

Влияние преаналитических переменных на качество внеклеточной ДНК. Биобанкирование материала для выделения внеклеточной ДНК

Кондрацкая В. А., Покровская М. С., Долудин Ю. В., Борисова А. Л., Лимонова А. С., Мешков А. Н., Драпкина О. М.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России.
Москва, Россия

Поиск ранних маркеров заболеваний, разработка диагностических тест-систем в последнее время все больше расширяется в рамках геномики. В качестве объектов генетических исследований используют геномную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), внеклеточную ДНК (вкДНК) и ДНК микробиоты, получаемые из разных типов образцов: тканей, крови и ее производных, кала и др. Показано, что вкДНК, которая попадает в кровоток, в частности, в результате апоптоза, некроза, активной секреции опухолей и при метастазировании, имеет большое значение для изучения молекулярных механизмов патологического процесса и применения в клинической практике. Анализ циркулирующих нуклеиновых кислот может использоваться в диагностике для мониторинга реакции на лечение, оценки возникновения лекарственной устойчивости и количественной оценки минимального остаточного заболевания. В обзорной статье отражены сведения о биоматериале — источнике вкДНК, способах выделения вкДНК, хранения и использования для диагностики определенных заболеваний. ВкДНК может присутствовать в биологических жидкостях, таких как кровь, моча, слюна, синовиальная и цереброспинальная жидкость. Выделяют вкДНК в большинстве случаев из производных крови — сыворотки и плазмы, причем наиболее правильно использовать именно плазму крови для выделения вкДНК. Оптимальным и экономически целесообразным является использование пробирок с этиленди-

аминтетрауксусной кислотой для взятия крови и получения плазмы с последующим выделением вкДНК. Есть данные, что оптимальным сроком хранения в пробирке с этилендиаминтетрауксусной кислотой от момента забора крови до последующего выделения является 2-часовой интервал. После центрифугирования вкДНК в плазме (или сыворотке) может храниться длительное время при температуре -80°C . Хранение при -20°C нежелательно, поскольку при такой температуре увеличивается ее фрагментация.

Ключевые слова: вкДНК, хранение, биобанкирование, биоматериал, пробоподготовка.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 02/11-2021

Рецензия получена 24/11-2021

Принята к публикации 29/11-2021



Для цитирования: Кондрацкая В. А., Покровская М. С., Долудин Ю. В., Борисова А. Л., Лимонова А. С., Мешков А. Н., Драпкина О. М. Влияние преаналитических переменных на качество внеклеточной ДНК. Биобанкирование материала для выделения внеклеточной ДНК. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021;20(8):3114. doi:10.15829/1728-8800-2021-3114

Influence of preanalytical variables on the quality of cell-free DNA. Biobanking of cell-free DNA material

Kondratskaya V. A., Pokrovskaya M. S., Doludin Yu. V., Borisova A. L., Limonova A. S., Meshkov A. N., Drapkina O. M.
National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

The search for early disease markers and the development of diagnostic systems has recently been expanding within genomics. Genomic deoxyribonucleic acid (DNA), cell-free DNA (cfDNA) and microbiome DNA obtained from different types of samples (tissues, blood and its derivatives, feces, etc.) are used as objects of genetic research. It has been shown that cfDNA that enters the bloodstream, in particular, as a result of apoptosis, necrosis, active tumor secretion and metastasis, is of great importance for studying molecular mechanisms of the pathological process and application in clinical practice. Circulating nucleic acid analysis can be used to monitor response to treatment, assess drug resistance, and quantify minimal residual disease. The review article reflects the following

information about the biomaterial: source of cfDNA, methods of cfDNA isolation, storage and use for the diagnosis of certain diseases. Cell-free DNA can be present in biological fluids such as blood, urine, saliva, synovial and cerebrospinal fluid. In most cases, cfDNA is isolated from blood derivatives (serum and plasma), while it is most correct to use blood plasma for cfDNA isolation. Optimal and economically justifiable is the use of ethylenediaminetetra-acetic acid tubes for taking blood and obtaining plasma with subsequent cfDNA isolation. There is evidence that the optimal shelf life in an ethylenediaminetetra-acetic acid tube from the moment of blood sampling to subsequent isolation is a 2-hour interval. After centrifugation, cfDNA in plasma (or serum) can be stored for a long time

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: vkozlova2905@gmail.com

Тел.: +7 (906) 044-25-02

[Кондрацкая В. А.* — м.н.с. лаборатории "Банк биологического материала", лаборант-исследователь, ORCID: 0000-0002-3843-6980, Покровская М. С. — к.б.н., руководитель лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0001-6985-7131, Долудин Ю. В. — руководитель лаборатории развития биомедицинских технологий, ORCID: 0000-0002-0554-9911, Борисова А. Л. — ведущий инженер лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0003-4020-6647, Лимонова А. С. — лаборант лаборатории клинической иммунологии, ORCID: 0000-0003-1500-3696, Мешков А. Н. — д.м.н., руководитель лаборатории молекулярной генетики, ORCID: 0000-0001-5989-6233, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

at a temperature of -80°C . Storage at -20°C is undesirable, since DNA fragmentation increases.

Keywords: cfDNA, storage, biobanking, biomaterial, sample preparation.

Relationships and Activities: none.

Kondratskaya V. A.* ORCID: 0000-0002-3843-6980, Pokrovskaya M. S. ORCID: 0000-0001-6985-7131, Doludin Yu. V. ORCID: 0000-0002-0554-9911, Borisova A. L. ORCID: 0000-0003-4020-6647, Limonova A. S. ORCID: 0000-0003-1500-3696, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

*Corresponding author:
vkozlova2905@gmail.com

Received: 02/11-2021

Revision Received: 24/11-2021

Accepted: 29/11-2021

For citation: Kondratskaya V. A., Pokrovskaya M. S., Doludin Yu. V., Borisova A. L., Limonova A. S., Meshkov A. N., Drapkina O. M. Influence of preanalytical variables on the quality of cell-free DNA. Biobanking of cell-free DNA material. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(8):3114. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2021-3114

вкДНК — внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота, вкНК — внеклеточные нуклеиновые кислоты, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция, цоДНК — циркулирующие опухолевые ДНК, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

Введение

За последнее десятилетие в значительной степени возрос интерес к исследованию внеклеточных нуклеиновых кислот (вкНК), в частности, внеклеточной дезоксирибонуклеиновой кислоты (вкДНК), в качестве потенциальных биомаркеров для прогнозирования течения и отслеживания результатов лечения множества заболеваний. Циркулирующие вкНК связаны со многими физиологическими и патологическими процессами. Изменение профиля вкНК наблюдается при стрессовых условиях, физической активности, системных гипоксически-ишемических нарушениях, при онкологических заболеваниях, в крови беременных женщин (содержатся фрагменты ДНК плода) и др.

Особый интерес в изучении вкНК представляет возможность их использования в новых неинвазивных методах диагностики, таких как жидкостная биопсия. Жидкостная биопсия — это анализ компонентов из биологических жидкостей. В периферической крови такими анализатами могут быть циркулирующие опухолевые клетки, вкДНК, внеклеточная рибонуклеиновая кислота, внеклеточные везикулы, опухолевые тромбоциты, белки или метаболиты [1-3]. Для анализа также можно использовать мочу, асцит, плевральный выпот и спинномозговую жидкость.

Свойства вкДНК и области применения

Впервые вкДНК была изолирована в 1948г [1]; она представляет собой сильно деградированные фрагменты ДНК, выделяемые в биологические жидкости, например, в периферическую кровь. Считается, что вкДНК попадает в кровоток в результате апоптоза или некроза. Обычно вкДНК обнаруживается в виде двухцепочечных фрагментов длиной ~150-200 пар оснований, что соответствует размерам ДНК, ассоциированной с нуклеосомами. Молекулы вкДНК быстро выводятся из кровотока с периодом полураспада ~1 ч или меньше. Выделяемая из нормальных клеток у здоровых людей вкДНК обнаруживается в плазме в низких

концентрациях (в среднем ~ от 10 до 15 нг/мл). Ее уровень может повышаться в условиях тканевого стресса, например, воспаления, хирургического вмешательства или повреждения тканей [2]. В 1977г было замечено, что у пациентов с онкологическими заболеваниями уровень вкДНК выше, чем у здоровых людей [3]. Обнаружено, что связанные с онкологическими заболеваниями циркулирующие опухолевые ДНК (цоДНК), как часть общего пула вкДНК, имеют генетические изменения [4]. Доля цоДНК в общей вкДНК у пациентов с онкологическими заболеваниями может сильно варьироваться — от <0,1% до >90%. Анализ вкДНК позволяет оценить молекулярный профиль опухоли без необходимости проведения инвазивной биопсии. Кроме того, при помощи анализа вкДНК молекулярная гетерогенность опухолей может выявляться более эффективно по сравнению с обычной биопсией. Анализ вкДНК дает возможность обнаружить опухоль у пациентов до проявления клинических признаков заболевания [2]. Методы анализа на основе вкДНК могут быть использованы для подбора наиболее эффективной терапии или ее коррекции.

Эффективность высокоточных методов лечения онкологических заболеваний ограничивается возможным появлением резистентности к применяемым препаратам. Как правило, приобретенная устойчивость возникает из-за одного или нескольких субклонов опухоли, обладающих резистентностью к терапии. Обнаружение молекулярных изменений, ведущих к резистентности, эффективнее проводить с помощью анализа вкДНК, т.к. биопсия единичного фрагмента опухоли может не в полной мере отображать ее молекулярную гетерогенность. Выделенная из опухолевых клеток вкДНК может продемонстрировать наличие генетических изменений, приведших к резистентности к определенной терапии [5].

При сравнении биопсии опухолей и тестов вкДНК во время прогрессирования заболевания было показано, что анализ вкДНК в двух третях случаев позволяет выявить изменения, не обнару-

Таблица 1

Различия в концентрации вкДНК между сывороткой и плазмой

Ссылка на статью	Группа пациентов	Концентрация вкДНК	
		Плазма	Сыворотка
[10]	Здоровые	40 копий/мл	8000 копий/мл
[11]	Онкологические заболевания	180±150 пг/мл	970±730 пг/мл
[12]	Трансплантация органов	1195,1 копий/мл	16344,8 копий/мл
[13]	ДНК плода	600 копий/мл	975 копий/мл

живаемые при помощи биопсии [6]. Таким образом, использование только биопсии для диагностики резистентности не дает достаточно точных ответов о росте отдельных резистентных субклонов, в то время как тестирование вкДНК позволяет их обнаружить и назначить более эффективное лечение.

Методы диагностики, основанные на анализе вкДНК, могут быть использованы для выявления случаев рецидива заболевания. Эффективный метод выявления риска послеоперационного рецидива заболевания на основе анализа вкДНК может избавить полностью вылечившихся пациентов от необходимости проходить потенциально токсичную адъювантную химиотерапию [2].

Методы на основе изучения вкДНК могут быть использованы для раннего обнаружения рака с помощью простого анализа крови у здоровых людей, не имеющих симптомов. Для этого необходим высокочувствительный метод, позволяющий обнаруживать малые количества вкДНК или других маркеров, выделяемых в кровь при предраковой патологии или на ранних стадиях онкологических заболеваний. Специфичность скринингового метода должна быть максимально высокой для минимизации ложноположительных результатов. Диагностика с помощью вкДНК осложняется тем, что многие типы рака имеют общие мутации в генах, таких как *KRAS*, *BRAF* или *TP53*, а кроме того, определение локализации рака в конкретном органе после положительного результата жидкостной биопсии может быть затруднено. Необходимо учитывать, что выделение вкДНК в кровотоки может наблюдаться при возникновении одной и той же мутации как в доброкачественных, так и в злокачественных опухолях.

Для раннего выявления некоторых онкологических заболеваний также используются методы, позволяющие идентифицировать во вкДНК связанные с опухолью нуклеотидные последовательности вируса Эпштейна-Барра и вируса папилломы человека, а также изменения метилирования ДНК [2].

Биоматериал для выделения вкДНК

ВкДНК может присутствовать в биологических жидкостях, таких как кровь, моча, слюна, синовиальная и цереброспинальная жидкости. Выделяют

вкДНК в большинстве случаев из производных крови — сыворотки и плазмы. Сыворотка — биоматериал, наиболее часто используемый в клинических лабораториях. В ряде научных исследований сообщается о значительно более высокой концентрации вкДНК в сыворотке, чем в плазме (таблица 1) [7-9]. Однако повышенная концентрация вкДНК в сыворотке связана с лизисом белых кровяных телец в процессе свертывания крови. Следовательно, концентрация специфической вкДНК в сыворотке крови сильно искажается наличием геномной ДНК [7]. Исходя из этого для выделения вкДНК рекомендуется использование только плазмы крови.

Для обеспечения сохранности вкДНК в цельной крови возможно использование различных пробирок для взятия крови. В связи с тем, что наиболее распространенным способом исследования вкДНК является полимеразная цепная реакция (ПЦР), при выборе антикоагулянта необходимо исключить ингибиторы ПЦР, в частности, гепарин [14]. Оптимальным и экономически целесообразным вариантом является использование этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Пробирки с ЭДТА предохраняют вкДНК от контаминации геномной ДНК вплоть до 6 ч хранения [15, 16], что отчасти объясняется инактивирующим действием ЭДТА на дезоксирибонуклеазу. Однако использовать этот тип пробирок для более длительного хранения не рекомендовано из-за лизиса клеток и контаминации геномной ДНК.

Для преодоления недостатков пробирок с ЭДТА были разработаны специальные пробирки, предохраняющие ядерные клетки крови от разрушения [17], такие как CellSave и Streck's Cell-Free DNA. Они предназначены для защиты вкДНК от контаминации геномной ДНК до 14 сут. при комнатной температуре, в связи с чем их можно использовать при транспортировке образцов крови. Использование данных пробирок нецелесообразно при немедленной обработке крови, т.к. в этом случае нет необходимости в стабилизаторах. Стоит отметить, что механическое воздействие во время транспортировки образцов цельной крови способствует лизису клеток и высвобождению геномной ДНК [18].

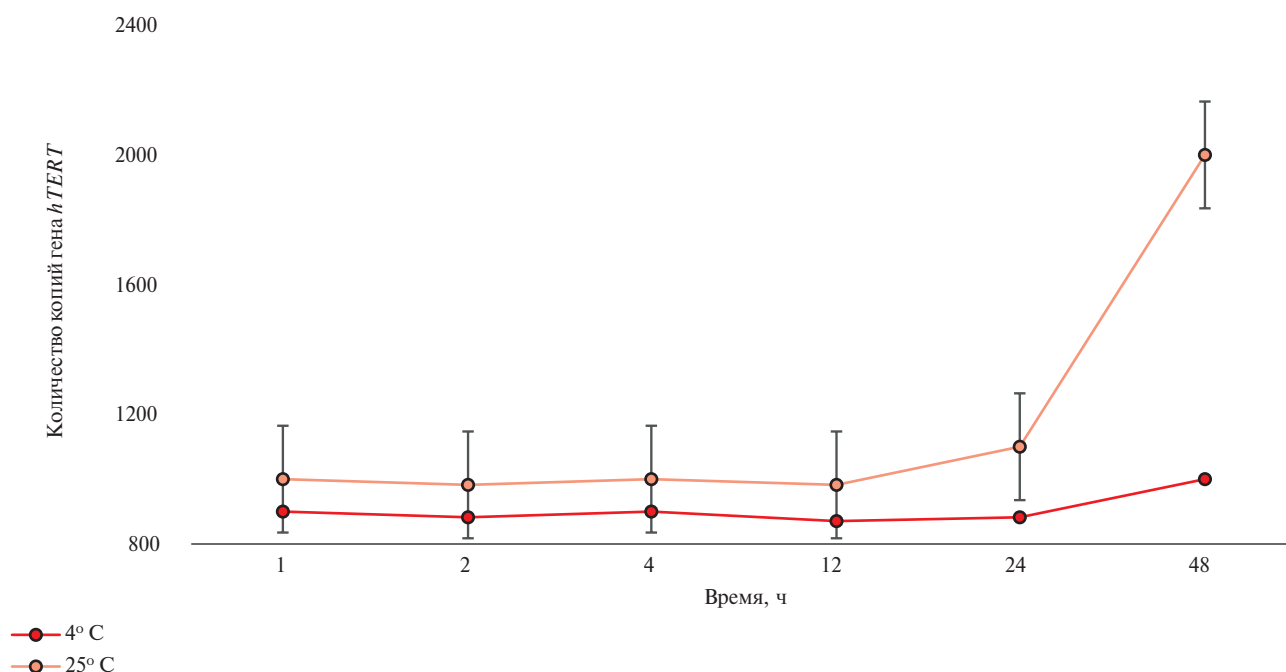


Рис. 1 Количество вкДНК (количество копий гена *hTERT*) в цельной крови в зависимости от различных периодов времени до центрифугирования при температуре 25° C и 4° C [24].

Пробоподготовка. Центрифугирование

Для удаления клеточных компонентов крови и предотвращения попадания в образец геномной ДНК необходимо правильно подобрать условия и параметры центрифугирования. После центрифугирования при отделении плазмы от клеточного осадка важно не задеть пипеткой промежуточный слой, содержащий тромбоциты и лейкоциты.

Для полной очистки плазмы от клеток центрифугирование проводят в два этапа: первое центрифугирование со скоростью от 800 до 1200 g при температуре 4° C в течение 10 мин и второе со скоростью от 14000 до 16000 g в течение 10 мин. Перед вторым этапом центрифугирования необходимо проводить контроль качества плазмы и не использовать образцы со следами гемолиза, с повышенной концентрацией билирубина, а также мутные (с признаками хилеза) [19]. Второе центрифугирование необходимо для более полного удаления клеточных компонентов крови [20], что позволяет уменьшить количество фрагментов ДНК длиной >300 п.н. [21]. Концентрации вкДНК после двойного центрифугирования сходны с концентрациями, определяемыми после однократного центрифугирования с последующим фильтрованием через 0,2 мкм фильтр (по протоколу фильтрование через поры диаметром 0,2 мкм обеспечивает получение бесклеточной плазмы) [22]. В третьем центрифугировании нет необходимости, поскольку показано, что концентрации вкДНК из супернатантов образцов после второй и третьей стадии центрифугирования сходны.

Условия хранения биоматериала для выделения вкДНК

С увеличением времени между взятием и обработкой (центрифугированием) крови в пробирках с ЭДТА, концентрация вкДНК в плазме увеличивается, т.к. к ней примешивается геномная ДНК. Неизменной концентрация вкДНК остается на протяжении 4 ч с момента взятия крови как при 4° C, так и при комнатной температуре [22]. В некоторых работах сообщается о контаминации геномной ДНК уже через 2 ч по сравнению с контрольными образцами (обработанными сразу после взятия крови) [23], в других говорится о подобных изменениях только через 24 ч [24]. Показано, что за 6 ч при комнатной температуре наблюдаются существенные изменения в концентрации вкДНК [25]. В масштабной работе 2018г подтверждается увеличение концентрации вкДНК с течением времени (6, 24, 48, 96 ч и 1 нед.) при комнатной температуре (19 и 25° C), причем наиболее значительное увеличение наблюдается после 48 ч, 96 ч и 1 нед. В то же время, концентрация фрагментов цодНК значительно снижается после 96 ч и 1 нед. хранения крови при комнатной температуре [26]. Влияние комнатной температуры и 4° C на уровень вкДНК в цельной крови с течением времени различно. Так, число копий гена *hTERT* увеличилось незначительно после 24 ч нахождения цельной крови на температуре 4° C, в то время как после 48 ч наблюдался, существенный рост числа копий (рисунок 1). При температуре 25° C существенное увеличение числа копий гена было обнаружено уже после 12 ч

(рисунок 1), что свидетельствует о том, что время и температура, при которой выдерживают цельную кровь до центрифугирования, оказывают влияние на уровень вкДНК [27].

Показано также, что при 48-часовом хранении образцов цельной крови с ЭДТА при комнатной температуре концентрация вкДНК увеличивалась, в то время как при 48-часовом хранении на 4° С этот эффект был выражен гораздо слабее. Однако при хранении в течение 96 ч увеличение концентрации вкДНК было ярко выражено как при температуре 4° С, так и при комнатной [26]. Исходя из этого, в случае, когда провести своевременное центрифугирование нет возможности, допустимо поместить кровь с ЭДТА на температуру 4° С на срок до 24 ч. Однако этот способ не подходит, если целью выделения является митохондриальная вкДНК, т.к. большой скачок температур (с комнатной до 4° С) вызывает активацию тромбоцитов и приводит к высвобождению митохондриальной ДНК [28].

Оптимальным сроком хранения в пробирке с ЭДТА от момента забора крови до последующего центрифугирования и выделения вкДНК является 2-часовой интервал времени при комнатной температуре, для более длительного хранения (до 24 ч) необходимо соблюдение условия пониженной температуры (от 2 до 8° С) [29].

После центрифугирования плазма (или сыворотка) могут храниться длительное время при температуре -80° С. Хранение при -20° С нежелательно, поскольку при такой температуре фрагментация вкДНК со временем увеличивается [25, 30]. Концентрация вкДНК в плазме при хранении при температуре -80° С не меняется в течение 2 нед. [25], а при хранении в течение года отмечается дегградация вкДНК на 30% от исходного содержания [31]. Температура и длительность хранения зависят от целей эксперимента с вкДНК. Рекомендуемый срок хранения плазмы при температуре 4° С составляет трое сут., при температуре -20° С — 3 мес., при -80° С — 9 мес. [32]. На основании на этих результатов рекомендуется обработать образцы цельной крови для получения плазмы как можно скорее после забора крови во избежание лизиса клеток в пробирке. Данные рекомендации необходимо соблюдать для оценки целостности и количественного анализа вкДНК. Для изучения специфических последовательностей или мутаций в вкДНК допустимо хранение образцов при низких температурах до 10 лет, поскольку, несмотря на уменьшение концентрации и нарушение целостности вкДНК, мутации в ней могут быть обнаружены и через несколько лет после замораживания образца [22, 32]. Авторами работы 2020г при проведении контроля качества плазмы крови, хранящейся в биобанке длитель-

ное время, был сделан вывод, что вкДНК, предназначенная для NGS-секвенирования, сохраняется при температуре -80° С от 1 до 6 лет [17].

Хранение выделенной и растворенной в буфере вкДНК рекомендуется осуществлять в пределах таких же сроков и при тех же условиях, что и плазму. Причем концентрация вкДНК в буфере с течением времени уменьшается медленнее, чем концентрация вкДНК в плазме [32]. Было показано, что хранение растворенной вкДНК рекомендуется осуществлять в полипропиленовых пробирках. Для анализа концентрации и целостности вкДНК рекомендуется использовать выделенную вкДНК, хранившуюся при температуре -20° С в течение ≤3 мес. [22].

Циклы замораживания-оттаивания

Циклы замораживания/оттаивания по-разному влияют на качество вкДНК, присутствующей в цельной крови, сыворотке и плазме, а также уже выделенной и растворенной в экстракционном буфере.

При исследовании влияния циклов замораживания/оттаивания (до 4 циклов) на выход вкДНК при выделении из образцов растворенной вкДНК в буфере, плазмы с ЭДТА и цельной крови с ЭДТА, замороженных при температуре -80° С и размороженных при комнатной температуре (25° С) [27] было обнаружено следующее: в образцах с плазмой [7, 27] и выделенной вкДНК [22, 25] не было выявлено существенных различий в концентрации вкДНК по сравнению со свежими образцами; однако в образцах с цельной кровью были обнаружены существенные изменения. Основываясь на результатах исследования, авторы предполагают, что цельная кровь, предназначенная для выделения вкДНК, не должна подвергаться циклам замораживания/оттаивания, т.к. плазма в ней не отделена от форменных элементов крови [27].

В работах 2005г и 2013г сообщается о нарушении целостности вкДНК (integrity index) в плазме после 3 циклов замораживания (-80° С)/оттаивания, что свидетельствует о дефрагментации участков вкДНК под действием неоднократного замораживания-оттаивания [22, 25].

Пробоподготовка. Выделение вкДНК

В настоящее время для выделения вкДНК из плазмы применяют различные методы, которые можно разделить на две группы в зависимости от используемых наборов: это наборы на основе колонок и наборы с использованием магнитных частиц.

Суть методов первой группы состоит в использовании центрифужных колонок с силиконовым матриксом, способным связывать фрагменты ДНК из пропускаемой плазмы, с последующим отмыванием, для которого используют вакуумный на-

сос или миницентрифугирование (FA (Epigentek), CNA (Qiagen) и др.). Выделение вкДНК, основанное на применении магнитных частиц, способных связываться с ДНК, позволяет миновать этап центрифугирования, снижая риск повреждения ДНК. Преимуществом этого способа выделения является автоматизация процесса. К наборам, основанным на этом принципе выделения, относятся: QS (Qiagen), EQ (Epigentek), MM (Thermo Fisher Scientific) и др. [33, 34]. Есть и менее распространенный способ выделения: технология полимеропосредованного обогащения при помощи набора PME (Analytik Jena) [34]. Наборы для выделения отличаются по объему плазмы, необходимого для выделения, который составляет от 2 до 10 мл.

Перечисленные методы оптимизированы для выделения вкДНК и являются предпочтительными. Однако они были разработаны относительно недавно, поэтому в литературе широко встречается использование для выделения общих и *homemade* методов [35], таких как DBM (Qiagen), который до сих пор часто применяется в исследованиях. Сравнение эффективности различных наборов имеет определенные сложности, поскольку на результат выделения могут влиять различные условия на этапах пробоподготовки. Тем не менее, удалось провести ряд исследований. В работе 2014г сравнивали эффективность выделения вкДНК из плазмы крови среди наборов, предназначенных специально для вкДНК (QIAamp® circulating nucleic acid (CNA) kit, NucleoSpin® Plasma XS (NS) kit and FitAmp™ plasma/serum DNA isolation (FA) kit), с широко используемым набором для выделения ДНК DBM (Qiagen). Наибольший выход вкДНК был получен при использовании наборов CNA и DBM (CNA kit > DBM kit > NS kit > FA kit). Тем не менее использование DBM нежелательно, поскольку он рассчитан на выделение более крупных молекул/фрагментов молекул ДНК, чем вкДНК, в то время как CNA и NS больше подходят для выделения небольших фрагментов вкДНК [36].

Для количественной оценки вкДНК чаще всего используют количественную ПЦР и флуориметрическое определение (краситель PicoGreen и флуориметр Qubit, который наиболее широко используется в лабораториях для подготовки к NGS-секвенированию [32]. Реже для количественной оценки применяется УФ-спектрофотометрия.

Анализ вкДНК в различных биоматериалах

Несмотря на то, что для изучения вкДНК наиболее часто используют кровь, выделение вкДНК из цереброспинальной жидкости, плевральной жидкости и мочи представляет определенный интерес при онкологических заболеваниях центральной нервной системы, легких, органов мочевыделительной системы. Однако в настоящее время нет стандартных

методов выделения, центрифугирования и хранения вкДНК из этих биологических жидкостей.

В моче вкДНК может появляться непосредственно из клеток мочевыделительной системы. Ее определение актуально для изучения опухолевого поражения этой локализации. Кроме того, в мочу проникает вкДНК из крови вследствие прохождения клубочковой фильтрации. Последняя может представлять интерес для диагностики и контроля лечения онкопатологии иной локализации [35]. Ввиду размера пор почечных клубочков вкДНК, проходящая фильтрацию и попадающая в мочу, является низкомолекулярной. В моче беременных женщин определяются короткие фрагменты (29-45 п.н.) ДНК плода. Данный факт важно учитывать при выборе метода экстракции, подходящего для выделения именно низкомолекулярной ДНК [37]. По данным некоторых исследований, вкДНК в моче распадается быстрее, чем в крови, поэтому необходимо максимально сократить интервал от получения биобразца до его анализа [38]. Как и при работе с кровью, мочу подвергают центрифугированию для осаждения клеток (однократному или двукратному), чтобы предупредить контаминацию геномной ДНК. Замораживание мочи до центрифугирования нежелательно, поскольку оно ускоряет лизис клеток. Для выделения вкДНК из мочи используются как специальные наборы, такие как Urine DNA Isolation Kit (UDI) (Norgen) и Extractall Urine DNA (EAU) (Zymo), так и в целом предназначенные для выделения вкДНК. Часто используются и традиционные наборы для выделения ДНК (DBM) [33].

Попадание вкДНК опухолевого происхождения из центральной нервной системы, в системный кровоток ограничено гематоэнцефалическим барьером, что делает актуальным выделение ее непосредственно из цереброспинальной жидкости [33]. Другим преимуществом выделения вкДНК из цереброспинальной жидкости является низкое содержание в ней клеток (0-5 клеток/мкл по сравнению с 3500-10500 лейкоцитов/мкл в крови), что снижает риск попадания геномной ДНК. В связи с этим достаточно однократного центрифугирования [39].

Выделение вкДНК из плевральной жидкости представляет интерес при онкологическом поражении легких [40]. Чаще всего для исследования используют образец плевральной жидкости объемом 2-5 мл, центрифугируют со скоростью 250 g в течение 10 мин при комнатной температуре и выделяют вкДНК с помощью различных наборов (DBM, CNA, и QIAamp DNA Blood Midi Kit).

Заключение. Рекомендации по обработке и хранению вкДНК

1. ВкДНК предпочтительнее выделять из плазмы, т.к. в сыворотке происходит контаминация вкДНК

геномной ДНК из разрушенных при коагуляции лейкоцитов.

2. Кровь необходимо отбирать в пробирки с ЭДТА, т.к. этот антикоагулянт не является ингибитором ПЦР. При перемешивании необходимо переворачивать пробирку, избегая тряски.

3. Кровь в пробирках с ЭДТА может храниться до центрифугирования ≤ 2 ч при комнатной температуре. При долгой задержке (до 5-6 сут.) необходимо использовать специальные пробирки со стабилизатором, предотвращающим разрушение ядерных клеток.

4. В случае, когда предполагается задержка обработки крови с ЭДТА на >2 ч образцы следует поместить на 4°C не более чем на сутки. Однако в случае выделения митохондриальной вкДНК это недопустимо.

5. Центрифугирование необходимо проводить в 2 этапа — низкоскоростное центрифугирование (800-1200 g) и высокоскоростное (14000-16000 g) при 4°C в течение 10 мин. После первого центрифугирования необходимо аккуратно отобрать плазму, не захватывая лейкоцитарную пленку. Перед вторым этапом центрифугирования необходимо

исключить образцы со следами гемолиза, повышенной концентрацией билирубина, а также замутненные (с признаками хилеза).

6. Хранить вкДНК лучше в экстрагированном виде, т.к. в этом случае она подвержена более медленной деградации, чем в плазме.

7. Следует избегать неоднократных циклов замораживания/оттаивания, особенно образцов плазмы, т.к. после 3 циклов наблюдается фрагментация вкДНК.

8. Температура и длительность хранения биообразцов для изучения вкДНК зависят от целей запланированных экспериментов с вкДНК. При количественном анализе допустимо хранение до 9 мес. при температуре -80°C . Для определения мутаций образцы пригодны в течение 10 лет.

9. Для выделения вкДНК следует использовать наборы, предназначенные специально для вкДНК, т.к. стандартные наборы предназначены для выделения высокомолекулярных участков ДНК.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

- Muhanna N, Eu D, Chan HL, et al. Cell-free DNA and circulating tumor cell kinetics in a pre-clinical head and neck Cancer model undergoing radiation therapy. *BMC Cancer*. 2021;21:1075. doi:10.1186/s12885-021-08791-8.
- Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med*. 2018;379(18):1754-65. doi:10.1056/NEJMr1706174.
- Moati E, Taly V, Garinet S. Role of Circulating Tumor DNA in Gastrointestinal Cancers: Current Knowledge and Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19):4743. doi:10.3390/cancers13194743.
- Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):531-48. doi:10.1038/nrclinonc.2017.14.
- Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun*. 2016;10(7):11815. doi:10.1038/ncomms11815.
- Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med*. 2019;25(9):1415-21. doi:10.1038/s41591-019-0561-9.
- Holdenrieder S, Burges A, Reich O, et al. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1137:162-70. doi:10.1196/annals.1448.013.
- Wang BG, Huang HY, Chen YC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res*. 2003;63(14):3966-8.
- Jiang WW, Zahurak M, Goldenberg D, et al. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int J Cancer*. 2006;119(11):2673-6. doi:10.1002/ijc.22250.
- Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*. 2001;41(2):276-82. doi:10.1046/j.1537-2995.2001.41020276.x.
- Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest*. 1975;56(2):512-5. doi:10.1172/JCI108118.
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon DS. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4270-6. doi:10.1200/JCO.2006.05.9493.
- Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 2004;48(3):421-7.
- Beutler E, Gelbart T, Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1990;9:166.
- Page K, Guttery DS, Zahra N, et al. Influence of Plasma Processing on Recovery and Analysis of Circulating Nucleic Acids. Otsuka M. *PLoS One*. 2013;8(10): e77963. doi:10.1371/journal.pone.0077963.
- Kang Q, Henry NL, Paoletti C, et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability in K₃EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem*. 2016;49(18):1354-60. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.03.012.
- Cell-Free DNA BCT. <https://www.streck.com/products/stabilization/cell-free-dna-bct/>. (10 августа 2021).
- Doludin YuV, Limonova AS, Kozlova VA, et al. Collection and storage of DNA-containing biomaterial and isolated DNA. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2730. (In Russ.) Долудин Ю.В., Лимонова А.С., Козлова В.А. и др. Сбор и хранение ДНК-содержащего биоматериала и выделенной ДНК. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020;19(6):2730. doi:10.15829/1728-8800-2020-2730.
- Lui YYN, Chik K-W, Lo YMD. Does centrifugation cause the ex vivo release of DNA from blood cells? *Clin Chem*. 2002;48:2074-6.

20. Volckmar AL, Sülthmann H, Riediger A, et al. A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications. *Genes Chromosom Cancer*. 2018;57(3):123-39. doi:10.1002/gcc.22517.
21. Page K, Powles T, Slade MJ, et al. The Importance of Careful Blood Processing in Isolation of Cell-Free DNA. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1075(1):313-7. doi:10.1196/annals.1368.042.
22. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, et al. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-30. doi:10.1590/s2175-97902018000117368.
23. Xue X, Teare MD, Holen I, et al. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta*. 2009;404:100-4. doi:10.1016/j.cca.2009.02.018.
24. Board RE, Williams VS, Knight L, et al. Isolation and extraction of circulating tumor 575 DNA from patients with small cell lung cancer. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1137:98-107. doi:10.1196/annals.1448.020.
25. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, et al. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem*. 2005;51:781-4. doi:10.1373/clinchem.2004.046219.
26. Risberg B, Tsui DW, Biggs H, et al. Effects of collection and processing procedures on plasma circulating cell-free DNA from cancer patients. *J Mol Diagn*. 2018;20(6):883-92. doi:10.1016/j.jmoldx.2018.07.005.
27. Chen Z, Zhang S, Li C, et al. Comprehensive Evaluation of the Factors Affecting Plasma Circulating Cell-Free DNA Levels and Their Application in Diagnosing Nonsmall Cell Lung Cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2019;23(4):270-6. doi:10.1089/gtmb.2018.0106.
28. Dewitte A, Tanga A, Villeneuve J, et al. New frontiers for platelet CD154. *Exp Hematol Oncol*. 2015;4(6):1-13. doi:10.1186/s40164-015-0001-626.
29. Norton SE, Luna KK, Lechner JM, et al. A New Blood Collection Device Minimizes Cellular DNA Release During Sample Storage and Shipping When Compared to a Standard Device. *J Clin Lab Anal*. 2013;27(4):305-11. doi:10.1002/jcla.21603.
30. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta*. 2015;450:243-53. doi:10.1016/j.cca.2015.08.028.
31. Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(24):1848-50. doi:10.1093/jnci/dji432.
32. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin Chem*. 2019;65(5):623-33. doi:10.1373/clinchem.2018.298323.
33. Ali N, Rampazzo R de CP, Costa ADT, et al. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1-13. doi:10.1155/2017/9306564.
34. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, et al. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits. *J Mol Diagnostics*. 2017;19(1):162-8. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.09.009.
35. Wang S, An T, Wang J, et al. Potential Clinical Significance of a Plasma-Based KRAS Mutation Analysis in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(4):1324-30. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2672.
36. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(26):6499-512. doi:10.1007/s00216-014-7835-3.
37. Melkonyan HS, Feaver WJ, Meyer E, et al. Transrenal Nucleic Acids: From Proof of Principle to Clinical Tests. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1137(1):73-81. doi:10.1196/annals.1448.015.
38. Yao W, Mei C, Nan X, et al. Evaluation and comparison of *in vitro* degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene*. 2016;590(1):142-8. doi:10.1016/j.gene.2016.06.033.
39. Pan W, Gu W, Nagpal S, et al. Brain Tumor Mutations Detected in Cerebral Spinal Fluid. *Clin Chem*. 2015;61(3):514-22. doi:10.1373/clinchem.2014.235457.
40. Asano H, Toyooka S, Tokumo M, et al. Detection of EGFR Gene Mutation in Lung Cancer by Mutant-Enriched Polymerase Chain Reaction Assay. *Clin Cancer Res*. 2006;12(1):43-8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0934.