

ПОЛЯНСКАЯ ЕЛИЗАВЕТА МАКСИМОВНА

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРЕДИКТОРНОЕ ЗНАЧЕНИЕ
ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ В КРОВИ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК
У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Федянин Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты:

Цуканов Алексей Сергеевич, доктор медицинских наук, руководитель отдела лабораторной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рыков Иван Владимирович, кандидат медицинских наук, заведующий отделением онкологии и паллиативной помощи Федерального государственного учреждения здравоохранения Санкт-Петербургской клинической больницы Российской академии наук

Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова департамента здравоохранения города Москвы»

Защита состоится «28» сентября 2023 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23 .

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

По данным мировой статистики в 2020 году колоректальный рак (КРР) вышел на третье место по заболеваемости и сохранил второе по смертности от злокачественных новообразований. По сведениям за 2020 год в мире было диагностировано 1,88 миллиона новых случаев данной патологии, а погибли ориентировочно 881 000 пациентов (Sung H., et al. 2021). При первичной постановке диагноза от 20 до 25% пациентов с КРР уже имеют отдаленные метастазы (Riihimäki M., et al. 2016), и более 60% – III–IV стадию, при этом медиана общей выживаемости (ОВ) в данной группе составляет в среднем 2,0 года (95% ДИ 1,4–2,1) (Joachim C., et al. 2019). По данным исследований 5-летняя ОВ при локализованных формах заболевания (I–II стадии) составляет 90%, около 70% при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах и всего 12% у пациентов с отдаленными метастазами (Haggar F.A. et al. 2009). При более тонком разделении прогноз внутри групп со II и III стадией заболевания значительно различается. По данным исследователей из США 5-летняя ОВ у пациентов с раком ободочной кишки при IА и IВ составила 87% и 65%, а для IIIА, IIIВ и IIIС стадии 90%, 72% и 53% соответственно (Rawla P., et al. 2019).

Благодаря достижениям в области лечения КРР показатели выживаемости улучшаются – за последние 20 лет средняя продолжительность жизни увеличилась с 6 месяцев при проведении симптоматической терапии до 30 месяцев при проведении химиотаргетной терапии (Joachim C., et al. 2019). В настоящее время хирургическое вмешательство остается основным методом лечения в случаях диагностики заболевания при I–III стадии и в случае резектабельных метастазов. Адьювантная химиотерапия рекомендована пациентам со II стадией высокого риска или III стадией КРР после проведения потенциально излечивающей операции. При этом более 50% пациентов III стадии и 80% пациентов II стадии излечиваются только хирургическим путем, то есть подвергаются избыточной химиотерапии (André T., et al. 2015, Auclin E., et al. 2017, Gunderson L.L., et al. 2010,

Sobrero A.F., et al. 2020). После проведения хирургического лечения по поводу резектабельных метастазов, прогрессирование выявляется более чем у 50% после резекции очагов в печени (Adam R., et al. 2006) и 67% после резекции легких (Corsini E.M., et al. 2019). Однако в группах благоприятного прогноза медиана ОВ приближается к 5 годам у пациентов с одиночными метастазами в легкие или печень (Corsini E.M., et al. 2019).

Сейчас основной системой для определения прогноза при КРР является классификация по системе TNM. Индексы Т и N коррелируют с ОВ даже при метастатической болезни. По данным популяционного шведского исследования (n=49,096) среди пациентов с T2 медиана ОВ составила 16,5 месяцев по сравнению с пациентами с T4 (8 месяцев). Среди пациентов с N0 медиана ОВ составила 19 месяцев по сравнению с пациентами с N2 (8 месяцев) (Riihimäki M., et al. 2016).

Принимая во внимание неоднородность данных выживаемости внутри групп при II и III стадиях заболевания, требуется поиск и интеграция новых данных для создания единой прогностической системы. Попытки объединения анатомических особенностей опухоли, а также ряда клинических характеристик были предприняты уже в 7-м издании UICC/AJCC (Mahar A.L., et al. 2017). В качестве неблагоприятными факторами, определяющими необходимость проведения химиотерапии при II стадии, являются: низкая степень дифференцировки, наличие лимфоваскулярной или периневральной инвазии, R1–2 объем резекции, операция на фоне кишечной непроходимости, неадекватный объем лимфодиссекции (Figueredo A., et al. 2004). В последнее время к этим факторам дополнительно относят tumor-budding (BD3), а также уровень РЭА>2,35 после операции (Anandappa G., et al. 2020). К факторам неблагоприятного прогноза при КРР так же принято относить правостороннюю локализацию опухоли и женский пол (Anandappa G., et al. 2020). Прогноз выживаемости при IV стадии также различается в зависимости от сайта метастазирования (Riihimäki M., et al. 2016, Franko J., et al. 2012).

Относительно новым подходом в оценке прогноза течения болезни является анализ мутационных особенностей опухоли. Мутации в *KRAS* связаны с низкой

безрецидивной выживаемостью (БРВ) (ОР (отношение рисков) 1,20; 95% ДИ 1,02-1,42), $p=0,03$) и ОВ (ОР 1,41; 95% ДИ 1,17-1,70, $p<0,001$) (Modest D.P., et al. 2016). Наличие мутаций в гене *TP53* так же связано с меньшей БРВ и ОВ, тогда как мутация в гене *APC* наоборот характеризовалась более длительной медианой ОВ (ОР 0,29; 95% ДИ 0,12-0,66; $p=0,003$) (Corsini E.M., et al. 2019). Известно, что при метастатическом КРР мутация в гене *BRAF* ассоциирована с крайне агрессивным течением (Федянин М.Ю., и др. 2021) и плохим прогнозом с медианой ОВ 11,7 месяцев (Bachet J.V., et al. 2018). Очевидно, что КРР представляет собой разнородную группу заболеваний, обусловленных широким спектром мутаций, в силу чего проведение универсальной молекулярно-опосредованной терапии невозможно.

Для дальнейшего совершенствования лечения необходимо изучение маркеров прогрессирования после проведенного радикального лечения и в процессе химиотерапии. В данном контексте представляет интерес изучение циркулирующей в крови опухолевой ДНК (цоДНК). ЦоДНК отражает геномные изменения опухоли, что делает возможным проведение количественной и качественной оценки опухолевой нагрузки в реальном времени по крови. Обнаружение цоДНК является перспективным маркером минимального резидуального заболевания (МРЗ), определяемого как обнаружение цоДНК без каких-либо других признаков рецидива. За счет большей чувствительности к изменениям опухолевой нагрузки цоДНК может помочь в подборе интенсивности неоадьювантной терапии, а также стать дополнительным критерием отбора пациентов для адьювантной химиотерапии. Проспективный мониторинг цоДНК позволяет выявить ранний рецидив. При метастатическом заболевании цоДНК может предсказать ответ на проводимую химиотерапию до появления других признаков прогрессирования. Большой опыт в выявлении, анализе и интерпретации данных цоДНК в рамках проспективных исследований позволит лучше определить ее роль для внедрения в рутинную клиническую практику.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения больных колоректальным раком на основании анализа наличия циркулирующей в крови опухолевой ДНК.

Задачи исследования

1. Провести проспективный анализ частоты выявления и спектра мутаций циркулирующей в крови опухолевой ДНК при различных стадиях колоректального рака.
2. Изучить взаимосвязь клинико-морфологических параметров с наличием опухолевой ДНК в крови при колоректальном раке.
3. Изучить конкордантность мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при колоректальном раке.
4. Проспективно оценить прогностическое влияние циркулирующей в крови опухолевой ДНК на годовичную выживаемость без прогрессирования при различных стадиях колоректального рака.
5. Изучить эффект противоопухолевого лечения в зависимости от наличия циркулирующей в крови опухолевой ДНК при различных стадиях колоректального рака.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена на базе онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтического) № 2, хирургического отделения № 3 (колопроктологии), хирургического отделения № 7 (опухолей гепатопанкреатобилиарной зоны) НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России совместно с лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

В первой части работы проводится анализ частоты и структуры мутаций в первичной опухоли пациентов с КРР, а также конкордантности мутационного профиля первичной опухоли и цоДНК. Вторая часть работы посвящена оценке чувствительности тест-системы по определению цоДНК в крови пациентов с

различными стадиями КРР, а также выявлению взаимосвязей клинико-морфологических параметров с наличием опухолевой ДНК в крови при КРР. Третья часть работы посвящена проспективному изучению прогностической роли цоДНК для выявления МРЗ при резектабельном КРР, а также после проведения метастазэктомий. Исследование проведено в рамках экспериментальной научной разработки приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации на значительном объеме данных НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина проведена проспективная оценка прогностической роли циркулирующей в крови опухолевой ДНК при КРР в процессе противоопухолевого лечения при различных стадиях с применением оригинальной тест-системы.

Теоретическая и практическая значимость

Выявление взаимосвязей между уровнем циркулирующей опухолевой ДНК позволит осуществлять стратификацию больных по риску возникновения прогрессирования и позволит оптимизировать тактику лечения пациентов с разными стадиями КРР.

Личный вклад

С 2016 г. по 2022 г. был самостоятельно проведен анализ опубликованной литературы – полнотекстовых статей, метаанализов, постерных докладов и тезисов конференций, посвященных предикторной, прогностической роли цоДНК в крови пациентов с разными стадиями КРР. Автор принимал участие в разработке дизайна и концепции исследования, осуществлял химиотерапевтическое лечение пациентов, включенных в исследование, оценивал эффективность проводимой терапии и отдаленные результаты, собирал материал для анализа, участвовал в интерпретации лабораторных данных. Автором заполнена база данных, ставшая основой для статистического анализа. Был проведен самостоятельный статистический анализ полученных данных.

Соответствие паспорту специальности

Основные положения, рекомендации и выводы диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия и направлениям исследований п. 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)», п. 3 «Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики».

Положения, выносимые на защиту

1. Чувствительность тест-системы по выявлению генетических альтераций в опухолевом материале составила 97,82%, в цоДНК – 51,20% для всех стадий заболевания и 64,5% для метастатического КРР. Высокая чувствительность тест-системы по выявлению генетических альтераций в опухолевом материале говорит о возможности замены им дорогостоящего NGS.

2. Конкордантность тест системы для мутаций в генах *KRAS*, *TP53*, *APC*, *PIK3CA*, *BRAF*, *FBXW7*, *MB21D2*, *SMAD4* составила 69,4% (95% ДИ 62,2-76,0%) в плазме крови и в опухолевом материале при всех стадиях заболевания. Конкордантность для ранних стадий (I–III) составила 65,4%, а для метастатического КРР 83,8%, что позволяет рассматривать ее в качестве альтернативы классического определения мутаций в опухолевом материале плазмой крови для определения биомаркеров эффективности таргетной терапии.

3. Наличие цоДНК после операции является независимым прогностическим признаком прогрессирования как при I–III стадиях (ОР=21,07, $p<0,001$), так и при проведении метастазэктомий (ОР=6,7, $p=0,01$). Пациенты с положительной цоДНК после операции при I–III стадиях КРР имеют худшие результаты выживаемости без признаков болезни (ВБПБ) несмотря на адъювантную химиотерапию (ХТ) (ОР 27,7, $p<0,001$). Пациенты с II стадией КРР без цоДНК после операции в 100% случаев не имели прогрессирования заболевания вне зависимости от проведения адъювантной ХТ.

Внедрение результатов исследования

После регистрации валидированная в нашем исследовании тест-система по выявлению цоДНК может быть использована в рутинной клинической практике. Полученные результаты и рекомендации могут быть рекомендованы к использованию для всех врачей, вовлеченных в лечение рака толстой кишки.

Апробация

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании с участием онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) № 2, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) № 1, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) № 4, онкологического отделения лекарственных методов лечения (химиотерапевтическое) № 17, онкологического отделения хирургических методов лечения № 3 (колопроктологии), онкологического отделения хирургических методов лечения № 7 (опухолей гепатопанкреатобилиарной зоны), онкологического отделения хирургических методов лечения № 11 (торакальной онкологии), молекулярно-биологической лаборатории отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, состоявшегося 21 июня 2022 года, протокол № 118.

Публикации

Материалы диссертационного исследования изложены в полном объеме в 9 научных работах, из них 2 научные статьи в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 124 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка литературы, содержащего 138

источников (9 отечественных и 131 зарубежных), и приложения. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 29 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертантом было проведено проспективное нерандомизированное одноцентровое исследование. В работу были включены данные пациентов с морфологически верифицированным колоректальным раком с любой стадией заболевания, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2016 по 2021 г. Критериями исключения являлись отсутствие морфологической верификации опухоли, опухоль червеобразного отростка, опухоли тонкой кишки, метастазы опухолей других локализаций, а также отсутствие образцов крови или доступности гистологического материала первичной опухоли для выполнения генетического анализа. Для выполнения задач диссертационной работы была сформирована коллекция парных образцов тканевой и циркулирующей опухолевой ДНК, полученных от пациентов КРР. Выделение ДНК из блока первичной опухоли осуществлялось при помощи набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). Перечень мутаций опухоли был определен при помощи полногеномного секвенирования (NGS). Выявленные в опухолевом материале мутации в дальнейшем мониторировались в плазме крови. Определение опухолевых специфических соматических мутаций в цоДНК из образцов плазмы крови проводилось с помощью ddPCR. С целью обогащения NGS-библиотеки применялась мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для секвенирования библиотек использовалась платформа MiniSeq (Illumina) и набор реагентов High output.

Найденные в исследуемых образцах с опухолевой тканью толстой кишки соматические мутации сопоставлялись с информацией из базы данных COSMIC, содержащей данные по частоте встречаемости и терапевтической значимости соматических мутаций. В общей сложности были исследованы мутации в 50 генах (*ACVR2A*, *AKT1*, *APC*, *B2M*, *BAX*, *BMPR2*, *BRAF*, *CBFB*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CHEK2*,

CTNNB1, DOCK3, EEF1B2, EGFR, ERBB2, ESR1, FAM39B, FBXW7, FOXA1, GATA3, GNAS, IRF5, KEAP1, KRAS, MB21D2, MED12, NFE2L2, NRAS, NRXN3, OR5K3, PGM5, PIK3CA, PRPF19, RHPN2, RNF43, RPL22, RPSAP58, RUNX1, SEMA5A, SF3B1, SMAD4, SPTA1, TCF7L2, TP53, TRIM48, TTK, U2AF1, VHL, XYLT2).

При расчете конкордантности положительными результатами считались те, где хотя бы в одном из образцов плазмы найденные в цоДНК мутации совпадали с мутацией в блоке. При отсутствии мутаций в блоке в цоДНК определялись наиболее часто встречающиеся при КРР раке мутации. Минимально допустимой концентрацией, при которой цоДНК в образце плазмы пациентов с I – III стадиями считали позитивной, составило 0,4 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы. Учитывая большую концентрацию цоДНК в крови пациентов с метастатическим заболеванием, минимально допустимой концентрацией, при которой цоДНК в образце плазмы считали позитивной, составило 0,5 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы.

Статистический анализ результатов выполнялся при помощи программ Microsoft Excel 2016 и IBM SPSS Statistics v. 26., онлайн ресурса <https://www.medcalc.org>.

Выживаемость без признаков болезни (ВБПБ) рассчитывалась как интервал от даты операции до регистрации рецидива, общая выживаемость (ОВ) рассчитывалась от даты начала лечения до даты последнего визита на основании электронной карты пациента, даты последнего контакта с пациентом по телефону или смерти пациента. Расчет выживаемости проведен с помощью метода Каплана-Майера. Сравнительный анализ выживаемости оценен при помощи логранового теста. Взаимосвязь между определением цоДНК и различными факторами была оценена с использованием корреляционных и регрессионных анализов. Влияние признаков на прогноз заболевания оценивалось посредством регрессионного анализа Кокса. В качестве порогового значения статистической значимости было принято $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ частоты выявления и спектра мутаций, выявленных в блоках и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при различных стадиях КРР

Всего в базу данных была внесена информация о 556 больных (1497 образцов плазмы). Из них критериям включения соответствовали всего 229 образцов первичной опухоли от 211 больных – 37,9% (в том числе от 18 пациентов по 2 образца первичной опухоли). Остальные образцы от 345 пациентов не были доступны для анализа или качество образцов не позволяло провести анализ. Из 211 больных у 72% доступны данные блоков первичной опухоли и цоДНК до и после лечения. Таким образом для проведения дальнейшего анализа были отобраны 229 образцов тканей и 471 образец плазмы 211 пациента. Данные по цоДНК удалось получить в 332 образцах плазмы.

В материале блоков с опухолевой тканью обнаружены 620 соматических мутаций в 28 генах (*ACVR2A* – 18, *AKT1* – 2, *APC* – 126, *BAX* – 7, *BMPR2* – 10, *BRAF* – 18, *CDH1* – 2, *CDKN2A* – 11, *CTNNB1* – 1, *DOCK3* – 9, *EGFR* – 4, *FBXW7* – 6, *GATA3* – 2, *IDH1* – 3, *IRF5* – 4, *KRAS* – 85, *MB21D2* – 8, *NRAS* – 5, *PGM5* – 2, *PIK3CA* – 31, *RNF43* – 10, *RPL22* – 19, *SMAD4* – 31, *SPTA1* – 1, *TCF7L2* – 4, *TP53* – 196, *TTK* – 2, *XYLT2* – 3). В 5 случаях мутаций в блоке не было определено (2,18%). Таким образом, чувствительность тест системы для выявления мутаций в ткани первичной опухоли составила 97,82%. Чаще всего встречались мутации в генах *TP53* – 85%, *APC* – 55%, *KRAS* – 37%, *SMAD4* – 13,5%, *PIK3CA* – 13%, *RPL22* – 8%, *ACVR2A* – 7,8%, *BRAF* – 7,8%, а *NRAS* – всего в 2%. При сравнении встречаемости соматических мутаций с известной терапевтической значимостью в исследованных образцах тканей пациентов с КРР и базой COSMIC выявились сопоставимые данные встречаемости наиболее распространенных при КРР мутаций: *KRAS*, *TP53*, *BRAF*, *APC*, *SMAD4*, *PIK3CA* и *NRAS*. А мутации *RPL22*, *ACVR2A* в базе данных COSMIC не описаны как часто встречающиеся.

Диапазон числа мутаций в одном образце составил от 1 до 12 мутаций. В 3 блоках мутаций обнаружено не было. Медиана количества выявленных в 1 образце

мутаций составила 2,75 (95% ДИ 2,1 – 3,4). Для дальнейшего анализа цоДНК были отобраны 332 образца плазмы. Мутации в цоДНК были определены в 170 образцах плазмы: из них до лечения в 90 из 168 образцов и в 80 из 164 в плазме после проведенного лечения. Клиническая чувствительность для всех стадий 51,2% (95% ДИ 45,8–56,6%), для метастатического КРР 64,5% (95% ДИ 53,3–74,5%, $p=0,80$).

Всего в цоДНК удалось определить 126 мутации в 8 генах: *KRAS* (47 – 37,30%), *TP53* (38 – 30,16%), *APC* (22 – 17,46%), *PIK3CA* (9 – 7,14%), *BRAF* (7 – 5,55%) и по 1 (0,79%) *FBXW7*, *MB21D2*, *SMAD4*. Все часто встречающиеся мутации удалось определить в цоДНК, при этом частота определения мутации *KRAS* была максимальна. Медиана концентрации цоДНК в случае наличия метастазов на момент забора крови оказалась значимо выше, чем при локализованных стадиях КРР (3,93 против 0 копий/мкл, $p<0,001$). Минимально допустимой концентрацией, при которой цоДНК в образце плазмы пациентов с I–III стадиями считали позитивной, составило 0,4 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы. Учитывая большую концентрацию цоДНК в крови пациентов с метастатическим заболеванием, минимально допустимой концентрацией, при которой цоДНК в образце плазмы считали позитивной, считали 0,5 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы.

В работе показана высокая чувствительность тест системы по выявлению генетических альтераций в опухолевом материале и плазме крови, что позволило нам продолжить исследование для оценки прогностической роли выявления цоДНК в плазме крови после хирургического лечения при резектабельных стадиях заболевания.

Оценка конкордантности мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при колоректальном раке

При расчете конкордантности положительными результатами считались те, где хотя бы в 1 из образцов плазмы найденные в цоДНК мутации совпадали с мутацией, определенной в блоке. При отсутствии мутаций в блоке первичной опухоли в цоДНК определялись наиболее часто встречающиеся при КРР раке мутации. В каждом образце плазмы для выявления цоДНК определяли от 1 до 5

мутаций (медиана 1,37: 95% ДИ 1,26–1,48%), первоначально обнаруженных в блоке ткани первичной опухоли. Из 208 пар данные о конкордантности возможно было определить в 170 случаях. Из 170 пар конкордантность была выявлена в 118 парах. При этом 113 пар совпадали хотя бы по 1 мутации, из них 11 по 2 мутациям и 3 по 3 мутациям. В 5 случаях мутаций не было определено ни в блоке, ни в плазме.

Всего в цоДНК удалось определить конкордантность по 126 мутациям в 8 генах: *KRAS* (47 – 37,30%), *TP53* (38 – 30,16%), *APC* (22 – 17,46%), *PIK3CA* (9 – 7,14%), *BRAF* (7 – 5,55%) и по 1 (0,79%) *FBXW7*, *MB21D2*, *SMAD4*. Из 5 случаев, в которых в первичном блоке была определена мутация в гене *NRAS*, ни в одном не удалось установить эту мутацию в цоДНК, таким образом конкордантность для этого гена была равна 0.

Рассчитанное число совпадений для мутаций во всех генах составило 69,4% (95% ДИ 62,2–76,0%).) (Таблица 1).

Таблица 1 – Конкордантность по всем генам в зависимости от стадии

Стадия	Конкордантность по всем генам			
	Количество	% совпадения	95,0% Нижняя граница ДИ %	95,0% Верхняя граница ДИ %
I	12	60,0%	38,4%	78,9%
II	40	65,6%	53,1%	76,6%
III	35	67,3%	53,9%	78,9%
IV	31	83,8%	69,6%	92,9%
Всего	118	69,4%	62,4%	76,0%

По мере увеличения стадии конкордантность увеличивалась – для I стадии 60,0% (95% ДИ 62,4–76,1%), для II стадии 65,6% (95% ДИ 53,1–76,6%), для III стадии 67,3% (95% ДИ 53,9–78,9%), для IV стадии (в эту группу объединены все пациенты с метастазами на момент забора плазмы для определения цоДНК: синхронными и метасинхронными) 83,8% (95% ДИ 69,6–92,9%) $p=0,030$.

Конкордантность по всем генам для ранних стадий (I–III) составила 65,4% (95% ДИ 57,1–73,1%). Конкордантность для всех стадий по гену *KRAS* составила 78,3% (95% ДИ 66,7–87,3%), для IV стадии 90,9% (95% ДИ 64,7–99,0%). При анализе совпадений по гену *BRAF* конкордантность для всех стадий составила 70%

(95% ДИ 39,4–90,7%), а по гену *TP53* – 71,7% (95% ДИ 58,7–82,4%), а по *APC* 62,9% (95% ДИ 46,3–77,3%).

Для метастатического заболевания конкордантность по *BRAF* составила 75,0% (95% ДИ 28,4–97,2%), по *PIK3CA* 83,3% (95% ДИ 44,2–98,1%), а по генам *TP53* и *APC* – 100%. Величина совпадений увеличивалась для всех генов по мере увеличения критерия T (конкордантность для T4 81,5% (95% ДИ 64,1–92,6%) против 57,1% (95% ДИ 23,5–86,1%) для T1) ($p=0,041$). Конкордантность для *BRAF* и *APC* при T4 была 100%, а для *KRAS* 88,9% (95% ДИ 58,6–98,5%). Для категории Nx конкордантность была наибольшей 87,5% (95% ДИ 54,6–98,6%) ($p=0,028$), что очевидно связано с большей распространенностью заболевания при неизвестных данных N. Для генов *BRAF* и *TP53* конкордантность при N2 была 100%, и для всех 4 генов: *KRAS*, *BRAF*, *APC* и *TP53* 100% при Nx.

В работе показана высокая конкордантность цоДНК и тканей первичной опухоли по всем генам. Конкордантность по генам *KRAS* и *BRAF* была выше. По мере увеличения стадии заболевания конкордантность увеличивалась. Так же конкордантность была выше при увеличении критерия T и N, однако при Nx конкордантность была наибольшей, что может быть объяснено большей распространенностью заболевания при неизвестных данных N.

Прогностическое значение цоДНК как маркера МРЗ при I–III стадиях

Среди всех пациентов, включенных в исследование, контроль цоДНК проводился для оценки МРЗ у 146 пациентов с I–III стадией заболевания, из них прогрессирование заболевания после операции было выявлено у 33 больных. При отборе больных со временем наблюдения больше 6 месяцев пропадают данные по 8 больным до операции и 10 после операции. После исключения данных этих пациентов медиана времени наблюдения составила 24 месяца (6–66 мес.). При анализе значимости цоДНК как маркера МРЗ были известны данные цоДНК до операции у 120 пациентов (из них I стадия – 19 (15,8%), II стадия – 54 (45,0%), III стадия – 47 (39,2%), после операции – у 119 пациентов (из них I стадия – 20 (16,8%), II стадия – 56 (47,0%), III стадия – 43 (36,2%)). Положительные данные цоДНК до

операции выявлены у 55 из 120 больных (45%), а после операции выявлены у 46 из 119 (38,6%) (Таблица 2).

Таблица 2 – Прогрессирование в зависимости от статуса цоДНК при выявлении МРЗ при I–III стадиях

	Без прогрессирования	Прогрессирование	Всего
	цоДНК до операции		
цоДНК-	56 (64,4%)	9 (27,3%)	120
цоДНК+	31 (35,6%)	24 (72,7%)	
p	<0,001		
	цоДНК после операции		МРЗ – 38%
цоДНК-	70 (81,4%)	3 (9,1%)	119
цоДНК+	16 (18,6%)	30 (90,9%)	
p	<0,001		

У 24 больных с прогрессированием заболевания была выявлена положительная цоДНК до операции (из 33 у кого было выявлено прогрессирование) – 72,7% (95% ДИ 54,5–86,7%). При отсутствии прогрессирования отрицательная цоДНК до операции выявлена у 56 человек – 64,4% (95% ДИ 53,4–74,4%) из 87 пациентов без прогрессирования ($p < 0,001$). У 30 больных с прогрессированием заболевания (из 33) выявлена положительная цоДНК после операции – 90,9% (95% ДИ 75,7–98,0%). При отсутствии прогрессирования у 70 человек выявлена отрицательная цоДНК после операции – 81,4% (95% ДИ 71,5–88,9%) из 86 пациентов без прогрессирования ($p < 0,001$). Чувствительность тест системы по определению цоДНК для выявления прогрессирования при I–III стадиях после операции составила 90,9% (95% ДИ 75,7–98%), специфичность 81,4% (95% ДИ 71,5–88,9%), PPV 65,2% (95% ДИ 54,3–74,7%), NPV 95,9% (95% ДИ 88,8–98,5%), точность 84,0% (95% ДИ 76,2–90,1%).

Влияние выявления цоДНК на выживаемость пациентов

При оценке ВБПБ в зависимости от статуса цоДНК выявлено, что при положительной цоДНК до операции медиана ВБПБ составила 35 месяцев (95% ДИ 24–45,9), в группе отрицательной цоДНК до операции медиана ВБПБ достигнута не была (ОР 4,6; 95% ДИ 2,0–10,4; $p < 0,001$) (Рисунок 1).

При положительной цоДНК после операции медиана ВБПБ составила 20 месяцев (95% ДИ 8,14–31,9)), в группе отрицательной цоДНК достигнута не была (ОР 27,7; 95% ДИ 6,6–116,6) $p < 0,001$ (Рисунок 2).

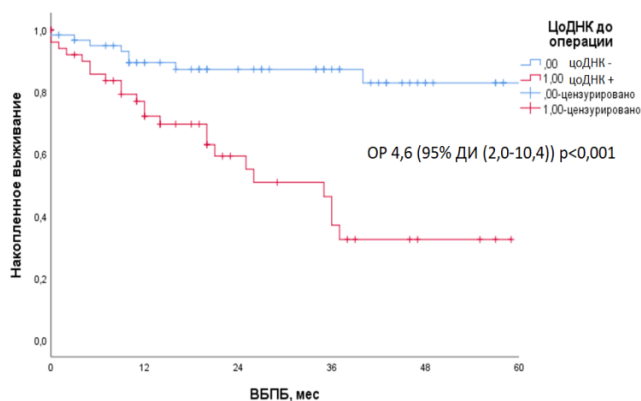


Рисунок 1 – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК до операции при I–III стадиях

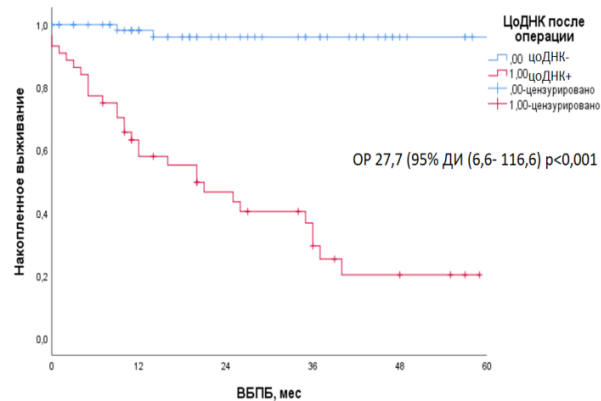


Рисунок 2 – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции при I–III стадиях

При однофакторном анализе показано, что на ВБПБ влияли стадия заболевания, Т, N, цоДНК до и после операции. При проведении многофакторного анализа наличие положительной цоДНК после операции явилось независимым предиктором прогрессирования для I–III стадии КРР (β 3,048 ОР=21,07; Т, $p < 0,001$). При проведении однофакторного анализа на прогрессирование при II стадии влияли наличие факторов риска (при разделении на наличие и отсутствие факторов риска получена слабая корреляция (ОР=1,6; 95% ДИ 0,99–2,8, $p < 0,05$), а так же наличие положительной цоДНК после операции (ОР=6,7; 95% ДИ 1,46–31,5, $p < 0,014$). При проведении многофакторного анализа положительная цоДНК после операции явилась независимым предиктором прогрессирования для II стадии КРР (β 1,9 ОР=6,79; 95% ДИ 1,4–31,47, $p < 0,014$). В таблице 3 представлены данные для I, II и III стадий по 1, 2, 3 годичной ВБПБ в зависимости от уровня цоДНК до и после операции.

Не было найдено статистически значимых различий в ОВ в зависимости от уровня цоДНК до операции (ОР 0,75; 95% ДИ 0,19–3,04, $p = 0,69$) и после операции (ОР 1,39; 95% ДИ 0,37–5,2, $p = 0,62$) при I–III стадиях. В группе положительной

цодНК после операции умерло 4 человек, в группе отрицательной цодНК после операции умерло 5 человек.

Таблица 3 – ВБПБ в зависимости от статуса цодНК до и после операции

стадия	ВБПБ, % цодНК(+) до операции			ВБПБ, % цодНК(+) после операции		
	1-летняя	2-летняя	3-летняя	1-летняя	2-летняя	3-летняя
I	70%	35%	35%	62%	41%	41%
II	72%	66%	45%	52%	46%	27%
III	63%	54%	27%	62%	49%	29%
стадия	ВБПБ, % цодНК(-) до операции			ВБПБ, % цодНК(-) после операции		
I	100%	100%	100%	100%	100%	100%
II	91%	91%	91%	100%	100%	100%
III	84%	78%	78%	94%	87%	87%

Прогностическая роль динамики цодНК до и после операции

При разделении всех пациентов, которым проводился анализ цодНК, для определения МРЗ на группы в зависимости от динамики изменений цодНК получились 4 категории: 1) с отсутствием цодНК и до, и после операции, 2) с отсутствием цодНК до операции, но с появлением после, 3) с наличием цодНК до операции и отсутствием после, 4) с наличием цодНК и до, и после операции.

Данные динамики изменений цодНК до и после операции имелись у 112 пациентов (Таблица 4).

Таблица 4 – Динамика изменения цодНК до и после операции

цодНК до операции	цодНК после операции	I стадия 18	II стадия 52	III стадия 42	Всего 112
-	-	7(38,9%)	22(42,3%)	16(38,1%)	45(40,2%)
-	+	2(11,1%)	5(9,6%)	9(21,4%)	16(14,3%)
+	-	4(22,2%)	12(23,1%)	7(16,7%)	23(20,5%)
+	+	5(27,8%)	13(25%)	10(23,8%)	28(25%)

В 1 и 3 группах медиана времени без прогрессирования достигнута не была, во 2 группе составила 40 месяцев (95% ДИ 0–84,3), а в 4 группе составила 20 месяцев (95% ДИ 9,2–30,8), (ОР 2,6; 95% ДИ 1,7–3,8, $p < 0,001$) (Рисунок 3). При I–

III стадиях динамика изменения цоДНК не влияла на ОВ (ОР 0,97; 95% ДИ 0,57–1,6, $p=0,91$, что, скорее всего, связано с малым числом событий ($n=9$).

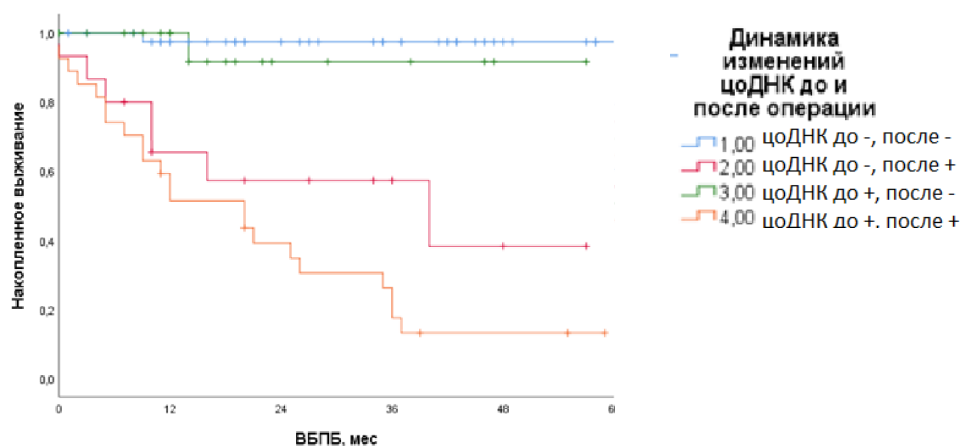


Рисунок 3 – ВБПБ в зависимости от динамики цоДНК до и после операции при I–III стадиях

Эффективность адъювантной химиотерапии в зависимости от цоДНК

При оценке влияния цоДНК после операции в зависимости от проведения адъювантной химиотерапии на ВБПБ получены следующие данные: всего информация о цоДНК и АХТ известна у 107 больных с I–III стадией болезни.

При отсутствии цоДНК не выявлено улучшения ВБПБ при проведении АХТ ($p=0,14$), в обеих группах медиана ВБПБ достигнута не была. При положительной цоДНК также не было обнаружено статистически значимого различия в ВБПБ ($p=0,34$).

При II стадии значимых различий в ВБПБ в зависимости от назначения АХТ так же выявлено не было. Однако пациенты без цоДНК в 100% случаев не имели прогрессирования заболевания вне зависимости от проведения АХТ (Рисунок 4).

Число пациентов с III стадией КРР без проведения адъювантной ХТ было незначительным, поэтому проведение анализа различий в ВБПБ в зависимости от назначения АХТ при III стадии неинформативно.

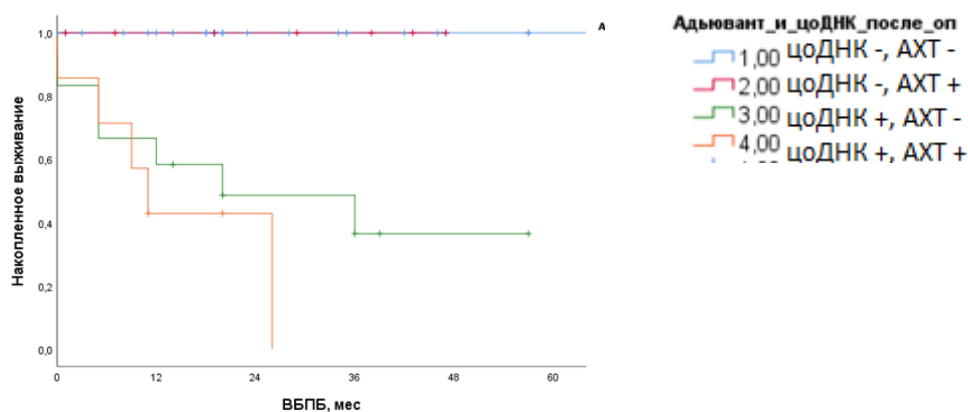


Рисунок 4 – ВБПБ в зависимости от наличия цоДНК после операции и проведения адъювантной ХТ при II стадии

Прогностическое значение цоДНК при проведении метастазэктомий

Среди всех пациентов, включенных в исследование, метастатическое заболевание было у 57 больных. Из них контроль цоДНК проводился для оценки МРЗ у 41 пациента после проведения метастазэктомий по поводу синхронных (34 – 83%) и метасинхронных метастазов (7 – 17%), из них прогрессирование заболевания после операции было выявлено у 28 больных (68%). Медиана времени наблюдения составила 25 месяцев (1–67 мес).

При анализе значимости цоДНК как маркера МРЗ при проведении метастазэктомий были известны данные цоДНК до операции у 22 пациентов, после операции у 22 пациентов. Положительные данные цоДНК до операции выявлены у 16 из 22 больных (72,7%), а после операции – у 14 из 22 (63,6%) (Таблица 5).

Учитывая большую концентрацию цоДНК в крови пациентов с метастатическим заболеванием, минимально допустимой концентрацией, при которой цоДНК в образце плазмы считали позитивной – 0,5 копий мутантного ДНК в 1 мкл плазмы. При таком пороговом уровне у 14 больных с прогрессированием заболевания (из 16) выявлена положительная цоДНК после операции – 87,5% (95% ДИ (67,8–95,8%). При отсутствии прогрессирования у 6 человек выявлена отрицательная цоДНК после операции – 100% (95% ДИ 76,8–100%), ($p=0,0003$).

В связи с этим дальнейший анализ проводился для статуса цоДНК после операции.

Таблица 5 – Прогрессирование в зависимости от статуса цоДНК при выявлении МРЗ при проведении метастазэктомий

	Без прогрессирования	Прогрессирование	Всего
	цоДНК до операции		
цоДНК-	3 (50%)	3 (50%)	22
цоДНК+	2 (17,6%)	14 (82,4 %)	
P	0,1		
	цоДНК после операции		
цоДНК-	6 (75%)	2 (25%)	22
цоДНК+	0	14 (100%)	
P	0,0003		

Чувствительность тест системы по определению цоДНК для выявления прогрессирования после операции при метастазэктомиях составила 100% (95% ДИ 76,8–100%), специфичность 75% (95% ДИ 34,9–96,8%), PPV 87,5% (95% ДИ 67,8–95,8%), NPV 100%, точность 90,9% (95% ДИ 70,8–98,9%).

Влияние выявления цоДНК на выживаемость пациентов после проведения метастазэктомий

При оценке ВБПБ в зависимости от статуса цоДНК до операции статистически значимых различий получено не было (ОР 2,7; 95% ДИ 0,7–9,8, $p=0,12$). При оценке ВБПБ в зависимости от статуса цоДНК после операции, при положительной цоДНК риски прогрессирования были значимо выше (ОР 7,4; 95% ДИ 1,6–33,9, $p=0,01$). При положительной цоДНК после операции медиана ВБПБ составила 6 месяцев (95% ДИ 1,15–8,2), в группе отрицательной цоДНК достигнута не была (Рисунок 5).

Одногодичная ВБПБ в группе с положительной цоДНК составила 33%, в группе отрицательной цоДНК 75%. Двухгодичная ВБПБ в группе с положительной цоДНК составила 16%, против 75% в группе отрицательной цоДНК. При однофакторном анализе показано, что статистически значимо на ВБПБ влияло число органов с метастазами (ОР=1,6; 95% ДИ 1,15–2,3, $p=0,006$), а также статус цоДНК после операции (ОР 7,4; 95% ДИ 1,6–33,9, $p=0,01$). При проведении

многофакторного анализа наличие положительной цоДНК после операции явилось независимым предиктором прогрессирования при проведении метастазэктомий при КРР (β 2,0; ОР=6,7; 95% ДИ 1,6–33,5, $p=0,01$).

Всего из 22 пациентов, у которых известны данные по цоДНК, после проведения метастазэктомий умерло 13 человек. Из них в группах положительной и отрицательной цоДНК после операции умерло 12 и 1 пациент соответственно. При обнаружении цоДНК после операции при проведении метастазэктомий риски смерти статистически значимо возрастали (ОР 8,15; 95% ДИ 1,05–62,8, $p=0,044$) (Рисунок 6). Одногодичная общая выживаемость в группе с положительной цоДНК составила 78%, в группе отрицательной цоДНК – 100%. 2-х годичная безрецидивная выживаемость в группе с положительной цоДНК составила 50% против 85% в группе отрицательной цоДНК.

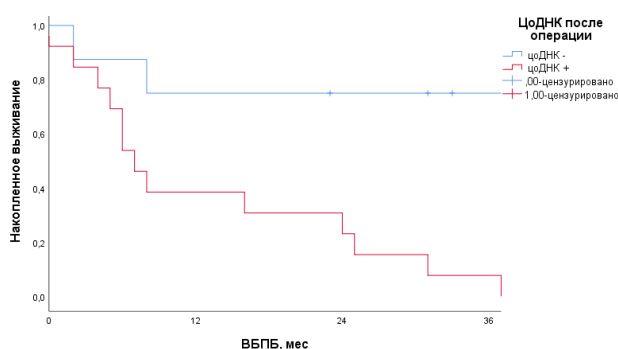


Рисунок 5 – ВБПБ пациентов в зависимости от наличия цоДНК после операции при выявлении МРЗ при проведении метастазэктомий

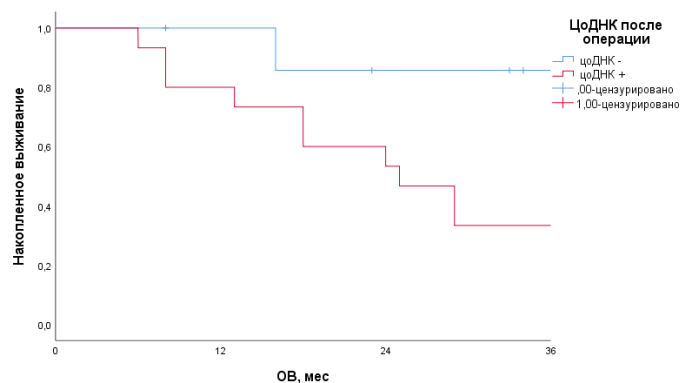


Рисунок 6 – ОБ пациентов в зависимости от наличия цоДНК после операции при выявлении МРЗ при проведении метастазэктомий

ВЫВОДЫ

1) Чувствительность теста, определяемая как доля образцов, в которых определялась хотя бы одна мутация, составила в опухолевом материале 97,82%, в цоДНК – 51,20% для всех стадий заболевания и 64,5% для метастатического КРР. Выявились сопоставимые данные встречаемости наиболее распространенных при КРР мутаций: *KRAS*, *TP53*, *BRAF*, *APC*, *SMAD4*, *PIK3CA* и *NRAS*.

2) При анализе клинико-морфологических факторов, ассоциированных с наличием цоДНК, последняя значимо чаще определялась при выявлении отдаленных метастазов ($p=0,05$) и поражении регионарных лимфоузлов ($p=0,025$).

3) Конкордантность цоДНК и тканей первичной опухоли была удовлетворительной, особенно для статуса генов *KRAS* (90,9%) и *BRAF* (75%) при метастатическом заболевании, что позволяет рассматривать ее в качестве альтернативы классического определения мутаций в опухолевом материале.

4) Обнаружение цоДНК после операции является независимым негативным прогностическим признаком в отношении прогрессирования при I–III стадиях КРР (ОР=21,07, $p<0,001$). Однолетняя ВБПБ при локализованных стадиях КРР при цоДНК (+) после операции составила 56%, а при цоДНК (-) 98%. Аналогичные данные получены при проведении метастазэктомий (ОР=6,7, $p=0,01$; однолетняя ВБПБ при цоДНК (+) после операции составила 33%, а при цоДНК (-) 75%).

5) Пациенты с цоДНК (+) после операции при I–III стадиях КРР имеют худшие результаты ВБПБ, несмотря на адъювантную химиотерапию (ОР 27,7, $p<0,001$). Пациенты с II стадией КРР без цоДНК после операции в 100% случаев не имели прогрессирования заболевания вне зависимости от проведения адъювантной ХТ, что говорит в пользу возможности отказа от проведения адъювантной химиотерапии в группе с отрицательной цоДНК при II стадии КРР.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Высокая концентрация цоДНК и высокая конкордантность мутационного профиля цоДНК и первичной опухоли при метастатическом раке толстой кишки создает в клинической практике возможность замены оценки мутационного статуса опухолевого материала на анализ цоДНК для решения вопроса о повторном назначении таргетных препаратов во второй и последующих линиях лечения. Проспективно доказана возможность использования цоДНК как маркера оценки МРЗ после хирургического лечения при I–III стадиях КРР, а также после метастазэктомий.

Проведенное исследование позволило сделать ряд практически значимых выводов. При II стадии КРР в случае отсутствия после операции цоДНК можно отказаться от проведения адъювантной ХТ. Аналогичный вывод равносителен и для пациентов после метастазэктомий – ни один из пациентов не прогрессировал при отсутствии после операции цоДНК. При выявлении цоДНК после операции при II–III стадии показано назначение адъювантной ХТ. Учитывая ранее прогрессирование у всех пациентов в случае выявления цоДНК после метастазэктомии в нашей работе, в данной ситуации возможно назначать соответствующее системное лечение.

После регистрации валидированная в нашем исследовании тест-система по выявлению цоДНК может быть использована в рутинной клинической практике. Полученные результаты и рекомендации могут быть рекомендованы к использованию для всех врачей, вовлеченных в лечение рака толстой кишки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) **Полянская, Е.М.** Оценка конкордантности мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей в крови опухолевой ДНК при колоректальном раке / Е.М. Полянская, М.Ю. Федянин, У.А. Боярских, А.А. Кечин, Е.А. Мороз, А.Н. Поляков, Н.Е. Кудашкин, Д.В. Подлужный, Е.А. Храпов, И.П. Оскоробин, Д.В. Шамовская, В.А. Алиев, З.З. Мамедли, А.А. Трякин, М.Л. Филипенко, С.А. Тюляндин // Тазовая хирургия и онкология. – 2022. – Т. 12. – №1. – С. 27–34. (журнал ВАК)

2) **Полянская, Е.М.** Прогностическое значение наличия в крови циркулирующей опухолевой ДНК как маркера минимального резидуального заболевания при колоректальном раке I–III стадии / Е.М. Полянская, М.Ю. Федянин, У.А. Боярских., А.А. Кечин, Е.А. Мороз, Е.А. Храпов, И.П. Оскоробин, Д.В. Шамовская, В.А. Алиев, З.З. Мамедли, А.А. Трякин, М.Л. Филипенко, С.А. Тюляндин // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9. – № 2. – С. 62–72. (журнал ВАК)