPCR), реже BEAMing PCR) [28, 29] и высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Safe-SeqS, TEC-Seq, CAPP-Seq + iDES, Duplex Sequencing) [21, 30]. Считается, что аналитический этап ЖБ на основе цоДНК уже приблизился к пределу своей разрешающей способности и позволяет детектировать даже единичные «мутантные» молекулы, циркулирующие в периферической крови в ничтожной концентрации 0,003–0,005% [31, 32]. Тем не менее в значительной доле случаев мутированные фрагменты опухолевой ДНК в плазме не обнаруживаются никакими методами. На практике от 10% (рак лёгкого (РЛ), рак прямой кишки, до 50% (рак щитовидной железы (РЩЖ) или почки) пациентов оказываются «плазма-негативными», несмотря на наличие у них достаточно больших прогрессирующих неопластических очагов [33, 34]. Возможным подходом к увеличению чувствительности ЖБ является использование aberrаций метилирования в качестве молекулярных маркеров [35], привлечение для экстракции цоДНК других биологических жидкостей, контактирующих с неоплазмами (поджелудочный сок, спинномозговая жидкость, слюна и др.), а также включение в анализ циркулирующих опухолевых маркеров иной природы, таких как ЦОК, экзосомы, белки, микроРНК.

ЦОК. Злокачественные клетки, подобно циркулирующим белковым комплексам и нуклеиновым кислотам, проникают в кровоток из первичных очагов солидных опухолей. Затем они могут выходить из кровеносных сосудов, инфильтрировать ткани, колонизировать «метастатические ниши», поэтому исследование их молекулярных особенностей очень ценно для понимания биологических механизмов метастазирования [36]. ЦОК могут дрейфовать в периферической крови как отдельные клетки или образовывать кластеры; последние обнаруживаются реже, полагают, что они более эффективно формируют метастазы [37].

Наличие и количество ЦОК используются для определения стадии злокачественного заболевания, а также в роли маркеров его прогрессирования и вероятности рецидива. Эффективность такого применения была продемонстрирована при различных локализациях карцином, включая РМЖ, РТК, РЛ, РП, рак мочевого пузыря и др. [38, 39]. Появление ЦОК наиболее характерно для метастазирующих неоплазм, требующих немедленной и интенсивной терапии, в то время как медленно растущие или «латентные» опухоли, как правило, не продуцируют ЦОК [40]. Другим многообещающим свойством ЦОК является то, что они могут сохранять жизнеспособность при изоляции и служить материалом для *in vitro* культивирования, объектом для функциональных тестов, в том числе тестирования препаратов [41] или изготовления ксеногraftов и других экспериментальных моделей [42].

Проблема использования ЦОК в качестве материала для ЖБ связана с тем, что они составляют очень небольшую долю от общего числа клеток, присутствующих в крови пациента – как правило, не более 1–10 клеток на 10 мл крови [43]. Следовательно, их обнаружение и изоляция является технически непростой задачей и требует предварительного этапа селекции и обогащения. Большинство клинических исследований ЦОК было выполнено с использованием автоматической платформы CellSearch® («Menarini Silicon Biosystems, Inc.», США, <https://www.siliconbiosystems.com/en-us/cellsearch-system>), определяющей ЦОК как ядроодержащие клетки, экспрессирующие EpCAM и цитокератины 8, 18 и/или 19, но лишенные CD45. Ограничением метода CellSearch является то, что некоторые ЦОК могут претерпевать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), в процессе которого теряется маркер EpCAM – такие трансформированные клетки становятся невидимыми для данной тест-системы. Чтобы идентифицировать клетки, совершившие ЭМП, рекомендуется использовать маркеры пластин-3 и виментин [44, 45]. Наличие таких мезенхимальных ЦОК в кровотоке само по себе является плохим прогностическим признаком и часто свидетельствует о резистентности опухоли к химиотерапии [46].

Преимущества использования комбинации цодНК и ЦОК для увеличения информативности ЖБ. Несмотря на существование выраженной корреляции между количеством ЦОК и концентрацией цодНК в препаратах крови онкологических пациентов, регрессионный анализ данных Shaw et al. (2017) свидетельствует о том, что эти показатели являются независимыми предикторами выживаемости и, следовательно, могут использоваться в комбинации [47]. Взаимодополняющая

ценность ЦОК и цодНК для прогнозирования течения РЛ, РМЖ, рака печени, мочевого пузыря, а также детекции минимальной остаточной болезни (minimal residual disease, MRD) подчёркивается в целом ряде работ [48–50]. По сведениям Ye et al. [51], у больных РМЖ с высоким уровнем обоих маркеров в крови риск смерти повышен более чем в 17 раз ($p < 0,001$). Интересно, что в данном исследовании синергический эффект цодНК и ЦОК был менее выражен при предсказании периода PFS, чем общей выживаемости (overall survival, OS), то есть комбинирование маркеров даёт незначительные преимущества при анализе эффективности конкретной лечебной схемы, но является очень показательным для оценки рисков метастазирования, прогрессирования и клинической агрессивности заболевания. Уровень цодНК может демонстрировать сложную динамику в ходе ответа опухоли на лечение, он напрямую отражает изменения опухолевой нагрузки в режиме реального времени. В то же время проникновение в кровоток ЦОК нарастает только во время прогрессирования заболевания [49, 52]. Примечательно, что только у 13% пациентов с РМЖ, вошедших в клиническое исследование COMET, в исходной точке не было обнаружено в плазме крови ни цодНК, ни ЦОК, при этом процент «плазма-негативных» случаев при детекции каждого маркера по отдельности был значительно выше – 26–28% [53].

Анализ спектра мутаций в цодНК с помощью метода секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) в сочетании с иммунофенотипированием ЦОК имеет ещё одно потенциально важное применение: полученные таким образом данные с высокой достоверностью предсказывают вероятные маршруты метастатического распространения первичной опухоли [52].

Циркулирующие внеклеточные везикулы. Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой устойчивые фосфолипидные двухслойные пузырьки, активно секретируемые живыми клетками (в том числе злокачественными) и в достаточных концентрациях циркулирующие в крови, асцитной жидкости, грудном молоке, слюне, спинномозговой жидкости и других биологических средах организма [54]. Полагают, что основным назначением ВВ является межклеточная коммуникация [55]. Согласно классификации Extracellular Vesicle Association, везикулы различного происхождения и размера подразделяются на три типа: экзосомы (40–150 нм), микровезикулы (40–1000 нм) и апоптотические тельца (800–5000 нм) [30, 56]. Экзосомы являются наиболее изученным подтипов ВВ; благодаря стабильности в крови, проникающим и миграционным способностям они влияют на развитие и диссеминацию

опухолевых клеток посредством репрограммирования иммунного микроокружения и молекулярного транспорта [57].

Экзосомы наполнены разнообразными молекулами, в основном РНК и белками, которые могут выполнять роль медиаторов онкологически значимых клеточных процессов и, таким образом, способствовать росту опухоли в отдалённых преметастатических нишах [48]. Помимо белок-кодирующих РНК, в экзосомальной фракции из плазмы крови были обнаружены регуляторные микроРНК и lncРНК, тРНК, малые ядрышковые РНК (snorNA) [58]. Все перечисленные экзосомальные молекулярные маркеры поддаются экстракции, количественному и качественному анализу и, ввиду своего обилия в периферической крови, они даже более информативны, чем микроКоличества цДНК или единичные ЦОК [5]. В отличие от свободно циркулирующих бесклеточных молекул, экзосомальные РНК защищены от деградации липидной мембраной. Они годятся для ранней диагностики, прогнозирования течения болезни и, что особенно ценно, мониторинга её ответа на терапию в реальном времени, так как производятся живыми опухолевыми клетками непосредственно в момент воздействия [48, 59]. Важно, что подобные циркулирующие везикулы потенциально способны влиять на эффективность терапии. Так, например, HER2-положительные экзосомы синтезируются клетками РМЖ в качестве «приманки» для анти-HER2-препараторов, тем самым ограничивая их активность в отношении неопластических клеток [60]. Экзосомы, синтезированные опухолевыми фибробластами, могут способствовать приобретению устойчивости неоплазмы к радиотерапии за счёт усиления роста стволовых клеток и распространению свойств резистентности между очагами. Предполагается, что медиатором этого процесса является микроРНК miR-93-5р [61]. miR-934, miR-186-5р, miR-497-5р и miR-29a-3р, переносимые экзосомами, были идентифицированы как регуляторы прогрессии РЛ, что позволяет рассматривать их как потенциальные биомаркеры [62, 63]. Экзосомальные lncРНК, такие как ZEB2-AS1, UFC1 и circUSP7, а также circSATB2 и опухолевые экзосомальные белки продемонстрировали потенциал для ранней диагностики РЛ [30, 64]. По некоторым данным, иммуногистохимическая окраска ВВ с большой точностью и чувствительностью характеризует статус экспрессии в опухоли некоторых клинически значимых молекул, таких как HER2 или PD-L1 [65, 66]. На поверхности экзосом располагаются тканеспецифические белки-интегрины, которые обеспечивают доставку содержимого по заданному «адресу» – в клетки преметастатической ниши [67, 68]. Анализ «интегринового кода» экзосом с помощью

иммуноблоттинга или иммуноферментного анализа (ELISA) может предоставлять информацию о потенциальной локализации метастазов, а поверхностные эпитопы мембран дают сведения о клетках-продуцентах экзосом [30].

Ключевым и наиболее сложным этапом молекулярной диагностики на основе экзосом является их эффективная экстракция и очистка. Для этого разработаны методы с использованием гель-фильтрационной хроматографии исключения по размеру (size exclusion chromatography, SEC), преципитационной иммуноаффинной хроматографии, микрофлюидики и ультрацентрифугирования [48, 69]. Техническая нетривиальность преаналитических этапов препятствует широкому внедрению этого варианта ЖБ в клиническую практику. Привлекательной является идея применения в терапии искусственных экзосом, нагруженных онкосупрессорными микроРНК или токсичными препаратами [70]. Встраивание в мембрану таких карго-конструкций специфического набора интегринов обеспечит таргетную доставку содержимого в опухолевые клетки определённого гистотипа [71].

Белковые маркеры. ЖБ, основанная на обнаружении белковых биомаркеров в периферической крови, была внедрена в клиническую практику значительно раньше других разновидностей ЖБ, но до сих пор имеет большой потенциал для выявления и мониторинга онкологических заболеваний [72]. В табл. 1 представлен обзор циркулирующих белковых маркеров, которые ассоциированы с разными видами рака, включая как признанные и повсеместно распространённые (CA-125, CEA, PSA, NSE), так и менее изученные (ITGAV, GAL-1, HE4 и др.). Измерение в крови уровня простатического специфического антигена (prostate-specific antigen, PSA, ПСА) было рекомендовано Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для идентификации рака предстательной железы ещё в 1986 году, и этот онкомаркер до сих пор широко используется, однако его реальная клиническая значимость постоянно обсуждается. Дело в том, что повышенный уровень PSA специфичен не только для РП, но и для других распространённых патологий, таких как простатит и доброкачественная гиперплазия предстательной железы [73]. Более того, существует целый ряд факторов (возраст, расовая принадлежность, индекс массы тела, приём лекарств и др.), которые необходимо учитывать, чтобы корректно определять индивидуальное пороговое значение этого показателя. По этим причинам диагностика на основании одного только PSA в значительной доле случаев приводит к ложноположительным результатам тестирования [74].

Таблица 1. Белковые онкомаркеры, циркулирующие в крови

Белок	Локализация опухоли	Комментарий	Ссылка
CA-125	РЯ, другие раки: РТМ, РЛ, РМЖ, РПЖ, лимфомы	входит в CancerSEEK	[75, 76]
CEA	РТК, РЖ, РМЖ, РПЖ, РЛ, РШЖ	входит в CancerSEEK	[75, 76]
CA19-9	РПЖ, холангiocарцинома, РТК, РЖ, рак пищевода, печени	входит в CancerSEEK; классический биомаркер	[75–77]
HGF	РЛ, РТК, рак почки, РМЖ, РП	входит в CancerSEEK; проангиогенный фактор	[75, 76]
OPN	РМЖ, РПЖ, рак печени, РЯ, РЛ	входит в CancerSEEK	[75, 76]
MPO	РЯ и другие	входил в первую версию CancerSEEK; маркер активации нейтрофилов	[75]
TIMP-1	РТК, РЖ, РЯ, РПЖ и другие	входит в CancerSEEK; хорошо дополняет CA19-9. Универсальный, но низкоспецифичный маркер	[75–77]
PRL	РМЖ, РЛ, РЯ (?)	входит в CancerSEEK	[75, 76]
CA15-3	РМЖ	вошёл в новую версию CancerSEEK	[76]
AFP	рак печени, герминогенные опухоли	вошёл в новую версию CancerSEEK	[76]
HABP2, CD163, AFP, PIVKA-II	рак печени	достаточная предиктивная ценность. Из дополнений к AFP: PIVKA-II – самый ценный маркер	[78]
HE4	РЯ	дополняет CA-125, более специфичный, менее чувствительный; превосходит CA-125 по аналитическим показателям у premenopausalных женщин	[79]
ITGAV	РЯ	дополняет CA-125 + HE4	[80]
SEZ6L	РЯ	дополняет CA-125 + HE4	[80]
CYFRA21-1	РЛ	известный дополнительный маркер для РЛ	[81]
Pro-SFTPB	РЛ	известный дополнительный маркер для РЛ	[82]
NSE	мелкоклеточный РЛ, нейроэндокринный рак, нейробластома; другие: немелкоклеточный РЛ, рак печени, саркома Меркеля	хорошо известный маркер. Относительно редкие опухоли	[83]
Хромогранин А (chromo-granin A)	нейроэндокринный рак	хорошо известный маркер. Относительно редкие опухоли	[84]

Таблица 1 (окончание)

Белок	Локализация опухоли	Комментарий	Ссылка
ProGRP	мелкоклеточный РЛ	превосходит более традиционный NSE при выявлении этой цели	[81]
S100	меланома	хорошо известный маркер	[84]
SCC	плоскоклеточный РЛ, другие плоскоклеточные раки	низкая чувствительность	[81]
PSA	РП	субоптимальные аналитические характеристики	[85]
SPARC	BRCA1/2+ РЯ	именно у носителей BRCA1/2 очень значительно повышается концентрация при возникновении РЯ	[86]
THBS1	BRCA1/2+ РЯ	именно у носителей BRCA1/2 очень значительно повышается концентрация при возникновении РЯ	[86]
CA 72-4	РЖ, РЯ	—	[84]
CA27.29	РМЖ	—	[84]
Тиреоглобулин (thyroglobulin)	РЩЖ	—	[84]
Кальцитонин (calcitonin)	РЩЖ	работает в случае мутаций RET	рекомендации Американской тиреоидной ассоциации (ATA guidelines)
Мезотелин (mesothelin)	мезотелиома	—	[87]
beta-hCG	трофобластическая болезнь, рак яичка	беременность может быть причиной ложноположительных результатов	[84]
LDH	герминогенные опухоли, меланома	—	[88]
β 2-микроглобулин (beta-2 microglobulin, β 2-M)	миелома, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфомы	—	[88]
CD20; CD19, CD22, CD25, CD30, CD33	неходжкинская лимфома, другие гемобластозы	—	[88]
GAL-1	РПЖ	—	[89]
GAL-3	РПЖ	—	[89]
THBS2	РПЖ	—	[89]

Примечание. РЖ – рак желудка, РПЖ – рак поджелудочной железы, РТМ – рак тела матки, СА-125 – рако-вый антиген-125

Другой популярный онкомаркер, содержащийся в сыворотке крови, раковый антиген-125 (CA-125), на протяжении последних четырёх десятилетий широко применялся в качестве первичного маркера РЯ [90]. Однако методам, используемым для тестирования уровня CA-125 в крови, не хватает чувствительности (~75%) и специфичности (~94%), необходимых для своевременного выявления РЯ в популяционных масштабах [91]. Рост уровня CA-125 в сыворотке наблюдается при менструации, эндометриозе и беременности, что может быть причиной ложноположительного теста в значительном числе случаев [92, 93]. Высокая концентрация CA-125 в сыворотке обнаруживается у 75–90% больных РЯ на поздних стадиях и только в 23–50% случаях раннего РЯ [93]. Таким образом, сейчас принято считать, что этот биомаркер сам по себе не годится для своевременной диагностики заболевания, он рутинно используется для мониторинга эффективности терапии только в случаях достоверно установленного повышения уровня CA-125 до начала лечения.

Повысить информативность «белковой» ЖБ можно за счёт включения в панели для тестирования дополнительных белковых маркеров [1], однако даже самые современные протеомные методы количественного анализа циркулирующих белков не достигают необходимой диагностической точности [2, 94]. Гораздо более перспективными являются подходы, сочетающие детекцию белковых и цДНК-маркеров, как это было реализовано, например, в коммерческой панели CancerSEEK [8, 75].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всём техническом совершенстве методов молекулярного анализа циркулирующих онкомаркеров, ЖБ, выполненная на базе единственного анализа, имеет ограниченную информативность. Мультипараметрический подход, объединяющий результаты тестирования нескольких разнородных циркулирующих фракций, может стать гораздо более чувствительным и полнее отражать характеристики заболевания [95, 96]. Однако наряду с дополнительными возможностями в ходе реализации такого комбинированного исследования возникают проблемы, которые важно признать и решить.

Прежде всего, преаналитический этап мульти modalной ЖБ, связанный со сбором, хранением и подготовкой биоматериала, требует стандартизации и унификации протоколов. Действительно, детекция разнородных циркулирующих биомаркеров – нуклеиновых кислот, клеток, экзосом и белков – основана на специфических методи-

ках хранения и экстракции. Таким образом, для надёжного анализа могут понадобиться разные пробирки с консервантами для взятия крови [97]. Следовательно, для проведения комбинированных тестов будет необходим больший объём крови, чем обычно требуется, что может оказаться затруднительным для пациента. Чтобы минимизировать необходимое количество крови и обеспечить сохранность анализов, были разработаны протоколы, позволяющие параллельно изолировать несколько биомаркеров из одной аликвоты. Так, например, многопараметрический подход ELIMA («Всё из одного образца крови») включал в себя анализ экзосомальной РНК, мРНК из ЦОК, геномной ДНК из ЦОК и цДНК всего из 18 мл крови с ЭДТА [98, 99]. Интеграция этих четырёх анализов позволила одновременно учитывать транскрипционную и геномную сложность опухоли; такая модификация ЖБ продемонстрировала высокую чувствительность и прогностическую значимость.

Ещё одним примером успешного применения мульти modalного теста для скрининга онкологических заболеваний явилась коммерческая панель CancerSEEK, сочетающая девять белковых онкомаркеров и 61 мутантный локус в цДНК. В исследовании-прототипе CancerSEEK применяли в отношении 1005 пациентов, у которых были диагностированы карциномы восьми разных локализаций (яичника, печени, желудка, поджелудочной железы, пищевода, колоректальной, лёгких и молочной железы) на разных стадиях прогрессирования. Пациентов, выявленных при скрининге, подвергали верифицирующему исследованию при помощи ПЭТ-КТ. Заболевание было детектировано со специфичностью > 99% и с чувствительностью 43%, 73% и 78% для стадий I, II и III соответственно. Показано клиническое и экономическое преимущество подобного подхода перед стандартными рекомендациями по диспансеризации. Эти результаты обнадёживают, но очевидно, что методу есть куда совершенствоваться – более половины случаев рака I стадии оказались пропущенными [75, 100]. По-видимому, будущее ЖБ лежит именно в области создания специализированных мульти modalных панелей, комбинирующих ДНК-, РНК- и белковые маркеры клеточного и экзосомального происхождения с учётом молекулярно-патогенетических особенностей опухолей разных локализаций и оптимизированных под конкретную задачу – первичный скрининг, детекция остаточной опухоли, прогнозирование или мониторинг ответа на терапию.

Вклад авторов. Е.Ш. Кулигина – исходная концепция работы, написание текста, иллю-

стации; Г.А. Янус – обсуждение и доработка; Е.Н. Имянитов – редактирование текста статьи и обсуждение.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-45-10038).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tran, D., Beeler, J. S., Liu, J., Wiley, B., Chan, I. C. C., Xin, Z., Kramer, M. H., Batchi-Bouyou, A. L., Zong, X., Walter, M. J., Petrone, G. E. M., Chlamydas, S., Ferraro, F., Oh, S. T., Link, D. C., Busby, B., Cao, Y., and Bolton, K. L. (2024) Plasma proteomic signature predicts myeloid neoplasm risk, *Clin. Cancer. Res.*, **30**, 3220-3228, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-3468>.
2. Ding, Z., Wang, N., Ji, N., and Chen, Z. S. (2022) Proteomics technologies for cancer liquid biopsies, *Mol. Cancer*, **21**, 53, <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01526-8>.
3. Hu, H., Song, H., Han, B., Zhao, H., and He, J. (2024) Tumor-educated platelet RNA and circulating free RNA: emerging liquid biopsy markers for different tumor types, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **29**, 80, <https://doi.org/10.31083/j.fbl2902080>.
4. Kan, C. M., Pei, X. M., Yeung, M. H. Y., Jin, N., Ng, S. S. M., Tsang, H. F., Cho, W. C. S., Yim, A. K.-Y., Yu, A. C.-S., and Wong, S. C. C. (2023) Exploring the role of circulating cell-free RNA in the development of colorectal cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 11026, <https://doi.org/10.3390/ijms241311026>.
5. Nicolò, E., Gianni, C., Pontolillo, L., Serafini, M. S., Munoz-Arcos, L. S., Andreopoulou, E., Curigliano, G., Reduzzi, C., and Cristofanilli, M. (2024) Circulating tumor cells: towards a comprehensive liquid biopsy approach in breast cancer, *Transl. Breast Cancer Res.*, **5**, 10, <https://doi.org/10.21037/tbcr-23-55>.
6. Song, X., Hu, W., Yu, H., Wang, H., Zhao, Y., Korngold, R., and Zhao, Y. (2020) Existence of circulating mitochondria in human and animal peripheral blood, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2122, <https://doi.org/10.3390/ijms21062122>.
7. Tivey, A., Church, M., Rothwell, D., Dive, C., Cook, N. (2022) Circulating tumour DNA – looking beyond the blood, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **19**, 600-612, <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00660-y>.
8. Keup, C., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2022) Combinatorial power of cfDNA, CTCs and EVs in oncology, *Diagnostics (Basel)*, **12**, 870, <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040870>.
9. Hu, Z., Chen, H., Long, Y., Li, P., and Gu, Y. (2021) The main sources of circulating cell-free DNA: apoptosis, necrosis and active secretion, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **157**, 103166, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103166>.
10. Mouliere, F., Chandrananda, D., Piskorz, A. M., Moore, E. K., Morris, J., Ahlborn, L. B., Mair, R., Goranova, T., Marass, F., Heider, K., Wan, J. C. M., Supernat, A., et al. (2018) Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis, *Sci. Transl. Med.*, **10**, eaat4921, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat4921>.
11. Fleischhacker, M., and Schmidt, B. (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey, *Biochim. Biophys. Acta*, **1775**, 181-232, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.10.001>.
12. Li, Y. Z., Kong, S. N., Liu, Y. P., Yang, Y., and Zhang, H. M. (2023) Can liquid biopsy based on ctDNA/cfDNA replace tissue biopsy for the precision treatment of EGFR-mutated NSCLC? *J. Clin. Med.*, **12**, 1438, <https://doi.org/10.3390/jcm12041438>.
13. Peng, H., Pan, M., Zhou, Z., Chen, C., Xing, X., Cheng, S., Zhang, S., Zheng, H., and Qian, K. (2024) The impact of preanalytical variables on the analysis of cell-free DNA from blood and urine samples, *Front. Cell Dev. Biol.*, **12**, 1385041, <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1385041>.
14. Diefenbach, R. J., Lee, J. H., Kefford, R. F., Rizos, H. (2018) Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA, *Cancer Genet.*, **228-229**, 21-27, <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2018.08.005>.
15. Ohmura, H., Hanamura, F., Okumura, Y., Ando, Y., Masuda, T., Mimori, K., Akashi, K., and Baba, E. (2024) Liquid biopsy for breast cancer and other solid tumors: a review of recent advances, *Breast Cancer*, Mar 16, <https://doi.org/10.1007/s12282-024-01556-8>.
16. Reichert, Z. R., Morgan, T. M., Li, G., Castellanos, E., Snow, T., Dall'Olio, F. G., Madison, R. W., Fine, A. D., Oxnard, G. R., Graf, R. P., and Stover, D. G. (2023) Prognostic value of plasma circulating tumor DNA fraction across four common cancer types: a real-world outcomes study, *Ann. Oncol.*, **34**, 111-120, <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.09.163>.
17. Tie, J., Cohen, J. D., Lo, S. N., Wang, Y., Li, L., Christie, M., Lee, M., Wong, R., Kosmider, S., Skinner, I., Wong, H. L., Lee, B., Burge, M. E., Yip, D., Karapetis, C. S., Price, T. J., Tebbutt, N. C., Haydon, A. M., Ptak, J., et al. (2021) Prognostic significance of postsurgery circulating tumor DNA in nonmetastatic colorectal cancer: individual patient pooled analysis of three cohort studies, *Int. J. Cancer*, **148**, 1014-1026, <https://doi.org/10.1002/ijc.33312>.

18. Zhang, X., Feng, R., Xu, Y., Yang, L., Xie, F., Yang, H., Wang, S., Peng, Y., Liu, M., Wang, C., and Wang, S. (2024) Baseline circulating tumor DNA predicts long-term survival outcomes for patients with early breast cancer, *Gland Surgery*, **13**, 684-696, <https://doi.org/10.21037/gs-24-115>.
19. Wang, R., Wang, B., Zhang, H., Liao, X., Shi, B., Zhou, Y., Zhou, C., Yan, Y., Zhang, W., Wang, K., Ge, G., Ren, Y., Tang, X., Gan, B., He, J., and Niu, L. (2024) Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy and prognosis in breast cancer patients during primary systemic therapy, *Breast*, **76**, 103738, <https://doi.org/10.1016/j.breast.2024.103738>.
20. Dobilas, A., Chen, Y., Brueffer, C., Leandersson, P., Saal, L. H., and Borgfeldt, C. (2023) Preoperative ctDNA levels are associated with poor overall survival in patients with ovarian cancer, *Cancer Genomics Proteomics*, **20** (6 suppl), 763-770, <https://doi.org/10.21873/cgp.20423>.
21. Phallen, J., Sausen, M., Adleff, V., Leal, A., Hruban, C., et al. (2017) Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA, *Sci. Transl. Med.*, **9**, eaan2415, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan2415>.
22. Moiseyenko, F. V., Kuligina, E. S., Zhabina, A. S., Belukhin, S. A., Laidus, T. A., et al. (2022) Changes in the concentration of EGFR-mutated plasma DNA in the first hours of targeted therapy allow the prediction of tumor response in patients with EGFR-driven lung cancer, *Int. J. Clin. Oncol.*, **27**, 850-862, <https://doi.org/10.1007/s10147-022-02128-6>.
23. Duffy, M. J. (2024) Circulating tumor DNA (ctDNA) as a biomarker for lung cancer: early detection, monitoring and therapy prediction, *Tumour Biol.*, **46** (s1), S283-S295, <https://doi.org/10.3233/TUB-220044>.
24. Thompson, J. C., Scholes, D. G., Carpenter, E. L., and Aggarwal, C. (2023) Molecular response assessment using circulating tumor DNA (ctDNA) in advanced solid tumors, *Br. J. Cancer*, **129**, 1893-1902, <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02445-1>.
25. Kim, S. T., Cristescu, R., Bass, A. J., Kim, K. M., Odegaard, J. I., Kim, K., Liu, X. Q., Sher, X., Jung, H., Lee, M., Lee, S., Park, S. H., Park, J. O., Park, Y. S., Lim, H. Y., Lee, H., Choi, M., Talasaz, A., Kang, P. S., et al. (2018) Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer, *Nat. Med.*, **24**, 1449-1458, <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0101-z>.
26. Bar, Y., Keenan, J. C., Niemierko, A., Medford, A. J., Isakoff, S. J., Ellisen, L. W., Bardia, A., and Vidula, N. (2024) Genomic spectrum of actionable alterations in serial cell free DNA (cfDNA) analysis of patients with metastatic breast cancer, *NPJ Breast Cancer*, **10**, 27, <https://doi.org/10.1038/s41523-024-00633-7>.
27. Lee, K., Lee, J., Choi, J., Sim, S. H., Kim, J. E., Lee, K., Lee, J., Choi, J., Sim, S. H., Kim, J. E., Kim, M. H., Park, Y. H., Kim, J. H., Koh, S.-J., Park, K. H., Kang, M. J., Ahn, M. S., Lee, K. E., Kim, H.-J., Ahn, H. K., Kim, H. J., Park, K. U., and Park, I. H. (2023) Genomic analysis of plasma circulating tumor DNA in patients with heavily pretreated HER2⁺ metastatic breast cancer, *Sci. Rep.*, **13**, 1-10, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35925-8>.
28. Visser, E., de Kock, R., Genet, S., van den Borne, B., Soud, M. Y., Soud, M. Y.-E., Belderbos, H., Stege, G., de Saegher, M., van 't Westeinde, S., Broeren, M., Eduati, F., Deiman, B., and Scharnhorst, V. (2023) Up-front mutation detection in circulating tumor DNA by droplet digital PCR has added diagnostic value in lung cancer, *Transl. Oncol.*, **27**, 101589, <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101589>.
29. Gilson, P. (2020) Enrichment and analysis of ctDNA, *Recent results Cancer Res.*, **215**, 181-211, https://doi.org/10.1007/978-3-030-26439-0_10.
30. Ren, F., Fei, Q., Qiu, K., Zhang, Y., Zhang, H., and Sun, L. (2024) Liquid biopsy techniques and lung cancer: diagnosis, monitoring and evaluation, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **43**, 96, <https://doi.org/10.1186/s13046-024-03026-7>.
31. Sánchez-Martín, V., López-López, E., Reguero-Paredes, D., Godoy-Ortiz, A., Domínguez-Recio, M. E., et al. (2023) Comparative study of droplet-digital PCR and absolute Q digital PCR for ctDNA detection in early-stage breast cancer patients, *Clin. Chim. Acta*, **552**, 117673, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117673>.
32. Kuligina, E. S., Meerovich, R., Zagorodnev, K. A., Kholmatov, M. M., Sokolova, T. N., Laidus, T. A., Romanko, A. A., Martianov, A. S., Anisimova, M. O., Zaitseva, O. A., Yatsuk, O. S., Yanus, G. A., and Imyanitov, E. N. (2021) Content of circulating tumor DNA depends on the tumor type and the dynamics of tumor size but is not influenced significantly by physical exercise, time of the day or recent meal, *Cancer Genet.*, **256-257**, 165-178, <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2021.05.014>.
33. Iam, W. T., Mackay, M., Ben-Shachar, R., Drews, J., Manghnani, K., Hockenberry, A. J., Cristofanilli, M., Nimeiri, H., Guinney, J., and Benson, A. B. (2024) Concurrent tissue and circulating tumor DNA molecular profiling to detect guideline-based targeted mutations in a multicancer cohort, *JAMA Netw. Open*, **7**, e2351700, <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.51700>.
34. Zhang, Y., Yao, Y., Xu, Y., Li, L., Gong, Y., et al. (2021) Pan-cancer circulating tumor DNA detection in over 10,000 Chinese patients, *Nat. Commun.*, **12**, 11, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20162-8>.
35. Liu, J., Dai, L., Wang, Q., Li, C., Liu, Z., et al. (2024) Multimodal analysis of cfDNA methylomes for early detecting esophageal squamous cell carcinoma and precancerous lesions, *Nat. Commun.*, **15**, 3700, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47886-1>.

36. Visal, T. H., Den Hollander, P., Cristofanilli, M., and Mani, S. A. (2022) Circulating tumour cells in the -omics era: how far are we from achieving the ‘singularity’? *Br. J. Cancer*, **127**, 173-184, <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01768-9>.
37. Zhou, J., Vorobyeva, A., Luan, Q., and Papautsky, I. (2023) Single cell analysis of inertial migration by circulating tumor cells and clusters, *Micromachines (Basel)*, **14**, 787, <https://doi.org/10.3390/mi14040787>.
38. Lawrence, R., Watters, M., Davies, C. R., Pantel, K., and Lu, Y. J. (2023) Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **20**, 487-500, <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00781-y>.
39. Yadav, A., Kumar, A., and Siddiqui, M. H. (2021) Detection of circulating tumour cells in colorectal cancer: emerging techniques and clinical implications, *World J. Clin. Oncol.*, **12**, 1169-1181, <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i12.1169>.
40. Srivastava, S., Koay, E. J., Borowsky, A. D., De Marzo, A. M., Ghosh, S., Wagner, P. D., and Kramer, B. S. (2019) Cancer overdiagnosis: a biological challenge and clinical dilemma, *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 349-358, <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0142-8>.
41. Renzi, G. D., Marco, G. D., Meo, M. D., Rosso, E. D., Gazzaniga, P., and Nicolazzo, C. (2022) *In vitro* cultures of circulating tumor cells: a potential tool to unravel drug sensitivity, *Cancer Drug Resist.*, **5**, 245-260, <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.121>.
42. Kahounová, Z., Píková, M., Drápela, S., Bouchal, J., Szczyrbová, E., et al. (2023) Circulating tumor cell-derived preclinical models: current status and future perspectives, *Cell Death Dis.*, **14**, 530, <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06059-6>.
43. Duffy, M. J., McDermott, E. W., and Crown, J. (2018) Blood-based biomarkers in breast cancer: from proteins to circulating tumor cells to circulating tumor DNA, *Tumour Biol.*, **40**, 1010428318776169, <https://doi.org/10.1177/1010428318776169>.
44. Chai, S., Naghdloo, A., Pore, M., Singh, M., Matsumoto, N., et al. (2022) Identification of epithelial and mesenchymal circulating tumor cells in clonal lineage of an aggressive prostate cancer case, *Npj Precision Oncol.*, **6**, 1-11, <https://doi.org/10.1038/s41698-022-00289-1>.
45. Yokobori, T., Iinuma, H., Shimamura, T., Imoto, S., Sugimachi, K., et al. (2013) Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis, *Cancer Res.*, **73**, 2059-2069, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0326>.
46. Papadaki, M. A., Stoupis, G., Theodoropoulos, P. A., Mavroudis, D., Georgoulias, V., and Agelaki, S. (2019) Circulating tumor cells with stemness and epithelial-to-mesenchymal transition features are chemoresistant and predictive of poor outcome in metastatic breast cancer, *Mol. Cancer Ther.*, **18**, 437-447, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0584>.
47. Shaw, J. A., Guttry, D. S., Hills, A., Fernandez-Garcia, D., Page, K., et al. (2017) Mutation analysis of cell-free DNA and single circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients with high circulating tumor cell counts, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 88-96, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0825>.
48. Wang, X., Wang, L., Lin, H., Zhu, Y., Huang, D., et al. (2024) Research progress of CTC, ctDNA, and EVs in cancer liquid biopsy, *Front. Oncol.*, **14**, 1303335, <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1303335>.
49. Kapeleris, J., Müller Bark, J., Ranjit, S., Irwin, D., Hartel, G., et al. (2022) Prognostic value of integrating circulating tumour cells and cell-free DNA in non-small cell lung cancer, *Heliyon*, **8**, e09971, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09971>.
50. Chalfin, H. J., Glavaris, S. A., Gorin, M. A., Kates, M. R., Fong, M. H., et al. (2021) Circulating tumor cell and circulating tumor DNA assays reveal complementary information for patients with metastatic urothelial cancer, *Eur. Urol. Oncol.*, **4**, 310-314, <https://doi.org/10.1016/j.euro.2019.08.004>.
51. Ye, Z., Wang, C., Wan, S., Mu, Z., Zhang, Z., et al. (2019) Association of clinical outcomes in metastatic breast cancer patients with circulating tumour cell and circulating cell-free DNA, *Eur. J. Cancer*, **106**, 133-143, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.10.012>.
52. Gerratana, L., Davis, A. A., Zhang, Q., Basile, D., Rossi, G., et al. (2021) Longitudinal dynamics of circulating tumor cells and circulating tumor DNA for treatment monitoring in metastatic breast cancer, *JCO Precis. Oncol.*, **5**, 943-952, <https://doi.org/10.1200/PO.20.0034>.
53. Bortolini Silveira, A., Bidard, F., Tanguy, M., Girard, E., Trédan, O., et al. (2021) Multimodal liquid biopsy for early monitoring and outcome prediction of chemotherapy in metastatic breast cancer, *NPJ Breast Cancer*, **7**, 1-9, <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00319-4>.
54. Vaiaki, E. M., and Falasca, M. (2024) Comparative analysis of the minimal information for studies of extracellular vesicles guidelines: advancements and implications for extracellular vesicle research, *Semin. Cancer Biol.*, **101**, 12-24, <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2024.04.002>.
55. Goberdhan, D. C. I. (2023) Large tumour-derived extracellular vesicles as prognostic indicators of metastatic cancer patient survival, *Br. J. Cancer*, **128**, 471-473, <https://doi.org/10.1038/s41416-022-02055-3>.

56. Doyle, L. M., and Wang, M. Z. (2019) Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis, *Cells*, **8**, 727, <https://doi.org/10.3390/cells8070727>.
57. Zhang, F., Guo, J., Zhang, Z., Qian, Y., Wang, G., et al. (2022) Mesenchymal stem cell-derived exosome: a tumor regulator and carrier for targeted tumor therapy, *Cancer Lett.*, **526**, 29-40, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.11.015>.
58. Huang, X., Yuan, T., Tschanne, M., Sun, Z., Jacob, H., et al. (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing, *BMC Genom.*, **14**, 319, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-319>.
59. Keup, C., Mach, P., Aktas, B., Tewes, M., Kolberg, H. C., Hauch, S., Sprenger-Haussels, M., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2018) RNA profiles of circulating tumor cells and extracellular vesicles for therapy stratification of metastatic breast cancer patients, *Clin. Chem.*, **64**, 1054-1062, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.283531>.
60. Ciravolo, V., Huber, V., Ghedini, G. C., Venturelli, E., Bianchi, F., et al. (2012) Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy, *J. Cell Physiol.*, **227**, 658-667, <https://doi.org/10.1002/jcp.22773>.
61. Chen, X., Liu, J., Zhang, Q., Liu, B., Cheng, Y., et al. (2020) Exosome-mediated transfer of miR-93-5p from cancer-associated fibroblasts confer radioresistance in colorectal cancer cells by downregulating FOXA1 and up-regulating TGFB3, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **39**, 65, <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1507-2>.
62. Hsu, X. R., Wu, J. E., Wu, Y. Y., Hsiao, S. Y., Liang, J. L., et al. (2023) Exosomal long noncoding RNA MLETA1 promotes tumor progression and metastasis by regulating the miR-186-5p/EGFR and miR-497-5p/IGF1R axes in non-small cell lung cancer, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **42**, 283, <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02859-y>.
63. Yan, Y., Du, C., Duan, X., Yao, X., Wan, J., et al. (2022) Inhibiting collagen I production and tumor cell colonization in the lung via miR-29a-3p loading of exosome-/liposome-based nanovesicles, *Acta Pharm. Sin. B*, **12**, 939-951, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.011>.
64. Chen, S. W., Zhu, S. Q., Pei, X., Qiu, B. Q., Xiong, D., et al. (2021) Cancer cell-derived exosomal circUSP7 induces CD8(+) T cell dysfunction and anti-PD1 resistance by regulating the miR-934/SHP2 axis in NSCLC, *Mol. Cancer*, **20**, 144, <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01448-x>.
65. Wu, Y., Fu, H., Hao, J., Yang, Z., Qiao, X., et al. (2024) Tumor-derived exosomal PD-L1: A new perspective in PD-1/PD-L1 therapy for lung cancer, *Front. Immunol.*, **15**, 1342728, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1342728>.
66. Nanou, A., Zeune, L. L., Bidard, F. C., Pierga, J. Y., and Terstappen, L. W. M. M. (2020) HER2 expression on tumor-derived extracellular vesicles and circulating tumor cells in metastatic breast cancer, *Breast Cancer Res.*, **22**, 86, <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01323-5>.
67. Grigoryeva, E. S., Tashireva, L. A., Savelieva, O. E., Zavyalova, M. V., Popova, N. O., et al. (2023) The association of integrins β 3, β 4, and α V β 5 on exosomes, CTCs and tumor cells with localization of distant metastasis in breast cancer patients, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2929, <https://doi.org/10.3390/ijms24032929>.
68. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., et al. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature*, **527**, 329-335, <https://doi.org/10.1038/nature15756>.
69. Heinemann, M. L., Ilmer, M., Silva, L. P., Hawke, D. H., Recio, A., et al. (2014) Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration, *J. Chromatogr. A*, **1371**, 125-135, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.026>.
70. Kalluri, R., and LeBleu, V. S. (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, **367**, eaau6977, <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.
71. Schwarzenbach, H. (2024) Potential of exosomes as therapeutics and therapy targets in cancer patients, *Int. J. Transl. Med.*, **4**, 247-261, <https://doi.org/10.3390/ijtm4020015>.
72. Scher, H. I., Morris, M. J., Larson, S., and Heller, G. (2013) Validation and clinical utility of prostate cancer biomarkers, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **10**, 225-234, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.30>.
73. Lin, K., Lipsitz, R., Miller, T., and Janakiraman, S. (2008) Benefits and harms of prostate-specific antigen screening for prostate cancer: an evidence update for the U.S. preventive services task force, *Ann. Intern. Med.*, **149**, 192, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00009>.
74. Lumbrieras, B., Parker, L. A., Caballero-Romeu, J. P., Gómez-Pérez, L., Puig-García, M., et al. (2022) Variables associated with false-positive PSA results: a cohort study with real-world data, *Cancers (Basel)*, **15**, 261, <https://doi.org/10.3390/cancers15010261>.
75. Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., et al. (2018) Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test, *Science*, **359**, 926-930, <https://doi.org/10.1126/science.aar3247>.
76. Lennon, A. M., Buchanan, A. H., Kinde, I., Warren, A., Honushefsky, A., et al. (2020) Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention, *Science*, **369**, eabb9601, <https://doi.org/10.1126/science.abb9601>.
77. Ben-Ami, R., Wang, Q. L., Zhang, J., Supplee, J. G., Fahrmann, J. F., Lehmann-Werman, R., Brais, L. K., Nowak, J., Yuan, C., Loftus, M., Babic, A., Irajizad, E., Davidi, T., Zick, A., Hubert, A., Neiman, D., Piyanzin, S., Gal-Rosenberg, O., Horn, A., et al. (2024) Protein biomarkers and alternatively methylated cell-free DNA detect early stage pancreatic cancer, *Gut*, **73**, 639-648, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-331074>.

78. Xing, X., Cai, L., Ouyang, J., Wang, F., Li, Z., Liu, M., Wang, Y., Zhou, Y., Hu, E., Huang, C., Wu, L., Liu, J., and Liu, X. (2023) Proteomics-driven noninvasive screening of circulating serum protein panels for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma, *Nat. Commun.*, **14**, 8392, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44255-2>.
79. Anastasi, E., Farina, A., Granato, T., Colaiacovo, F., Pucci, B., et al. (2023) Recent insight about HE4 role in ovarian cancer oncogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10479, <https://doi.org/10.3390/ijms241310479>.
80. Boylan, K. L. M., Petersen, A., Starr, T. K., Pu, X., Geller, M. A., Bast, R. C., Lu, K. H., Cavallaro, U., Connolly, D. C., Elias, K. M., Cramer, D. W., Pejovic, T., and Skubitz, A. P. N. (2022) Development of a multiprotein classifier for the detection of early stage ovarian cancer, *Cancers (Basel)*, **14**, 3077, <https://doi.org/10.3390/cancers14133077>.
81. Huang, H., Yang, Y., Zhu, Y., Chen, H., Yang, Y., et al. (2022) Blood protein biomarkers in lung cancer, *Cancer Lett.*, **551**, 215886, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215886>.
82. Fahrmann, J. F., Marsh, T., Irajizad, E., Patel, N., Murage, E., et al. (2022) Blood-based biomarker panel for personalized lung cancer risk assessment, *J. Clin. Oncol.*, **40**, 876-883, <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01460>.
83. Isgrò, M. A., Bottone, P., and Scatena, R. (2015) Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects, *Adv. Exp. Biol.*, **867**, 125-143, https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_9.
84. Filella, X., Rodríguez-García, M., and Fernández-Galán, E. (2022) Clinical usefulness of circulating tumor markers, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **61**, 895-905, <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-1090>.
85. Liu, Y., Hatano, K., and Nonomura, N. (2024) Liquid biomarkers in prostate cancer diagnosis: current status and emerging prospects, *World J. Mens Health*, **42**, e45, <https://doi.org/10.5534/wjmh.230386>.
86. Ahn, H. S., Ho, J. Y., Yu, J., Yeom, J., Lee, S., et al. (2021) Plasma protein biomarkers associated with higher ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers, *Cancers (Basel)*, **13**, 2300, <https://doi.org/10.3390/cancers13102300>.
87. Schillebeeckx, E., van Meerbeeck, J. P., and Lamote, K. (2021) Clinical utility of diagnostic biomarkers in malignant pleural mesothelioma: a systematic review and meta-analysis, *Eur. Respir. Rev.*, **30**, 210057, <https://doi.org/10.1183/16000617.0057-2021>.
88. Nagpal, M., Singh, S., Singh, P., Chauhan, P., and Zaidi, M. A. (2016) Tumor markers: a diagnostic tool, *Natl. J. Maxillofac. Surg.*, **7**, 17-20, <https://doi.org/10.4103/0975-5950.196135>.
89. Sok, C. P., Polireddy, K., and Kooby, D. A. (2024) Molecular pathology and protein markers for pancreatic cancer: relevance in staging, in adjuvant therapy, in determination of minimal residual disease, and follow-up, *Hepatobiliary Surg. Nutr.*, **13**, 56-70, <https://doi.org/10.21037/hbsn-22-628>.
90. Charkhchi, P., Cybulski, C., Gronwald, J., Wong, F. O., Narod, S. A., and Akbari, M. R. (2020) CA125 and ovarian cancer: a comprehensive review, *Cancers (Basel)*, **12**, 3730, <https://doi.org/10.3390/cancers12123730>.
91. Sahu, S. A., and Shrivastava, D. (2023) A comprehensive review of screening methods for ovarian masses: towards earlier detection, *Cureus*, **15**, e48534, <https://doi.org/10.7759/cureus.48534>.
92. Dochez, V., Caillon, H., Vaucel, E., Dimet, J., Winer, N., and Ducarme, G. (2019) Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review, *J. Ovarian Res.*, **12**, 28, <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0503-7>.
93. Moss, E. L., Hollingsworth, J., and Reynolds, T. M. (2005) The role of CA125 in clinical practice, *J. Clin. Pathol.*, **58**, 308-312, <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.018077>.
94. Landegren, U., and Hammond, M. (2021) Cancer diagnostics based on plasma protein biomarkers: hard times but great expectations, *Mol. Oncol.*, **15**, 1715-1726, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12809>.
95. Felekkis, K., and Papaneophytou, C. (2024) The circulating biomarkers league: combining miRNAs with cell-free DNAs and proteins, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 3403, <https://doi.org/10.3390/ijms25063403>.
96. Di Sario, G., Rossella, V., Famulari, E. S., Maurizio, A., Lazarevic, D., Giannese, F., and Felici, C. (2023) Enhancing clinical potential of liquid biopsy through a multi-omic approach: a systematic review, *Front. Genet.*, **14**, 1152470, <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1152470>.
97. Schneegans, S., Lück, L., Besler, K., Bluhm, L., Stadler, J. C., et al. (2020) Pre-analytical factors affecting the establishment of a single tube assay for multiparameter liquid biopsy detection in melanoma patients, *Mol. Oncol.*, **14**, 1001-1015, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12669>.
98. Keup, C., Suryaprakash, V., Hauch, S., Storbeck, M., Hahn, P., Sprenger-Haussels, M., Kolberg, H.-C., Tewes, M., Hoffmann, O., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2021) Integrative statistical analyses of multiple liquid biopsy analytes in metastatic breast cancer, *Genome Med.*, **13**, 85, <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00902-1>.
99. Keup, C., Suryaprakash, V., Storbeck, M., Hoffmann, O., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2021) Longitudinal multi-parametric liquid biopsy approach identifies unique features of circulating tumor cell, extracellular vesicle, and cell-free DNA characterization for disease monitoring in metastatic breast cancer patients, *Cells*, **10**, 212, <https://doi.org/10.3390/cells10020212>.
100. Connal, S., Cameron, J. M., Sala, A., Brennan, P. M., Palmer, D. S., et al. (2023) Liquid biopsies: the future of cancer early detection, *J. Transl. Med.*, **21**, 118, <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03960-8>.

THE DIVERSITY OF CIRCULATING TUMOR MARKERS: A TREND TOWARDS A MULTIMODAL LIQUID BIOPSY

Review

E. S. Kulagina^{1*}, G. A. Yanus^{1,2}, and E. N. Imyanitov^{1,2}

¹ N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology,
197758 St. Petersburg, Russia; e-mail: kate.kulagina@gmail.com

² St. Petersburg State Pediatric Medical University, 194100 St. Petersburg, Russia

Over the past decade, liquid biopsy (LB) has become a routine diagnostic test essential for the treatment of malignant tumors of various localizations. Its capabilities include early diagnosis, molecular genotyping, prognosis, prediction, and monitoring of tumor response. Typically, liquid biopsy involves the extraction of a single type of tumor-derived molecules or cellular elements from blood and subsequent molecular analysis. These elements may include circulating tumor DNA (ctDNA), circulating tumor cells (CTCs), circulating RNA (ctRNA), or the contents of extracellular vesicles (exosomes). Despite the technical sophistication of molecular analysis methods for circulating biomarkers, this diagnostic approach has limited relevance. In a significant proportion of cancer patients (ranging from 10 to 50%, depending on the tumor type), none of these analytes can be detected and analyzed, despite the presence of large, progressing neoplastic foci in the body. It seems reasonable to posit that heterogeneous fractions of circulating tumor-specific biomarkers complement each other, thus the simultaneous analysis of several fractions will not only increase the sensitivity of the method but also more accurately characterize and predict the clinical situation. This review examines the possibilities and advantages of applying a combined multiparametric approach to liquid biopsy, which involves testing multiple circulating analytes in a single blood sample.

Keywords: liquid biopsy, ctDNA, exosomes, CTC, ctRNA, protein tumor markers, prognostic markers, predictive markers, cancer